

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO TRANSIENTE DO GENE DA
GLICOPROTEÍNA DO VÍRUS DA RAIVA (RVGP) EM CÉLULAS DE
INSETO DA LINHAGEM *Drosophila melanogaster* S2**

Sandra Fernanda Suárez Patiño

SÃO CARLOS

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO TRANSIENTE DO GENE DA
GLICOPROTEÍNA DO VÍRUS DA RAIVA (RVGP) EM CÉLULAS DE
INSETO DA LINHAGEM *Drosophila melanogaster* S2**

Sandra Fernanda Suárez Patiño

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia para a obtenção do título
de Mestre em Biotecnologia.**

Orientadores: Prof. Dr. Cláudio Alberto Torres Suazo

Prof. Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça

Co-orientador: Prof. Dra. Soraia Attie Calil Jorge

SÃO CARLOS

2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S939ae

Suárez Patiño, Sandra Fernanda.

Avaliação da expressão transiente do gene da glicoproteína do vírus da raiva (RVGP) em células de inseto da linhagem *Drosophila melanogaster* S2 / Sandra Fernanda Suárez Patiño. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
121 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Biotecnologia. 2. *Drosophila melanogaster*. 3. Expressão transiente. 4. Glicoproteína da raiva. 5. Fosfato de cálcio. 6. Transfecção. I. Título.

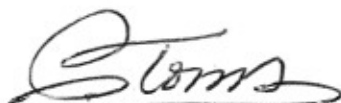
CDD: 660.6 (20^a)

Sandra Fernanda Suáres Patiño

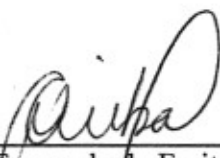
Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Aprovado em: 22/11/2011

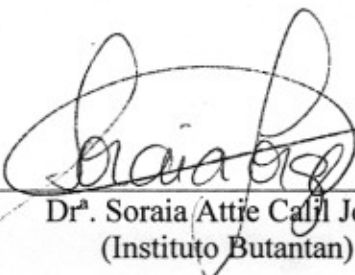
BANCA EXAMINADORA



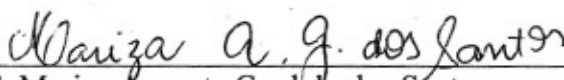
Prof. Dr. Cláudio Alberto Torres Suazo (Orientador)
(UFSCar)



Prof. Dr.ª Fernanda de Freitas Anibal
(UFSCar)



Dr.ª Soraia Attie Calif Jorge
(Instituto Butantan)



Dr.ª Mariza Augusta Gerdujo dos Santos
(Hospital das Clinicas -USP)

AGRADECIMENTOS

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

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

A meus pais: Pedro e Cecília, porque cada dia vivido é devido a eles, em cada vitória e cada derrota sinto sua mão, sua fortaleza, sua vida mesma dedicada a mim e ao que faço. Por isso, este trabalho é também deles, é o fruto do cultivo chamado descendência.

A Jackson: O caminho e o tempo compartilhados são o pilar dos nossos triunfos.

A minha irmã Yaneth: Porque sem dar conta faz que cada dia eu queira me esforçar mais para ser melhor para conseguir meus propósitos... E claro agradeço por meu futuro sobrinho.

Ao professor Cláudio pela orientação, e apoio no meu trabalho.

Ao professor Ronaldo, pelo apoio e por essa atitude positiva e vontade de ajudar sempre.

A Soraia e Renato, por estar sempre prestes a escutar e ajudar, e por todos esses conhecimentos oferecidos.

Ao Doutor Carlos Augusto Pereira, por me permitir desenvolver meu trabalho nessas instalações e por todas as contribuições feitas.

Aos amigos do LATECC: Ana Carolina, Camilo, Amanda, Thaís, Simone e Thaila, porque acredito que sem sua amizade, apoio e fundamentais contribuições no meu conhecimento, o final desta etapa não teria o mesmo significado.

Aos amigos do lab de Imunologia Viral: Ana Lia, Alexandre, Luciana, Vera, Fernanda, Marcos, Gustavo, Polyana, Mayra, Mariza, Dani, Mari... (nossa que laboratório grande), obrigada por me adotar, me brindar conhecimento, carinho e muitas palavras de apoio em momentos de dificuldade. Quando não queria olhar para atrás e tinha medo de olhar para frente, olhei para os lados e aí estavam vocês!!!

As minhas companheiras de moradia: Thati, Camila, Aline, Bet, por longas conversas da vida.

Aos meus amigos de Colômbia em São Carlos: Ana Maria, Galia, Sandra, Aymer, Abraham, Inti, Carlos, Claudia, etc, por conceder-me tantos momentos de alegria que permitiram que momentos difíceis se tornaram mais amigáveis.

A CNPq pela bolsa concedida.

Aos meus pais

Pedro e Cecilia

Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado.

Un esfuerzo total es una victoria completa.

Mahatma Gandhi

RESUMO

A raiva é uma enfermidade causada por um vírus do gênero *Lyssavirus* que afeta várias espécies de mamíferos. Esta doença apresenta um alto custo social e econômico principalmente em países em desenvolvimento. Na superfície do vírus da raiva está localizada a glicoproteína do vírus, reconhecida como antígeno capaz de conferir resposta imunológica contra a raiva, sendo, o foco de pesquisas no desenvolvimento de uma vacina recombinante. Células da linhagem *Drosophila melanogaster* S2 estavelmente transfectadas têm sido usadas na produção de muitas proteínas heterólogas e tem sido estudada para a produção da glicoproteína do vírus da raiva (RVGP) em nosso laboratório. A abordagem para a obtenção de linhagens recombinantes estáveis envolve a seleção de populações celulares altamente produtoras; sendo um processo que requer consideráveis períodos de tempo (meses), uma elevada manipulação e altos custos de produção. Neste sentido, nas últimas décadas, muitos sistemas focados na expressão de proteínas heterólogas através da expressão transiente de genes foram analisados, porque eles permitem a obtenção de quantidades consideráveis de proteína recombinante em um curto período de tempo (semanas). Para o uso da tecnologia de transfecção transiente pode ser encontrada uma variedade de métodos e agentes disponíveis, tais como eletroporação, lipídeos catiônicos, polímeros catiônicos e fosfato de cálcio. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão transiente do gene da glicoproteína do vírus da raiva (RVGP) em células de inseto da linhagem *Drosophila melanogaster* S2, avaliando os veículos de transfecção fosfato de cálcio, lipídeo catiônico (Cellfectin) e polímero catiônico (ExGen500 e JetPEI). A fim de determinar o agente de transfecção mais eficiente, foram feitos experimentos em placa de 6 poços e frasco de cultivo de 100mL, onde foram analisados a influência da densidade celular; a concentração de DNA, o volume do reagente de transfecção sobre a expressão da RVGP analisada através do método de ELISA. Quantidades de RVGP que variaram entre 50-90 ng/10⁷cel foram obtidas nos diferentes experimentos feitos em placa, sugerindo um efeito da relação DNA: agente de transfecção. A comparação entre os agentes de transfecção não mostrou diferenças significativas. Nas transfecções feitas em cultura em suspensão foi analisado o efeito de transfectar o plasmídeo para expressão de RVGP contendo ou não o sinal de secreção celular BiP. Quando foi usado o plasmídeo contendo o sinal BiP (pMTiRVGP) foram atingidas valores de RVGP de 160 ng/10⁷cel e produções volumétricas de 200 ng/mL, porém sem diferenças significativas entre os diferentes agentes de transfecção. Entretanto, foram encontradas diferenças quando foi usado o plasmídeo não contendo o sinal BiP (pMTRVGP), onde a produção de RVGP foi de 60 ng/10⁷cells nas células transfectadas com Cellfectin, ExGen500 e fosfato de cálcio, porém as células transfectadas com JetPEI obtiveram uma produção de 120 ng/10⁷cels de RVGP. Em experimento em frasco de cultivo tipo “spinner” com volume de trabalho de 60 mL, foram atingidas expressões de RVGP de 140 ng/10⁷cel para células transfectadas com JetPEI e fosfato de cálcio, sugerindo que otimizações nas condições de cultivo e transfecção ainda podem ser testadas visando aumentar a expressão da proteína recombinante em cultivos em larga escala.

Palavras chave: Células *Drosophila melanogaster* S2; expressão transiente; glicoproteína do vírus da raiva “RVGP”; fosfato de cálcio; PEI; transfecção.

ABSTRACT

Rabies is a zoonotic viral disease caused by a virus of the genus *Lyssavirus* that affects several species of mammals. Rabies remains a global public health threat that kills more than 55,000 people per year mainly in developing countries, this disease once established do not have a specific treatment. The RV envelope is composed of a glycoprotein, known as a unique antigen capable of conferring immune response against the rabies, and therefore, is the focus of research for development an efficient and safe recombinant vaccine based on this viral antigen. Cell line stably transfected *S2 Drosophila melanogaster* have been used in the production of many heterologous proteins and has been studied for the production of the rabies virus glycoprotein (RVGP) in our laboratory. This approach involves the selection of high producing cell populations; procedure that requires considerable periods of time (months), increasing management and costs of production. In this sense, in recent decades, many systems focused on the expression of heterologous proteins by transient expression of genes, were analyzed because they allow obtaining significant quantities of recombinant protein in a short period of time (weeks). For the use of transient transfection technology can be found a variety of methods and available agents, such as electroporation, cationic lipids, cationic polymers and calcium phosphate precipitated. The choice and optimization of each of them depends mainly on the cell type and protein being expressed. Thus, the objective of this study was to evaluate the transient expression of the glycoprotein gene of rabies virus (RVGP) in insect cells of *Drosophila melanogaster* S2 lineage, evaluating the vehicles transfection: calcium phosphate, cationic lipid (Cellfectin) and cationic polymer (ExGen500 and JetPEI). In order to determine the most efficient transfection agent, experiments were performed in 6 well plate and bottle of 100 mL of culture, which analyzed the influence of cell density, the concentration of DNA and transfection reagent volume on the expression of RVGP assessed by ELISA and fluorescence microscopy. Yields ranging from 50-90 ng/10⁷cel were obtained in different experiments on multiwell plate, suggesting strong effect of ratio DNA: transfection agent used. Comparison of transfection agents showed no significant differences. In transfections made in suspension culture was analyzed the effect of the plasmid (whether or not the signal of BiP cell secretion) on the expression RVGP. When we used the plasmid containing the signal BiP (pMTiRVGP) were obtained 160 ng/10⁷cel of RVGP production, and 200 ng/mL of volumetric production without significant differences between the different transfection agents. However, significant differences were found when we used the plasmid not containing the signal BiP (pMTRVGP), with the RVGP production was 60 ng/10⁷cells in cells transfected with Cellfectin, ExGen500 and calcium phosphate, except in cells transfected with JetPEI was reached a production of 120 ng/10⁷cells. In preliminary experiment bottle type "spinner" with a working volume of 60 mL were achieved expressions of 140 ng/10⁷cel of RVGP in cells transfected with JetPEI and calcium phosphate. This suggests that optimization of culture conditions and transfection are possible to increase recombinant protein expression in cultured on a large scale.

Key words: *Drosophila melanogaster* S2 cells; rabies virus glycoprotein "RVGP"; calcium phosphate; PEI; transfection.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Esquema do vírus da raiva e suas proteínas (SCHNELL et al., 2010)...	20
FIGURA 2	Mapa dos vetores de expressão pMtEGFP (proteína repórter fluorescente); pMTRVGP e pMTiRVGP (expressão da glicoproteína do vírus da raiva).....	46
FIGURA 3	Resultados experimento 1p: Porcentagem de células S2 fluorescentes transfectadas com Cellfectin e ExGen500.....	59
FIGURA 4	Resultados experimento 1p: Porcentagem de células S2 fluorescentes transfectadas pelo método de precipitação com fosfato de cálcio.....	60
FIGURA 5	Microscopia de fluorescência de células S2 transfectadas com Cellfectin e ExGen500.....	62
FIGURA 6	Resultados experimento 2p: Efeito do uso do Soro Fetal Bovino (SFB) na transfecção transiente pelo método de precipitação com fosfato de cálcio.....	63
FIGURA 7	Microscopia de fluorescência de células S2 transfectadas pelo método de precipitação com fosfato de cálcio.....	64
FIGURA 8	Resultados experimento 3p: Efeito dos diferentes parâmetros para padronização da expressão transiente da RVGP.....	66
FIGURA 9	Resultados experimento 4p: Efeito da concentração de DNA na expressão transiente da RVGP	67
FIGURA 10	Resultados experimento 5p: Otimização da expressão transiente de RVGP com Fosfato de cálcio.....	69
FIGURA 11	Resultados experimento 1s: Expressão transiente da RVGP usando o plasmídeo pMTiRVGP em cultivos em suspensão.....	72
FIGURA 12	Microscopia de fluorescência de células S2 transfectadas com pMTiRVGP.....	73
FIGURA 13	Análise estatística de TUKEY das médias de expressão de RVGP do experimento 1s.....	73
FIGURA 14	Consumo de aminoácidos do experimento 1s.....	74
FIGURA 15	Resultados experimento 2s: Expressão transiente da RVGP usando o plasmídeo pMTRVGP em cultivos em	78

	suspensão.....	
FIGURA 16	Microscopia de fluorescência de células S2 transfectadas com pMTRVGP.....	79
FIGURA 17	Análise estatística de TUKEY das médias de expressão de RVGP do experimento 2s.....	79
FIGURA 18	Resultados experimento 3s: Expressão transiente da RVGP usando o plasmídeo pMTRVGP em cultivos em suspensão.....	82
FIGURA 19	Microscopia de fluorescência de células S2 transfectadas com pMTRVGP.....	83
FIGURA 20	Consumo de aminoácidos do experimento 3s.....	84
FIGURA 21	Expressão Transiente de RVGP em Frasco tipo “Spinner”.....	88
FIGURA 22	Consumo de aminoácidos experimento Frasco tipo “Spinner”.....	89
FIGURA A1	Curva padrão de ELISA.....	115

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Resumo das principais características da expressão transiente e estável (BOLLATI e COMINI, 2007).....	25
TABELA 2	Produtos comerciais em desenvolvimento usando <i>Spodoptera frugiperda Sf9</i> (GRANADOS et al., 2007).....	28
TABELA 3	Produtos comerciais em desenvolvimento usando <i>Trichoplusia ni</i> “High Five cells” (GRANADOS et al., 2007).....	28
TABELA 4	Expressão da glicoproteína da raiva (RVGP) em diferentes hospedeiros celulares (Adaptado de SWIECH, 2007).....	35
TABELA 5	Agentes de transfecção usados.....	49
TABELA A1	Valores de DO associados a cada valor de RVGP.....	115
TABELA B1	Porcentagem de células fluorescentes obtidos no FACS do experimento 1p.....	116
TABELA B2	Porcentagem de células fluorescentes obtidos no FACS do experimento 2p.....	117
TABELA C1	Valores de RVGP do experimento 3p.....	118
TABELA C2	Valores de RVGP do experimento 4p.....	118
TABELA C3	Valores de RVGP do experimento 5p.....	118
TABELA D1	Valores de RVGP do experimento 1s.....	119
TABELA D2	Valores de RVGP volumétrica do experimento 1s.....	119
TABELA D3	Valores de RVGP do experimento 2s.....	119
TABELA D4	Valores de RVGP volumétrica do experimento 2s.....	119
TABELA D5	Valores de RVGP do experimento 3s.....	120
TABELA D6	Valores de RVGP volumétrica do experimento 3s.....	120
TABELA D7	Valores de RVGP do experimento em “spinner”.....	120
TABELA D8	Valores de RVGP volumétrica do experimento em “spinner”.....	120

LISTA DE ABREVIATURAS

BHK	<i>Baby Hamster Kidney cells</i>
BiP	<i>Immunoglobulin heavy chain binding protein</i>
BSA	Albumina sérica bovina
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
cel/mL	Células por mililitro
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary cells</i>
CMV	Citomegalovirus
CuSO ₄	Sulfato de Cobre
DH5α	Cepa da bactéria <i>Escherichia coli</i>
DMSO	Dimetilsulfoxido
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EGT	Expressão transiente de gene
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney cells</i>
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IgG	Imunoglobulina G
kDa	kilodalton
LB	Meio de cultura de bactérias Luria Bertani
NP-40	Detergente nonidet p-40
OMS	Organização mundial da saúde
OPD	<i>o-Phenylenediamine</i>
pAc5	Promotor de actina 5c
PBS	Tampão salina
PEI	Polietilenoimina
pMt	Promotor da proteína metalotioneína
RVGP	Glicoproteína do vírus da raiva (<i>Rabies Virus Glycoprotein</i>)
Sf9	<i>Sporodoptera frugiperda</i>
SFB	Soro fetal bovino
SFV	Vírus Semliki Forest

SV40	Vírus de Símio 40
TE	Tris-EDTA
VERO	<i>African green monkey kidney cells</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 A Raiva e o Virus da Raiva	18
2.2 Proteínas Recombinantes.....	21
2.3 Expressão da glicoproteína recombinante do virus da raiva (RVGP).....	23
2.4 Sistemas de Expressão.....	26
2.4.1 Expressão em Células de inseto	27
2.4.1.1 Transfecção em Células de Inseto	31
2.4 Expressão de Proteínas Recombinantes em Células Animais	32
2.5.1 Expressão estável.....	33
2.5.2 Expressão transiente	34
2.5 Considerações sobre a revisão bibliográfica	41
3 OBJETIVOS	42
3.1 Objetivo Geral.....	42
3.2 Objetivos específicos.....	42
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 Cultivo de Bactérias	43
4.1.1 Meios para cultivo de bactérias	43
4.1.2 Preparação de bactérias competentes.....	44
4.1.3 Transformação de bactérias competentes	45
4.2 Extração de DNA plasmidial	45
4.3 Vetores genéticos (plasmídeos)	45
4.4 Cultivo de células Schneider S2 (S2).....	46
4.4.1 Manutenção das células	47
4.4.2 Congelamento das células	47
4.4.3 Descongelamento das células	47
4.4.4 Análise de densidade e viabilidade celular	47

4.5 Transfecção.....	48
4.5.1 Co-precipitação com fosfato de Cálcio.....	50
4.5.2 Polietilenoimina (PEI).....	51
4.5.3 Cellfectin.....	53
4.6 Detecção e quantificação da proteína EGFP.....	54
4.6.1 Microscopia de fluorescência.....	54
4.6.2 Citometria de fluxo.....	54
4.7 Detecção e quantificação da proteína RVGP.....	55
4.7.1 Imunofluorescência indireta.....	55
4.7.2 ELISA.....	55
4.8 Análise de resultados.....	57
5 RESULTADOS.....	58
5.1 Expressão Transiente de EGFP em placa.....	58
5.1.1 Efeito dos diferentes parâmetros para padronização da transfecção transiente da EGFP -Experimento 1p.....	58
5.1.2 Efeito do uso do Soro Fetal Bovino (SFB) na transfecção pelo método de precipitação com fosfato de cálcio - Experimento 2p.....	62
5.2 Expressão Transiente de RVGP em Placa.....	65
5.2.1 Efeito dos diferentes parâmetros para padronização da transfecção transiente da RVGP - Experimento 3p.....	65
5.2.2 Efeito da concentração de DNA na transfecção transiente de RVGP- Experimento 4p.....	66
5.2.3 Otimização da transfecção transiente de RVGP com Fosfato de cálcio- Experimento 5p.....	67
5.3 Expressão Transiente de RVGP em Frasco Agitado.....	69
5.3.1 Expressão transiente de RVGP usando o plasmídeo pMTiRVGP- Experimento 1s... 70	
5.3.2 Expressão transiente de RVGP usando o plasmídeo pMTRVGP- Experimento 2s.... 74	
5.3.3 Expressão transiente de RVGP usando o plasmídeo pMTiRVGP- Experimento 3s... 80	
5.4 Expressão Transiente de RVGP em Frasco tipo “Spinner”.....	84
6 DISCUSSÃO.....	89
7 CONCLUSÕES.....	101

REFERÊNCIAS	104
APÊNDICES	114
Apêndice A- Curva padrão do teste de ELISA – Quantificação de RVGP	115
Apêndice B- Tabelas com os valores de porcentagem de células fluorescentes obtidos nos experimentos 1p e 2p	116
Apêndice C- Tabelas com os valores de RVGP dos experimentos 3p, 4p e 5p.....	118
Apêndice D- Tabelas com os valores de RVGP e volumétrica dos experimentos 1s, 2s, 3s e experimento em frasco "spinner"	119

1 INTRODUÇÃO

A Raiva é uma doença mundialmente reconhecida, e tem sido parte da história da humanidade por vários milênios. O vírus da raiva possui uma das maiores taxas de mortalidade entre os patógenos virais humanos até hoje conhecidos. Indivíduos que desenvolvem a sintomatologia ocasionada por infecção com este vírus na maioria dos casos vêm a óbito, sendo a causa de morte de 50.000 pessoas cada ano (OMS, 2006; ERTL, 2009). Dentre os poucos sobreviventes, uma parte pode sofrer danos cerebrais seguidos à infecção, e o tratamento baseado na indução do coma, nem sempre é eficiente. O elevado investimento que é realizado na tentativa de controlar esta doença não tem sido suficiente, e esta enfermidade é reconhecida ainda hoje, como uma doença negligenciada (ERTL, 2009).

Os avanços em virologia molecular permitiram que fosse possível obter vacinas mais seguras a partir de vírus atenuados, e obter a purificação de antígenos virais a partir de sistemas de expressão altamente eficientes. As vacinas baseadas em subunidades do vírus têm sido testadas em modelos experimentais, onde mostraram prover proteção frente ao desafio viral (WOJSZYK et al., 1998; YOKOMIZO et al., 2007; RAMYA et al, 2011). As vacinas recombinantes baseadas no uso de antígenos virais oferecem num mesmo produto biológico a eficácia das vacinas convencionais e a segurança de vacinas inativadas.

A raiva é causada por um vírus RNA da família *Rhabdoviridae* e gênero *Lyssavirus* (GAUDIN et al., 1992). No envelope deste vírus é encontrada a proteína G (glicoproteína), uma proteína N-glicosilada classe I, que se encontra ancorada na membrana viral através do domínio transmembrânico. Esta proteína também possui um ectodomínio que por sua vez se encontra organizado como um trímero (3×65 kDa), essa conformação trimérica é requerida para o reconhecimento e ligação do vírus nas células infectadas (SISSOËFF et al., 2005). A glicoproteína do vírus da raiva (RVGP) também tem sido reconhecida como o principal antígeno responsável pela indução da formação de anticorpos neutralizantes do vírus e pela proteção dos animais contra o desafio subsequente com vírus da raiva (WIKTOR et al., 1973; YOKOMIZO et al., 2007; RAMYA et al, 2011), tornando-a uma forte candidata na produção de uma vacina recombinante e sendo de grande interesse a sua produção em sistemas de expressão heterólogos (ERTL, 2009). Deste modo, sendo esta uma proteína complexa, sua produção deve ser feita em sistemas de expressão eucariotos que garantissem sua correta forma antigênica a fim de induzir uma adequada resposta imunológica.

Diferentes sistemas de expressão já foram avaliados para a expressão da glicoproteína do vírus da raiva (RVGP), incluindo leveduras (SAKAMOTO et al., 1999), células de mamíferos BHK-21 (BENMAAMAR, 2009), células de tabaco (ASHRAF et al., 2005), células de inseto Sf9 com baculovírus (RAMYA et al., 2011). Recentes trabalhos (YOKOMIZO et al., 2007; SWIECH, 2008; GALESSI et al., 2008) mostraram potencialidades interessantes das células S2 em cultivo utilizando sistema de expressão constitutivo para produção de glicoproteína do vírus da raiva (RVGP). O trabalho de Yokomizo et al., 2007 inclui o teste “*in vivo*” de desafio viral em camundongos imunizados com a proteína produzida. LEMOS et al., 2009, mostrou um sistema de expressão de RVGP indutível por células S2 e seus dados demonstram um nível de expressão satisfatório e contínuo ao longo do cultivo. O enfoque utilizado nesses trabalhos para a expressão em células S2 foi a criação de uma plataforma de expressão estável através da qual várias condições de cultivo foram aprimoradas, aumentando significativamente a produção da RVGP (LEMOS et al., 2009; VENTINI et al., 2010). Porém, grandes inconvenientes das tecnologias de expressão estável são as altas exigências de tempo, recursos e custos envolvidos na geração de uma linhagem celular altamente produtora (WURM, 2004).

A produção comercial de proteínas recombinantes requer dois principais conceitos: biologia molecular e engenharia de processos. Os conhecimentos da biologia molecular permitem o desenvolvimento de células com uma expressão de genes de interesse eficiente para a produção em grande escala. O princípio da engenharia de processos estuda diversas condições de cultivo, tanto para permitir culturas celulares em alta densidade quanto para aumentar a produção de um determinado produto. Por tanto, estes dois enfoques devem ser juntados de forma eficiente na obtenção de uma plataforma de expressão adequada.

Neste sentido, a expressão transiente de genes ressurgiu como uma importante tecnologia para uma rápida produção de quantidades razoáveis de proteína recombinante, pois diferente da estável, ela envolve a produção de proteína recombinante num tempo curto, por até 10 dias pós-transfecção pulando a complexa e demorada fase de seleção genética dos clones produtores (necessária na tecnologia de expressão estável) (GEISSE, 2009). O sucesso deste sistema depende então da associação eficiente das ferramentas de biologia molecular (o tipo de vetor de expressão do vetor e do método de transferência do DNA) e das ferramentas de bioprocessos (a formulação do meio, a linhagem celular, as condições do cultivo), para a criação de uma plataforma de expressão transiente em larga escala. (PHAM et al., 2006).

O método ou veículo de transfecção utilizado tem mostrado ser um fator determinante no sucesso de um sistema de expressão transiente (CHENUET et al., 2008). Há uma variedade de métodos de transfecção não virais que incluem co-precipitação com fosfato de cálcio, eletroporação, polifecção e lipofecção. Dentre estes métodos o que tem apresentado melhores resultados tem sido o método de lipofecção, cujos reagentes são bastante variados e encontrados comercialmente, porém, tem como inconveniente o alto custo, que faz dele um produto inviável para processos em larga escala. Os métodos de co-precipitação com fosfato de cálcio e polifecção, são objetivo de muitas pesquisas, devido a seus baixos custos e relativa simplicidade (WURM et al., 1999; PHAM et al., 2006). Neste sentido, pesquisas têm sido dirigidas para células de mamíferos, principalmente HEK293 e CHO, no entanto, para células de inseto não se tem tanta informação sobre o uso deste tipo de tecnologia (GEISSE, 2009).

O processo para a escolha de uma técnica ocorre com o estudo de diferentes fatores que podem influenciar importantemente os níveis de expressão e que precisam ser padronizados durante a implementação da tecnologia de expressão transiente de gene. Esta padronização pode ser feita usando proteínas que têm sido chamadas de repórter, porque, facilitam uma monitorização rápida dos níveis do processo. Neste sentido, a proteína EGFP (*Green Fluorescent Protein*), tem sido amplamente usada como ferramenta de marcação repórter na identificação de condições importantes de transfecção (BRILLET et al., 2008).

Trabalhos referentes ao uso da tecnologia de expressão transiente de gene em células de inseto são escassos, sendo por tanto uma estratégia nova na produção da proteína viral RVGP, proporcionando novos dados de desempenho das células S2 como sistema de expressão. Deste modo, neste trabalho foi avaliado o comportamento da expressão transiente de gene em células *Drosophila melanogaster* S2 crescendo em meio SF900II, expressando o gene repórter da EGFP e a glicoproteína do vírus da raiva. Para isso foram analisadas as tecnologias de transfecção bioquímicas baseadas em precipitação com fosfato de cálcio; transfecção com lipídeo catiônico usando o kit comercial Cellfectin, desenvolvido para células de inseto e por último a transfecção através do polímero catiônico PEI linear de 22 kDa usando os kits comerciais ExGen500 e JetPEI. Neste sentido, primeiro foi avaliada a expressão transiente da proteína EGFP (como repórter) em placa de cultura, depois foi analisada a expressão transiente da RVGP em placa de cultura, e finalmente foi analisada a expressão em cultivos agitados em suspensão quando foi usado um plasmídeo contendo ou não o sinal BiP para secreção celular, finalizando com um cultivo preliminar em frasco de cultivo tipo “spinner”.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Raiva e o Virus da Raiva

A raiva é uma enfermidade mortal difundida mundialmente, que por séculos tem afetado a humanidade, e representa um sério problema de saúde pública em países em desenvolvimento (FRAZATTI-GALLINA et al., 2004). Ela apresenta um alto custo social com uma letalidade de 100% (recentemente 2 casos humanos de sobrevivência à raiva foram relatados) (Ministério da Saúde, 2009). Animais domésticos, principalmente cachorros, gatos e agora com maior seriedade animais silvestres são importantes reservatórios do vírus e transmitem a doença para humanos e animais de grande interesse econômico, como gado, cavalos, entre outros (SVS, 2009). A OMS notificou que esta doença provoca cerca de 55.000 mortes por ano no mundo, principalmente na África e na Ásia (OMS, 2006), no Brasil, de 1988 a 1997 foram reportados 452 mortes humanas por raiva, significando em 342.830 pessoas expostas a animais suspeitos, dado que para 2005 foi de 430.553 pessoas (SVS, 2007). Além disto, as campanhas de vacinação e de prevenção contra a raiva geram altos custos econômicos. Esta doença não tem um tratamento específico, e sua fácil propagação em animais silvestres dificulta a sua eliminação através da vacinação.

A vacina para tentar controlar essa doença tem evoluído desde a primeira tentativa feita por Pasteur no ano 1885, principalmente em relação a sua imunogenicidade e segurança. Ao longo dessa evolução foram desenvolvidas três tipos de vacinas: de primeira, segunda e terceira geração. As vacinas de primeira geração são produzidas utilizando substrato do tecido nervoso do animal doente para obtenção da massa viral, apresentando sérias reações adversas como meningoencefalite, meningoencefalomielite e paralisia, devido à produção de anticorpos frente à mielina e outras substâncias do tecido nervoso presentes na vacina (PÉREZ e PAOLAZZI, 1997; FRAZATTI-GALLINA et al., 2004).

As vacinas chamadas de segunda geração (usadas atualmente) consistem de um vírus inativado após a propagação em ovos embrionados ou em cultura de células (cultivo primário de células de mamíferos, fibroblastos humanos diplóides, células Vero) (MENDONÇA et al., 1993). Estas vacinas, embora sejam mais seguras, ainda são baseadas na atenuação do vírus, razão pela qual ainda tem alto risco de apresentar reações adversas no organismo a ser imunizado. Também apresentam alto risco na etapa de produção devido à manipulação de grandes quantidades de material infeccioso (COSTA et al., 2000).

As vacinas de terceira geração estão sendo utilizadas na área veterinária e incluem as vacinas recombinantes. As vacinas recombinantes tendem a não causar patogenicidade residual causada pela raiva, porque elas contêm apenas produtos gênicos não virulentos. Atualmente as vacinas recombinantes existentes são usadas na vacinação oral de raposas. Tomando como referência a severidade desta doença e sua alta incidência em países em desenvolvimento, a procura por novas vacinas é justificada (ERTL, 2009).

No Brasil existe demanda de grandes quantidades da vacina anti-rábica, devido à grande população humana e animal, principalmente caninos e bovinos. Além disso, o Brasil exporta esta tecnologia para alguns países da América do Sul. A produção desta vacina encontra-se principalmente em centros de pesquisa como o Instituto Butantan que tem a seu cargo a vacina humana e o Instituto de Tecnologia do Paraná (Tecpar) que é o maior produtor da vacina para uso veterinário, com uma produção anual de mais de 30 milhões de doses distribuídas pelo Programa Nacional de Profilaxia da Raiva, do Ministério de Saúde (VOSS, 2008). Os dois institutos produzem a vacina a partir de cultura de células Vero (Rim de macaco verde africano), mantendo um alto padrão tecnológico de produção (MENDONÇA et al., 1993). Apesar desse panorama favorável, o advento de novas tecnologias torna necessária a busca de alternativas de produção mais eficientes e baixo custo da vacina anti-rábica.

A raiva é causada por um vírus do gênero *Lyssavirus* e família *Rhabdoviridae* que afeta o sistema nervoso central. O vírus contém uma única fita de RNA de polaridade negativa, linear e não segmentado, de cerca de 12kb (*GenBank: M13215*). Seu genoma foi completamente sequenciado (TORDO et al., 1986; 1988), e codifica para cinco proteínas: uma nucleoproteína (N), uma fosfoproteína (NS), uma RNA polimerase (L), a proteína de matriz (M) e a glicoproteína de superfície (G) ou RVGP (do inglês: *rabies virus glycoprotein*) como será chamada neste trabalho. O complexo ribonucléico conhecido como RNP é formado pela união das proteínas N, NS e L. O envoltório viral é uma membrana que circunda a partícula viral, sendo adquirida durante o processo de brotamento do vírus a partir da membrana celular (YANG et al., 1998).

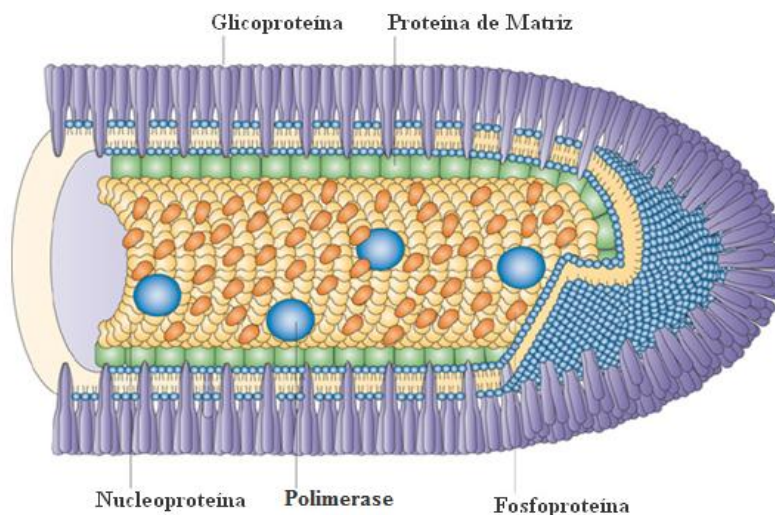


Figura 1: Esquema do vírus da raiva e suas proteínas (SCHNELL, 2010).

A glicoproteína do vírus da raiva (RVGP) está presente no envelope viral na quantidade aproximada de 1200 moléculas na forma de 400 espículas triméricas (formadas por monômeros de 65 kDa) responsáveis pela adesão do vírus aos receptores da célula hospedeira (GAUDIN et al., 1992). É o elemento responsável pela indução de anticorpos neutralizantes no organismo exposto ao vírus da raiva (PERRIN et al., 1985).

A glicoproteína do vírus da raiva é a única proteína exposta na superfície da partícula viral e é mediadora na adesão aos receptores celulares e também na entrada na célula hospedeira. A estrutura da glicoproteína, uma proteína transmembrana do tipo 1, consiste em um domínio citoplasmático, um domínio transmembrânico e um ectodomínio exposto como trímeros na superfície do vírus (GUPTA et al., 2005). O peso molecular da glicoproteína na forma monomérica é de 65 kDa e na forma trimérica é de 195 kDa

A RVGP é composta por 524 aminoácidos. Os primeiros 19 aminoácidos do N-terminal correspondem ao peptídeo sinal e estão ausentes na proteína madura, os demais estão organizados em três domínios: ectodomínio N-terminal glicosilado (aminoácidos de 1 a 439), um domínio hidrofóbico transmembranar (aminoácidos 440 a 461) e o domínio hidrofílico citoplasmático carboxiterminal (aminoácidos de 462 a 524) (GAUDIN et al., 1999). O ectodomínio da RVGP possui 8 sítios antigênicos estabelecidos (I – VI, “a” e G1). Desses, os sítios II e III, demonstraram possuir a maior representação de epitopos para anticorpos neutralizantes (97%), sendo, portanto, os de maior interesse para o estudo do desenvolvimento de resposta imune contra essa molécula (BENMANSOUR et al., 1991).

O sítio antigênico III está presente exclusivamente na forma trimérica da proteína, apontada como essencial para a ligação da mesma aos receptores celulares. Essa ligação é produzida através de uma interação hidrofóbica do vírus com a membrana da célula, mediante a interação de um grande número de moléculas de RVGP em um ambiente de pH baixo. A RVGP apresenta três estados conformacionais possíveis e intercambiáveis: Um estado inativo necessário para seu transporte pelo complexo de Golgi, um estado nativo hidrofóbico, presente no vírus circulante e um estado ativo presente no pH ligeiramente ácido a que é exposto logo após a adesão à célula hospedeira e internalização mediada por endocitose, o que leva à fusão do vírus com a membrana do endossomo (GAUDIN et al., 1991; GAUDIN et al., 1999).

A via de síntese da RVGP pela célula hospedeira começa pela tradução ribossomal associada ao retículo, seguindo uma translocação da proteína pelas cisternas desse retículo endoplasmático rugoso (RER) estimulada pelo segmento sinal amino terminal. Durante esse evento iniciam-se a formação dos trímeros e as modificações pós-traducionais da proteína, como a glicosilação inicial, levando finalmente à formação das vesículas do complexo de Golgi (GAUDIN *et al.*, 1991). Neste, ocorre a glicosilação terminal com hidrólise parcial da fração glicídica e a adição de novos açúcares em um ou dois dos seus três potenciais sítios de ligação N-link para oligossacarídeos (DIETZSCHOLD, 1977), originando assim a proteína específica estrutural e funcionalmente completa. Além da glicosilação, a RVGP sofre uma acetilação durante seu transporte para o Complexo de Golgi e uma palmitolação em uma cisteína situada ao lado do carbono terminal da sua região transmembrana (GAUDIN et al., 1992).

2.2 Proteínas Recombinantes

Desde a década de 1970, os avanços na biotecnologia têm permitido a síntese de proteínas a partir da técnica do DNA recombinante usando sistemas de expressão, tanto em células procarióticas como eucarióticas. Essas proteínas são geralmente chamadas de "recombinantes" (rec-r ou r-proteínas), a fim de distingui-las das proteínas endógenas, demonstrando que elas são produzidas a partir da expressão de genes heterólogos (WULHFARD, 2009).

A produção de proteínas recombinantes em grande escala já abrange os substitutos de hormônios ou mediadores intercelulares humanos e proteínas virais potencialmente usadas na vacinação ou imunomodulação em humanos e animais. A produção de proteínas recombinantes heterólogas envolve uma série de passos, iniciando-se com a identificação e caracterização genética da proteína e das suas propriedades bioquímicas, e a definição dos requisitos estruturais para a sua atividade funcional, como as modificações pós-traducionais, entre elas a glicosilação, a formação de heterodímeros, etc. A produção propriamente dita envolve a escolha do vetor de expressão e das células, em função da complexidade de processamento molecular necessário para a obtenção da proteína funcional, o aperfeiçoamento do bioprocessamento de produção e a separação, purificação e preparo para o uso da proteína (BOROJEVICK, 2006).

A primeira r-proteína aprovada para uso humano foi a insulina produzida em *E. coli* pela companhia Genentech que posteriormente foi adquirida por Eli Lilly (Indianápolis, EUA) em 1984. Entretanto, a primeira r-proteína produzida em um sistema eucarioto foi o ativador de plasminogênio tecidual (tPA) em células de ovário de hamster chinês (CHO) também pela Genentech em 1986. Em 2007 havia mais de 170 produtos recombinantes aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) órgão regulador destes produtos nos EUA, mas este número deverá aumentar nos próximos anos, considerando que em 2006 cerca de 5.000 produtos de proteínas se encontravam em ensaios pré-clínicos e clínicos (BUTTLER, 2005).

A produção de proteínas recombinantes pela indústria biofarmacêutica atendeu um mercado global de US\$ 99 bilhões em 2009 (WALSH, 2010). O crescimento rápido desse setor é impulsionado pela taxa de sucesso relativamente alta, de proteínas recombinantes usadas como drogas nos ensaios clínicos. Prevê-se que até 2015 os biofármacos constituirão pelo menos 30% do mercado total farmacêutico (O'CALLAGHAN e JAMES, 2008).

As tecnologias para preparação de produtos virais, como antígenos e vacinas em culturas celulares, vêm sendo desenvolvidas há alguns anos com bastante sucesso, sendo tecnologias que permitem uma produção em larga escala e com alto grau de controle e reprodutibilidade (IVEY-HOYLE, 1991). No entanto, o número de formulações pertencentes a vacinas, baseadas ou contendo uma proteína recombinante é atualmente limitado. O desenho de vacinas potenciais e estratégias de diagnósticos têm aberto um longo caminho para o uso extenso de antígenos recombinantes no mercado farmacêutico (SODOYER, 2004).

2.3 Expressão da glicoproteína recombinante do vírus da raiva (RVGP)

Na atualidade, o grande interesse na melhora da tecnologia de produção de vacinas está dirigido ao uso de sistemas de expressão de proteínas heterólogas, através da tecnologia de DNA recombinante. Neste sentido, a vacina é baseada em proteínas recombinantes e não na partícula viral, fundamentada no fato de que apenas uma simples proteína viral, no caso do vírus da raiva a proteína G, seja suficiente para produzir resposta imune (SAKAMOTO et al., 1999). Assim, as vacinas recombinantes oferecem num mesmo produto biológico a eficácia das vacinas convencionais e a segurança de vacinas inativadas.

A RVGP tem sido reconhecida como um antígeno capaz de induzir anticorpos neutralizantes do vírus, conferindo imunidade protetora contra raiva, resultando no interesse de produzi-la nos mais diversos sistemas de expressão conhecidos. Por esta razão a expressão do gene da RVGP tem sido estudada em diversos sistemas de expressão: células de inseto infectadas com baculovírus recombinante, em leveduras, plantas transgênicas, entre outros. Na Tabela 3.5 pode ser encontrado um resumo com alguns dos sistemas de expressão que têm sido usados para expressão da RVGP.

A proteína expressa em bactérias falhou na proteção de camundongos após desafio, provavelmente porque procaríotos não são capazes de realizar adequadamente a glicosilação de proteínas (modificações pós-traducionais) que seriam fundamentais para a antigenicidade da RVGP (YELVERTON, 1983). Neste sentido, sistemas de expressão em células de mamíferos também foram testados. Morimoto et al. (1992), construíram um vetor derivado de retrovírus contendo o gene da RVGP. Esse vetor permitiu a expressão de RVGP em células de neuroblastoma (NA) e células de rim de hamster (BHK-21). A proteína produzida foi corretamente glicosilada apenas em células BHK-21, sugerindo que as alterações pós-traducionais dependem também das condições celulares sob as quais a proteína é metabolizada. Mochizuki et al. (1998), utilizaram HIV-1 defeitivo e também observaram produção de RVGP em células humanas HEK293-T. Em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, Klepfer et al. (1993), expressaram a proteína G do vírus da raiva utilizando um vetor de expressão sob controle de um promotor indutível (metalotioneína) e um promotor constitutivo (triose desidrogenase). A glicoproteína foi glicosilada e encontrou-se associada à membrana das leveduras, porém extratos de levedura contendo a proteína G protegeram animais em desafio intramuscular, mas não no desafio intracerebral com camundongos.

Estudos da expressão da RVGP em células de inseto *Spodoptera frugiperda* (Sf9) utilizando um baculovírus recombinante foram realizados. Prehaud et al. (1989), demonstraram através da construção de um baculovírus recombinante com o gene da RVGP sob comando do promotor da poliedrina que a RVGP expressa manteve as características estruturais e imunogênicas nessas culturas. Tuchiya et al. (1992), verificaram que a RVGP produzida por baculovírus recombinante é capaz de se fundir formando complexos em condições de baixo pH.

Tabela 1: Expressão da glicoproteína da raiva (RVGP) em diferentes hospedeiros celulares (Adaptado de SWIECH, 2007).

Sistema de Expressão	Célula	Produção de RVGP	Conclusões	Referência
Planta	<i>Nicotiana tabaccum</i>	0,001-0,38% do total protéico das folhas	100% de sobrevivência após desafio com o vírus da raiva.	Ashraf et al., 2005.
Cel. Mamíferos (Transfecção estável)	BHK-21	n.d.	Mudança conformacional da GPV em função do pH alterando o reconhecimento pelo anticorpo.	Kankanange et al., 2003.
Bactérias	<i>Escherichia coli</i>	n.d.	A proteína expressa falhou na proteção de camundongos após desafio	Yelverton, 1983.
Leveduras	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30-40 ng.mL ⁻¹	RVGP não foi corretamente produzida, com baixa imunogenicidade.	Sakamoto et al., 1999.
Cel. Mamíferos (Infecção vírus)	BHK-21	n.d.	Expressão apenas do ectodomínio da RVGP leva a mudanças conformacionais e formação de monômeros.	Maillard e Gaudin, 2002.
Cel. Mamíferos (Transfecção estável)	BHK-21	10-50% de células fluorescentes	Adição de butirato de sódio e propianato de sódio auxiliam na correta maturação da proteína e aumentam a expressão.	Sakai et al., 2004.
Cel. Mamíferos (Transfecção estável)	CHO-K1	n.d.	Expressão satisfatória de RVGP secretada com adequada imunogenicidade.	Wojszyk et al., 1998.
Cel. Inseto Baculovírus	Sf9	n.d.	RVGP pode ser produzida em este sistema com alta imunogenicidade.	Drings et al., 1999; Tuchiya et al., 1992; Ramya et al, 2011.
Cel. Inseto (transfecção estável)	S2 (AcRVGP2K)	300ng.mL ⁻¹	RVGP pode ser expressa em células S2 com correta atividade biológica.	Yokomizo et al., 2007.
Cel. Inseto (transfecção estável)	S2 (AcRVGP2K)	136ng.mL ⁻¹	Estratégias utilizadas para controlar o crescimento celular propiciaram aumento na produção de RVGP.	Swiech et al, 2007.
Cel. Inseto (transfecção estável)	S2 (PMtRVGPHy)	Até 5,5µg/10 ⁷ cel	Estratégias usando diferentes vetores, e uma nova pressão seletiva.	Lemos et al, 2009.
Cel. Inseto (transfecção estável)	S2 (AcRVGP2K)	300–400 ng/10 ⁷ cel	Cultivo em biorreator de 2L: Biostat MD System	Galessi et al, 2008
Cel. Inseto (transfecção estável)	S2 (PMtRVGPHy)	1,5-2µg/10 ⁷ cel	Cultivo em biorreator de 1L: BioFlo 110	Ventini et al, 2010.
SFV Semliki Forest Virus	BHK-21	1,8-2,2µg/10 ⁶ cel	Sistema altamente produtivo, estável e reproduzível.	Benmaamar et al, 2009

n.d.- não definido

Estes experimentos conseguiram resultados variáveis, o qual não é surpreendente considerando a complexidade estrutural da glicoproteína do vírus da raiva (ERTL, 2009).

2.4 Sistemas de Expressão

A seleção de um sistema de expressão de proteínas recombinantes adequado é uma das etapas mais importantes no desenvolvimento de um bioprocesso, sendo que um bom sistema de expressão pode levar a uma boa funcionalidade do produto, altos rendimentos de produção e purificação com baixos custos. No entanto, esta seleção está frequentemente baseada em fatores complexos, como por exemplo: propósito de utilização da proteína recombinante (farmacêutico, enzima industrial, alimentação humana ou animal), a funcionalidade da proteína expressa, propriedades físico-químicas da proteína, níveis de expressão requeridos, modificações pós traducionais desejadas (glicosilação, formações de ligações dissulfeto, entre outras), secreção, enovelamento, velocidade de crescimento da célula, rendimento celular e assim por diante (CHA et al., 2005).

O desenvolvimento de diferentes sistemas de expressão de proteínas recombinantes compreende hoje uma incrível variedade de organismos, incluindo algas (unicelulares) e plantas completas, diversas leveduras, novas bactérias, células de inseto, células de mamíferos, células tronco, entre outros (LANGER, 2009).

Com o incremento da informação sobre a maquinaria e regulação da expressão gênica e o desenvolvimento da biotecnologia, a maioria dos sistemas de expressão tem sido melhorada funcionalmente, e novos sistemas têm aparecido. Sistemas de expressão em células eucariotas são candidatos ideais para a análise funcional de proteínas ou preparação de vacinas que compreendem proteínas complexas com modificações pós-traducionais. Em contraste, sistemas de expressão procariotos podem produzir antígenos artificiais para diagnóstico ou análise estrutural de proteínas que não requerem modificações pós-traducionais (YIN et al., 2007). Neste sentido, *Escherichia coli* devido a suas vantagens, como sistema robusto e de fácil manipulação, continua sendo o hospedeiro dominante na produção de proteínas recombinantes.

Uma análise dos sistemas de expressão utilizados na obtenção de estruturas depositadas em um banco de dados - *Protein Data Bank* (PDB) pode demonstrar a frequência em que a *E. coli* tem sido utilizada. Assim, 88% das estruturas protéicas cujo sistema de expressão está disponível foram produzidas em *E. coli* em comparação aos 9% para o resto de hospedeiros eucariotos. Destes, o sistema baculovírus/células de inseto representa 4%, enquanto que as células de mamíferos, incluindo as linhagens celulares estáveis e, mais recentemente, o sistema de expressão transiente, representam 2,4%. Fica claro que os avanços

na biologia molecular e na tecnologia de cultura celular facilitaram a utilização de células de insetos e mamíferos como segundo colocado na produção de proteínas recombinantes (NETTLESHIP, 2010).

2.4.1 Expressão em Células de inseto

Alternativas de sistemas de produção de proteínas que reproduzem os processos das modificações pós-traducionais que acontecem em células de mamíferos estão sendo estudados para a produção de proteínas complexas. Proteínas produzidas em tais sistemas devem ser devidamente processadas de forma a garantir a eficácia e/ou antigenicidade da proteína recombinante e, portanto, nem sempre podem ser feitas em sistemas de expressão mais simples (ALTMANN et al., 1999).

Geralmente, com respeito à capacidade de produção de proteínas recombinantes totalmente processadas e biologicamente ativas, células de inseto se encontram no segundo lugar depois de células de mamíferos. O DNA exógeno que codifica para uma determinada sequência do peptídeo, a estrutura primária do polipeptídeo recém-traduzido será praticamente a mesma expressa em células de inseto, em células de mamíferos ou no organismo original. A grande e fundamental diferença encontra-se em mecanismos pós traducionais na “montagem” da proteína final, a qual será ativa e funcional. Cada dia mais e mais proteínas na fase pré-clínica de testes são produzidas em células de insetos, o que torna muito atraente este campo de pesquisa (ALTMANN et al., 1999).

Após a primeira tentativa de cultura *in vitro* de células de inseto em 1915, quase 50 anos se passaram antes que os métodos para o estabelecimento de linhagens celulares contínuas fossem instituídos com sucesso. Somente em 1962, Grace demonstrou a habilidade das células de inseto *Antheraea eucalypti* se replicarem indefinidamente *in vitro* (BROOKS e KURTTI, 1971). Em 1980, a utilização de cultura de células de insetos tinha amadurecido e muitas linhagens celulares de diferentes espécies estavam disponíveis para o estudo de vírus de insetos. Com o advento do sistema de expressão baseado em baculovírus (um vírus específico que infecta artrópodes) em células de inseto, uma nova aplicação em biotecnologia para estas células foi conseguida. Paralelamente, a necessidade de novas linhagens celulares para a produção de proteínas recombinantes tornou-se importante e as pesquisas com cultura de células de inseto ganhou grande interesse. Além disto, a produção

de proteínas recombinantes para a pesquisa básica foi aceita pela indústria para a produção comercial de agentes, terapêuticos e vacinas para uso em agricultura e saúde humana. Alguns exemplos importantes de produtos recombinantes derivados de este sistema de expressão estão citados nas Tabelas 3.2 e 3.3:

Tabela 2: Produtos comerciais em desenvolvimento usando *Spodoptera frugiperda Sf9* (GRANADOS et al., 2007).

Produto	Companhia	Estado
Vacina Provenge • Câncer de próstata	Dendreon	Fase clínica 3
Vacina Flubok • Influenza humana	Protein Sciences	Fase clínica 3
Vacinas Chimigen • Hepatite B crônica • Hepatite C crônica	Virexx Medical Corp.	Fase clínica 1& 2
Vacina Febre Suína • Febre suína clássica	Intervet	Comercial

Tabela 3: Produtos comerciais em desenvolvimento usando *Trichoplusia ni* “High Five cells” (GRANADOS et al., 2007).

Produto	Companhia	Estado
Vacina Cervarix HPV • Câncer cervical idiótipo/KLH vacina • Células B Non-Hodgkin's • Linfoma	Medimmune/GlaxoSmithKline Favrille	Fase clínica 3

As vantagens das células de inseto frente a células de mamíferos incluem: temperatura mais baixa de crescimento, condições menos complexas, facilidade para cultivos contínuos, adaptabilidade para obter culturas em larga escala, capacidade de processamento pós-traducionais, habilidade de crescer em meios livres de soro, e livres de produtos de origem animal, diminuindo o risco de patógenos presentes no produto final, alta tolerância à mudanças de osmolalidade e adaptabilidade em crescimento em suspensão (GALESSI et al., 2008; VENTINI et al., 2010).

A maioria dos sistemas de expressão heterólogos usados comercialmente e em nível de pesquisa tem sido desenhada com células de lepidópteros, principalmente *Spodoptera frugiperda* (Sf9/Sf21) e *Trichoplusia ni* (High Five), usando tanto o sistema de expressão do

baculovírus (transiente) como o estabelecimento de linhagens celulares estáveis através de vetores de expressão gênica. Mais recentemente, alguns trabalhos com células de dípteros como *Drosophila melanogaster* (S2 ou Kc) (OGAY et al., 2006) têm mostrado resultados promissores, apresentando estas células como uma alternativa de sistema de expressão viável e eficiente.

Embora o sistema de expressão baseado em baculovírus seja usado amplamente para suprir as deficiências da expressão em bactérias, a geração de baculovírus recombinantes pode levar várias semanas, e é baseado essencialmente numa infecção lítica. Por estes motivos, a purificação da proteína é dificultada devido à lise celular no final do processo de infecção e liberação de proteases que causam degradação dos produtos. Além disso, a biossíntese de proteínas é máxima perto da morte das células infectadas, razão pela qual o processamento completo da proteína pode ser afetado, particularmente no caso de proteínas secretadas ou proteínas de membrana, que geralmente são insolúveis (FARREL e LATROU, 2004). Do mesmo modo, o sistema baculovírus exige grande manipulação e tempo para criar, titular e amplificar o vírus (LOOMIS et al., 2005), e constitui-se em uma expressão transiente, já que após a lise celular, não há mais células para a expressão.

Nenhum destes problemas tem sido observado em sistemas de expressão em células de inseto em que a célula se mantém intacta (sem infecção) durante a fase de produção (LU et al., 1997), significando isto o desenvolvimento de sistemas estáveis, baseados na expressão de plasmídeos, gerando assim a linhagens de produção contínua de proteína em células de *Spodoptera* (MCCARROLL e KING, 1997). A taxa de expressão de proteínas em células transformadas estavelmente, geralmente (mas não necessariamente) é mais baixa que com o sistema convencional do baculovírus, mas, para determinados propósitos de estudos funcionais de alguma proteína, isto pode não ser um problema (ALTMANN et al., 1999).

A mesma estratégia de células estáveis foi desenvolvida para o sistema de expressão em células de mosquito e *Drosophila*. O sistema de expressão utilizando células de *Drosophila* tem apresentado os mais elevados níveis de produção de proteínas recombinantes, possivelmente devido ao uso de eficientes promotores que permitem a geração de alto número de mRNAs e de grande quantidade de cópias dos plasmídeos que são introduzidos no genoma celular (GEISSE, 2009).

Existem no mínimo 94 diferentes linhagens de *Drosophila* cultiváveis, das quais aproximadamente 12 são facilmente obtidas, com o propósito de expressão gênica. A maioria

dos estudos têm utilizado as linhagens Schneider S2 e S3 (CHERBAS e CHERBAS, 1994) ou derivações da linhagem Ohanession Kc (SEGAL et al., 1996), que são facilmente mantidas em cultura (MCCARROLL e KING, 1997). A linhagem Schneider S2 foi estabelecida a partir de culturas primárias embrionárias (embriões com 20-24 horas de idade) (SCHNEIDER, 1972) e foi desenvolvida como sendo um sistema de expressão baseado na utilização de plasmídeos (portanto não-lítico) para a secreção de proteínas humanas funcionais. Muitas características da célula S2 sugerem que ela é uma linhagem derivada de macrófago e de morfologia epitelial, e mais recentemente indicam que sua origem é de células sanguíneas (RÄMET et al., 2002). As células S2 possuem muitas vantagens como sistema de expressão recombinante, incluindo capacidade para realizar diferentes modificações pós-traducionais, atingem altas densidades celulares (50-100 vezes mais elevadas que células de mamíferos), crescem em suspensão (eliminando a necessidade do uso de microcarregadores), crescem facilmente em temperaturas entre 22 e 28°C, não requerem a utilização de incubadora de CO₂ e possibilitam altos rendimentos de proteínas quando comparado a células de mamíferos (SHIN e CHAO, 2002; SHIN et al., 2003; BRILLET, et al., 2008).

Uma característica importante das células de inseto S2 é a possibilidade de integração de mais de 1000 cópias do vetor de expressão no genoma celular. Além disso, o vetor pode ser construído gerando possibilidade de expressão e seleção em apenas um evento; não sendo necessário um longo período para amplificação do plasmídeo e seleção das células clonadas para estabelecer uma linhagem celular com altos níveis de expressão do gene introduzido (DEML et al., 1999). Porém, uma desvantagem em relação a estas células, é sua dificuldade em se replicar e se manter em baixas densidades, o que pode limitar os processos de seleção e sub-clonagem de populações que produzem a proteína de interesse em altas concentrações (JORGE et al., 2008).

Células S2 podem atualmente ser transfectadas transiente ou estavelmente usando uma série de plasmídeos contendo promotores constitutivos ou indutíveis, oferecendo um painel significativo de condições de expressão para serem testadas. Os vetores mais usados contém o promotor constitutivo do gene da Actina 5C (pAc5) ou o promotor indutível da metalotioneína (pMT, preferido para expressão de proteínas de membrana) ambos de drosófilas (BRILLET, et al., 2008). Desta forma, este sistema combina várias vantagens fisiológicas para bioprocessos, que fazem dele uma ferramenta com grande potencial para a produção de proteínas dentro de uma variedade de aplicações, incluindo a caracterização funcional, perfil farmacológico, simulações moleculares, análises estruturais, ou geração de

vacinas. Isto, inclusive, motivou uma edição especial da revista *Cytotechnology* sobre expressão de genes heterólogos em *Drosophila melanogaster* publicada em Maio 2008¹.

Diversas proteínas procariotas, eucarióticas e de origem viral já foram expressas em células de *Drosophila* S2, mostrando altos níveis de expressão de proteínas, apropriadamente processadas e biologicamente ativas, incluindo moléculas de adesão celular (Bellosta et al., 1995), antígenos virais (DEML et al., 1999; JORGE et al., 2008), anticorpos (KIRKPATRICK et al., 1995), anticorpos monoclonais (JOHANSSON et al., 2007), dentre outras. Também no caso específico de proteínas de membrana se encontram relatos de expressão de lectinas, enzimas, glicoproteínas de membrana, receptores acoplados a proteína G, transportadores e proteínas associadas a canais iônicos (BRILLET, et al., 2008).

Apesar das células de inseto não serem consideradas como eficientes hospedeiros para a expressão de glicoproteínas (GRABENHORST et al., 1999), há relatos de que determinadas glicoproteínas, como por exemplo, gp120 (glicoproteína envelope) (IVEY-HOUILLE, 1991) e proteínas de membrana com ancoramento GPI, estão sendo expressas com correta atividade biológica em células de *Drosophila* S2 (BENTING et al., 2000).

2.4.1.1 Transfecção em Células de Inseto

Como já foi citado, o sistema de expressão estável pode fornecer centenas de miligramas de proteína recombinante por litro. No entanto, o processo de seleção com antibióticos até a obtenção de clones celulares isolados e caracterizados altamente produtivos, leva vários meses e constitui-se um trabalho intensivo. O aumento de escala em células de mamíferos para a expressão transiente em cultivos em suspensão já foi relatado como um caminho eficiente para gerar rapidamente miligramas de proteínas solúveis em meios livres de soro ou com poucas quantidades dele (GEISSE e HENKE, 2005; PHAM et al., 2006; FLIEDL e KAISERMAYER, 2011). Neste sentido, muitas células de inseto podem ser facilmente cultivadas em suspensão e também são úteis para realizar transfecções em larga escala, analogamente aos procedimentos de transfecção para células de mamífero (FARRELL e IATROU, 2004).

Um número de métodos de transfecção, inicialmente desenvolvidos para células de mamíferos têm sido adaptados para células de inseto, mas as condições requeridas para obter

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/?term=cytotechnology%202008%20drosophila>

altas eficiências de transfecção podem variar grandemente entre linhagens de vertebrados e insetos (OGAY et al., 2006).

Infelizmente, apesar da diversidade de métodos de inserção de DNA, sua aplicação em células de inseto pode ser difícil devido à toxicidade dos agentes de transfecção, baixas eficiências de transfecção ou pobre reprodutibilidade dos resultados. Portanto, a procura por agentes alternativos para a introdução *in vitro* de DNA dentro das células de inseto e o desenvolvimento de um método simples e eficiente de transfecção é de grande interesse (OGAY et al., 2006).

Além disso, não existe muita informação disponível que relate o uso de células de inseto como plataformas de transfecção transiente (GEISSE, 2009). A cultura de células da linhagem S2 tem mostrado potencial no campo da produção de proteínas recombinantes. Neste sentido, o sistema de expressão com linhagens de expressão estável de *Drosophila* S2 tem sido proposto para a produção da glicoproteína do vírus da raiva (RVGP) e diversos aspectos da sua produção já foram estudados e otimizados por parte do grupo temático da FAPESP *Projeto Temático 02/09482-3*, do qual nosso laboratório fez parte. Desta maneira têm se conseguido aumentos consideráveis nos níveis de expressão (ao redor 10 vezes em $\text{ng}/10^7\text{cel}/\text{mL}$), no entanto, o processo para a obtenção dessas células altamente produtivas demandou períodos de tempo extensos (LEMOS et al., 2009; VENTINI et al., 2010)

Entretanto, a expressão transiente pode levar apenas alguns dias, apresentando uma vantagem associada de tempo e consumo de material. Portanto, o sistema de expressão do gene transiente utilizando células de inseto S2 para a produção da glicoproteína do vírus da raiva é uma tecnologia que permitiu gerar dados sobre o comportamento das células de inseto como sistema de expressão transiente e que direcionada adequadamente poderia oferecer uma nova opção de produção de uma vacina anti-rábica. Além disso, comprovada sua viabilidade, poderia se constituir numa opção tecnológica para outras inúmeras aplicações na produção de proteínas recombinantes terapêuticas.

2.4 Expressão de Proteínas Recombinantes em Células Animais

A expressão de proteínas recombinantes é possível a partir da introdução de DNA heterólogo em uma célula hospedeira. Este processo pode ser feito em células procariotas

recebendo o nome de transformação e, em células eucariotas recebendo o nome de transfecção (MULLER, 2005).

Uma vez que o DNA codificando a proteína de interesse é inserido na célula, ele pode ser expresso de forma transiente ou estável.

2.5.1 Expressão estável

A produção de proteínas recombinantes para o mercado farmacêutico é baseada principalmente na expressão contínua do gene recombinante na célula hospedeira (WURM, 2004). Este evento é obtido através de um processo que inicia com a introdução do DNA heterólogo, esse DNA viaja dentro da célula até atingir o núcleo da célula, aí por ação de enzimas de recombinação acontece uma integração randômica dentro do genoma do hospedeiro, depois disso a informação genética para a transcrição e tradução da proteína de interesse fica no cromossomo da célula e desta maneira a informação é herdada pelas células filhas. O sítio de integração tem um efeito importante sobre o sucesso da transcrição do gene recombinante, a integração em heterocromatina inativa resulta em pouca ou ausente expressão do transgene, enquanto a integração em eucromatina ativa frequentemente permite uma expressão adequada (WURM, 2004). As células submetidas a este evento de integração de gene são selecionadas geneticamente através de marcadores de seleção, partindo da população total transfectada e desta forma gerando as subpopulações ou os clones recombinantes. A linhagem celular contendo o fenótipo desejado para expressão de proteína e crescimento celular é usada para a produção da proteína (WULHFARD, 2009).

As vantagens de este processo são:

- a) Todas as células na cultura, em teoria, estão expressando o gene.
- b) O DNA recombinante é replicado, juntamente com o genoma celular, razão pela qual ele não é perdido durante a divisão celular.
- c) Rendimentos muito elevados de proteína recombinante já foram relatados.

A principal desvantagem deste sistema é que o processo de obtenção de uma linhagem estável compreende um longo processo desde a clonagem até a seleção dos clones estáveis, significando isto, alto custo e períodos de tempo consideráveis (aproximadamente 6 – 12

meses) (WURM, 2004). Por esta razão, a procura por um sistema alternativo mais eficiente, que seja viável técnica e economicamente se apresenta como alternativa muito promissora.

2.5.2 Expressão transiente

O sistema de Expressão Transiente de Gene – EGT (do inglês TGE – Transient Gene Expression), é fundamentado na habilidade das células para expressar o DNA exógeno inserido durante curto período de tempo, permitindo obter quantidades razoáveis de proteína de maneira rápida (semanas) (BOLLATI e COMINI, 2007). Este sistema não requer a integração estável do DNA. Depois que o DNA entra no núcleo da célula, a transcrição do gene começa e a síntese de proteína é iniciada. Usualmente a proteína pode ser detectada dentro de umas poucas horas depois da transfecção (MULLER, 2005).

Embora os níveis de expressão de células transfectadas transientemente se encontrem só em algumas dezenas de miligramas por litro de meio, o curto período de tempo, de uns poucos dias entre a liberação do DNA e a coleta da proteína, faz esta abordagem muito atraente (NETTLESHIP, 2010; LEE et al., 2009; NETTLESHIP et al., 2009; ARICESCU et al., 2006). A transfecção transiente foi originalmente usada em células aderentes, mas a demanda de grandes quantidades de proteína recombinante levou ao desenvolvimento de expressões transientes em larga escala em cultivos em suspensão (PHAM et al, 2006).

Na última década este sistema vem sendo contemplado em muitas pesquisas com resultados promissores (BALDI et al., 2007). Os resultados de expressão em pequena escala obtidos a partir de desenhos de transfecção transiente são geralmente preditivos dos rendimentos que serão obtidos em larga escala. No entanto, a maior desvantagem do sistema transiente são as grandes quantidades de DNA plasmidial necessárias para realizar a transfecção (NETTLESHIP, 2010).

Sistemas de expressão transiente têm sido explorados principalmente para a síntese de pequenas quantidades de proteínas recombinantes usando diferentes linhagens celulares (COS, HEK293, BHK) (GEISSE, 2009; PHAM et al., 2006). Para fazer da expressão transiente um processo mais eficiente em nível industrial, devem ser feitas melhorias focadas nos volumes para larga escala, simplificação ou redução nas etapas de manipulação e redução na quantidade de DNA necessário para a transfecção (MEISSNER, 2001).

Embora, neste sistema não precisemos do processo de seleção de clones, é importante, quando não se tem muita informação sobre porcentagens de eficiência na transfecção, o uso dos marcadores repórter, cujo gene codifica para uma proteína que pode ser monitorada por métodos simples e sensíveis. Este método é de grande utilidade para otimizar e monitorar os veículos de transfecção de DNA. Dentre estes genes repórter, a Proteína Verde Florescente (GFP), tem sido usada vastamente em células S2 e em outras linhagens celulares (PERRET et al., 2003; FARRELL e IATROU, 2004; LEE et al., 2000; PARK et al., 1999; BRILLET et al., 2008, SANTOS et al., 2007). Desde sua descoberta, se têm gerado mutantes para melhorar as características dela como repórter; dando origem à variante EGFP (GFP intensificada), na qual a treonina da posição 65 foi substituída por uma serina. Tem-se selecionado esta variante por apresentar vantagens, a saber: intensidade fluorescente incrementada, curto período entre a síntese da proteína e a fluorescência e por apresentar os mais elevados níveis de expressão em várias células animais (BOLLATI e COMINI, 2007).

Os componentes fundamentais requeridos para a produção de proteínas por transfecção transiente incluem seleção da linhagem celular, meio de cultura adequado, vetor de expressão para dirigir a biossíntese da proteína de interesse e o veículo para introduzir o vetor de expressão nas células.

Um resumo das características mais relevantes dos sistemas transiente e estável é apresentado na Tabela 4.

Tabela 4: Resumo comparativo das principais características da expressão transiente e estável (BOLLATI e COMINI, 2007)

EXPRESSÃO TRANSIENTE	EXPRESSÃO ESTÁVEL
Curto período para geração do produto.	Longo período para geração do produto.
Simple, não requer marcadores de seleção.	Marcadores de seleção ou de amplificação são requeridos.
Não é necessário realizar a seleção de clones produtores.	A seleção de clones produtores é exaustiva e requer um período relativamente longo.
Os níveis de expressão não são influenciados pelo sítio de integração cromossomal.	Os níveis de expressão são influenciados pelo sítio de integração e pelo número de cópias do gene.
Útil para confirmar a integridade de vetores de expressão; apropriada para métodos de seleção rápida.	Uma vez identificado um clone produtor estável, dispõe-se de uma fonte ilimitada para a produção da proteína.
Toda vez é requerido fazer o processo de transfecção.	Depois de realizada a transfecção a otimização consiste em seleção.
Requer grandes quantidades de plasmídeo.	Requer pouca quantidade de plasmídeo.

A. Linhagens celulares

Embora várias linhagens celulares de mamíferos tenham sido usadas para a expressão transiente de proteínas, os dados reportados se referem principalmente a células COS (Células derivadas de Rim de Macaco Verde Africano); HEK293 (derivadas de rim de embrião humano- “Human Embryonic Kidney”) e CHO (derivada de ovário de hamster chinês- “Chinese Hamster Ovary”), as quais têm sido transfectadas usando agentes químicos tais como Polietilenoimina (PEI) ou fosfato de cálcio (GEISSE, 2009; BALDI et al., 2007). Dentre elas, a que tem dado melhores produtividades é a HEK293E (PHAM et al, 2006).

As características fundamentais que deve ter uma linhagem celular para a expressão transiente são (GEISSE, 2009):

- a. Alta transfectabilidade com métodos comuns.
- b. Adaptação a cultivo em suspensão e livre de soro.
- c. Flexíveis ao aumento de escala de forma custo - efetiva.
- d. Intensa atividade mitótica.

Segundo um levantamento feito por Baldi, et al. (2007), várias proteínas secretadas, transmembrânicas e intracelulares, têm sido expressas por expressão transiente de gene em células animais (principalmente HEK e CHO) em suspensão em escalas maiores que 1L com rendimentos altos de proteína recombinante (~80 mg/L).

B. Meios de cultura

A eleição do meio de cultura tem um impacto significativo sobre a eficiência da transfecção e a produtividade. O uso de meios livres de soro é altamente recomendado para a expressão de proteínas recombinantes, pois facilita a recuperação e purificação da proteína e além disso, evita o risco associado ao uso de produtos de origem animal. No entanto, muitas formulações livres de soro usadas nas primeiras tentativas de transfecção transiente falharam, principalmente devido à presença de substâncias que incidem na estabilidade e forma do complexo dentro da célula, resultando em baixas eficiências de transfecção (BALDI et al., 2007; PHAM et al, 2006), e requerendo o desenho de um meio de intercâmbio na hora da transfecção. Neste sentido, a transfecção nestes meios tem sido possível através de aperfeiçoamentos dos protocolos da liberação do DNA dentro da célula (DEROUAZI et al, 2004; MULLER, 2005).

C. Vetores de expressão

Diferentes vetores de expressão tanto virais como não virais têm sido desenhados para transferir genes exógenos dentro de células eucarióticas. A seleção do vetor depende da aplicação, da célula hospedeira, do nível de produto desejado e da segurança desejada (BALDI et al., 2007).

a) Vetores virais: Neste sistema de expressão, a transferência do DNA dentro da célula é baseada num processo biológico mediado por um vírus (infecção viral mediada por receptores) (BOLLATI AND COMINI, 2007).

Um dos sistemas virais usados amplamente para transfecção transiente é o Semliki Forest Virus (SFV), que foi usado para a produção em larga escala de um receptor acoplado à proteína G, em células de mamífero cultivadas em suspensão em biorreator ou frasco de cultura tipo “spinner” (BLASEY et al., 2000; HASSAINE et al., 2006).

Os métodos baseados em vírus, embora sejam mais eficientes, compreendem mais passos, sendo mais complicados e demandando mais tempo que os baseados em vetores plasmidiais. Além disso, a natureza do processo de infecção requer receptores vírus-específicos na célula hospedeira para que ocorra a penetração viral, restringindo substancialmente o espectro das linhagens celulares a ser utilizadas (BOLLATI AND COMINI, 2007).

b) Vetores não virais: Os vetores não virais são bastante usados nas transfecções transientes relatadas em larga escala (GEISSE e HENKE, 2005; PHAM et al., 2006; FLIEDL e KAISERMAYER, 2011). Os elementos essenciais destes vetores incluem a presença de um promotor gênico constitutivo ou indutivo; um elemento (sequência) que inicie e termine a transcrição; e sequências procarióticas com a origem de replicação e marcador de seleção para a amplificação em bactéria. A seleção do promotor gênico é de grande importância para garantir o encaminhamento da transcrição do DNA e assim atingir elevados rendimentos. Neste sentido, é importante fazer comparações de diferentes promotores, pois eles podem ter um impacto significativo sobre a expressão do gene de interesse (BALDI et al, 2007; PHAM et al., 2006).

Os promotores gênicos de origem viral usados em transfecções transientes incluem o promotor do Citomegalovírus (CMV) e do Vírus de Símio 40 (SV40) (BALDI et al, 2007).

Os vetores não virais são transferidos para dentro da célula através do uso de métodos físicos ou bioquímicos.

Vetores não-virais têm uma maior flexibilidade no número e tamanho de genes a serem transferidos, bem como pouco risco em questões de biossegurança. Porém, podem apresentar baixa eficiência de transfecção, devido à existência de várias barreiras físicas e químicas nas células (LECHARDEUR et al., 1999; LUKÁCS et al., 2000; HONG et al. 2001; CHAN e JANS 2002; WIETHOFF e MIDDAUGH, 2003) que incluem o contato entre o DNA e a membrana celular, o trânsito de todo o DNA através da membrana celular, escapar dos compartimentos endossomais ou lisossomais, o transporte através do citoplasma e a entrada no núcleo (MULLER, 2005).

D. Veículos de transfecção

Diferentes meios de transfecção são utilizados para melhorar a eficiência na transferência do DNA para dentro da célula. Métodos de transferência não-viral de genes podem ser divididos em duas categorias: física e bioquímica. Os métodos físicos incluem microinjeção intracelular de DNA, biobalística e eletroporação. Já alguns exemplos de métodos bioquímicos incluem coprecipitação de DNA com fosfato de cálcio, lipídeos catiônicos e polímeros catiônicos. Todos estes três métodos dependem da formação de partículas carregadas positivamente que podem complexar com o DNA e penetrar nas células após a ligação com a superfície celular carregada negativamente. O agente de condensação também pode fornecer proteção contra nucleases uma vez que o DNA seja internalizado. Uma alta porcentagem do DNA que entra na célula, no entanto, é degradada antes que ele atinja o núcleo (GODBEY et al., 2000; POLLARD et al., 2001). Após a captação por endocitose, o DNA deve escapar do endossomo para ser liberado no citosol e entrar no núcleo. Para cada método de transfecção, os mecanismos envolvidos nestes eventos podem ser diferentes. Outro fator é a dependência do ciclo celular. A eficiência da entrega do gene através destes métodos têm se mostrado dependente do ciclo celular (LECHARDEUR et al., 1999; BRUNNER et al., 2002; MANNISTO et al., 2005). Maior expressão de proteínas recombinantes foi observada após a transfecção com fosfato de cálcio em células CHO aderentes durante a fase S do ciclo celular (BRUNNER et al. 2000). Transfecção com lipossomos e PEI ramificado é mais eficiente quando adicionados a células em fase S tardia (GROSJEAN et al., 2002). Estas observações indicam que, para todos esses métodos de transfecção, o DNA plasmidial provavelmente entra no núcleo após a ruptura da membrana nuclear durante a mitose. Os

mecanismos envolvidos nesses eventos continuam sendo pesquisados (MULLER, 2005). Alguns dos métodos de transfecção são comentados a seguir:

I. Co-precipitação com fosfato de cálcio

Este método foi desenvolvido por Graham e Van Der Eb, (1973), e foi inicialmente empregado para aumentar a infectividade do DNA adenoviral, e posteriormente Wigler et al., (1977) e Maitland e Mcdougall, (1977) o tornaram popular ao estender sua aplicação ao DNA plasmidial. Todas as numerosas variações do protocolo encontradas na literatura são baseadas no mesmo princípio; a precipitação espontânea que ocorre em soluções supersaturadas. O método é desenvolvido em duas etapas; o DNA purificado é misturado com cloreto de cálcio e logo é adicionado o tampão fosfato de pH neutro, resultando na formação de um precipitado fino visível, que leva incorporado o DNA. Uma vez que a partícula atinge um tamanho adequado, os complexos são adicionados às células em cultura. Embora várias condições interfiram na formação do precipitado, altas eficiências de transfecção só são conseguidas dentro de uma estreita faixa de parâmetros otimizados que garantem determinadas propriedades do precipitado (PHAM et al., 2006). Os complexos ingressam na célula via fagocitose dependente de energia e são encontrados em vesículas parecidas a endossomas ou lisossomos (LOYTER et al., 1982a, 1982b; ORRANTIA e CHANG., 1990). O DNA é depois liberado dentro do citoplasma devido à ruptura das vesículas causada pelas altas concentrações de cálcio ou redução do pH no interior delas. O DNA provavelmente entra no núcleo durante a mitose quando a membrana nuclear desaparece (WURM, 1999).

Os parâmetros críticos deste sistema são o pH, a qualidade do precipitado, o tempo em contato com as células, concentração do DNA plasmidial e o estado das células (JORDAN e WURM, 2004). A vantagem desta tecnologia é seu baixo custo, sua relativa simplicidade e a possibilidade de ser aplicada em diferentes linhagens celulares. No entanto, as desvantagens incluem sua toxicidade, e a necessidade da presença de soro no momento da transfecção.

II. Polímeros catiônicos

Diversos polímeros com capacidade de tamponamento abaixo de níveis de pH fisiológico, tais como polímeros de lipopoliaminas e de poliamidoaminas, foram propostos como eficientes agentes de transfecção (BOUSSIF et al., 1995), incluindo o Dextrana, Polietilenoimina (PEI) e Polilisina. Deles o mais usado com esta finalidade é o PEI, que foi relatado pela primeira vez como veículo para a transferência de genes por Boussif et al.,

(1995), e desde então o interesse pelo seu emprego em transfecções de células animais tanto *in vitro* quanto *in vivo* tem crescido muito (BOLLATI e COMINI, 2007).

PEI é uma macromolécula orgânica com elevada densidade catiônica que permite condensar moléculas de DNA eficientemente. Esta densidade é devida à presença de um grupo amina a cada três átomos que pode ser protonado. Estes grupos amino podem ter uma função protetora, prevenindo a degradação do DNA nos endossomos citoplasmáticos devido a sua alta capacidade de tamponamento. (BASSANI, 2005). As moléculas de PEI podem apresentar dois tipos de estruturas, lineares ou ramificadas, com massas molares variáveis. Estas diferenças mostram notável impacto sobre a sua capacidade para transferir genes (PHAM et al., 2006). O PEI linear de 25 kDa tem se mostrado como o mais eficiente na transfecção de células HEK293 e CHO (DUROCHER et al., 2002; DEROUAZI et al., 2004). Os complexos DNA-PEI (poliplexos) entram na célula por ligação na membrana celular através de uma interação não específica com glicoproteínas carregadas negativamente, proteoglicanos sulfatados ou não presentes na superfície da célula. Depois disso os complexos são internalizados na célula via endocitose, uma vez no interior da célula, parece que o DNA escapa do endossomo por uma acidificação, que promove o influxo dos canais de cloro. Este efeito esponja resulta no inchamento osmótico do endossoma e seu subsequente rompimento, permitindo a liberação do DNA no citoplasma (MULLER, 2005). Diferentes linhagens celulares têm sido transfectadas com sucesso em várias escalas de operação (BOUSSIF et al., 1995; GODBEY et al., 1999a; 1999b; 1999c; DUROCHER e PERRET et al., 2002; DEROUAZI et al., 2004; WULHFARD et al., 2010 RAJENDRA et al., 2011; FLIEDL e KAISERMAYER, 2011). Os principais parâmetros críticos do uso do PEI na transferência gênica incluem a quantidade de DNA; a razão PEI:DNA; densidade celular e a ordem de adição dos agentes (DEROUAZI et al., 2004).

III. Lipídeos catiônicos sintéticos

Descritos para uso na transferência de genes por Felgner et al., (1987) e Gao e Huang (1995). Desde que os primeiros lipídeos foram descritos, um elevado número de novos agentes de transfecção deste tipo têm surgido no mercado com relevantes eficiências. Os lipídeos catiônicos formam pequenos lipossomas unilamelares quando preparados em água sob condições ótimas. A superfície desses lipossomas encontra-se carregada positivamente, fenômeno que facilita a ligação eletrostática aos grupos fosfato do DNA, e que resulta na formação de complexos (lipoplexos) que por sua vez apresentam elevada afinidade pelas

cargas negativas expostas na superfície das membranas celulares. Depois disso o DNA é internalizado na célula por um processo de endocitose. A grande variedade de formulações oferece grande versatilidade à lipofecção, permitindo seu uso em diferentes linhagens celulares com resultados reprodutíveis e bons rendimentos de expressão. As desvantagens deste sistema incluem a toxicidade da formulação e seu elevado custo quando o desejo é aumentar a escala do processo (COLOSIMO et al., 2000).

2.5 Considerações sobre a revisão bibliográfica

Há um grande número de trabalhos na literatura envolvendo o uso da tecnologia de expressão transiente de gene em pequena e larga escala, sendo que já várias empresas como a Genentech, Inc.; MedImmune Ltd e MacroGenics, Inc., possuem este sistema dentre suas plataformas de expressão, e apresentam ela como uma alternativa na expressão de proteínas recombinantes em curto prazo (MORROW, 2008). O grupo de pesquisa focado no uso desta tecnologia (Wurm e colaboradores) se encontra fortemente estabelecido e está gerando continuamente resultados promissórios. No entanto, o enfoque desta tecnologia tem sido dirigido ao uso de células de mamíferos, principalmente HEK-293 e CHO.

Os trabalhos referentes ao estudo da expressão transiente de gene em células de inseto são muito incipientes e pouca informação bibliográfica se encontra disponível no uso desta tecnologia. Neste sentido e tomando como referente às características e experiências das células S2 em sistemas estáveis, neste trabalho a proposta foi avaliar o uso da tecnologia de expressão transiente no sistema de expressão em células de drosófila, utilizando a expressão da RVGP como alvo.

Este trabalho torna-se assim inédito e proporciona dados novos que podem servir como modelo para a produção desta e de outras glicoproteínas (para estudos vacinais e de diagnóstico) usando novas tecnologias.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão transiente do gene da glicoproteína do vírus da raiva (RVGP) em células de inseto da linhagem *Drosophila melanogaster* S2, utilizando os veículos de transfecção fosfato de cálcio, lipídeo catiônico (Cellfectin) e polímero catiônico (ExGen500 e JetPEI™).

3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o comportamento das células transfectadas em expressão transiente de EGFP e RVGP em placa, com os veículos de transfecção Cellfectin, JetPEI, ExGen500 e precipitação com fosfato de cálcio
- b) Estudar o efeito de diferentes condições de densidade celular, concentração de DNA e volume de agente de transfecção, sobre a expressão transiente de EGFP e RVGP em placa.
- c) Avaliar o comportamento das células transfectadas quanto à produtividade em expressão transiente de RVGP em frasco agitado de 100 mL com volume de trabalho de 15 mL, com os veículos de transfecção Cellfectin, JetPEI, ExGen500 e precipitação com fosfato de cálcio.
- d) Avaliar o comportamento das células transfectadas quanto à produtividade em expressão transiente de RVGP em frasco tipo “spinner” de 100 mL com volume de trabalho de 60 mL, com os veículos de transfecção JetPEI e precipitação com fosfato de cálcio.
- e) Definir as condições necessárias e o agente de transfecção para uma expressão mais eficiente da glicoproteína do vírus da raiva.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para a implementação de um sistema de expressão transiente um fator limitante resulta ser a elevada quantidade de DNA plasmidial necessária, neste sentido é necessário ter um sistema de amplificação e purificação de DNA eficiente na obtenção de material plasmidial de boa qualidade. Para tal fim, foi usado o sistema de amplificação em bactérias *Escherichia coli*.

4.1 Cultivo de Bactérias

O DNA plasmidial usado para realizar os experimentos de transfecção foi amplificado através da transformação em bactérias competentes da cepa *Escherichia coli* DH5 α crescidas em meio LB com antibiótico (Ampicilina 100 mg/mL).

4.1.1 Meios para cultivo de bactérias

Os meios foram preparados com água MilliQ e esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Para culturas sólidas, o meio LB foi acrescido de 16 g de ágar por litro e, então distribuído em volumes de 12 a 25 mL em placas de Petri de 10 ou 15 cm de diâmetro, com posterior estocagem a 4 °C. Quando adequado após esterilização e esfriamento foram adicionados 50 mg/mL de ampicilina.

I. LB:

- 1) 2% Lennox L Broth Base (Invitrogen™)

II. SOB (Caldo Super Ótimo, do inglês: Super Optimal Broth):

- 1) 2% bactotripton
- 2) 0,5% extrato de levedura
- 3) 10 mM NaCl
- 4) 2,5 mM KCl
- 5) 10 mM MgCl₂
- 6) 10 mM MgSO₄
- 7) pH 6,8 -7,0

III. SOC (Caldo Super Ótimo com repressor catabólico, do inglês: Super Optimal broth with Catabolic repressor)

- 1) Meio SOB

- 2) 20 mM de glicose

4.1.2 Preparação de bactérias competentes

Soluções:

I. RF I:

- 1) 100 mM KCl
- 2) 50 mM MnCl₂
- 3) 30 mM acetato de potássio
- 4) 10 mM CaCl₂
- 5) 15% glicerol

II. RF II:

- 1) 10 mM NaMOPS
- 2) 10 mM KCl
- 3) 75 mM CaCl₂
- 4) 15% glicerol.

A bactéria foi estriada por esgotamento em placa LB ágar e incubada a 37 °C por 20 horas, uma colônia foi inoculada em 2 mL de meio SOB e mantida à 37 °C sob agitação. Após 2 horas, quando o meio de cultura já estava ligeiramente turvo, foram adicionados 50 mL de meio SOB e as bactérias foram novamente incubadas à 37 °C com agitação por aproximadamente 2 horas, até a cultura atingir uma DO (densidade ótica) entre 0,3 e 0,5 na leitura no espectrofotômetro de 600 nm.

A essa suspensão foi adicionado 1 mL de MgCl₂ 1 M, e logo foi mantida no gelo por 15 minutos, depois foi centrifugada à 900g por 17 minutos à 4 °C (centrífuga Eppendorf). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 20 mL de solução RFI, mantendo os tubos no gelo por 15 minutos.

Passado esse tempo, a suspensão foi novamente centrifugada à 900 g por 17 minutos à 4 °C, descartando o sobrenadante. As células foram ressuspensas em 4 mL da solução RFII, previamente mantida no gelo. Alíquotas de 400 µL foram estocadas em microtubos, em nitrogênio líquido.

4.1.3 Transformação de bactérias competentes

Um criotubo contendo as bactérias competentes foi descongelado numa temperatura de $\pm 4^{\circ}$ C e foram feitas alíquotas de 50 μ L em tubos devidamente marcados. Adicionou-se a cada tubo 2 μ L do DNA plasmidial. Após 30 minutos no gelo, as bactérias foram submetidas a um choque térmico à 42 $^{\circ}$ C por 40 segundos e imediatamente resfriadas e mantidas em gelo por 2 minutos. Nove volumes de LB, foram adicionados e a suspensão incubada por 1 hora à 37 $^{\circ}$ C. Passado esse tempo as bactérias foram espalhadas em placas com meio LB sólido mais ampicilina (100 mg/mL), e incubadas à 37 $^{\circ}$ C por 12 a 18 horas.

4.2 Extração de DNA plasmidial

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

4.3 Vetores genéticos (plasmídeos)

Para a expressão do gene de RVGP (glicoproteína do vírus da raiva) foi usado o vetor pMTiRVGP, obtido no laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan (YOKOMIZO et al., 2007) e o vetor pMTRVGP construído anteriormente no laboratório e cedido para utilização neste trabalho (LEMOS et al., 2009). A expressão do gene de interesse nestes vetores está sob controle do promotor indutível da metalotioneína (pMt), para expressão indutível por metais pesados (BUNCH et al., 1988), neste caso o indutor usado foi o CuSO_4 na concentração final de 700 μ M (SANTOS et al., 2007; LEMOS et al., 2009). Esses plasmídeos também contêm os elementos pUC ori para replicação em bactéria e sequência codificadora para a resistência à ampicilina, sequência SV40 que confere poliadenilação e o epítipo de detecção da proteína V5. O pMTiRVGP contém também o sinal BiP

(Imunoglobulina de cadeia pesada ligada a proteínas), associada a secreção celular (KIRKPATRICK et al., 1995). Para a expressão do gene EGFP, usado nos primeiros experimentos para padronizar as melhores condições de transfecção o vetor de expressão usado foi o pMtEGFP (SANTOS et al, 2007) (Figura 2), o qual também tem um promotor de metalotioneína (pMt), elementos pUC ori para replicação em bactéria e sequência codificadora para a resistência a ampicilina, sequência de poli-adenilação do vírus SV40 e o epítipo de detecção da proteína V5.

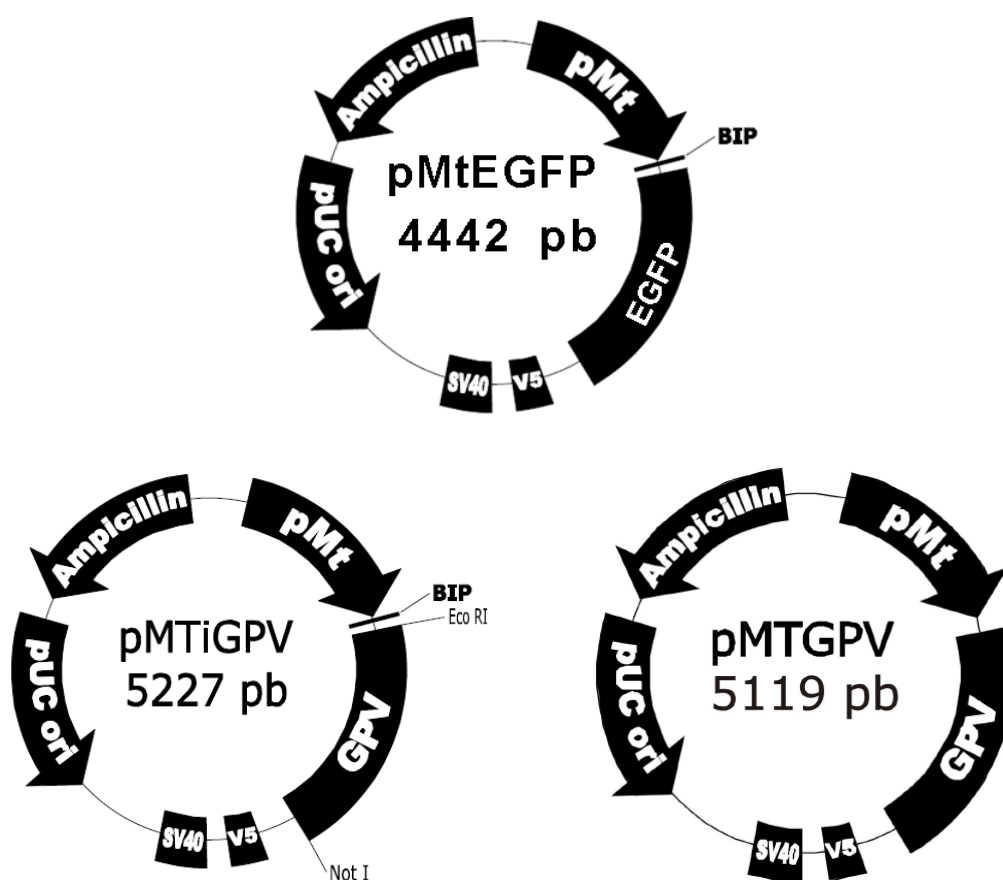


Figura 2: Mapa dos vetores de expressão pMtEGFP (proteína repórter fluorescente); pMTRVGP e pMTiRVGP (expressão da glicoproteína do vírus da raiva). pMT corresponde ao promotor do gene da metalotioneína de drosófila, BIP ao sinal de secreção celular, EGFP ao cDNA que codifica a EGFP e GPV ao cDNA da glicoproteína do vírus da raiva, SV40 à sequência de poli-adenilação do vírus SV40 e V5 ao epítipo da proteína V5. O gene que confere resistência a ampicilina (ampicillin) e a origem de replicação em bactérias (pUC ori) também estão presentes nesses vetores.

4.4 Cultivo de células Schneider S2 (S2)

Todos os experimentos desenvolvidos para a transfecção transiente foram feitos usando células de *Drosophila melanogaster*, Schneider 2 ou S2 (SCHNEIDER, 1972).

4.4.1 Manutenção das células

As células S2, transfectadas e selvagens foram mantidas em meio de cultura SF900II (GIBCO BRL) em incubadora a 28 °C, sendo subcultivadas 2 vezes por semana. Os cultivos estáticos foram realizados em frascos T de 25 cm², com volume de trabalho de 5 mL. Os cultivos sob agitação foram realizados em frascos de 100 mL (Schott), com volume de trabalho de 15mL e agitação orbital de 100 rpm.

4.4.2 Congelamento das células

As células na fase exponencial foram centrifugadas a 800 g por 3 minutos a 28 °C, depois do descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em meio de congelamento contendo 50% de Soro Fetal Bovino, 40% de SF900II e 10% de DMSO em concentração de 10⁷ células/mL. Essa suspensão foi alíquotada em criotubos com volume de 1 mL a 1,5 mL, após aproximadamente 15 minutos em contato com o DMSO, os tubos foram congelados primeiramente a -80 °C utilizando um reservatório específico contendo álcool isopropílico que promove uma taxa de congelamento constante de -1 °C por minuto. Depois de 16-24 horas no congelador os tubos foram transferidos e mantidos em nitrogênio líquido até uso.

4.4.3 Descongelamento das células

Para o descongelamento das células um tubo criogênico foi retirado do nitrogênio líquido, descongelado parcialmente a 37 °C e transferido para um tubo de 15 mL contendo 9 mL de meio de cultura SF900II SFM. O tubo, então foi centrifugado a 800 g por 3 minutos a 28 °C, o sobrenadante foi em seguida descartado para remoção do DMSO e o “*pellet*” de células foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultura novo e transferido para uma garrafa de cultura T de 25 cm² contendo 4 mL de meio SF900II. As células foram mantidas em incubadora à 28 °C por 72 horas e repicadas normalmente após esse período.

4.4.4 Análise de densidade e viabilidade celular

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

A densidade celular foi determinada pela contagem em hemacitômetro. Foram retiradas alíquotas de 20 μL do recipiente em questão e, em seguida, foi acrescentado 20 μL de uma solução etílica 0,4% (m/v) azul de Tripán preparado previamente.

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

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

4.4.5 Análise de aminoácidos

Durante os cultivos em frasco de cultura tipo “shott” e “spinner”, amostras do sobrenadante foram separadas e congeladas a -20°C para posteriores análises dos aminoácidos.

A análise foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), baseada no método proposto por Henrikson e Meredith (1984). Uma coluna pico-tag (Waters, Ireland) foi utilizada como fase estacionária e como eluente um gradiente constituído por duas fases móveis A e B. A fase A é composta de acetato de sódio tri-hidratado, trietilamina, água milli-Q e acetonitrila. A fase B apenas água e acetonitrila. As condições de operação do cromatógrafo da Waters foram: temperatura de 36°C , tempo de corrida de 45 minutos e gradiente com vazão pré-determinada. Os picos foram detectados no comprimento de onda 254 nm.

As amostras do sobrenadante do cultivo foram preparadas segundo as etapas de filtração, secagem, reidratação, derivatização até sua diluição em tampão antes da injeção no equipamento. Uma curva padrão foi preparada para cada aminoácido a partir de uma solução padrão da Waters. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.5 Transfecção

Foram realizados conjuntos de experimentos para avaliar os veículos de transfecção: fosfato de cálcio; polímero catiônico: ExGen500 (Fermentas) e JetPEI (Polyplus) e lipídeo catiônico: Cellfectin (Invitrogen), na Tabela 5 se encontra a formulação de cada agente. Após ativação das células S2 provenientes do nitrogênio líquido, as mesmas foram cultivadas a 28°C em garrafas plásticas de cultura tipo T-25 em cultura estática e, a seguir, em frasco T-75.

Finalmente essas células foram usadas como inóculos dos experimentos realizados em placa de 24, 12 ou 6 poços. Para os experimentos de transfecção transiente em condições de cultivo em suspensão, as células foram cultivadas em garrafa T-25 e em seguida em frascos agitados (Schott) de 100 mL, de onde foram retirados inóculos para os diferentes experimentos de transfecção.

Tabela 5: Agentes de transfecção usados

AGENTE	CARACTERISTICAS
Cellfectin (Invitrogen)	Formulação 1:1.5 assim: N, N ^I , N ^{II} , N ^{III} -Tetramethyl-N, N ^I , N ^{II} , N ^{III} -tetrapalmityl-spermina (TM-TPS), dioleoyl phosphatidylethanolamina (DOPE).
Fosfato de Cálcio	CaCl ₂ 2 M + HEPES 2X salino.
ExGen500 (Fermentas)	PEI linear de 22 KDa
JetPEI (Polyplus)	PEI linear de 22 KDa

Os experimentos foram realizados seguindo as seguintes etapas:

Material e Métodos

Etapa I: Cultivos em placas

- a) Experimentos de expressão transiente de EGFP nas células S2 em placa de 24 ou 12 poços utilizando diferentes relações de:
 - i. Fosfato de cálcio:DNA plasmidial;
 - ii. ExGen500:DNA plasmidial;
 - iii. Cellfectin:DNA plasmidial.

b) Experimentos de expressão transiente de RVGP nas células S2 em placa de 6 poços utilizando diferentes relações de:

- i. Fosfato de cálcio:DNA plasmidial;
- ii. ExGen500:DNA plasmidial;
- iii. Cellfectin:DNA plasmidial.

Etapa II: Cultivos em frascos agitados (Schott)

a) Experimentos de expressão transiente de RVGP nas células S2 em frascos agitados (Schott) de 100 mL, fazendo análise de crescimento celular e produtividade.

Etapa III: Cultivos em frascos de cultura tipo “spinner”

Experimentos de expressão transiente de RVGP nas células S2 em frascos de cultura tipo “spinner” fazendo análise de crescimento celular e produtividade.

4.5.1 Co-precipitação com fosfato de Cálcio

Soluções: Filtradas (em filtro 0,22 μ m)

- i. Cloreto de cálcio na concentração 2 M
- ii. TE 0,1x: Tris-Cl 1 M + EDTA 0,5 M
- iii. HEPES 2X Salino (50 mM HEPES, 1,5 mM Na₂HPO₄, 280 mM NaCl, pH 7,1).

A. Transfecção em placa

No dia anterior à transfecção, células S2 selvagens em fase exponencial de crescimento foram inoculadas nas concentrações de 8×10^5 ou 1×10^6 células/poço em uma placa de 24, 12 ou 6 poços. Para cada mL de cultura foi preparada uma solução de transfecção de 100 μ L. Em um tubo Falcon de 15mL, misturou-se 25 μ L de CaCl₂ (2 M) com diferentes quantidades de pMTEGFP ou pMTiRVGP, completou-se com TE 0,1 \times até um volume de 100 μ L. Adicionou-se lentamente o mesmo volume de HEPES 2X Salino sobre a solução anterior, agitando levemente. Essa solução foi incubada por 1 minuto a temperatura ambiente para a formação do precipitado. Para a transfecção, removeu-se o meio das células previamente incubadas, e foi adicionada a solução de fosfato-DNA sobre elas. Depois disso, permitiu-se uma incubação a temperatura ambiente de 15min e adicionou-se 800 μ L de meio SF900II suplementado com 2% de soro fetal bovino. Após 2 horas de incubação a temperatura ambiente sob agitação lenta, as células foram levadas para a incubadora a 28°C. Decorridas 4 horas, a solução de transfecção foi trocada por meio SF900II fresco (2mL). Depois de um período de incubação de 16-24horas nas condições já citadas o meio foi trocado e as células foram induzidas com CuSO₄ na concentração final de 700 μ M. As células foram incubadas novamente por 48 horas, tempo em que as células foram contadas e uma alíquota de 10^6 células foi separada. Foram feitas contagens celulares a cada 24 horas, onde uma alíquota de 1×10^6 células foi

separada, centrifugada a 800g por 5 minutos e armazenada a -20°C para análise da glicoproteína expressa pelo método de ELISA.

B. Transfecção em frascos agitados Schott

No dia anterior à transfecção, células S2 selvagens em fase exponencial foram inoculadas na concentração de $1,5 \times 10^6$ células/mL em um frasco do tipo Schott de 100mL. Em um tubo Falcon de 15mL, misturou-se 50 μL de CaCl_2 (2 M) com 15 μg de pMTiRVGP ou pMTRVGP, completou-se com TE 0,1x até um volume de 500 μL . Adicionou-se lentamente o mesmo volume de HEPES 2X Salino sobre a solução anterior, agitando levemente; essa solução foi incubada por 1 minuto a temperatura ambiente para a formação do precipitado. Depois desse tempo a solução de fosfato-DNA foi adicionada sobre as células (7mL de cultura celular em uma concentração de $3,2 \times 10^6$ células/mL), permitindo-se uma incubação a temperatura ambiente de 10min e em seguida foram adicionados 4mL de meio SF900II com 2% de soro fetal bovino, as células foram então incubadas a 28°C sob agitação orbital de 100rpm. No tempo de 30 minutos pós-transfecção foram adicionados 3mL de meio SF900II fresco para completar um volume final de 15mL e uma concentração de $1,5 \times 10^6$ células/mL. Depois de um período de incubação de 16-24 horas nas mesmas condições já citadas, as células foram induzidas com CuSO_4 na concentração final de 700 μM . As células foram incubadas novamente. Foram feitas contagens celulares a cada 24 horas, onde uma alíquota de 1×10^6 células foi separada, centrifugada a 800g por 5 minutos e armazenada a -20°C para análise da glicoproteína expressa pelo método de ELISA.

4.5.2 Polietilenoimina (PEI)

Soluções:

- i. ExGen500® (Fermentas): PEI linear de 22kDa e 5,47mM resíduos de nitrogênio.
- ii. JetPEI™ (Polyplus): PEI linear de 22kDa e 7,5mM resíduos de nitrogênio.
- iii. NaCl 150mM: Filtrado (tamanho de poro 0,22 μm) e autoclavado.

A. Transfecção em placa

No dia anterior à transfecção, células S2 selvagens em fase exponencial foram inoculadas nas concentrações de 8×10^5 ou 1×10^6 células/poço em uma placa de 24, 12 ou 6 poços. Para cada mL de cultura foi preparada uma solução de transfecção de 100 μL . Em um

tubo eppendorff de 1mL, diferentes quantidades de pMTEGFP ou pMTiRVGP foram diluídas em um volume de 200 μ L de NaCl 150mM e misturadas usando vortex por 10 segundos. A este tubo foram adicionadas diferentes quantidades de ExGen500 e a solução final foi misturada usando vortex por 10 segundos. Essa solução final foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente para a formação do complexo. Para a transfecção, removeu-se o meio das células previamente incubadas, e foi adicionada a solução de transfecção sobre elas. Depois disso, permitiu-se uma incubação a temperatura ambiente de 15min e adicionou-se 800 μ L de meio SF900II, as células foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente, sob agitação lenta e depois levadas para incubadora a 28°C. No tempo de 4 horas pós-transfecção foi adicionado 1mL de meio SF900II fresco para completar o volume de trabalho de 2mL. Depois de um período de incubação de 16-24 horas nas condições já citadas o meio foi trocado e as células foram induzidas com CuSO₄ na concentração final de 700 μ M. As células foram incubadas novamente por 48 horas, tempo em que as células foram contadas e uma alíquota de 10⁶ células foi separada, centrifugada a 800g por 5 minutos e armazenada a -20°C para análise da glicoproteína expressa pelo método de ELISA.

B. Transfecção em frascos agitados (Schott)

O procedimento tomado como referencia é relatado por Buchs et al., 2009. No dia anterior à transfecção, células S2 selvagens em fase exponencial foram inoculadas na concentração de 1,5 \times 10⁶ células/mL em um frasco do tipo Schott de 100mL. Em um tubo Falcon de 15mL, 15 μ g de pMTiRVGP ou pMTRVGP foram diluídos em 500 μ L de meio SF900II. Em outro tubo misturou-se 30 μ L de ExGen500 ou JetPEI com 500 μ L de meio SF900II. As soluções foram incubadas por 10 minutos, depois deste tempo a solução contendo o agente de transfecção foi adicionada na solução contendo o DNA, mantendo uma incubação de mais 10 minutos a temperatura ambiente para a formação do complexo. Depois desse tempo a solução de transfecção foi adicionada sobre as células (7mL de cultura celular em uma concentração de 3,2 \times 10⁶ células/mL). As células foram levadas para incubadora a 28°C sob agitação orbital de 100rpm. No tempo de 30 minutos pós-transfecção foram adicionados 7mL de meio SF900II fresco para completar um volume final de 15mL e uma concentração de 1,5 \times 10⁶ células/mL. Depois de um período de incubação de 16-24 horas nas mesmas condições já citadas, as células foram induzidas com CuSO₄ na concentração final de 700 μ M. As células foram incubadas novamente. Foram feitas contagens celulares a cada 24 horas, onde uma alíquota de 1 \times 10⁶ células foi separada, centrifugada a 800g por 5 minutos e armazenada a -20°C para análise da glicoproteína expressa pelo método de ELISA.

4.5.3 Cellfectin

Cellfectin® (Invitrogen) é uma formulação lipossomal 1:1.5 (M/M) dos lipídeos catiônicos N, N^I, N^{II}, N^{III}-Tetramethyl- N, N^I, N^{II}, N^{III}-tetrapalmityl-spermina (TM-TPS), e dioleoyl phosphatidylethanolamina (DOPE).

A. Transfecção em placa

No dia anterior à transfecção, células S2 selvagens em fase exponencial foram inoculadas nas concentrações de 8×10^5 ou 1×10^6 células/poço em uma placa de 24, 12 ou 6 poços. Para cada mL de cultura foi preparada uma solução de transfecção de 100 μ L. Em uma placa de 24 poços diferentes quantidades de pMTEGFP ou pMTiRVGP foram diluídas em um volume de 100 μ L de SF900II. Na mesma placa foram também misturadas diferentes quantidades de Cellfectin com meio SF900II. Estas soluções foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente. Depois deste tempo a solução com DNA foi adicionada na solução com Cellfectin. Essa solução final foi incubada por 20 minutos a temperatura ambiente para a formação do complexo. Para a transfecção, removeu-se o meio das células previamente incubadas, e foi adicionada a solução de transfecção sobre elas. Depois disso, permitiu-se uma incubação a temperatura ambiente de 15min e adicionou-se 800 μ L de meio SF900II, as células foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente, sob agitação lenta e depois levadas para incubadora a 28°C. No tempo de 4 horas pós-transfecção foi adicionado 1mL de meio SF900II fresco para completar o volume de trabalho de 2mL. Depois de um período de incubação de 16-24horas nas condições já citadas o meio foi trocado e as células foram induzidas com CuSO₄ na concentração final de 700 μ M. As células foram incubadas novamente por 48 horas, tempo em que as células foram contadas e uma alíquota de 10^6 células foi separada centrifugada a 800g por 5 minutos e armazenada a -20°C para análise da glicoproteína expressa pelo método de ELISA.

B. Transfecção em frascos agitados Schott

O procedimento tomado como referência é relatado por Buchs et al., 2009. O dia anterior à transfecção, células S2 selvagens em fase exponencial foram inoculadas na concentração de $1,5 \times 10^6$ células/mL em um frasco Schott de 100mL. Em uma placa de 12 poços, 15 μ g de pMTiRVGP ou pMTRVGP foram diluídos em 500 μ L de meio SF900II. Na mesma placa foram também misturados 45 μ L Cellfectin com meio SF900II em um volume de 500 μ L. Estas soluções foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente. Depois deste tempo a

solução com DNA foi adicionada na solução com Cellfectin. Essa solução final foi incubada por 20 minutos a temperatura ambiente para a formação do complexo. Em seguida a solução de transfecção foi adicionada sobre as células (7mL de cultura celular em uma concentração de $3,2 \times 10^6$ células/mL). Então as células foram incubadas a 28°C sob agitação orbital de 100rpm. No tempo de 30 minutos pós-transfecção foram adicionados 7mL de meio SF900II fresco para completar um volume final de 15mL e uma concentração de $1,5 \times 10^6$ células/mL. Depois de um período de incubação de 16-24 horas nas mesmas condições já citadas, as células foram induzidas com CuSO_4 na concentração final de $700 \mu\text{M}$. As células foram incubadas novamente. Foram feitas contagens celulares a cada 24 horas, onde uma alíquota de 1×10^6 células foi separada, centrifugada a 800g por 5 minutos e armazenada a -20°C para análise da glicoproteína expressa pelo método de ELISA.

4.6 Detecção e quantificação da proteína EGFP

4.6.1 Microscopia de fluorescência

A análise foi realizada em microscópio de fluorescência “Olympus System Microscopes” modelo BX51 ou em microscópio confocal “Carl Zeiss” modelo LSM 510 com o auxílio da Dra. Toshie Kawano e do Sr. Alexsander de Souza Seixas no laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, no qual a amostra é excitada a 488 nm e a luz emitida entre 500 – 600 nm é medida. Para esta análise, amostras de $30 \mu\text{L}$ foram retiradas dos cultivos celulares transfectados e colocadas numa lâmina para visualização no microscópio.

4.6.2 Citometria de fluxo

As análises de citometria de fluxo foram realizadas no setor de citometria de fluxo do Instituto Butantan no laboratório de Imunoquímica em um aparelho FACSCALIBUR da Becton Dickinson. Para isso foi retirada uma amostra de $400 \mu\text{L}$ de células (contendo 10^6 células), e adquiridos 10.000 eventos por cada amostra de células. A EGFP foi excitada a 480 nm e a emissão medida com filtro de 530 nm. A aquisição foi configurada a cada análise, com base em uma suspensão de células não transfectadas que foram tratadas igualmente às células transfectadas, sendo esta a fluorescência controle negativo. Somente valores acima desses foram considerados como positivos na expressão de EGFP.

4.7 Detecção e quantificação da proteína RVGP

4.7.1 *Imunofluorescência indireta*

A análise em microscopia de fluorescência foi realizada nos microscópios citados no item de detecção da EGFP.

I. Anticorpos e soluções

- 1) Anticorpo IgG monoclonal anti glicoproteína do vírus da raiva (D1-25N^oI-1805 Instituto Pasteur Paris)
- 2) Anticorpo FITC Goat Anti mouse Ig
- 3) Acetona 80%,
- 4) Tampão PBS pH 7,0
- 5) Solução de Azul de Evans 0,02%, diluída 1:20 em tampão PBS
- 6) Glicerol 50%.

Para essa análise uma amostra de 40 µL da suspensão celular com uma concentração de 2×10^6 células S2 transfectadas com o vetor pMTRVGP e não transfectadas (controle negativo) foi colocada em lâmina de vidro e deixada sedimentar por 30 minutos a temperatura ambiente, após o sobrenadante ser retirado, a lâmina foi lavada com tampão PBS e algumas gotas de acetona 80% gelada foram adicionadas e deixadas durante 20 minutos a 4 °C para fixar as células. A acetona foi descartada e a lâmina lavada com tampão PBS. O anticorpo IgG monoclonal anti glicoproteína do vírus da raiva, que reconhece o sítio III da glicoproteína da cepa PV, foi diluído na razão de 1:100 em azul de Evans e 20 µL dessa suspensão foi adicionada as células, as quais foram incubadas por 1 hora a 37 °C. Depois desse tempo a lâmina foi, então, lavada 3 vezes com PBS e seca com gaze. Foi adicionado o segundo anticorpo conjugado com fluoresceína diluído 1:400 em tampão PBS. As células foram incubadas por 1 hora a 37 °C e lavadas com PBS. Para não ressecar as células, foi colocada uma gota de glicerol 50% em PBS e uma lamínula sobre as células.

4.7.2 *ELISA*

A produção de RVGP foi avaliada no Instituto Butantan em São Paulo, pelo método de ELISA utilizando o kit “*Rabies Glycoprotein Enzyme Immunoassay*” (Instituto Pasteur, Paris) segundo Astray et al. (2008). Nesse imunoenensaio foi utilizado o anticorpo IgG monoclonal anti glicoproteína do vírus da raiva (D1-25N^oI-1805).

Soluções:**I. Tampão Carbonato:**

- 1) 0,05 M Carbonato
- 2) pH 9,6

II. Solução de Bloqueio 0,3% BSA

- 1) 5% Sacarose
- 2) Tampão Carbonato

III. Solução de Lavagem

- 1) PBS (pH 7,0)
- 2) 0,005% Tween 20

IV. Solução de Diluição

- 1) PBS (pH 7,0)
- 2) 0,05% Tween 20
- 3) 0,5 % BSA

V. Solução Substrato-cromógeno

- 1) 40 mM Citrato tri-sódio diidratado
- 2) 10 mM Ácido cítrico monoidratado
- 3) 30% H₂O₂
- 4) 2 mg/mL OPD (o-Phenylenediamine)

VI. Solução de Parada

- 1) 4 N Ácido sulfúrico

O anticorpo primário, de sensibilização da placa, foi diluído na proporção de 1:200 em tampão carbonato e distribuído 200 µL por poço da placa de 96 poços. Em seguida a placa foi incubada selada a 37 °C por 3 horas e a 4 °C durante a noite. Após o descarte do anticorpo de sensibilização, a placa foi bloqueada com 300 µL por poço de solução de bloqueio a 37 °C por 30 minutos.

Para a obtenção de amostras, as células de cada experimento foram contadas e o volume contendo 10⁶ células foi centrifugado a 100 g por 5 minutos e congeladas secas a – 20 °C. No momento da análise, as amostras foram descongeladas e ressuspensas no tampão de lise (50 mM Tris, 150 mM NaCl e 1% Nonidet P-40) em seguida elas foram misturadas no vórtex por

10 segundos e depois a cada 15 minutos por um período de 1 hora, sendo as amostras mantidas em geladeira ou banho de gelo. Após a lise as amostras foram centrifugadas a 10600 g por 10 minutos para retirada dos *debris* celulares, sendo analisado apenas o sobrenadante obtido após a centrifugação.

A placa sensibilizada foi lavada 5 vezes em tampão PBS-Tween e seca em papel absorvente. Para o branco foi utilizado o tampão PBS-Tween-BSA. O antígeno de referência diluído em tampão PBS-Tween-BSA foi distribuído na placa em duplicata (200 μ L), assim como as amostras previamente preparadas. A placa foi coberta com filme e incubada por 1 hora a 37 °C. Após incubação a placa foi lavada 5 vezes com tampão PBS-Tween e foram adicionados 200 μ L por poço do anticorpo marcado com peroxidase diluído em tampão PBS-Tween-BSA. Após 1 hora a 37 °C a placa foi lavada 6 vezes com PBS-Tween. Foi adicionada então a solução substrato cromógeno. Após 30 minutos de incubação em ambiente escuro a reação foi bloqueada com 50 μ L de solução de bloqueio.

A densidade óptica de cada amostra foi analisada no leitor de ELISA (Multiskan EX, MJLabsystems) a 492 nm. Para a avaliação quantitativa da glicoproteína, a densidade ótica de cada amostra é comparada com uma curva padrão que é resultado de uma diluição seriada da vacina de referência constituída por partículas virais com conhecido conteúdo de glicoproteína (ng/mL).

4.8 Análise de resultados

A avaliação quantitativa da expressão transiente da RVGP foi obtida através da análise de ELISA e foi comparada em termos de produtividade de proteína expressa por 10^7 células e também em termos de concentração volumétrica, ou seja, ng de proteína por mL de meio. Estes valores foram utilizados, tanto na Fase I para analisar o comportamento de expressão transiente em placa, como na Fase II para quantificar o potencial da transfecção transiente em maior escala.

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

5 RESULTADOS

5.1 Expressão Transiente de EGFP em células S2 cultivadas em placa

Com o intuito de determinar as melhores condições para a transfecção transiente em células S2 diferentes parâmetros de cultura e transfecção foram estudados. O vetor pMTEGFP foi amplificado em bactérias DH5 α e confirmada sua integridade pelo análise dos padrões de restrição observados em eletroforese em gel de agarose, esse plasmídeo foi usado para os experimentos de transfecção.

5.1.1 Efeito dos diferentes parâmetros para padronização da transfecção transiente da EGFP -Experimento 1p

Para a avaliação da expressão transiente da EGFP em células *Drosophila melanogaster* S2 foram utilizados diferentes agentes de transfecção: fosfato de cálcio, ExGen500 e Cellfectin. Para isso, transfecções foram feitas usando o plasmídeo pMTEGFP apresentado na Figura 2. As transfecções foram feitas em duplicata em cultivos de células S2 realizados em microplaca de 24 poços com volume de trabalho de 1 mL (segundo o procedimento descrito em item 4.5).

Com a finalidade de identificar alguma interdependência entre parâmetros que são definidos como principais numa transfecção (densidade celular, concentração de DNA e agente de transfecção), foi avaliado primeiramente o efeito da densidade celular sobre a expressão, assim neste experimento foram avaliadas densidades de 1×10^5 e 5×10^5 células/mL. Em adição, as células foram transfectadas com diferentes concentrações de DNA de 0,5; 1 e 2 μ g e diferentes volumes de agente de transfecção de 5 e 15 μ L para Cellfectin; 25 e 50 μ L para CaCl₂ (2 M) e 3,3 e 6,6 μ L para ExGen500.

Na Figura 3 são apresentados os resultados das transfecções utilizando Cellfectin e ExGen500, obtidos na análise feita por citometria de fluxo. Podemos observar em ambos os agentes, um aumento de 7 vezes na porcentagem de células fluorescentes quando usamos um inóculo de 1×10^5 cel/mL (3-4%), em relação ao inóculo com 5×10^5 cel/mL (0,5%). Este fato pode ser atribuído a uma melhor disponibilidade do DNA nas células, como ocorre quando elas estão em concentrações menores (1×10^5 cel/mL). Quanto aos volumes de agente de transfecção avaliados, não foram observadas maiores diferenças entre eles (Figura 3).

Referente às concentrações de DNA avaliadas, o melhor resultado foi encontrado quando a concentração de DNA foi de 0,5 μg ; mostrando entre 2,5 e 3,5% de células fluorescentes para Cellfectin e ExGen500, respectivamente. Nas concentrações de 1 e 2 μg a porcentagem de células fluorescentes encontrada foi 0,5%, para estes dois agentes (Figura 3).

A intensidade da fluorescência também medida por citometria de fluxo não mostrou diferenças para nenhuma das condições comparadas (densidade celular inicial, concentração de DNA e concentração de agente de transfecção) apresentando uma média de 30 unidades de fluorescência para células transfectadas tanto com Cellfectin como com ExGen500 (dados não apresentados).

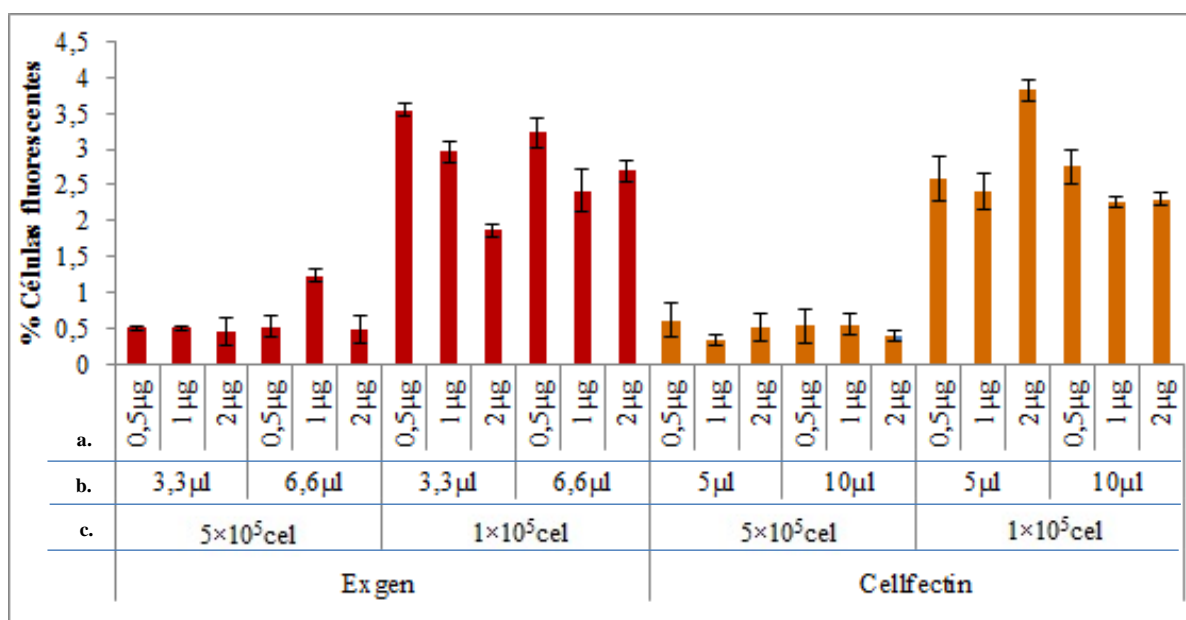


Figura 3: Mediana da porcentagem de células S2 fluorescentes transfectadas com ExGen500 e Cellfectin. As células foram transfectadas em placa de 24 poços com volume de trabalho de 1 mL e usando meio SF900II. As condições usadas foram: **a.** Concentrações de DNA de 0,5; 1 e 2 μg ; **b.** Volumes de agente de transfecção de 3,3 e 6,6 μL para ExGen500 e de 5 e 10 μL para Cellfectin e **c.** Densidades de 1×10^5 e 5×10^5 células/poço. As células foram induzidas 24 horas depois da transfecção com CuSO_4 (numa concentração final de $700 \mu\text{M}$). Uma amostra de 400 μL do cultivo foi retirada 48 horas após a indução, e analisada por citometria de fluxo. As células foram mantidas em incubadora a 28°C .

Um experimento utilizando como agente de transfecção a precipitação com fosfato de cálcio também foi realizado. A mediana das células fluorescentes encontrada para este método foi 10 vezes maior (25-30% de células fluorescentes) quando comparada com os valores citados anteriormente para os outros métodos (Figura 4). Porém, as células transfectadas com este método também apresentaram a formação de grandes aglomerados horas após a transfecção, dificultando a análise do estado real das células. Estes precipitados provavelmente originaram artefatos na leitura por citometria de fluxo, gerando assim os níveis elevados de fluorescência.

Referente aos volumes de CaCl_2 usados para a formação do precipitado DNA-fosfato de cálcio (25 e 50 μL), pode-se perceber que quando foram usados 50 μL de CaCl_2 , além dos precipitados, a maioria das células morreram, fato que foi verificado através do método de exclusão do corante azul de tripan em hemacitômetro. Este fenômeno foi sugerido como o motivo da diminuição na mediana de células fluorescentes de aproximadamente 2 vezes para o volume de 50 μL de CaCl_2 , quando comparado com o resultado encontrado quando o volume de CaCl_2 foi de 25 μL (Figura 4).

Entretanto, foi observado que a densidade celular para a transfecção usando o método de precipitação com fosfato de cálcio não teve um efeito tão expressivo na mediana de células fluorescentes (1,2 vezes) com 25% para $5 \times 10^5 \text{ cel/mL}$ e 30% para $1 \times 10^5 \text{ cel/mL}$ (Figura 4). A concentração de DNA que mostrou melhor eficiência, igual que para as transfecções com Cellfectin e ExGen500 foi 0,5 μg .

A intensidade de fluorescência determinada por citometria de fluxo para as células fluorescentes transfectadas por este método foi encontrada em 80 unidades de fluorescência (dados não apresentados), verificando o argumento de que a elevada porcentagem de células fluorescentes encontradas nas transfecções feitas com este método foi produto de algum artefato que interferiu na leitura no FACS.

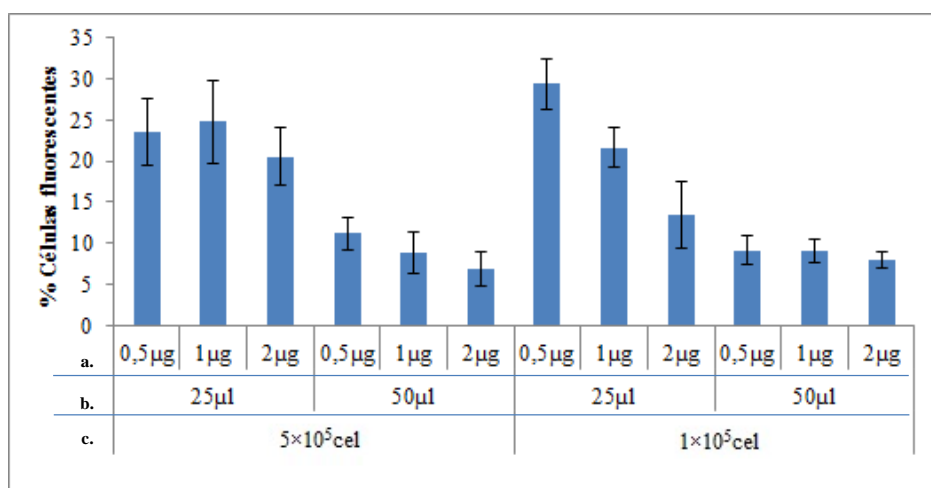


Figura 4: Mediana da porcentagem de células S2 fluorescentes transfectadas pelo método de precipitação com fosfato de cálcio. As células foram transfectadas em placa de 24 poços com volume de trabalho de 1 mL e usando meio SF900II. As condições usadas foram: **a.** Concentrações de DNA de 0,5; 1 e 2 μg ; **b.** Volumes de 25 e 50 μL de CaCl_2 para a formação do precipitado e **c.** Densidades de 1×10^5 e 5×10^5 células/poço. As células foram induzidas 24 horas depois da transfecção com CuSO_4 (numa concentração final de 700 μM). Uma amostra de 400 μL do cultivo foi retirada 48 horas após a indução, e analisada por citometria de fluxo. As células foram mantidas em incubadora a 28°C.

Com o intuito de avaliar a reprodutibilidade dos resultados, mais dois experimentos foram realizados em placa de 24 poços e analisados por citometria de fluxo. Estes

experimentos foram feitos partindo dos resultados apresentados anteriormente e usando aquelas condições de transfecção que foram identificadas como as que apresentaram as melhores porcentagens de células fluorescentes.

Pensando na possibilidade de que os artefatos encontrados na leitura do FACS das células transfectadas usando o fosfato de cálcio foram ocasionados por alguma interação entre a solução de transfecção e o meio de cultura, também foram avaliadas por citometria de fluxo as soluções de transfecção Cellfectin e ExGen500 sem conter o plasmídeo pMTEGFP. Os resultados de fluorescência basal gerados por estas soluções “controle” foram subtraídos dos resultados da porcentagem de células fluorescentes encontrados nas células transfectadas com cada agente respectivamente. Este fato diminuiu expressivamente os valores na porcentagem de células fluorescentes encontrados nas células transfectadas. De tal modo, o resultado da mediana de células fluorescentes destes experimentos foi encontrado em 0,5% de células fluorescentes nas transfecções feitas com Cellfectin e ExGen500. Contudo, permitiu observar novamente pouca diferença na porcentagem de células fluorescentes entre as transfecções feitas usando o Cellfectin e ExGen500, e ao mesmo tempo, se encontrou uma tendência de que baixas densidades celulares sejam capazes de gerar maior porcentagem de células fluorescentes. Novamente as células transfectadas com Fosfato de cálcio apresentaram aglomerados dificultando a análise.

Nestes experimentos também foi feita uma análise por microscopia de fluorescência (como do no item 4.6.1) das células transfectadas com Cellfectin e ExGen500 48 horas após a indução com CuSO_4 . As imagens obtidas podem ser observadas na Figura 5. Uma fluorescência muito fraca foi encontrada nas células transfectadas principalmente com ExGen500. Quando analisadas no microscópio as células transfectadas com Cellfectin apresentaram uma fluorescência mais clara, mesmo que na análise feita em FACS não fossem encontradas diferenças significativas entre estes dois agentes (Figura 3).

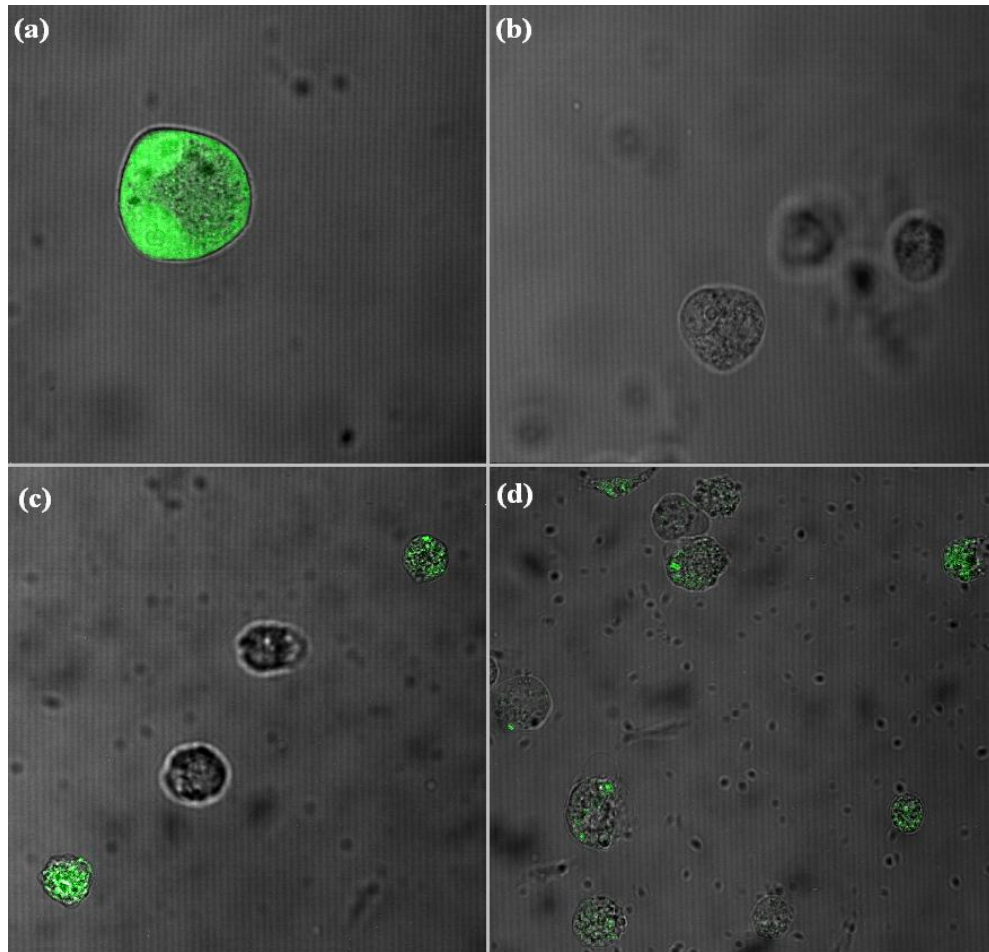


Figura 5: Microscopia de fluorescência de células S2 transfectadas com pMTEGFP, 48 horas após indução com CuSO_4 . (a) Células S2-MTEGFP, linhagem estável expressando EGFP. (b) S2 selvagem (c) Células S2 transfectadas com Cellfectin (d) S2 transfectadas com ExGen500.

5.1.2 Efeito do uso do Soro Fetal Bovino (SFB) na transfecção pelo método de precipitação com fosfato de cálcio - Experimento 2p

A transfecção com fosfato de cálcio provocou a formação de aglomerados nas células transfectadas. Com o intuito de diminuir este problema, foi avaliado o efeito de acrescentar 2% de soro fetal bovino (SFB) no meio SF900II. Para isso, foi feito um experimento em placa de 24 poços com volume de trabalho de 1 mL, usando diferentes esquemas na adição de SFB: 1) Sem presença de SFB. 2) Adição de 2% de SFB no meio SF900II adicionado 3,5 horas antes da transfecção. 3) Eliminação do meio das células na hora da transfecção, gotejamento da solução de transfecção sobre elas e adição de 800 μL de meio SF900II suplementado com 2% de SFB. Quatro horas após a transfecção foi trocado o meio das células transfectadas em todas as condições por 2mL de SF900II fresco (sem SFB).

As células que haviam sido transfetadas sem soro (condição 1), apresentaram a formação de grandes aglomerados visíveis uma hora após a transfecção. Na condição 2,

embora as células apresentassem melhor aspecto, ainda era visível a presença de alguns aglomerados. No entanto, na condição 3, a presença de aglomerados foi substancialmente diminuída (dados de porcentagem de células fluorescentes não apresentados).

A partir destes resultados foi empregada a condição 3 para as seguintes transfecções, unicamente para fosfato de cálcio. Um experimento com a finalidade de ilustrar as diferenças na expressão de EGFP na presença ou não de SFB (medida como porcentagem de células fluorescentes) foi realizado. Os resultados deste experimento se encontram na Figura 6. Como pode ser observado, a porcentagem de células fluorescentes quando foi usado o SFB, foi ainda maior que aquela encontrada no experimento usando o Cellfectin e o ExGen500 como métodos de transfecção (Figura 3). Diferente dos outros agentes de transfecção testados, quando usado o fosfato de cálcio não foram observadas amplas diferenças na expressão de EGFP como resultado do número de células usadas na transfecção com fosfato de cálcio.

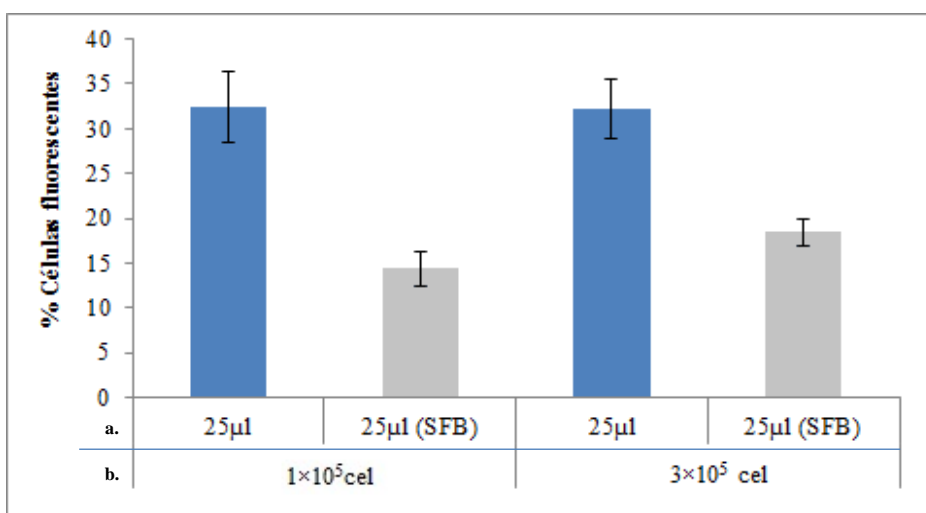


Figura 6: Mediana da porcentagem de células S2 fluorescentes transfectadas pelo método de precipitação com fosfato de cálcio. As células foram transfectadas em placa de 24 poços com volume de trabalho de 1 mL de meio SF900II. As condições usadas foram: **a.** Volume de 25 µL de CaCl_2 (2 M) foi usado para a formação do precipitado, SFB indica a adição de meio SF900II suplementado com 2% de soro fetal bovino na hora da transfecção e **b.** As densidades celulares usadas foram de 1×10^5 e 3×10^5 células/poço. A concentração de DNA usada neste experimento foi de 2 µg. As células foram induzidas 24 horas depois da transfecção com CuSO_4 (numa concentração final de 700µM). Uma amostra de 400 µL do cultivo foi retirada 48 horas após a indução, e analisada por citometria de fluxo. As células foram mantidas em incubadora a 28°C.

Neste experimento também foi feita uma análise por microscopia de fluorescência (como do item 4.6.1) das células transfectadas 48 horas após a indução com CuSO_4 . Pode ser observado na Figura 7 um aglomerado no caso da transfecção com fosfato de cálcio sem

adição de soro e uma marcante diminuição de aglomerados quando foi usado o SF900II suplementado com 2% de SFB no momento da transfecção.

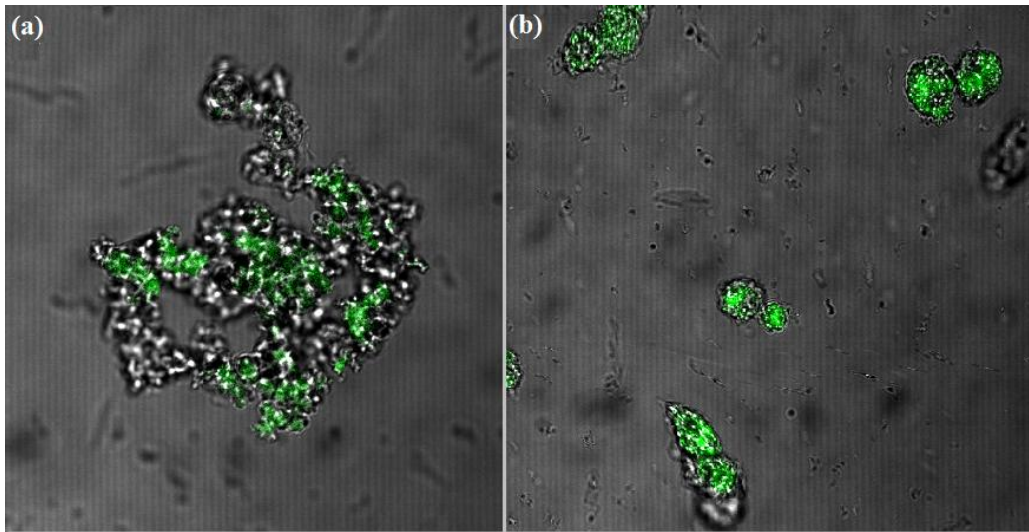


Figura 7: Microscopia de fluorescência de células S2 transfetadas com pMTEGFP, 48 horas após indução com CuSO_4 . (a) Células S2 transfetadas com fosfato de cálcio. (b) Células S2 transfetadas com fosfato de cálcio e suplementadas com 2% SFB.

Os experimentos realizados nesta parte do trabalho para a avaliação da expressão transiente em células S2 usando o plasmídeo repórter pMTEGFP nos permitiu identificar condições importantes de transfecção, validando que a concentração de DNA e o volume de agente de transfecção são parâmetros que precisam ser avaliados com cuidado, permitindo encontrar os valores mais adequados para a expressão do gene transfetado. A densidade celular também foi uma variável importante, mostrando que densidades baixas foram melhores na expressão de EGFP definida como mediana da porcentagem de células fluorescentes na análise por citometria de fluxo (Figura 3). Este fato deve ser melhor avaliado pois já tem sido relatado que células S2 apresentam dificuldade para crescer em densidades baixas (JORGE et al., 2008). A presença de fluorescência nas soluções de transfecção não contendo o plasmídeo pMTEGFP e os valores superiores na porcentagem de células fluorescentes encontrados nas células transfetadas com fosfato de cálcio dificultaram uma melhor padronização neste nível do trabalho. Visando cumprir nosso objetivo principal que era a avaliação da expressão transiente da glicoproteína do vírus da raiva (RVGP), foram realizados os experimentos de transfecção transiente do gene para expressão da RVGP.

5.2 Expressão Transiente de RVGP em células S2 cultivadas em placa

5.2.1 Efeito dos diferentes parâmetros para padronização da transfecção transiente da RVGP - Experimento 3p

O vetor pMTiRVGP contendo o gene para a expressão da glicoproteína do vírus da raiva foi amplificado em bactérias DH5 α e confirmada sua integridade pelo análise dos padrões de restrição observados em eletroforese em gel de agarose, esse plasmídeo foi usado para os experimentos de transfecção. Para esta etapa do trabalho aumentamos a escala dos experimentos para placa de 6 poços, com a finalidade de aumentar a concentração celular e aumentar a superfície de contato da solução de transfecção com as células.

Visando estabelecer as condições da transfecção transiente para expressão da RVGP foi feito um primeiro experimento em placa de 6 poços com um volume de trabalho de 2 mL. Foram avaliadas as densidades celulares de 1×10^6 células/poço e 8×10^5 células/poço, concentrações de DNA de 2 e 4 μg ; e um volume de 8 e 12 μL de Cellfectin; e 6,6 e 8 μL de ExGen500.

Na Figura 8 pode ser observado que, quando a concentração de DNA na solução de transfecção foi aumentada, a produção de RVGP cresceu em 30% para células transfectadas com ExGen500 (aproximadamente 1,2 vezes na densidade celular de 8×10^5 células/poço) e 40% para células transfectadas com Cellfectin (aproximadamente 1,4 vezes), atingindo aproximadamente $70 \text{ ng}/10^7$ células nos dois casos.

Contrário aos resultados encontrados nos experimentos da expressão de EGFP, os quais mostravam uma evidência de que a densidade celular afetava a porcentagem de células fluorescentes, a expressão da RVGP. Neste experimento não observou-se diferenças amplas e conclusivas entre as densidades avaliadas.

Ainda neste experimento, a comparação dos agentes de transfecção ExGen500 e Cellfectin não mostrou diferenças significativas na expressão da RVGP, atingindo uma produção máxima de $70 \text{ ng}/10^7$ células com os dois agentes (Figura 8). No entanto, com o fosfato de cálcio, pode ser observado uma expressão de RVGP 3,5 vezes menor, indicando que a alta porcentagem de células fluorescentes, observada nas transfecções com pMTEGFP, poderia ser provocada pela presença de artefatos.

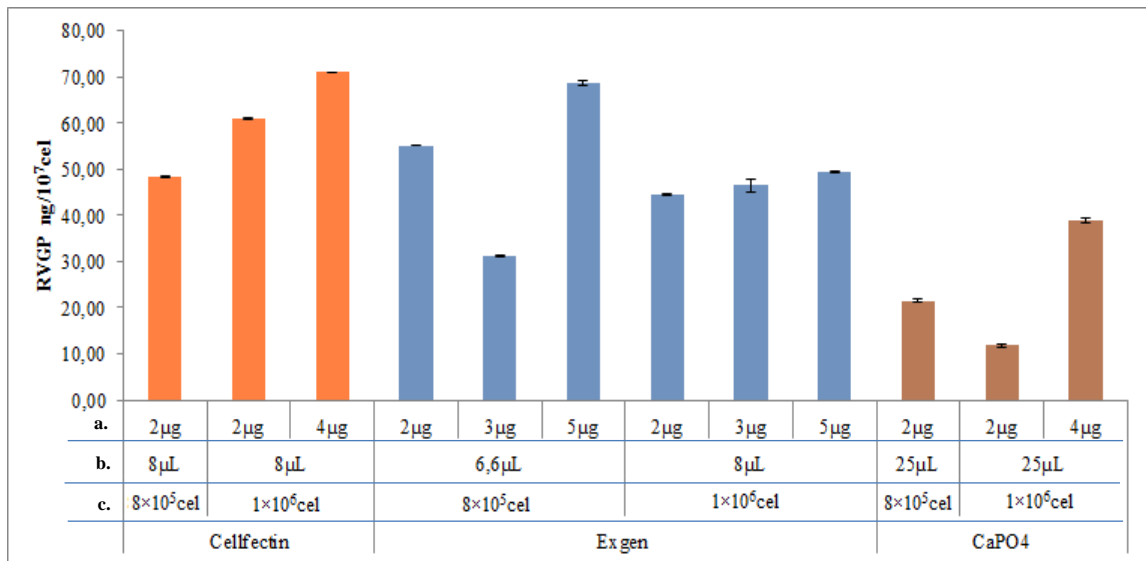


Figura 8: Expressão de RVGP (ng/10⁷ cel) em células S2 transfectadas com ExGen500, Cellfectin e Fosfato de cálcio. As células foram transfectadas em placa de 6 poços, com volume de trabalho de 2 mL de meio SF900II. Foram avaliadas em **a.** Concentrações de pMtiRVGP de 2, 4 e 5 µg, em **b.** Volumes de ExGen500 de 6,6 e 8 µL; volumes de Cellfectin de 8 e 12 µL e 25 µL de CaCl₂ (2 M para formação do precipitado com fosfato de cálcio, e em **c.** Densidades celulares de 8 × 10⁵ cel/poço e 1 × 10⁶ cel/poço. As células foram induzidas 24 horas depois da transfecção com CuSO₄ (numa concentração final de 700 µM). Uma amostra contendo 1 × 10⁶ cel foi retirada 48 horas após a indução e analisada por método de ELISA. As células foram mantidas em incubadora a 28°C. As barras correspondem ao desvio padrão das medidas.

5.2.2 Efeito da concentração de DNA na transfecção transiente de RVGP- Experimento 4p

Uma vez que a densidade celular não pareceu afetar amplamente na expressão da RVGP realizamos um experimento onde a densidade celular foi fixada em 1 × 10⁶ células/poço. No experimento anterior foi observado aumento da expressão (aproximadamente 40%) quando foi aumentada a concentração de DNA (Figura 8). Por isto, foi realizado um experimento onde foram testadas concentrações de DNA de 5; 10 e 15 µg, com o intuito de verificar o efeito da concentração do DNA sobre a expressão da RVGP. A quantidade de agente de transfecção foi mantida constante em cada caso, sendo de 15 µL para Cellfectin (analisando as relações 1:1; 1:1,5 e 1:3 de DNA:Lipossomo), 10 µL para ExGen500 (analisando as relações 1:1; 1:1,5 e 1:2 de DNA:PEI) e para fosfato de cálcio 25 µL de CaCl₂ (2 M).

Como pode ser observado na Figura 9, as células transfectadas com Cellfectin mostraram 30% (1,3 vezes) mais na expressão de RVGP atingindo 80 ng/10⁷ células, comparada com a expressão de RVGP de 60 ng/10⁷ células quando o agente usado foi o ExGen500.

A concentração de DNA que mostrou os melhores resultados foi de 10 μg para os dois casos, numa relação 1:1 no caso DNA:ExGen500 e 1:1,5 no caso DNA: Cellfectin (Figura 9).

Também a partir das concentrações de DNA avaliadas, foi observado que quantidades acima de 15 μg de DNA no volume de trabalho usado diminuíram a expressão de RVGP em 50% (1,5 vezes) para ExGen500 e 60% (1,6 vezes) para Cellfectin. Um experimento anterior havia sido feito avaliando também uma concentração de 20 μg de DNA e comportamentos similares foram encontrados (dados não mostrados).

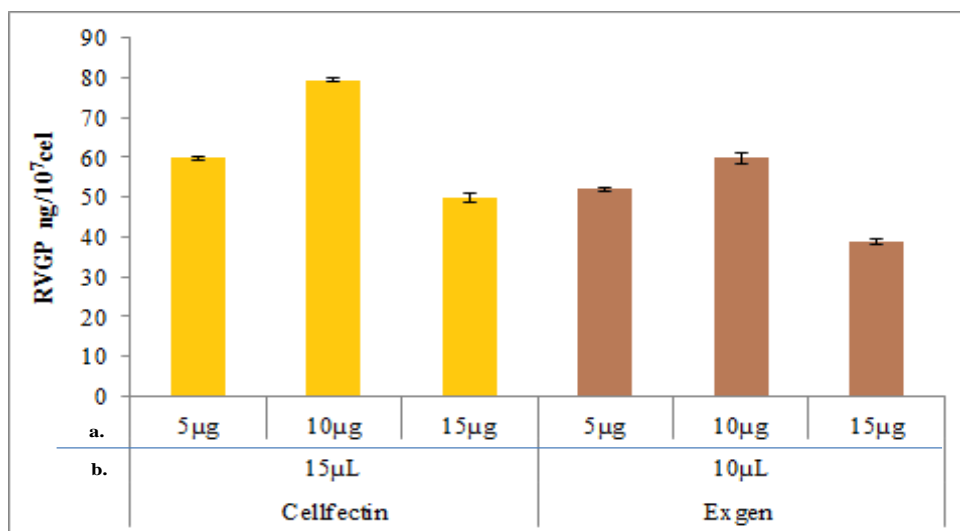


Figura 9: Expressão de RVGP ($\text{ng}/10^7$ cel) em células S2 transfectadas com ExGen500 e Cellfectin. As células foram transfectadas em placa de 6 poços, com volume de trabalho de 2 mL de meio SF900II e uma densidade celular de 1×10^6 cel/poço. Foram avaliadas as concentrações de 5; 10 e 15 μg de pMtiRVGP, o volume de ExGen500 usado foi de 10 μL e o volume de Cellfectin foi de 15 μL . As células foram induzidas 24 horas depois da transfecção com CuSO_4 (numa concentração final de $700 \mu\text{M}$). Uma amostra contendo 1×10^6 cel foi retirada 48 horas após a indução e analisada por método de ELISA. As células foram mantidas em incubadora a 28°C . As barras correspondem ao desvio padrão das medidas.

Devido aos resultados baixos (20-30 $\text{ng}/10^7$ células) apresentados para fosfato de cálcio no experimento anterior (Figura 8), um experimento foi realizado avaliando o uso de 50 μL de CaCl_2 . No entanto, apesar da presença do soro fetal bovino, a elevada concentração de cálcio provocou novamente a formação de muitos aglomerados que resultaram em uma desprezível expressão de RVGP (dados não mostrados).

5.2.3 Otimização da transfecção transiente de RVGP com Fosfato de cálcio- Experimento 5p

A transfecção usando o fosfato de cálcio como veículo de transfecção até o momento tinha gerado alguns imprevistos. Tentando otimizar os resultados para este agente, foi feito um experimento em frasco T-25 com um volume de trabalho de 5 mL, usando uma densidade

celular de 1×10^6 cel/mL e uma concentração de DNA de 5 e 15 μ g. Estas últimas, em virtude do aumento na expressão de RVGP, possivelmente associado ao aumento na concentração de DNA (Figura 8) e a fim de comparar com os resultados do experimento 4p.

Choques osmóticos com glicerol têm sido relatados como estratégia para melhorar a eficiência da transfecção em células de mamíferos (GORMAN et al., 1983; GROSJEAN et al., 2006) Por esta razão, foi realizado um experimento onde foi avaliado o efeito de submeter as células a um choque osmótico duas horas após a transfecção com glicerol 12% por 1 minuto. Para isto, as células foram lavadas duas vezes com meio SF900II, submetidas ao choque com 1,5 mL de Glicerol (12%) por 1 minuto (tempo escolhido depois de testes prévios de citotoxicidade) e depois lavadas novamente 2 vezes com meio e deixadas com 2 mL de SF900II fresco e incubadas até a indução e a análise para RVGP. Também neste experimento foi testado o efeito de re-transfectar as células, com o intuito de determinar se este procedimento aumentava a produção de RVGP. Deste modo, as células de um cultivo com 96 horas de indução foram re-transfectadas, induzidas novamente e analisadas nos tempos de 48 e 72 horas após a indução.

Os resultados deste experimento apresentados na Figura 10 mostram uma expressão de RVGP de 60-70 ng/ 10^7 células com um aumento de 2 vezes em relação as transfecções realizadas em microplacas de 6 poços (20-30ng/ 10^7 células) (Figura 8).

Não foi possível observar amplas diferenças entre as duas concentrações de DNA avaliadas, e a inibição da expressão de RVGP como resultado da concentração de DNA (Figura 9), não foi registrada devido à que a proporção total de células usadas neste experimento foi maior, precisando também de mais DNA para a transfecção.

No referente ao teste com glicerol, não foi encontrada diferença na expressão da RVGP (60 ng/ 10^7 células), quando comparada com o controle, sem choque com glicerol (65 ng/ 10^7 células) (Figura 10). Os resultados apresentados são uma média de dois experimentos.

Quanto à “re-transfecção” o aumento na expressão foi de 15% (1,2 vezes), passando de 58-65 ng/ 10^7 células na primeira transfecção a 70-75 ng/ 10^7 células na “re-transfecção” (Figura 10). No entanto, foi reconhecida uma desvantagem inerente ao uso de células com estados fisiológicos diferentes, devida ao uso dos diferentes métodos que constituiria uma variável difícil de controlar.

O volume de cultura neste experimento permitiu a amostragem para análise de ELISA nas 48 e 72 horas após a indução com CuSO_4 , possibilitando-nos analisar o comportamento da expressão transiente da RVGP no tempo. Neste sentido, pode ser observada na Figura 10 que parece ocorrer uma queda na expressão da proteína após 72 horas em quase todas as condições (exceto na “retransfecção” com 15 μg), que poderia estar associada possivelmente à perda do plasmídeo na divisão celular.

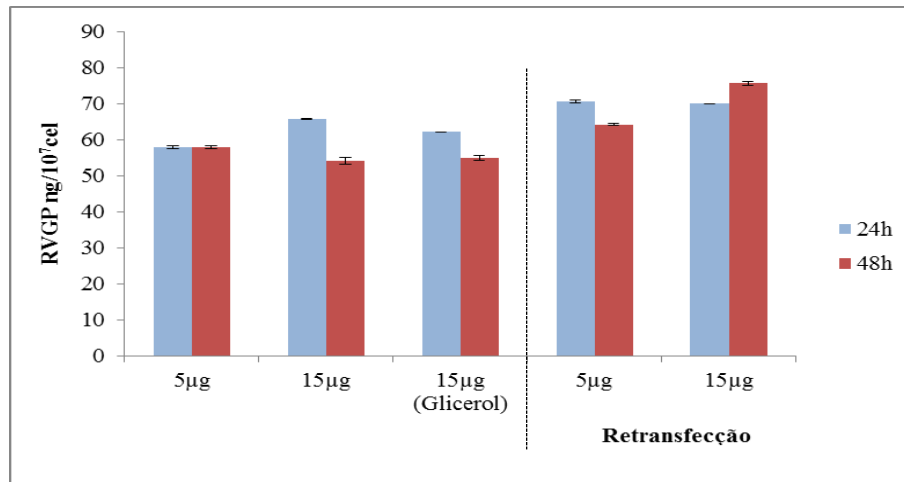


Figura 10: Expressão de RVGP ($\text{ng}/10^7$ cel) em células S2 transfectadas com o método de precipitação com fosfato de cálcio. As células foram transfectadas em garrafa de cultura T-25, com volume de trabalho de 5 mL de meio SF900II e uma densidade celular de 1×10^6 cel/mL. Foram avaliadas as concentrações de 5 e 15 μg de pMtiRVGP, o volume de CaCl_2 (2 M) usado para formação do precipitado foi de 25 μL . Duas horas após a transfecção as células de uma garrafa foram submetidas ao choque osmótico com 1,5 mL de Glicerol (12%) por 1 minuto, lavadas e levadas novamente a incubação com meio SF900II fresco. As células foram induzidas 24 horas depois da transfecção com CuSO_4 (numa concentração final de $700 \mu\text{M}$). Uma amostra contendo 1×10^6 cel foi retirada 48 e 72 horas após a indução e analisada por método de ELISA. Uma re-transfecção foi feita com células que levavam 96 horas de indução (mesmas condições de DNA e CaCl_2) e submetidas a indução e amostragem do mesmo modo que citado anteriormente. As células foram mantidas em incubadora a 28°C . As barras correspondem ao desvio padrão das medidas.

5.3 Expressão Transiente de RVGP em células S2 cultivadas em Frasco Agitado

Os resultados de expressão transiente de RVGP obtidos em transfecção em garrafa T-25 (Figura 10) nos permitiram analisar melhor o comportamento da expressão ao longo do tempo e também levaram a um aumento da proteína. Este fenômeno nos motivou a dar continuidade ao escalonamento do processo planejado nos objetivos de nosso trabalho. Nesta etapa foi incluído um novo agente baseado em PEI (JetPEI), porque ele apresentou menor custo.

Resultados de estudos anteriores de expressão estável comparando a expressão de RVGP a partir de populações celulares transfectadas com construções plasmidiais contendo ou não o sinal de secreção da proteína BiP (*Immunoglobulin heavy chain binding protein*), mostraram

diferenças na expressão da RVGP (LEMOS et al., 2009). Baseados nisso, realizamos uma comparação da expressão transiente de RVGP em células S2 cultivadas em frasco agitado usando o plasmídeo pMTiRVGP (com sinal BiP), e o plasmídeo pMTRVGP (sem sinal BiP). O procedimento para amplificação e verificação do vetor pMTRVGP foi igual ao descrito no item 5.2.1.

5.3.1 Expressão transiente de RVGP usando o plasmídeo pMTiRVGP- Experimento 1s

Este experimento foi realizado usando o plasmídeo pMTiRVGP (com sinal Bip), em frasco de cultura tipo Schott de 100 mL, meio SF900II, temperatura de 28° C, agitação orbital de 100 rpm e um volume de trabalho de 15 mL. O protocolo usado para esta transfecção foi baseado no descrito por Buchs et al., 2009 para células Sf21 (item 5.5). Foi usada uma relação 1:3 no caso DNA: Lipossomo e uma relação 1:2 no caso DNA: PEI. A densidade celular foi de 1×10^6 cel/mL, a concentração de DNA usada foi de 15 µg e os volumes de agente de transfecção usados foram de 45 µL de Cellfectin, 30 µL de ExGen500 e JetPEI e um volume de 50 µL de CaCl₂ (2 M) foi usado na formação do precipitado para fosfato de cálcio.

O cultivo em suspensão permitiu realizar uma análise da produção de RVGP mais detalhada, identificando tanto a produção de RVGP (ng/10⁷células) no tempo, assim como a produção volumétrica (ng/mL) e finalmente determinar a produção máxima para cada agente avaliado.

Como pode ser observado na Figura 11 (A) a produção da RVGP nas células transfectadas com Cellfectin apresentou um pico às 72 horas após a transfecção (48 horas após a indução), com aproximadamente 140 ng/10⁷células. Entretanto, o pico para ExGen500 e JetPEI foi encontrado 96 horas após a transfecção (72 horas após a indução), com aproximadamente 160 ng/10⁷células e 165 ng/10⁷células, respectivamente. Diferente do comportamento em cultura estática onde a maior produção de RVGP foi observada em células transfectadas com Cellfectin, no cultivo em frasco agitado os agentes baseados no polímero catiônico sintético (PEI linear 22 kDa) geraram até 15% mais de RVGP 96 horas após a transfecção em relação aos demais agentes. As células transfectadas com fosfato de cálcio apresentaram o pico de produção 48 horas após a transfecção (24 horas de indução) com aproximadamente 160 ng/10⁷células, e depois mantiveram a RVGP em aproximadamente 110 ng/10⁷células.

Na Figura 11 (B), ao analisarmos a produção volumétrica da expressão transiente de RVGP usando o plasmídeo pMTiRVGP pudemos identificar comportamentos similares nos agentes de transfecção baseados no PEI linear 22 kDa (ExGen500 e JetPEI). A produção da RVGP apresenta um comportamento crescente, possivelmente devido ao acúmulo de expressão proteica ligado ao crescimento celular, atingindo uma concentração máxima de aproximadamente 190 ng/mL de RVGP.

A produção da RVGP em células transfectadas com Cellfectin, como observado para a expressão por célula, apresentou um pico de produção 72 horas após a transfecção com aproximadamente 170 ng/mL. No entanto, foi observada uma queda importante de 20 ng/mL na produção, isto provocado possivelmente pela degradação ou denaturação da proteína, fato que já tem sido observado em transfecção estável.

Embora o pico para fosfato de cálcio tenha sido encontrado nas primeiras 24 horas de indução, a produção volumétrica é maior às 48 horas de indução atingindo 150 ng/mL de RVGP, resultando em um valor maior de RVGP acumulada.

Na Figura 11 (C) estão apresentadas as cinéticas de crescimento das células transfectadas com cada um dos agentes. Como pode ser observado, em todos os casos as concentrações obtidas são similares (aproximadas de $1,4 \times 10^7$ cel/mL) durante as 96 horas do cultivo. Este comportamento indica pouco efeito do veículo de transfecção no crescimento celular.

Estas células foram submetidas à imunoensaio 48 horas após a indução com CuSO_4 , conforme descrito em 4.7.1 e analisadas em microscopia de fluorescência. Nas imagens obtidas na Figura 12, é possível notar a marcação com anticorpo anti RVGP nas células transfectadas com fosfato de cálcio, Cellfectin, ExGen500 e JetPEI. Porém, como pode ser observado poucas células se encontram expressando a RVGP.

Foi realizada uma análise estatística para estudar a presença de diferenças significativas entre os diferentes métodos de transfecção avaliados e entre os diferentes tempos de análise. Na análise de ANOVA não foram encontradas diferenças significativas, nem para os métodos, nem para os tempos de análise. Na Figura 13 está ilustrado o resultado da análise de TUKEY para os diferentes métodos de transfecção, e pode ser verificado o resultado de ANOVA, pois as médias de produção encontram-se dentro dos desvios padrões de cada método.

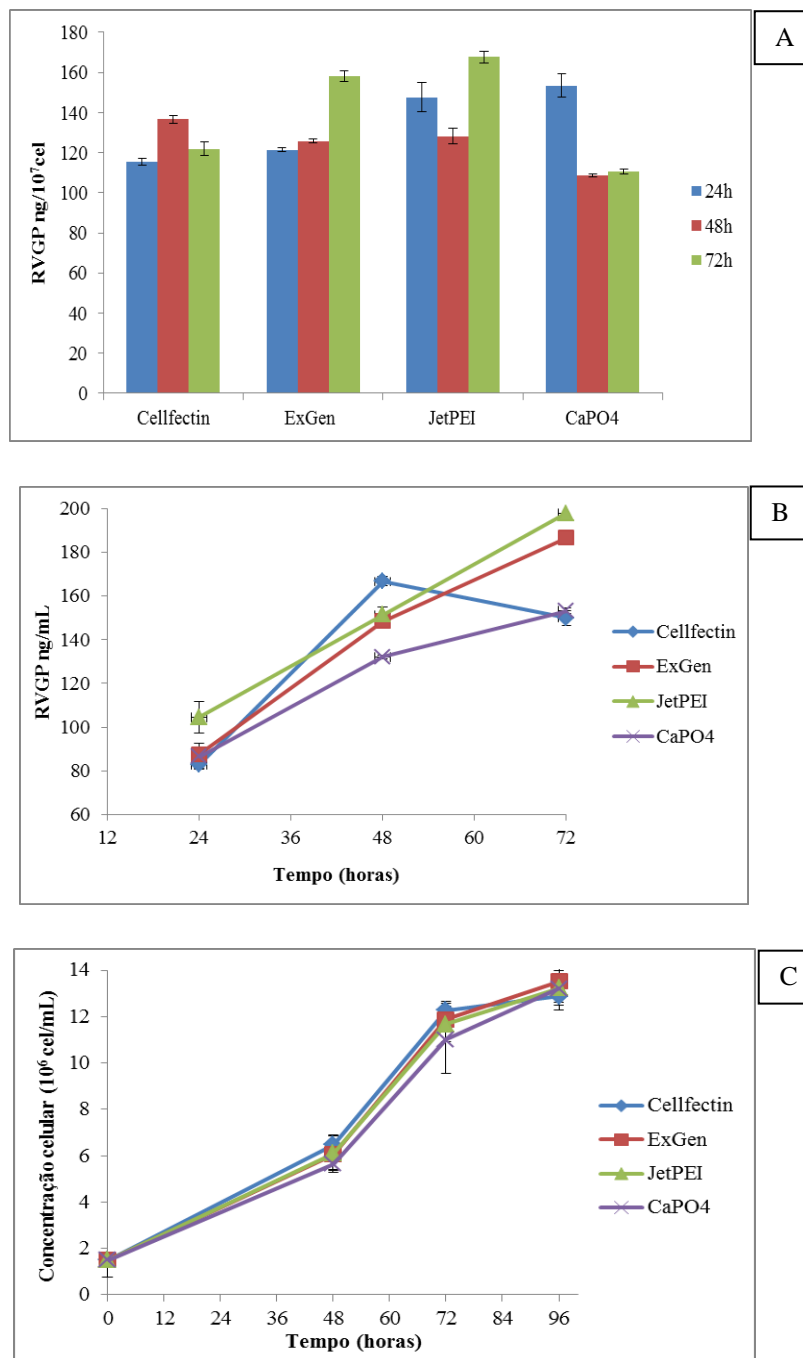


Figura 11: Células S2 transfectadas com Cellfectin, ExGen500, JetPEI e fosfato de cálcio. As células foram transfectadas em frasco agitado tipo “schott” de 100mL, com volume de trabalho de 15 mL de meio SF900II e uma densidade celular de 1×10^6 cel/ mL. A concentração de pMTiRVGP usada foi de $15 \mu\text{g}$ e os volumes de agentes de transfecção usados foram de $45 \mu\text{L}$ de Cellfectin, $30 \mu\text{L}$ ExGen500; e um volume de $50 \mu\text{L}$ de CaCl_2 (2 M) para a formação do precipitado com fosfato de cálcio. As células foram induzidas 24 horas depois da transfecção com CuSO_4 (numa concentração final de $700 \mu\text{M}$). Uma amostra contendo 1×10^6 cel foi retirada 24, 48 e 72 horas após a indução e analisada pelo método de ELISA. As células foram mantidas em incubadora a 28°C com agitação orbital de 100 rpm. Em (A) esta representada a expressão de RVGP ($\text{ng}/10^7$ cel), em (B) está representada a expressão volumétrica de RVGP por mL de meio (ng/mL) e em (C) se encontra a concentração celular ao longo do experimento (10^6 cel/mL). As barras correspondem ao desvio padrão das medidas.

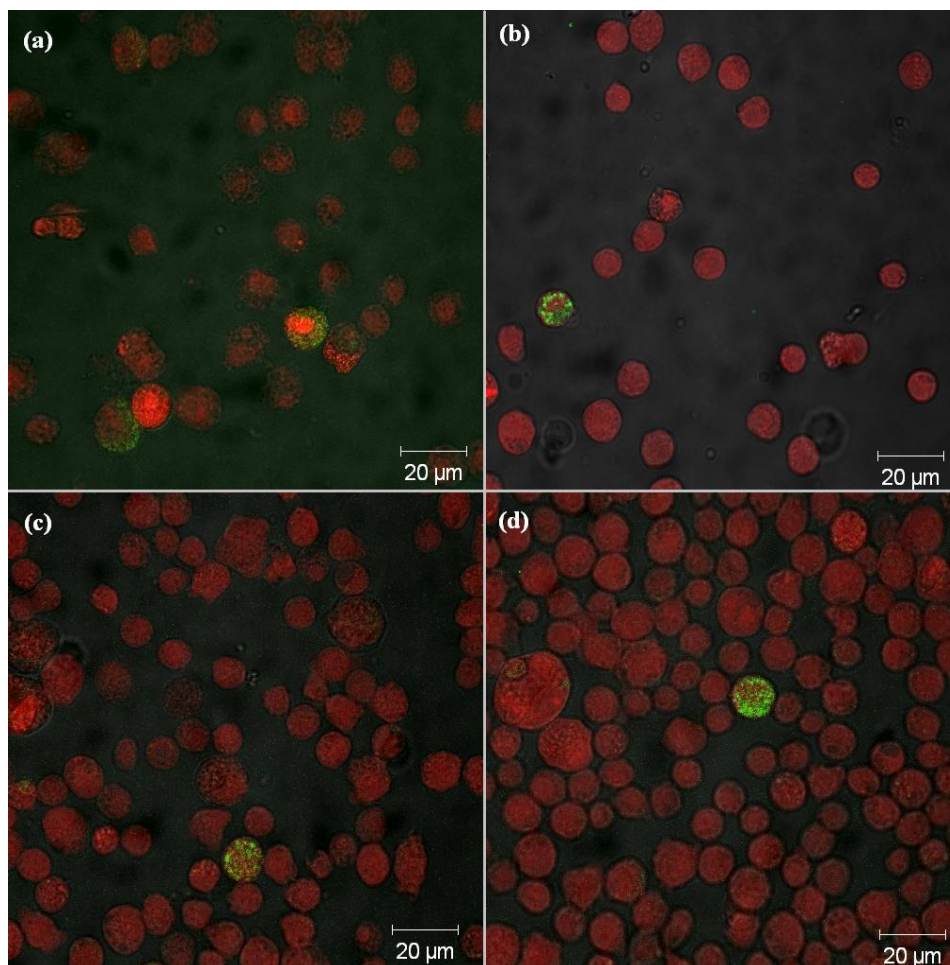


Figura 12: Microscopia de imunofluorescência indireta de células S2 transfetadas com pMtiRVGP, 48 horas após indução com CuSO_4 . (a) Células S2 transfetadas com fosfato de cálcio. (b) Células S2 transfetadas com Cellfectin (c) Células S2 transfetadas com ExGen500 (d) Células S2 transfetadas com JetPEI.

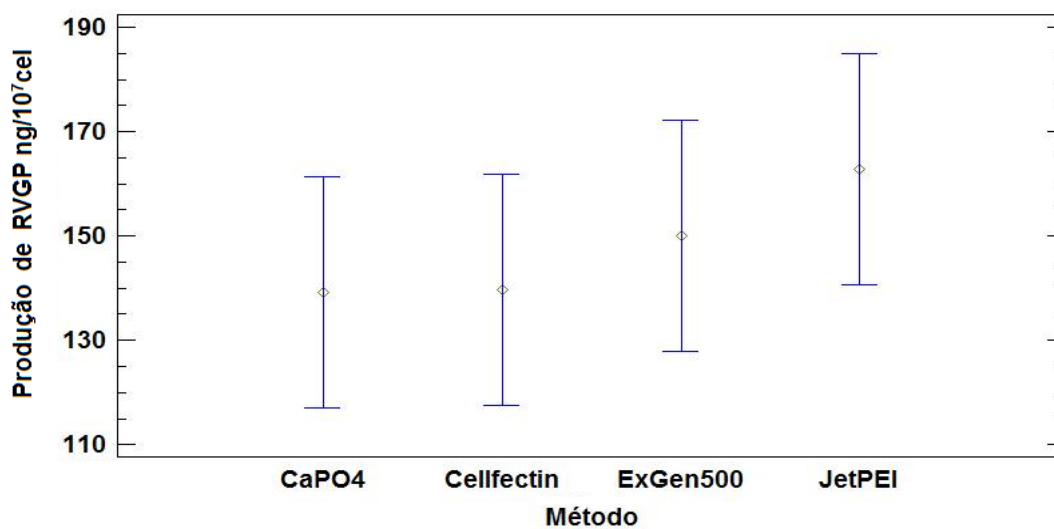


Figura 13: Análise estatística de TUKEY das médias de expressão de RVGP dos diferentes métodos de transfecção. O nível de significância foi de 95%.

Neste experimento, foi feita uma análise do consumo de aminoácidos segundo procedimento descrito no item 4.4.5. Na Figura 14 se encontram apresentados os aminoácidos que tem sido reconhecido previamente como limitantes para o crescimento de células de inseto (SWIECH, 2007).

Foi encontrado que o único aminoácido que esgotou em todas as condições de transfecção foi a Cisteína, iniciando o cultivo numa concentração de aproximadamente 2,5mM e atingindo entre 0,4 e 0,6mM às 96 horas de cultivo; sendo que para as células transfectadas com ExGen500 ele zerou. Depois da Cisteína os aminoácidos mais consumidos foram a Serina e a Prolina. A Glutamina por sua vez não foi totalmente consumida, devido a sua alta concentração (40mM) no início do cultivo Figura 14.

O consumo dos aminoácidos observado nos diferentes agentes de transfecção foi similar para Cellfectin, Fosfato de cálcio e JetPEI Figura 14 (a,b,c). Para o caso do ExGen500 pode ser observado um maior consumo de todos os aminoácidos Figura 14 (d).

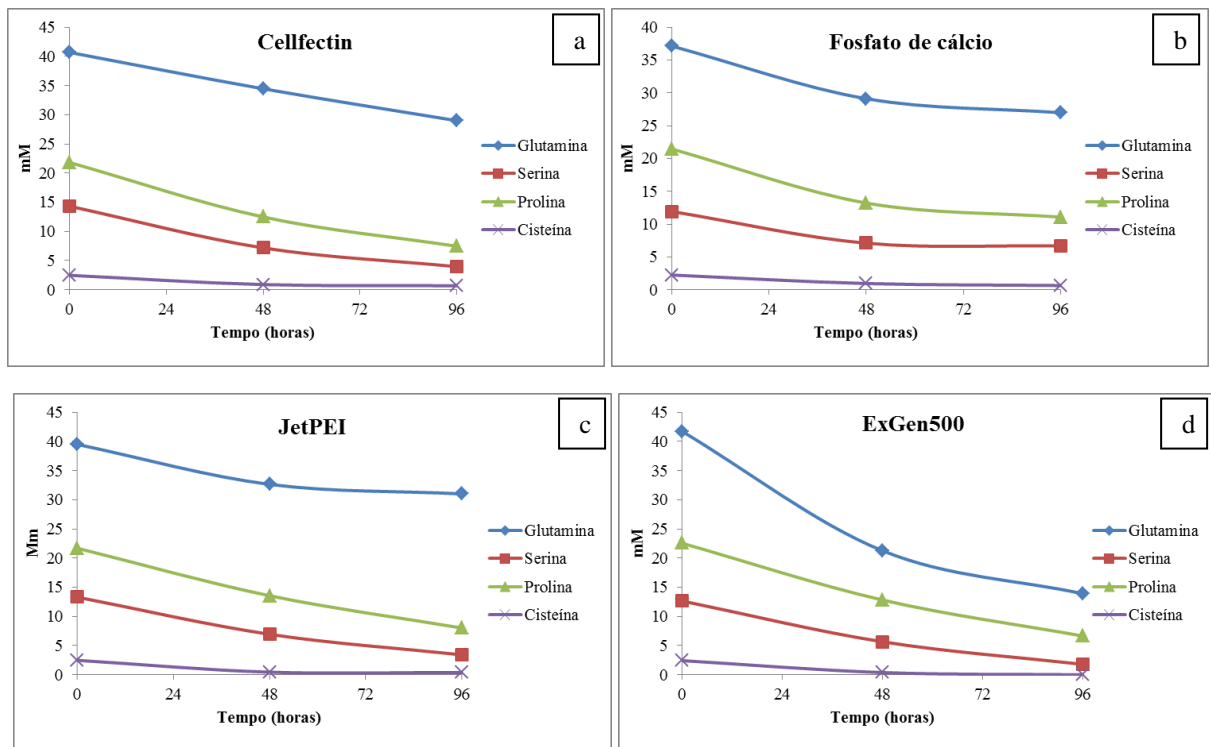


Figura 14: Consumo de aminoácidos (concentração mM) em células S2 transfectadas com pMtiRVGP, mantidas em cultivo por 96 horas. (a) Células S2 transfectadas com Cellfectin. (b) Células S2 transfectadas com fosfato de cálcio. (c) Células S2 transfectadas com JetPEI (d) Células S2 transfectadas com ExGen500.

5.3.2 Expressão transiente de RVGP usando o plasmídeo pMTRVGP- Experimento 2s

Um experimento foi realizado com o plasmídeo pMTRVGP (sem sinal BiP) e os resultados foram comparados com os resultados da expressão obtida no experimento anterior.

Este experimento também foi realizado em frasco Schott de 100 mL, com meio SF900II, agitação orbital de 100 rpm e um volume de trabalho de 15 mL. As condições avaliadas foram as mesmas que para o experimento anterior.

As produções de RVGP foram reduzidas significativamente quando o plasmídeo sem conter o sinal BiP (pMTRVGP) foi usado para realizar a transfecção. Como pode ser observado na Figura 15 (A), a expressão de RVGP nas células transfectadas com Cellfectin, ExGen500 e Fosfato de cálcio foi menor do que $60 \text{ ng}/10^7$ células, sendo ao redor de 3 vezes mais baixa quando comparada com a produção de RVGP obtida no experimento onde foi utilizado o plasmídeo contendo o sinal BiP (Figura 11 (A)). Entretanto, para JetPEI essa diminuição na produção não foi significativa, sendo que para pMTiRVGP foi de $160 \text{ ng}/10^7$ células e para pMTRVGP foi de aproximadamente $120 \text{ ng}/10^7$ células (30% menos).

Novamente o pico de expressão das células transfectadas com Cellfectin foi encontrado às 48 horas pós indução com aproximadamente $50 \text{ ng}/10^7$ células, concordando com o padrão de produção do experimento anterior (Figura 15 (A)).

O comportamento das células transfectadas com fosfato de cálcio semelhante ao experimento 1s mostrou um pico nas primeiras 24 horas de indução, com $40 \text{ ng}/10^7$ células e depois se manteve em $30 \text{ ng}/10^7$ células (Figura 15 (A)).

Neste experimento foi feita uma análise 96 horas após a indução, para determinar o comportamento de expressão transiente ao longo do tempo. Baseados no experimento 1s, para ExGen500 e JetPEI o pico de expressão foi situado 72 horas após a indução, não permitindo concluir se era este mesmo o momento da expressão máxima de RVGP para estes agentes. Como pode ser observada na Figura 15 (A), a expressão diminuiu depois das 72 horas em todos os agentes testados, este comportamento pode ser atribuído a que o número de células expressando RVGP diminui devido ao crescimento e duplicação celular; fato que leva à uma perda do plasmídeo (LAM e CULLIS, 2000).

Na análise da produção volumétrica apresentada na Figura 15 (B), pode se notar igualmente a superioridade dos resultados da expressão quando o agente de transfecção foi o JetPEI chegando em 96 horas numa produção máxima de $160 \text{ ng}/\text{mL}$, 4 vezes maior que os outros agentes. A expressão apresentou um comportamento linear até 72 horas de indução, e após esse período a produção aumentou discretamente acompanhando o crescimento celular (RVGP acumulada).

Para o caso das células transfectadas com Cellfectin a expressão dobrou nas primeiras 48 horas de indução de 20 ng/mL para 40 ng/mL e depois disso foi observado um aumento discreto como resultado do crescimento celular, atingindo uma concentração máxima de RVGP de 55 ng/mL (Figura 15 (B)).

A expressão de RVGP observada nas células transfectadas com ExGen500 mostrou um pico em 72 horas de indução atingindo a produção máxima com 60 ng/mL, mas depois disto não consegue manter a RVGP acumulada, gerando uma queda na produção volumétrica (Figura 15 (B)).

A expressão da RVGP observada nas células transfectadas com fosfato de cálcio atingiu às 96 horas de indução apenas 40 ng/mL, sendo para este experimento o agente com o nível de expressão mais baixa. Embora o pico da produção de RVGP por célula seja comparável com a produção encontrada para Cellfectin e ExGen500 (40 ng/10⁷ células) (Figura 15 (A)), a queda nos seguintes três pontos, somado ao fato de que as células transfectadas com fosfato de cálcio apresentaram um crescimento celular menor (Figura 15 (C)), não permitiram obter a mesma quantidade de RVGP da obtida obtidos nas células transfectadas com ExGen500 e Cellfectin.

Na Figura 15 (C) podem ser observados os dados das cinéticas de crescimento obtidas para este experimento. Novamente não foram encontradas diferenças significativas de crescimento entre as células submetidas aos diferentes agentes de transfecção. No entanto, cabe notar nesta mesma figura, uma ligeira queda na cinética de crescimento nas células transfectadas com fosfato de cálcio a partir das 48 horas de cultivo.

Com o intuito de verificar estes comportamentos de produção em placa, foi feito um experimento mudando o esquema para obtenção de amostras (metodologia 5.5.2), e então foram extraídas amostras de 1×10⁶ cel/mL nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a indução com CuSO₄. No entanto, nos dois experimentos realizados nestas condições, a expressão de RVGP foi muito baixa (dados não mostrados), fato que nos leva a pensar que uma excessiva manipulação na placa (descolamento das células para contagem e amostragem) afetou a expressão da RVGP, pois foi observado que elas não conseguem aderir de novo na placa de maneira eficiente. Este fenômeno foi mais notório quando o agente usado foi o JetPEI, provavelmente por ele ter uma concentração de PEI maior do que o ExGen500, e que também mostrou ser mais tóxico quando usado em relações de 1:3 e 1:4 (DNA:JetPEI) (dados não mostrados).

Estas células foram submetidas à imunoensaio 48 horas após a indução, conforme descrito em 4.7.1 e analisadas em microscópio de fluorescência. A Figura 16 apresenta as imagens obtidas. É possível notar a marcação com anticorpo anti RVGP nas células transfectadas com Cellfectin, ExGen500 e JetPEI. Similarmente aos resultados obtidos no experimento 1s pode ser observado novamente um número baixo de células expressando RVGP.

Foi realizada uma análise estatística para estudar a presença de diferenças significativas entre os diferentes métodos de transfecção avaliados e entre os diferentes tempos de análise. Na análise de ANOVA no experimento usando o plasmídeo não contendo o sinal BiP, não foram encontradas diferenças significativas para os tempos de análise, nem para os métodos Cellfectin, ExGen500 e fosfato de cálcio, no entanto, foram encontradas diferenças significativas na produção de RVGP nas células transfectadas com JetPEI. Na Figura 17 está ilustrado o resultado da análise de TUKEY para os diferentes métodos de transfecção, e pode ser verificado o resultado de ANOVA, pois a médias de produção do JetPEI encontra-se fora dos desvios padrões dos outros três métodos.

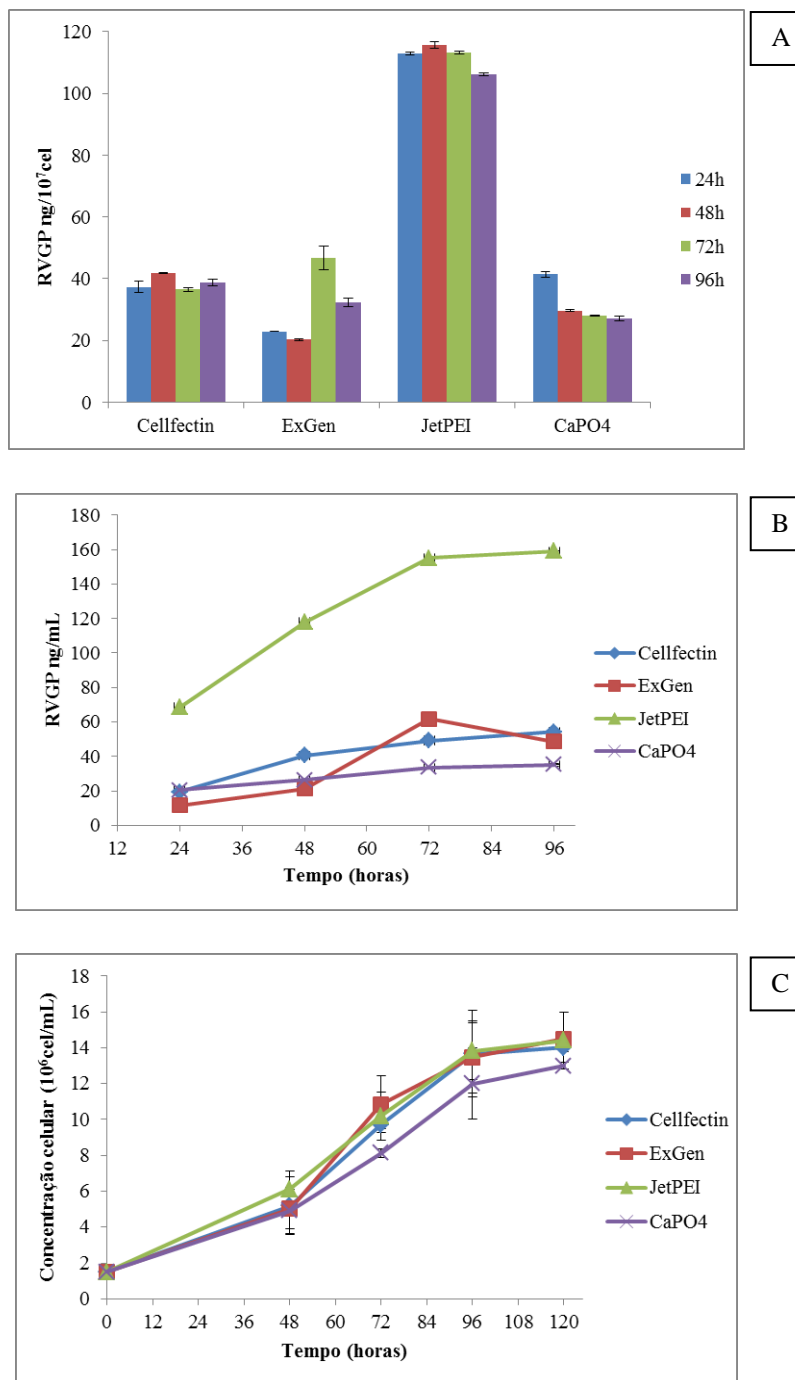


Figura 15: Células S2 transfectadas com Cellfectin, ExGen500, JetPEI e fosfato de cálcio. As células foram transfectadas em frasco agitado tipo “schott” de 100mL, com volume de trabalho de 15 mL de meio SF900II e uma densidade celular de 1×10^6 cel/ mL. A concentração de pMTRVGP usada foi de 15 μ g e os volumes de agentes de transfecção usados foram de 45 μ L de Cellfectin, 30 μ L ExGen500; e um volume de 50 μ L de CaCl_2 (2 M) para a formação do precipitado com fosfato de cálcio. As células foram induzidas 24 horas depois da transfecção com CuSO_4 (numa concentração final de 700 μ M). Uma amostra contendo 1×10^6 cel foi retirada 24, 48, 72 e 96 horas após a indução e analisada pelo método de ELISA. As células foram mantidas em incubadora a 28°C com agitação orbital de 100 rpm. Em (A) esta representada a expressão de RVGP (ng/10⁷ cel), em (B) está representada a expressão volumétrica de RVGP por mL de meio (ng/mL) e em (C) se encontra a concentração celular ao longo do experimento (10⁶ cel/mL). As barras correspondem ao desvio padrão das medidas.

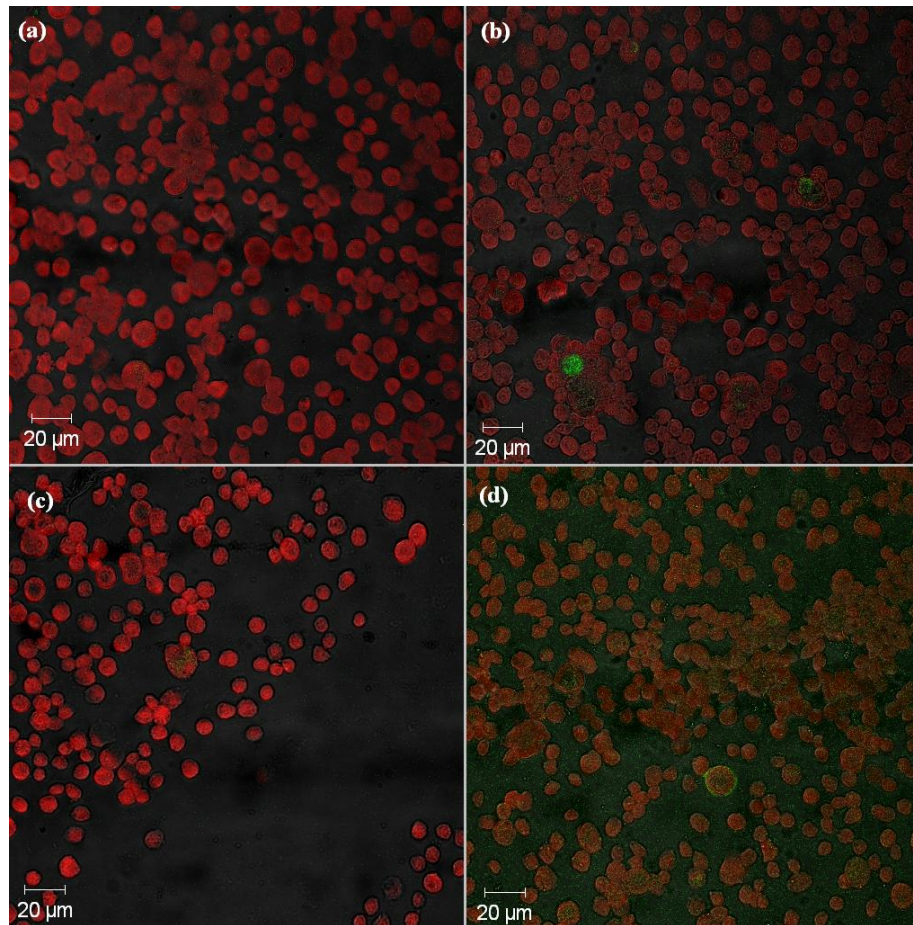


Figura 16: Microscopia confocal de imunofluorescência indireta de células S2 transfetadas com pMtRVGP, 48 horas após indução com CuSO_4 . (a) S2 selvagem (b) Células S2 transfetadas com Cellfectin (c) S2 transfetadas com ExGen500. (e) Células S2 transfetadas com JetPEI.

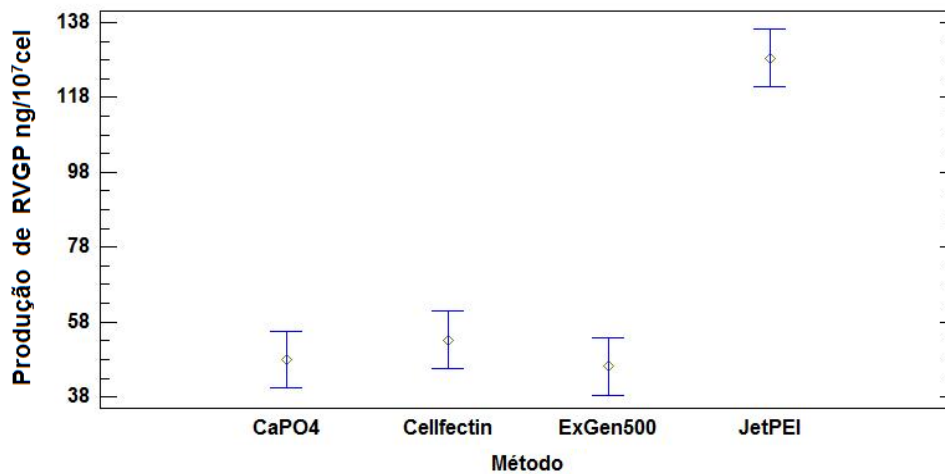


Figura 17: Análise estatística de TUKEY das médias de expressão de RVGP dos diferentes métodos de transfecção. O nível de significância foi de 95%.

5.3.3 Expressão transiente de RVGP usando o plasmídeo pMTiRVGP- Experimento 3s

A avaliação das construções plasmidiais para expressão da RVGP contendo ou não o sinal BiP permitiu observar que o plasmídeo pMTiRVGP (contendo o sinal BiP) apresentou melhores resultados de expressão transiente de RVGP (Figura 11 (A) (B)). Partindo deste raciocínio, e com o intuito de verificar a reprodutibilidade dos resultados obtidos nesse experimento, realizamos um experimento usando essas mesmas condições e incluindo mais dias de amostragem, para identificar até que ponto ainda conseguíamos obter expressão de RVGP.

Na Figura 18 (A), podemos observar que as produções de RVGP atingidas nas primeiras 48 horas de indução foram aproximadamente 2,3 vezes mais baixas que aquelas obtidas no experimento 1s (Figura 11 (A)), no entanto, depois deste ponto as células conseguiram aumentar a expressão de RVGP atingindo valores de 170 ng/10⁷ células nas células transfectadas com Cellfectin, 200 ng/10⁷ células nas células transfectadas com JetPEI e de 230 ng/10⁷ células nas células transfectadas pelo método de fosfato de cálcio. Estes valores representam 43% (1,2 vezes) mais expressão de RVGP nas células transfectadas com Cellfectin e JetPEI e 53% (1,5 vezes) no caso das células transfectadas com fosfato de cálcio.

Neste experimento analisamos a duração e picos da expressão transiente da RVGP em cultivos em suspensão. Desta maneira, observamos na gráfica 18 (A) que o pico de expressão para todos os métodos avaliados foi encontrado às 120 horas após a indução, este fenômeno, diferiu dos resultados encontrados no experimento 1s, no entanto, devido a que nesse caso só tínhamos avaliado até 72 horas de indução, não foi possível uma análise mais conclusiva.

A Figura 18 (B) ilustra a produção volumétrica de RVGP. Podemos observar que, neste experimento conseguimos obter um comportamento crescente de expressão, atingindo valores máximos de aproximadamente 220 ng/mL de RVGP nas células transfectadas com Cellfectin e JetPEI (sendo em média 1,5 vezes mais RVGP que no experimento 1s) e de 270 ng/mL nas células transfectadas com fosfato de cálcio (sendo 1,8 vezes mais RVGP que no experimento 1s). Com este resultado podemos inferir no fato que ainda 5 dias após a indução com CuSO₄, podemos obter expressão de RVGP através da transfecção com Cellfectin, JetPEI e fosfato de cálcio.

Na Figura 18 (C) encontramos a cinética de crescimento deste experimento. Podemos ver também uma curva de crescimento das células S2 selvagem. Como observado nos dois

experimentos anteriores, as células atingiram o final da fase exponencial aproximadamente às 72 horas de cultivo e depois desse tempo apresentaram um crescimento discreto atingindo 12×10^6 cel/mL nas células transfectadas. As células S2 selvagens (sem transfectar) conseguiram atingir 16×10^6 cel/mL, mas não foi observável uma ampla diferença entre células transfectadas e não. Baseados nestes fatos podemos inferir que o processo de transfecção não afetou o crescimento de células S2, fenômeno que pode ser devido a que o inóculo para começar o experimento (1×10^6 cel/mL) compreende um número de células suficiente para que o processo não afete a etapa de crescimento exponencial das células.

Estas células foram submetidas à imunoenaios 48 e 72 horas após a indução, conforme descrito em 4.7.1 e analisadas em microscópio de fluorescência. Na Figura 19 é possível notar a marcação com anticorpo anti RVGP nas células transfectadas com JetPEI, Cellfectin e fosfato de cálcio. Como observado em experimentos anteriores podemos notar um baixo número de células expressando RVGP.

Na análise de aminoácidos foi encontrado que os aminoácidos mais consumidos foram Glutamina, Serina, Prolina, Cisteína e Leucina. Na Figura 20 pode ser observado o padrão de consumo ao longo do experimento. Uma suplementação com Cisteína (numa concentração final de 4 mM) foi feita às 48 horas do cultivo, com base no dado do experimento 1s.

Para este experimento a Serina e a Leucina praticamente esgotaram no final do experimento, (144 horas de cultivo) atingindo concentrações de 0,3 mM. A suplementação com Cisteína às 48 horas do cultivo evitou o esgotamento deste aminoácido até o final do experimento Figura 20.

O comportamento de consumo nos diferentes agentes mostrou ser similar em todos os casos Figura 20 (a,b,c). Pode ser observado nesta figura que as concentrações dos aminoácidos no início do experimento se encontravam abaixo dos valores encontrados no experimento 1s Figura 14, o que presume uma degradação do meio de cultivo SF900II.

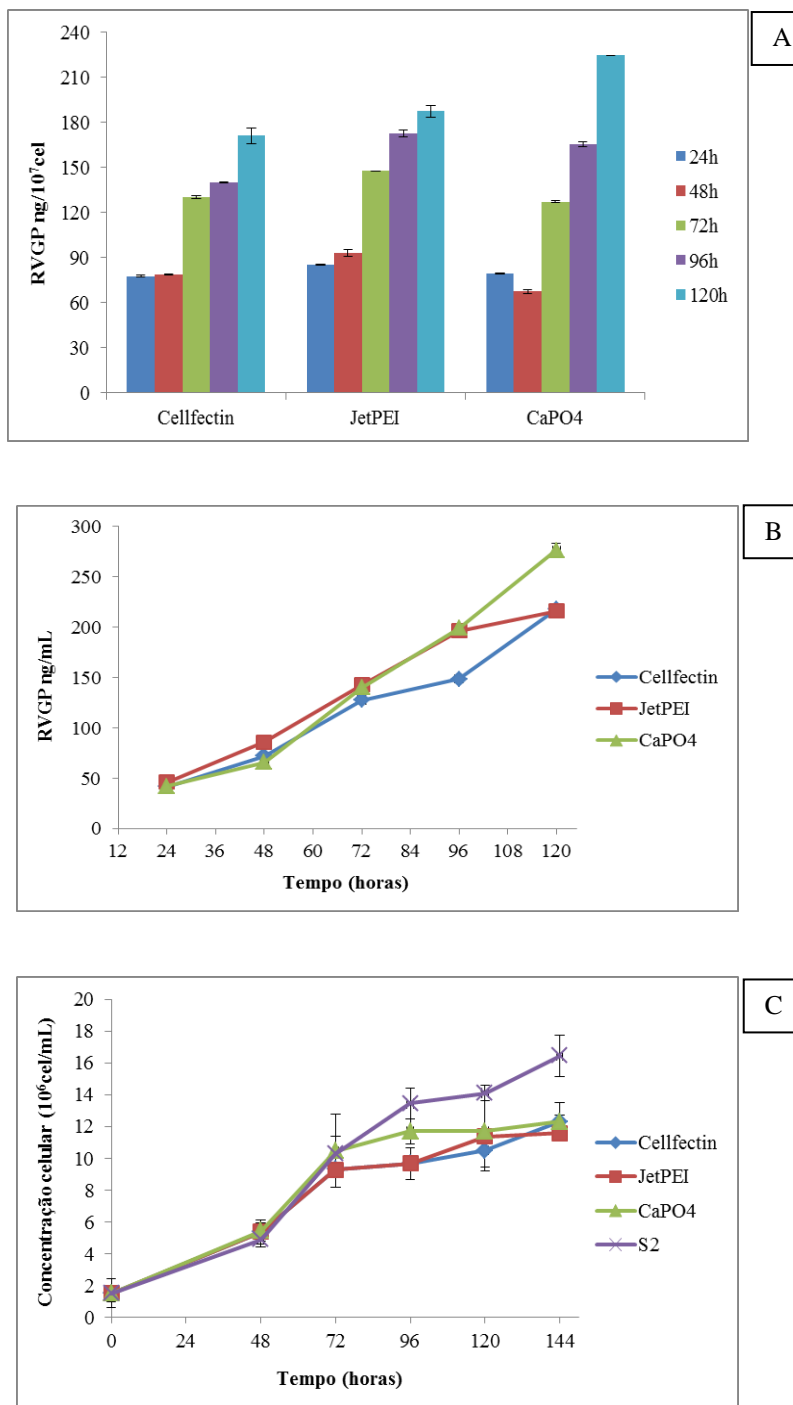


Figura 18: Células S2 transfectadas com Cellfectin, JetPEI e fosfato de cálcio. As células foram transfectadas em frasco agitado tipo “schott” de 100mL, com volume de trabalho de 15 mL de meio SF900II e uma densidade celular de 1×10^6 cel/ mL. A concentração de pMTiRVGP usada foi de $15 \mu\text{g}$ e os volumes de agentes de transfecção usados foram de $45 \mu\text{L}$ de Cellfectin, $30 \mu\text{L}$ ExGen500; e um volume de $50 \mu\text{L}$ de CaCl_2 (2 M) para a formação do precipitado com fosfato de cálcio. As células foram induzidas 24 horas depois da transfecção com CuSO_4 (numa concentração final de $700 \mu\text{M}$). Uma amostra contendo 1×10^6 cel foi retirada 24, 48 e 72 horas após a indução e analisada pelo método de ELISA. As células foram mantidas em incubadora a 28°C com agitação orbital de 100 rpm. Em (A) esta representada a expressão de RVGP ($\text{ng}/10^7$ cel), em (B) está representada a expressão volumétrica de RVGP por mL de meio (ng/mL) e em (C) se encontra a concentração celular ao longo do experimento (10^6 cel/mL). As barras correspondem ao desvio padrão das medidas.

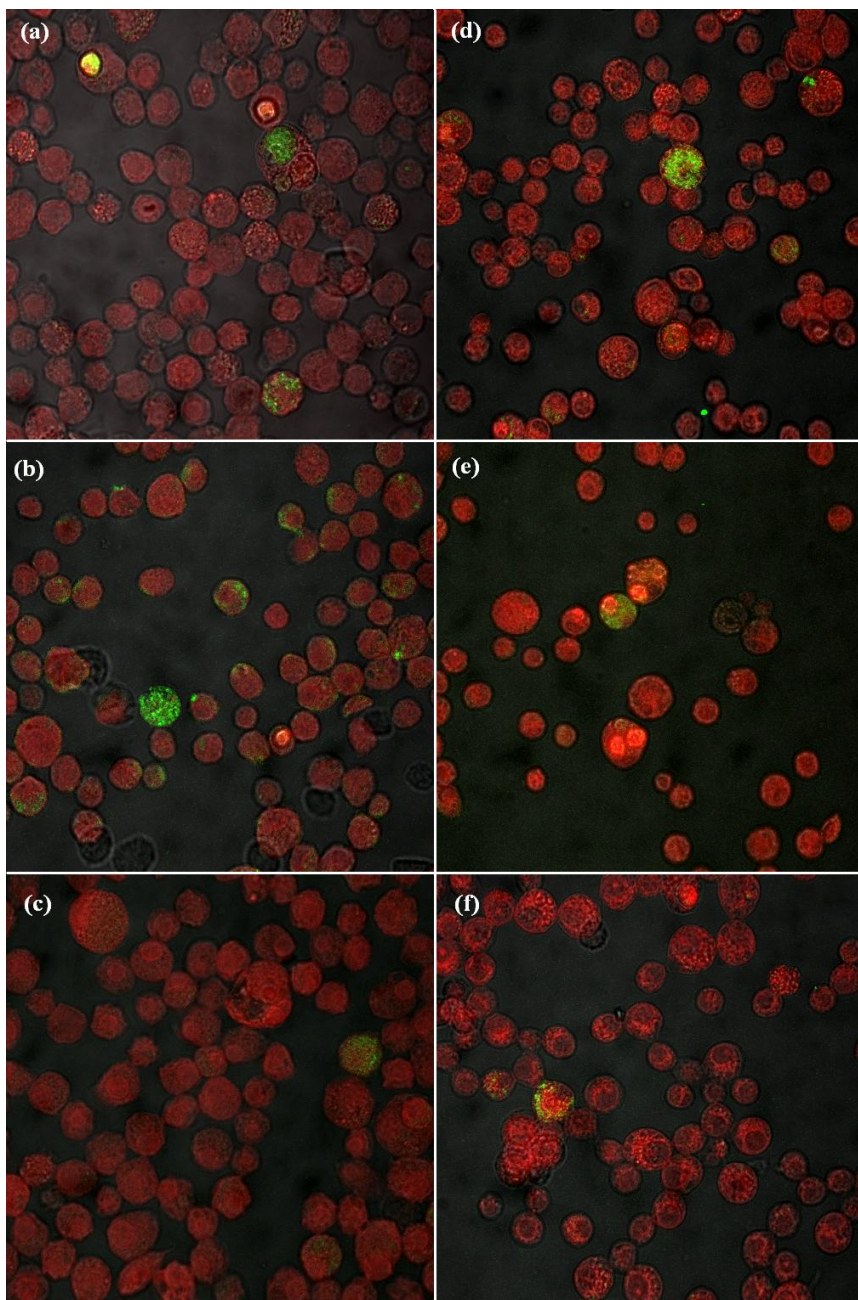


Figura 19: Microscopia de imunofluorescência indireta de células S2 transfetadas com pMtiRVGP, 48 e 72 horas após indução com CuSO_4 . (a) Células S2 transfetadas com JetPEI com 48 horas de indução (b) Células S2 transfetadas com Cellfectin com 48 horas de indução (c) Células S2 transfetadas com fosfato de cálcio com 48 horas de indução (d) Células S2 transfetadas com JetPEI com 72 horas de indução (e) Células S2 transfetadas com Cellfectin com 72 horas de indução (f) Células S2 transfetadas com fosfato de cálcio com 72 horas de indução.

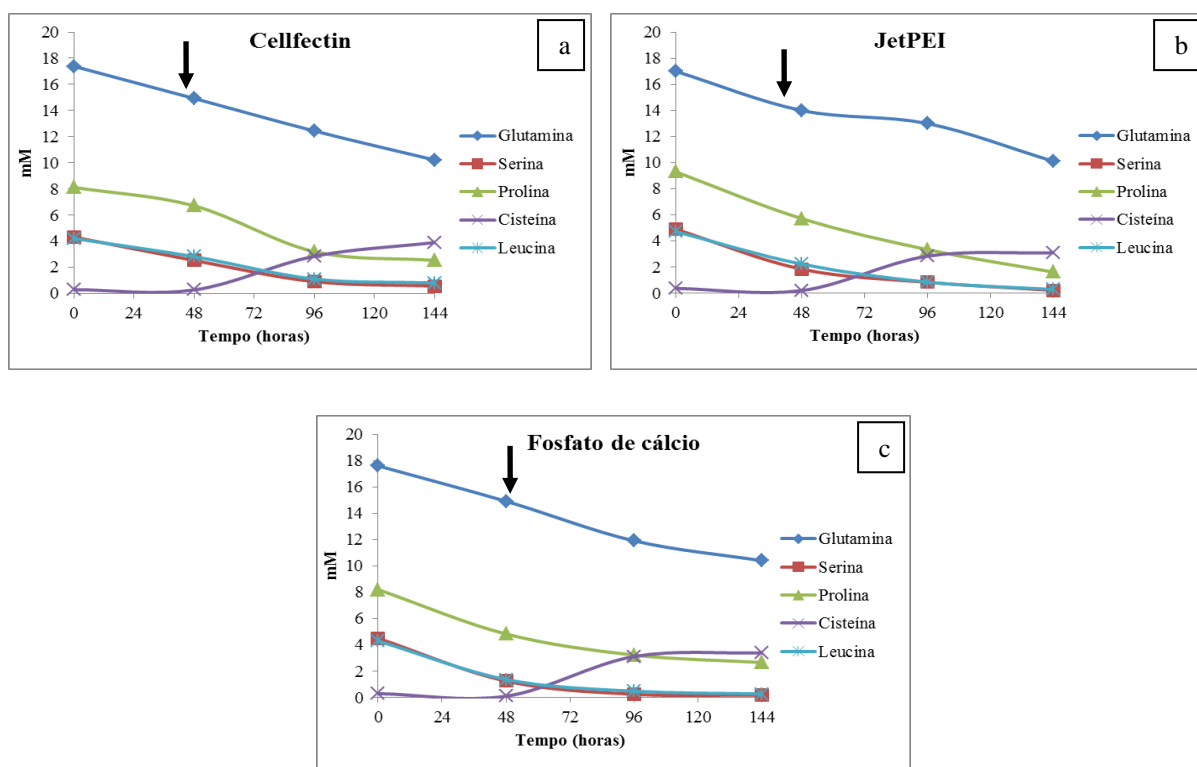


Figura 20: Consumo de aminoácidos (concentração mM) em células S2 transfetadas com pMtiRVGP, mantidas em cultivo por 144 horas, a seta preta indica suplementação de Cisteína (numa concentração final de 4mM). (a) Células S2 transfetadas com Cellfectin. (b) Células S2 transfetadas com JetPEI. (c) Células S2 transfetadas com fosfato de cálcio.

5.4 Expressão Transiente de RVGP em Frasco tipo “Spinner”

Para verificar a escalabilidade das condições de transfecção apresentadas anteriormente, realizamos um experimento preliminar em frasco de cultura tipo “spinner”, em virtude do pouco conhecimento acerca do comportamento de expressão transiente desta célula neste volume de trabalho. Devido a restrições das nossas condições de cultivo nestes frascos, optamos por testar apenas o JetPEI e o fosfato de cálcio, tomando como referência a viabilidade econômica do processo. Foram mantidas as proporções (densidade celular/agente/DNA) usadas nos experimentos em frasco de cultura de 100 mL. Isto é, as células foram transfetadas numa densidade de 1×10^6 cel/mL, a concentração de DNA foi de 1 μ g/mL de meio, o volume de agente foi mantido numa relação de 1:2 no caso DNA:JetPEI e o volume de CaCl_2 (2 M) foi de 200 μ L para o frasco de cultura tipo “spinner” de 60 mL e de 330 μ L para o frasco de cultura tipo “spinner” de 100 mL (mantido de acordo com a proporção usada nos experimentos em frasco agitado). Foram feitos experimentos em paralelo usando um frasco de cultura tipo “spinner” de 100 mL com um volume de trabalho de 60 mL de meio SF900II. Para avaliar JetPEI e fosfato de cálcio, paralelamente um frasco de cultura

tipo “spinner” de 250mL com um volume de trabalho de 100 mL foi também usado para avaliar só o método de fosfato de cálcio. As células foram mantidas em incubadora a 28°C, com uma agitação inicial de 55 rpm que as 96 horas de cultivo foi aumentada até 95 rpm.

Ao analisarmos a Figura 21 (A), podemos perceber nos dois experimentos feitos em frasco de cultura tipo “spinner” de 100 mL, um incremento da expressão de RVGP às 48 horas de indução que aumenta aproximadamente 2,5 vezes no caso das células transfectadas com JetPEI passando de 40 ng/10⁷cel de RVGP para 114 ng/10⁷cel, e para o caso das células transfectadas com fosfato de cálcio aumentou 1,3 vezes passando de 70 ng/10⁷cel às 24 horas para 100 ng/10⁷cel às 48 horas de indução. No entanto, a expressão obtida às 72 horas diminui 3,4 vezes nas células transfectadas com JetPEI e 2 vezes nas células transfectadas com fosfato de cálcio, atingindo 33 ng/10⁷cel e 46 ng/10⁷cel respectivamente. Este fenómeno foi acompanhando de um crescimento lento de células (Figura 21 (C)), fato que nos sugeriu que as células estavam passando por alguma carência, de nutrientes ou de oxigênio. Deste modo, aplicamos duas estratégias para aumentar o oxigênio, uma aumentando a agitação orbital de 55 rpm usadas por Galessi et al., 2009, e passamos para uma agitação final de 95 rpm aumentando 10 rpm de duas em duas horas, para não aplicar uma mudança drástica sobre as células. A outra estratégia referente ao oxigênio foi abrir a tampa do frasco de cultura tipo “spinner” na hora da amostragem por alguns segundos, pois desde que tinha se começado o experimento, o frasco tinha permanecido fechado e as amostras eram retiradas rapidamente por um dos braços sem ter mais chance de intercambio de gases com o meio externo. Além destas duas, uma terceira estratégia utilizada foi suplementar o cultivo com cisteína numa concentração final de 4 mM (concentração deste aminoácido no meio original SF900II).

Curiosamente após 96 horas a expressão de RVGP foi recuperada atingindo 110 ng/10⁷cel nas células transfectadas com JetPEI e, depois a expressão de RVGP atinge um pico às 144 horas de indução com 150 ng/10⁷cel e finalmente cai significativamente até 50 ng/10⁷cel às 168 horas de indução. Nas células transfectadas com fosfato de cálcio a expressão de RVGP também é recuperada atingindo 120 ng/10⁷cel às 96 horas, o pico é encontrado às 120 horas com 138 ng/10⁷cel, mas, sem muita diferença com o ponto das 144 horas (131 ng/10⁷cel), igualmente a expressão as 168 horas cai até 66 ng/10⁷cel de RVGP (Figura 21 (A)).

Na Figura 21 (A) também podemos observar a produção de RVGP obtida do experimento em paralelo feito em frasco de cultura tipo “spinner” de 250 mL usando o método de

precipitação com fosfato de cálcio. Podemos notar nessa figura que a expressão de RVGP nas primeiras 72 horas de indução se manteve constante em aproximadamente $70 \text{ ng}/10^7 \text{ cel}$. No entanto, depois deste ponto a expressão aumentou 1,8 vezes ao atingir $130 \text{ ng}/10^7 \text{ cel}$ às 96 horas de indução e atinge uma máxima às 144 horas com $138 \text{ ng}/10^7 \text{ cel}$ de RVGP e depois disso apresenta uma queda atingindo $96 \text{ ng}/10^7 \text{ cel}$ ao final do experimento. A partir destes resultados, podemos inferir que a produção de RVGP não teve diferenças significativas entre o experimento feito em frasco de cultura tipo “spinner” de 250 mL e o frasco de cultura tipo “spinner” de 100 mL. O volume de trabalho foi aumentado em 4 e 6 vezes respectivamente, no entanto, podemos observar que estes resultados não apresentaram amplas diferenças com os experimentos feitos em frasco agitado de 100 mL (Figuras 11 e 17 (A)), possibilitando melhoras na expressão, com uma otimização das condições do cultivo que neste experimento afetaram os níveis de expressão.

Podemos observar na Figura 21 (B) uma queda importante na produção volumétrica de RVGP tanto nas células transfectadas em frasco de cultura tipo “spinner” de 100 mL, como nas células transfectadas em frasco de cultura tipo “spinner” de 250 mL, gerada por uma diminuição na produção de RVGP e uma queda no crescimento celular, que poderia ser atribuída a falta de oxigênio nas células. Os valores máximos de produção volumétrica foram aproximadamente de $129 \text{ ng}/\text{mL}$ de RVGP nos experimentos em frasco de cultura tipo “spinner” de 100 mL, valor 1,6 vezes mais baixo comparado com os valores obtidos nos experimentos feitos em frasco agitado de 100 mL.

A produção volumétrica no frasco de cultura tipo “spinner” de 250 mL como observado na Figura 21 (B) foi mais afetada, atingindo uma máxima de $70 \text{ ng}/\text{mL}$, este fenômeno sugere um crescimento das células mais comprometido, resultando numa produção volumétrica menor (1,8 vezes menor que no frasco de cultura tipo “spinner” de 100 mL). Apesar disso, sabendo que a produção de RVGP não exibiu amplas diferenças, podemos supor que esta discrepância possa ser superada com a melhoria das condições das células.

Analisando a Figura 21 (C), podemos observar que o número de células também foi afetado neste experimento, sendo que o experimento feito em frasco de cultura tipo “spinner” de 250 mL foi o mais comprometido, apresentando um crescimento bastante baixo, e chegando ao final do experimento em apenas $6 \times 10^6 \text{ cel}/\text{mL}$, comparado com as células dos frascos de 100 mL, que embora tivessem apresentado um crescimento baixo, atingiram $1 \times 10^7 \text{ cel}/\text{mL}$ no final do experimento.

Na Figura 22 pode ser observado o consumo dos aminoácidos Glutamina, Serina, Prolina, Cisteína e Leucina nos experimentos realizados em frasco de cultivo tipo “spinner” com um volume de trabalho de 60 e 100 mL. Uma suplementação com Cisteína (concentração final de 4 mM) foi feita às 72 horas de cultivo depois de tirar a amostra, verificando posteriormente na análise que este aminoácido já estava esgotado.

Nos experimentos feitos em frasco de cultivo tipo “spinner” com um volume de trabalho de 60 mL usando os reagentes de transfecção JetPEI e fosfato de cálcio, pode ser observado um consumo similar dos aminoácidos, só a Glutamina parece ser mais consumida nas células transfectadas com JetPEI depois das 72 horas de cultivo (Figura 22 (a,b)). Nenhum dos aminoácidos esgotou no final do experimento, devido possivelmente a uma concentração celular mais baixa (Figura 21 (C)).

No experimento feito em frasco de cultivo tipo “spinner” com um volume de trabalho de 100 mL, pode ser observado um consumo mais rápido dos aminoácidos, apresentando uma queda significativa de todos eles já no ponto de 72 horas Figura 22 (c).

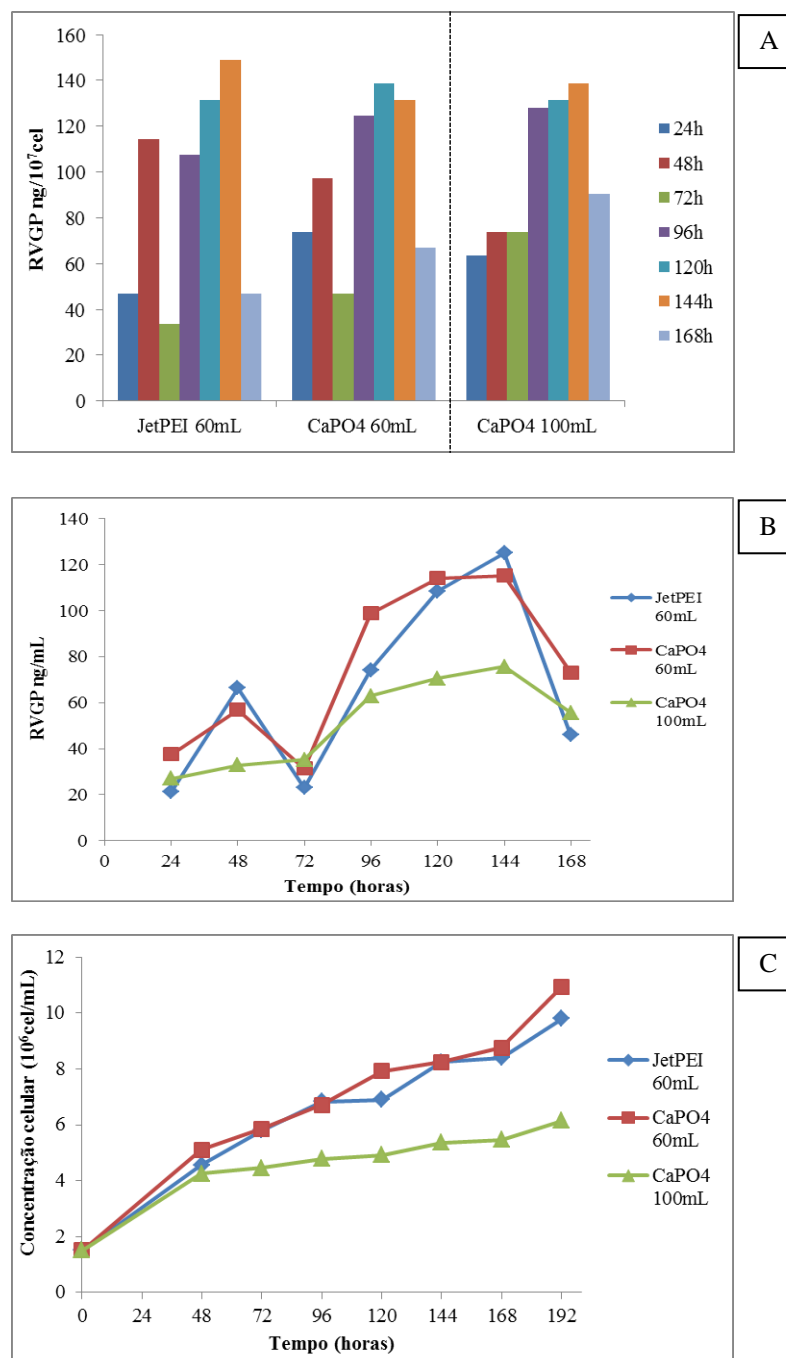


Figura 21: Células S2 transfectadas com JetPEI e fosfato de cálcio. As células foram mantidas em frasco tipo “spinner” de 100 mL, com volume de trabalho de 60 mL de meio SF900II, e em frasco tipo “spinner” de 250 mL, com volume de trabalho de 100 mL de meio SF900II. Foi usada uma densidade celular de 1×10^6 cel/mL. A concentração de pMTiRVGP usada foi de $1 \mu\text{g/mL}$ de meio, o volume de JetPEI usado foi baseado numa relação de 1:3 de DNA:JetPEI e o volume de CaCl_2 (2 M) foi 200 μL (spinner de 100 mL) e de 330 μL (spinner de 250 mL). As células foram induzidas 24 horas depois da transfecção com CuSO_4 (numa concentração final de $700 \mu\text{M}$). Uma amostra contendo 1×10^6 cel foi retirada 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 192 horas após a indução e analisada pelo método de ELISA. As células foram mantidas em incubadora a 28°C sob agitação orbital de 95 rpm, e foi feita uma suplementação com cisteína (concentração final de 4 mM) às 96 horas. Em (A) esta representada a expressão de RVGP ($\text{ng}/10^7$ cel), em (B) está representada a expressão volumétrica de RVGP por mL de meio (ng/mL) e em (C) se encontra a concentração celular ao longo do experimento (10^6 cel/mL).

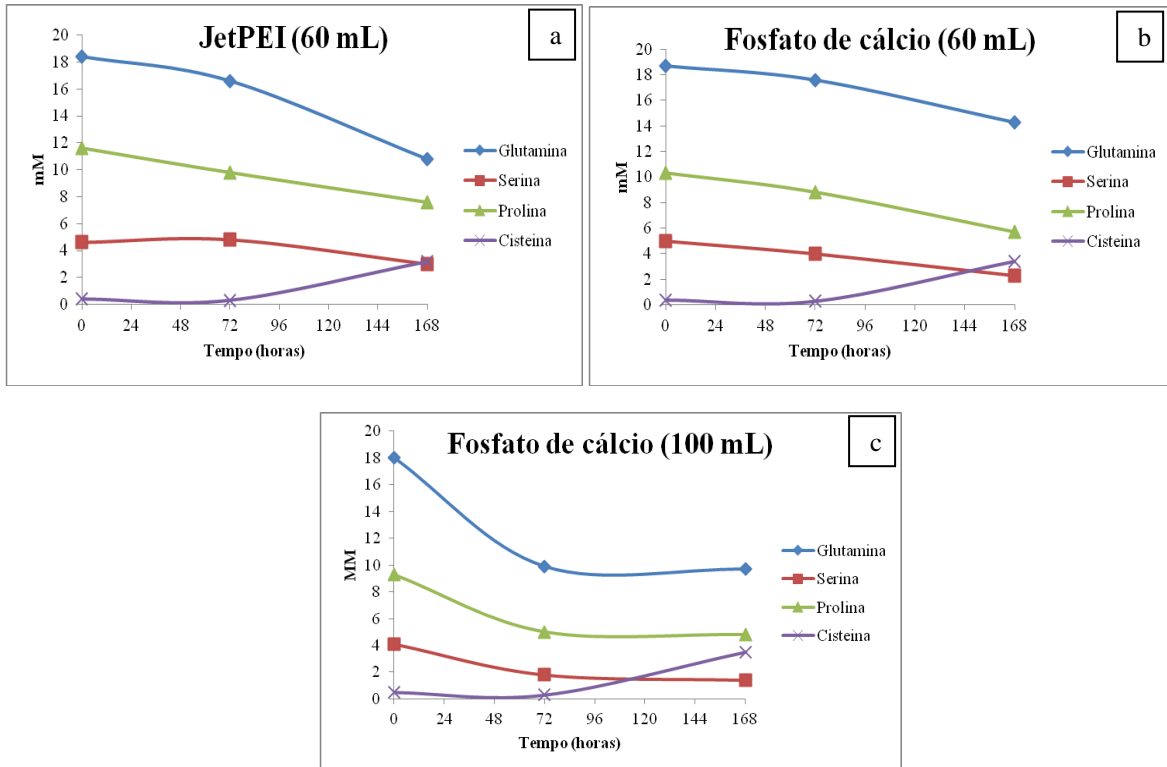


Figura 22: Consumo de aminoácidos em células S2 transfectadas com pMtiRVGP, mantidas em cultivo por 144 horas, a seta preta indica suplementação de Cisteína (numa concentração final de 4mM). (a) Células S2 transfectadas com JetPEI em frasco tipo “spinner” com um volume de trabalho de 60 mL. (b) Células S2 transfectadas com Fosfato de cálcio em frasco tipo “spinner” com um volume de trabalho de 60 mL. (c) Células S2 transfectadas com Fosfato de cálcio em frasco tipo “spinner” com um volume de trabalho de 100 mL

6 DISCUSSÃO

A tecnologia de produção de proteínas recombinantes tem evoluído muito no decorrer das últimas duas décadas. Seu papel na obtenção de produtos farmacêuticos das mais variadas aplicações tem sido de crucial importância. Na procura de sistemas altamente eficientes de expressão de proteínas as áreas da biologia molecular e engenharia celular vêm conseguindo grandes progressos. Muitas das proteínas encontradas no mercado farmacêutico, como por exemplo, as glicoproteínas, e no caso particular desta dissertação a glicoproteína do vírus da raiva (RVGP), possuem uma estrutura complexa, que necessita de modificações pós traducionais para apresentar sua correta conformação antigênica e função biológica, sendo, portanto, indicado o uso de células de eucariotos.

Em estudos anteriores em nosso laboratório a linhagem *Drosophila melanogaster* S2 transfectada estavelmente foi estudada para a produção da Glicoproteína do vírus da Raiva (RVGP). Esta abordagem implicou a seleção de clones estáveis e a otimização de várias condições de cultivo, conseguindo aumentar os níveis de produção em até 10 vezes. Este procedimento, no entanto, demandou períodos de tempo da ordem de anos. Abordagens mais rápidas para a obtenção de proteínas recombinantes podem ser vantajosas para seleção de variantes da proteína com alto potencial imunobiológico. Neste sentido, a expressão transiente de gene pela célula surge como uma alternativa, pois diferentemente da expressão estável, ela envolve prazo da ordem de 10 dias para a obtenção da proteína após a transfecção na ausência de pressão seletiva.

A tecnologia de transfecção transiente de gene usando vetores plasmidiais tem mostrado resultados animadores principalmente em células de mamífero HEK293 e CHO (FLIEDL e KAISERMAYER, 2011; RAJENDRA et al., 2011; LIU et al., 2008; entre outros). Progressos significativos com esta tecnologia têm sido atingidos através do desenho de melhores vetores de expressão, seleção de linhagens celulares e meios de cultura, seleção de veículos de transfecção, identificação e otimização de parâmetros chaves, assim como o desenvolvimento do processo em larga escala (PHAM et al., 2006).

Embora, o sistema de expressão transiente dispense o processo de seleção de clones, é importante, sobretudo, quando não se tem muita informação sobre porcentagens de eficiência na transfecção, o uso dos marcadores repórter, cujo gene codifica para uma proteína que pode ser monitorada por métodos simples e sensíveis. Este método tem sido de grande utilidade para otimizar e monitorar os veículos de transfecção de DNA. Dentre estes genes repórter, a

Proteína Verde Fluorescente (GFP), tem sido amplamente usada em células de inseto (OGAY et al., 2006; PERRET et al., 2003; FARRELL e IATROU, 2004; LEE et al., 2000; PARK et al., 1999; BRILLET et al., 2008 e SANTOS et al., 2007).

O plasmídeo contendo o gene da variante EGFP foi usado neste trabalho para analisar a expressão transiente em células S2, através de citometria de fluxo e de microscopia confocal. Os resultados desta etapa mostraram baixas eficiências de transfecção não conseguindo superar 5% de células fluorescentes em nenhum dos experimentos realizados, avaliando diversas condições (Figuras 5 e 7). Problemas na eficiência e reprodutibilidade dos resultados da transfecção de EGFP foram relatados por Santos et al., 2007. Também nesta etapa foi identificado que soluções de transfecção sem conter o pMTEGFP, eram capazes de gerar níveis de fluorescência equivalentes às células transfectadas, este fato, sugere a presença de uma fluorescência basal, possivelmente pela presença de alguma substância no meio que seja capaz de emitir fluorescência.

Níveis de expressão elevados têm sido reportados por Han 1996; Park et al., 1999; Shin e Cha 2002, através do uso da tecnologia de lipossomos em células de inseto. Eficiências de transfecção têm sido encontradas na faixa de 34%–45% em *Bombyx mori* (Bm5), *Spodoptera frugiperda* (Sf21), e *Lymantria dispar* (IPLB-LdEp, IPLB-LdEIta, IPLB-Ld652Y) por Keith et al., 2000; Gundersen-Rindal et al., 2000.

Farrell e Iatrou, 2004 e Loomis et al., 2005, relataram o uso de lipossomas para expressão transiente. No entanto, esta tecnologia não resulta muito atraente, devido ao elevado custo dos reagentes de transfecção, o que resultaria num bioprocessamento inviável economicamente quando aplicado em larga escala.

Neste trabalho avaliamos o uso do kit comercial Cellfectin (Invitrogen), cuja formulação envolve alguns lipídeos catiônicos (TM-TPS e DOPE). Este kit foi desenvolvido para uso em células de inseto e inicialmente seu uso neste trabalho foi proposto como controle positivo (uma vez que ele foi usado no desenvolvimento das linhagens estáveis obtidas para expressão de RVGP) Porém, os resultados encontrados nos experimentos tanto para EGFP como para RVGP feitos em placa, mostraram que ele foi o agente com as melhores expressões, contudo, sem apresentar diferenças significativas sobre os outros agentes: fosfato de cálcio e PEI. Nos experimentos feitos posteriormente em frasco agitado, ao contrário do que o observado em placa, os níveis de expressão das células transfectadas com Cellfectin foram superados pelos níveis encontrados nas células transfectadas com ExGen500 e JetPEI (Figuras 11, 14 e 17).

Nas Figuras 11 e 14 pode ser observado um pico de expressão para células transfectadas com Cellfectin após 48 horas da indução, posterior a esse período apresentou queda afetando o rendimento final da transfecção, razão pela qual nos experimentos feitos em placa, onde era feita uma única análise 48 horas após a indução com CuSO_4 , as células transfectadas com Cellfectin apresentavam sempre os melhores resultados de expressão. Já na Figura 17 onde o experimento foi mantido por mais dias, se observou um comportamento crescente de produção até às 120 horas de indução, melhorando assim a produtividade final, revelando a importância de acompanhar o cultivo por mais dias.

A transfecção de células usando o método de precipitação com fosfato de cálcio foi uma das primeiras tecnologias a ser descritas na transferência de genes, e desde então tem sido usada amplamente devido às vantagens associadas ao baixo custo, relativa simplicidade e possibilidade de ser usada em diferentes linhagens celulares. Transfecções transientes em larga escala já foram relatadas por Jordan e Wurm, 2004; Girard et al., 2002. Também tem sido relatado como um método eficiente na transfecção de células de inseto por Di Nocera, 1983; Van der Straten et al., 1989. Neste sentido, avaliamos esta tecnologia na expressão transiente em S2 avaliando o efeito de diferentes parâmetros como a densidade celular, concentração de DNA e concentração de CaCl_2 .

O primeiro fato observado foi o aparecimento de grandes precipitados sobre as células, o que causou inconvenientes para avaliar o estado delas e também para a análise por citometria de fluxo, pois geravam níveis de fluorescência de fundo de aproximadamente 30% (Figura 4), sendo 10 vezes maior que para os outros agentes. Jordan e Wurm, 2004 e Muller, 2005 também relataram a aparição de aglomerados ou grandes precipitados nas células transfectadas com fosfato de cálcio, como resposta às variações no pH e nas concentrações de fosfato, de cálcio e de DNA. Também citaram o soro fetal bovino como um fator que compromete a solubilidade do cálcio e atenua a formação de grandes precipitados. A necessidade da presença do soro já foi relatada como uma das desvantagens referidas para o uso desta tecnologia (WURM et al., 2004), este fato também foi verificado neste trabalho. Para isso, avaliamos algumas estratégias para a adição de 2% de SFB no meio SF900II usado para a transfecção com este agente, desta maneira foi constatada a importância deste fator na diminuição dos precipitados (Figura 7). Cabe ressaltar neste sentido, que, embora, a adição de soro fetal bovino tenha melhorado o estado das células, o descolamento delas na hora da amostragem para análise de ELISA, quando a transfecção foi feita em placa, era muito mais difícil comparado com as células transfectadas com os outros agentes, gerando uma amostra

com a presença principalmente das células encontradas em suspensão, levando a obtenção de uma amostra de células menos saudáveis e com pouca RVGP, e dando como resultado um valor subestimado de proteína. Este fato é importante, pois neste laboratório já foi observado como critério de bem estar da célula a facilidade delas para aderir numa superfície de cultivo.

Diferentes estratégias têm sido implementadas na transfecção com fosfato de cálcio com a finalidade de aumentar a eficiência da expressão, dentre estas o choque osmótico com glicerol ou DMSO pode ser encontrado como sugestão em vários protocolos. O choque osmótico com glicerol tem sido reportado por Wilson e Smith, 1999; Jordan e Wurm, 2004; Grosjean et al., 2006 e Khosravi-Darani et al., 2010, como um fator importante para incrementar a eficiência da transfecção principalmente em células CHO. Este aumento na eficiência parece ser devido a um aumento na osmolaridade dentro da célula que favorece o escape do DNA dos compartimentos endossomais/ lisossomais (Grosjean et al., 2006). Com o propósito de avaliar esta estratégia em nosso sistema, realizamos uma transfecção em garrafa T-25 dando um choque osmótico com glicerol 12% por 1 minuto nas células transfectadas. Também, para fosfato de cálcio avaliamos o efeito de transfectar novamente umas células já transfectadas (re-transfecção); esta última com o intuito de analisar se isto poderia ter um efeito de expressão acumulativa de RVGP. A estratégia do choque osmótico com glicerol não mostrou diferenças de expressão frente a células que não tinham sido submetidas ao choque (Figura 10). Um trabalho relatando a ineficiência do glicerol em células de drosófila D3 foi reportado por Sinclair e Briant, 1989. Nesse trabalho eles assinalaram o uso de 20-Hydroxyecdysone para incrementar os valores de expressão dos genes repórter CAT (cloramfenicol acetil transferase) e β -galactosidase, pois segundo eles nem o glicerol nem a cloroquina funcionaram nestas células.

Com as conclusões extraídas dos experimentos feitos em placa de cultura e garrafa T-25, o protocolo aplicado na transfecção com fosfato de cálcio em frasco agitado foi feito com suplementação de 2% de SFB na hora da transfecção sem usar choque osmótico. O comportamento de expressão nas células em suspensão apresentou um pico de produção de RVGP nas 24 horas após a indução com níveis similares aos agentes Cellfectin e ExGen500 (Figuras 11 e 14). Em cultura em placa as amostras eram extraídas 48 horas depois da indução com o CuSO_4 , fato que pode explicar os resultados baixos obtidos nestes experimentos (Figura 8), uma vez que, nos experimentos feitos em frasco agitado (Figuras 11 e 14) e em frasco de cultura tipo “spinner” (Figura 17) não foram observadas diferenças significativas entre este e os outros métodos de transfecção avaliados, verificando a possibilidade de estar

subestimando a expressão de RVGP em células transfectadas com fosfato de cálcio em cultura em placa. Sob este suposto, podemos inferir que o método de transfecção com fosfato de cálcio é considerada uma estratégia viável de expressão transiente em células S2, devido a seu baixo custo.

A procura por veículos de transfecção alternativos, que sejam eficientes, e economicamente atrativos; levaram ao uso de polímeros catiônicos que condensam eficientemente o DNA e entram na célula na forma de poliplexos ou polissomos. Dentre estes, o PEI linear tem sido relatado como uma molécula eficiente e promissora para uso na expressão transiente de genes em larga escala (GEISSE, 2009; HALDANKAR et al, 2006; PHAM et al., 2006 e DEROUAZI et al., 2004) . Ele tem a vantagem de ser mais barato que o Cellfectin e a diferença do método de transfecção com fosfato de cálcio, não demanda a presença de soro na transfecção. Seu uso em larga escala tem sido amplamente estudado como pode ser observado numa revisão feita por Baldi et al., 2007. No presente trabalho avaliamos o comportamento de dois diferentes kits comerciais (ExGen500 e JetPEI) baseados em PEI linear de 22 kDa, o ExGen500 foi usado na etapa de transfecções feitas em placa e nos primeiros dois experimentos de frasco agitado, e o JetPEI foi incluído na etapa de transfecções feitas em frasco agitado por ser um produto mais barato.

O ExGen500 não tem sido descrito em células S2, mas foi eficiente na expressão da proteína EGFP em células Sf9, atingindo um máximo de 55% de células fluorescentes às 72 horas após a transfecção. Neste mesmo trabalho é citado o uso do ExGen500 em outras células de inseto, com variações na eficiência entre elas (OGAY et al., 2006). JetPEI tem sido reportado em expressão estável de células S2 por Piccini et al., 2004; Perret et al., 2003; Garcia-Alles et al., 2006, porém sem dados de eficiência de transfecção. Inicialmente só foi testado o uso do kit ExGen500 para a expressão transiente baseada em PEI, no decorrer do trabalho foi adquirido o JetPEI, fazendo interessante a comparação entre eles no experimento em frasco agitado.

Nos experimentos em placa, como já foi mencionado, células transfectadas com ExGen500 apresentaram níveis de produção muito similares aos de células transfectadas com Cellfectin, sugerindo a transfecção baseada em PEI como uma alternativa mais econômica e igualmente eficiente na expressão de proteínas recombinantes em células de inseto. Nos experimentos feitos em frasco agitado, estes fatos foram corroborados de maneira mais inesperada, pois tanto células transfectadas com ExGen500 como com JetPEI apresentaram

picos de produção nas 72 horas após a indução superando as produções de células transfectadas com Cellfectin nas diferentes condições testadas e apresentando uma queda menos significativa no tempo, permitindo obter uma cinética de produção de RVGP/mL mais eficiente (Figura 11).

Embora a base dos agentes de transfecção ExGen500 e JetPEI seja o PEI linear de 22 kDa, o agente JetPEI apresentou melhores resultados para a expressão transiente de células S2 em cultivos em suspensão, porém devido à nossa pequena amostragem, não podemos concluir se essa diferença é significativa. Piccinni, et al., 2004, testaram várias linhagens celulares para a expressão de promotores de transcrição do gene *Lama 1*, usando ExGen500 para transfectar as células Caco2-TC7 e JetPEI para transfectar as células S2, sugerindo talvez, um conhecimento prévio do melhor desempenho do JetPEI neste tipo celular.

O uso do JetPEI apresentou resultados interessantes, pois ele mostrou as melhores expressões, conseguiu manter uma produção constante sem queda significativa da produção no tempo. Além disso, é importante ressaltar que as quantidades necessárias para transfectar uma determinada concentração de DNA são menores requerendo uma relação de 1:2 (DNA:JetPEI), comparada com a relação necessária para lipossomas, no caso 1:3 (DNA:Cellfectin), utilizando menor quantidade de agente para um experimento, e portanto, diminuindo o custo da transfecção. Neste sentido segundo cálculos aproximados, o valor de cada transfecção em frasco agitado para JetPEI (27R) é menor que do ExGen500 (45R) e do Cellfectin (67,5R). Na transfecção com fosfato de cálcio não foi usado kit comercial, pelo qual o valor encontra-se entorno de 6R.

Independente do agente de transfecção usado, fosfato de cálcio; Cellfectin ou ExGen500/JetPEI, diferentes parâmetros reconhecidos como chave em qualquer processo de expressão transiente, foram avaliados no intuito de aumentar as eficiências de transfecção. Neste sentido, densidades celulares diferentes para a transfecção foram usadas, resultando em grande variação quando a proteína a ser expressa era EGFP (Figura 3), Nestes experimentos, foi encontrada uma melhor expressão, mensurada como % de células fluorescentes, em densidades celulares mais baixas, porém, uma menor influência foi observada quando a proteína expressa foi RVGP (Figura 8). Este fato pode estar ligado às diferentes metodologias usadas na dosagem das proteínas avaliadas, já que para EGFP a medida é dada por célula fluorescente (na citometria de fluxo) e para RVGP por proteína expressa por célula (quantificada através do teste de ELISA).

Liu et al., 2008 também estudaram o efeito da densidade celular sobre a eficiência da expressão transiente de EGFP em células HEK293 e CHO, seus resultados concordaram que densidades baixas resultaram em melhores eficiências, no entanto, eles encontraram que o número total de células transfectadas (células GFP positivas/mL) era mais baixo quando comparado com o total de células GFP positivas/mL das transfecções feitas em densidades celulares maiores. Nós também consideramos este fato como um motivo de diminuição do rendimento total do cultivo, com o agravante de que as células S2 apresentam dificuldades em crescer em culturas em baixa densidade (JORGE et al., 2008), podendo limitar consideravelmente a produção volumétrica.

Análises foram feitas em microscópio de fluorescência para verificar a fluorescência como produto da expressão de EGFP e para verificar a marcação anti-RVGP produto da técnica de imunofluorescência indireta realizada para detectar células expressando RVGP. Os resultados observados nas fotografias tanto para EGFP (Figuras 5 e 7) quanto para RVGP (Figuras 12, 15 e 18), permitem apreciar que esta técnica foi importante para confirmar a expressão da proteína, no entanto, é uma técnica subjetiva para obter dados quantitativos de produção.

Os conhecimentos sobre a resistência das células à transfecção assim como o mecanismo de entrada e transporte do DNA complexado, faz difícil a escolha de um agente específico para uma determinada linhagem celular, sendo necessário na maioria dos casos, identificar o veículo de transfecção através do sistema de tentativa e erro, pois, os níveis de expressão são influenciados pelo tipo de célula e gene a ser expresso.

O efeito da concentração do DNA tem sido considerado um parâmetro importante na obtenção de bons resultados de expressão. Estudos feitos neste sentido por vários pesquisadores (BACKLIWAL et al., 2008; MULLER, 2005) evidenciam que existe uma faixa que deve ser encontrada, pois resultados acima ou abaixo dela afetam os níveis de expressão. Este parâmetro foi também avaliado neste trabalho. Concentrações baixas de DNA plasmidial foram suficientes para expressar EGFP, entretanto, concentrações maiores foram requeridas para expressão de RVGP em placa. Por outro lado, quando concentrações muito altas de DNA foram testadas 7,5 ou 10 µg/mL, foi observado um efeito negativo sobre a expressão da RVGP, concordando com os trabalhos encontrados. A concentração usada para as transfecções feitas em frasco agitado e frasco tipo “spinner” de 100 mL, foi de 1 µg/mL de meio e foi baseada no trabalho feito por Buchs et al., 2009.

O sinal de secreção BiP, é utilizado com a função de direcionar o RNAm para o retículo endoplasmático e para a via de secreção de proteínas (DOMS et al., 1993; KIRKPATRICK et al., 1995; GAUDIN, 1997), além disso, é sugerido que BiP pode promover uma correta conformação das proteínas e/ou prevenir a saída de proteínas imaturas ou incorretamente glicosiladas (KIRKPATRICK et al., 1995). Assim, dependendo da natureza da proteína a ser expressa, a presença do sinal BiP dentro do vetor de expressão pode representar mudanças no padrão de produção da proteína. Estudos comparativos da expressão de RVGP em linhagens celulares de S2 transfectadas estavelmente com vetores contendo ou não o sinal Bip apresentaram diferenças na obtenção da RVGP. Lemos et al, 2009, encontraram que esse sinal não influenciou na produção de RGPV nas populações S2MTiGPV e S2MTGPV. Entretanto, encontraram diferenças nas populações S2MTiGPV-H e S2MTGPV-H (contém o gene de seleção para higromicina no mesmo plasmídeo do gene de expressão), onde teve uma maior produção de RVGP nas subpopulações S2MTGPV-H (sem sinal BiP). Para verificar se este sinal interferia ou não na expressão transiente da RVGP, foram feitos 1 experimento em frasco agitado transfectando com o plasmídeo contendo o sinal BiP e um outro experimento usando o plasmídeo não contendo este sinal. Como resultado destes experimentos, foi encontrada uma diferença significativa na expressão transiente da RVGP, sendo cerca de 4 vezes maior quando o sinal estava presente (Figura 11), esta diferença frente aos experimentos feitos para expressão estável, podem ser atribuídos à necessidade do rápido processamento da proteína requerido para expressão transiente, no que este sinal poderia interferir, ajudando na conformação trimérica da proteína.

Neste trabalho também conseguimos avaliar a produção transiente em escala de frasco Schott de 100 mL, com o intuito de identificar a viabilidade de aumentar a escala de um processo de expressão transiente em células S2. Várias características do processo de cultivo em suspensão nos permitiram avaliar melhor as cinéticas de produção transiente nos diferentes agentes testados. Entre estas características ou vantagens podemos citar a facilidade para amostragem sem necessidade de descolar as células, facilitando checar o número e viabilidade celular em diferentes tempos do cultivo, e também resultando em uma amostra mais homogênea para análise da proteína; pouca manipulação requerida antes ou depois da transfecção (em placa era necessário a troca do meio antes da transfecção, e 4 ou 24 horas depois dela), além disso reduz o custo associado ao consumo de material de cultivo descartável (placas), confirmando a vantagem de se otimizar as condições de expressão de

genes heterólogos em células de drosófilas, uma vez que estas crescem facilmente em suspensão, facilitando seu uso em bioprocessos.

O escalonamento de bioprocessos faz parte fundamental na criação de uma plataforma de expressão. Por este motivo, a realização de um experimento preliminar em larga escala com a finalidade de verificar a reprodutibilidade dos resultados obtidos nas primeiras etapas representou uma fase importante no decorrer do trabalho. Deste modo, na Figura 19 conseguimos uma expressão transiente de RVGP em frasco tipo “spinner” durante 6 dias de cultivo. Embora neste experimento tenhamos enfrentado grande dificuldade para conseguir um bom crescimento celular, possivelmente associado à falta de oxigênio, conseguimos uma produção crescente até o dia 5 do experimento. Acreditamos que um aprimoramento nas condições do cultivo poderão melhorar os níveis de expressão, sendo necessário o desenvolvimento de experimentos futuros onde sejam controladas as condições de oxigênio do cultivo.

A verificação do consumo de alguns nutrientes essenciais durante os cultivos se faz necessária para um melhor aproveitamento do cultivo e também para investigar o efeito da suplementação destes nutrientes na produção de proteínas recombinantes. Isso porque, se houver falta de um destes componentes essenciais do meio de cultivo, a formação e rendimento da proteína poderão ser afetados.

Desta forma foi feita uma análise de consumo de aminoácidos no primeiro experimento em frasco de cultivo “shott”. Foi encontrado que os aminoácidos mais consumidos foram prolina, serina e cisteína, sendo que cisteína zerou para todos os agentes de transfecção (Figura 14). Estudos anteriores realizados por Swiech, 2007 demonstraram que os aminoácidos prolina, serina, glutamina e cisteína foram os mais consumidos pela linhagem recombinante S2AcGPV, chegando a muitos casos à exaustão.

Serina e cisteína são aminoácidos que apresentam um papel muito importante no dobramento e estabilização da proteína. A serina participa intensivamente no processamento da proteína através da glicosilação das cadeias laterais, tendo como função auxiliar o bom dobramento e proteger a molécula da degradação por proteases (JENTOFT, 1990). Por outro lado, a cisteína é bem conhecida pelo seu papel na formação de pontes de enxofre covalentes representando um papel crucial na estabilização de proteínas (FREEDMAN, 1990). Também a cisteína desempenha um papel indireto fundamental na proteção das células ao estresse

oxidativo e exerce influência na formação das estruturas secundárias e terciárias das proteínas (Sigma-Aldrich Life Science, 2009).

Neste sentido, foi avaliada a suplementação do aminoácido cisteína, uma vez que este aminoácido tem sido sugerido como componente chave na estabilização de proteínas (FREEDMAN, 1984). Estas estratégias foram usadas no experimento 3s e nos frascos de cultura tipo “spinner” com volume de trabalho 100 mL e 250 mL. Radford, Reid e Greenfield, 1997, observaram que em cultivos com Sf9, em meio SF-900 II, o único aminoácido completamente consumido foi a cisteína. Eles observaram também que junto à exaustão da cisteína, o consumo de outros aminoácidos foi interrompido, indicando que a cisteína influencia o metabolismo celular. Além disso, também foi observado limitação na produção da proteína específica na ausência desse aminoácido.

Foi encontrado na segunda análise de aminoácidos que os valores correspondentes ao ponto inicial (tempo=0 horas) de todos os aminoácidos se encontravam baixos (Figuras 19 e 21) em relação aos valores iniciais encontrados no experimento 1s (Figura 14), sugerindo uma degradação do meio de cultura SF900II. Estudos neste sentido foram realizados por Heeneman et al., 1993, que avaliaram as concentrações de glutamina e amônia em meios comerciais para cultura de células, e relataram que o armazenamento dos meios por longos períodos de tempo leva à degradação da glutamina e acumulação de amônia como produto de degradação.

Esses resultados sugerem a importância de uma cuidadosa análise dos meios de cultura empregados nos experimentos, e de uma suplementação adequada que possa garantir a presença dos nutrientes necessários para a expressão da proteína de interesse.

Como foi mencionado na metodologia, os plasmídeos usados para transfecção, contendo ou não o sinal BiP, possuem um promotor Mt para indução da expressão com metais pesados (neste caso foi usado CuSO_4 na concentração final de 700 μM). Trabalhos anteriores feitos por Santos et al., 2007 e Lemos et al., 2009, confirmaram a importância de estabelecer parâmetros focados na correta indução das células. Em uma transfecção transiente o tempo é uma variável muito importante, e a literatura indica que o indutor deve estar em contato com as células transfectadas por aproximadamente 72 horas (Lemos et al., 2009). Por esta razão fizemos um teste avaliando o efeito de transfectar células já submetidas previamente a uma adaptação com CuSO_4 , antes de ser transfectadas, para assim evadir a etapa de indução pós-

Discussão

transfecção. Nestes experimentos foi encontrado que o CuSO_4 , quando adicionado no início do cultivo 1×10^6 cel/mL, afetou o crescimento celular provocando uma fase lag maior. Resultados obtidos por Lemos et al, 2009 não encontraram diferença no crescimento, pelo qual é evidente que quando o indutor é adicionado já na fase exponencial, o efeito é imperceptível. Os resultados da análise de ELISA para RVGP mostraram que esta estratégia afetou a produção da proteína, uma vez que não foi possível detectar a RVGP em nenhum dos agentes testados.

Finalmente, o sistema de transfecção transiente apresentado neste trabalho, embora com rendimentos de proteína ainda baixos quando comparado com as produções obtidas em linhagens estáveis, verifica a possibilidade que tem as células S2 de produzir proteínas complexas (como é o caso de uma glicoproteína) num curto período de tempo, e apresenta este processo passível de otimizações, com a finalidade de aumentar os níveis de expressão. Também, é importante ressaltar que por serem metodologias diferentes e por encontrarmos em fases preliminares de otimização, ainda é prematura uma comparação entre esses dois sistemas. Também é importante citar neste ponto, que ainda hoje, com todos os aprimoramentos da tecnologia de expressão transiente, uma das principais desvantagens da expressão transiente ainda é a baixa produção em relação aos sistemas de expressão estável (WULHFARD, 2009).

7 CONCLUSÕES

1. Nos experimentos realizados em placa de cultura para expressão transiente de EGFP conseguimos obter uma porcentagem máxima de células fluorescentes (medidas por citometria de fluxo) de 4%, valor obtido em células transfectadas com Cellfectin, porém, não foram observadas diferenças entre os métodos avaliados.
2. Na transfecção pelo método de precipitação por fosfato de cálcio é conveniente usar soro fetal bovino na hora da transfecção, com a finalidade de diminuir a aparição de grandes precipitados.
3. Nos experimentos realizados em placa de cultura para expressão transiente de RVGP, foi possível obter uma produção de até $80 \text{ ng}/10^7 \text{ cel}$ de RVGP (medida por ELISA). Novamente o método que mostrou melhores resultados foi o Cellfectin, sem superioridade sobre ExGen500. Os valores de RVGP obtidos para células transfectadas com fosfato de cálcio foram os mais baixos.
4. Nas transfecções feitas em cultura em placa foi encontrado que a densidade celular teve efeito sobre a porcentagem de células fluorescentes, porém o efeito deste parâmetro sobre a expressão de RVGP não foi tão notório.
5. A concentração de DNA e o volume de agente de transfecção mostraram ser de vital importância na expressão da proteína RVGP.
6. Nos experimentos de expressão transiente de RVGP realizados em cultivos em suspensão usando o plasmídeo pMTiRVGP, foi atingida uma produção de até $220 \text{ ng}/10^7 \text{ cel}$ e uma produção volumétrica de 270 ng/mL após 120 horas de indução com CuSO_4 . Produzindo em média $5,4 \text{ } \mu\text{g}$ por frasco. Não foram encontradas diferenças significativas entre os diferentes métodos de transfecção.
7. A expressão transiente de RVGP em frasco agitado foi 4 vezes menor quando foi usado o plasmídeo pMTRVGP (não contendo o sinal BiP), nas células transfectadas com Cellfectin, ExGen500 e fosfato de cálcio.
8. Em cultivo preliminar feito em frasco de cultivo tipo “spinner” foi possível atingir uma produção de RVGP de $140 \text{ ng}/10^7 \text{ cel}$ e uma produção volumétrica de 120 ng/mL , produzindo em média $7,2 \mu\text{g}$ por frasco.

-
9. Todos os agentes de transfecção utilizados neste trabalho apresentaram semelhantes resultados de expressão da proteína recombinante. Assim, o cálculo aproximado da relação de custo entre os diferentes agentes mostrou que o valor de cada transfecção nos experimentos feitos em frasco agitado para JetPEI foi de 27R, do ExGen500 foi de 45R e do Cellfectin foi de 67,5R. Na transfecção com fosfato de cálcio não foi usado kit comercial, pelo qual o valor encontra-se entorno de 6R. Desta forma, o Fosfato de cálcio seria o agente a ser recomendado pelo critério de custo, no entanto, devido aos inconvenientes encontrados neste método (uso do Soro Fetal Bovino e presença de artefatos), o uso do PEI na transfecção transiente de células S2 não pode ser descartado.

8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1. Realizar análise de nutrientes e suplementação do cultivo.
2. Realizar um experimento em frasco tipo “spinner”, em condições mais controladas de oxigênio.
3. Uma razão de 1:2 de DNA: PEI foi suficiente para a expressão de RVGP, sendo importantes estudos posteriores testando 1:3.
4. A concentração de DNA usada foi de 1µg/mL, precisando também testar concentrações maiores (2-3µg/mL).
5. O meio de cultura pode ser um fator importante na eficiência da transfecção, razão pela qual também seria importante realizar experimentos de transfecção usando outros meios de cultivo para células de inseto.
6. Embora testes *in vivo* com a proteína obtida de culturas estáveis de S2 já tenham sido feitos, é importante também uma análise futura *in vivo* da proteína obtida de forma transiente.
7. Verificada a eficiência do PEI através do kit JetPEI, sugerimos avaliar o uso da molécula pura, pois os custos da transfecção poderiam ser bastantes reduzidos.

REFERÊNCIAS

ALTMANN, F. Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. **Glycoconjugate Journal**, v.16, p. 109–123, 1999.

ANGELA, M. I. Calcium enhances the transfection potency of plasmid DNA-cationic liposome complexes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1463, p. 279-290, 1999.

ARICESCU, A. R.; LU, W.; JONES, E. Y. A time- and cost-efficient system for highlevel protein production in mammalian cells. **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.**, v. 62, p. 1243–1250, 2006.

ASHRAF, S. et al. High level expression of surface glycoprotein of rabies virus in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice. **Journal of Biotechnology**, v. 119, p. 1-14, 2005.

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

BACKLIWAL, G. et al. High-Density Transfection With HEK-293 Cells Allows Doubling of Transient Titers and Removes need for A Priori DNA Complex Formation With PEI. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 99, No. 3, 2008.

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

BASSANI, M. **Transient Transfection of HEK293 Cells in suspension: Process Characterization and Optimization by Applying Invasive Nucleotide and Non-invasive Electronic Nose Technology**. 192p. Tese de doutorado. Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig. Alemanha, 2005.

BATISTA, F. R. Influence of culture conditions on recombinant *Drosophila melanogaster* S2 cells producing rabies virus glycoprotein cultivated in serum-free médium. **Biologicals** v. 37, p. 108-118, 2009.

BELLOSTA, P.; COSTA, M.; LIN, D. A.; BASILICO, C. The receptor tyrosine kinase ARK mediates cell aggregation by homophilic binding. **Mol Cell Biol.**, v. 15, p. 614-625, 1995.

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

BENMANSOUR, A. et al. Antigenicity of rabies virus glycoprotein. **J. Virol.**, v. 65, n. 8, p. 4198-203, 1991.

BENTING, J. et al. Protein expression in *Drosophila* Schneider cells. **Analytical Biochemistry**, v.278, p.59-68, 2000.

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

BOLLATI-FOGOLIN, M.; COMINI, M. **Cloning and expression of heterologous proteins in animal cells**. In: Leda Castilho; Angela Moraes; Elisabeth Augusto; Mike Butler. (Org.). *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy*. 1 ed. Londres: Taylor and Francis, v. 1, p. 39-73, 2007.

BOROJEVIC, R. **Biotecnologia na área de saúde humana e animal, bioengenharia e biomimética**. Disponível em: <www.anbio.org.br/pdf/2met_tendencias_futuras_saude.pdf>. Acesso em: Outubro, 2010.

BOUSSIF, O. et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, n. 16, p. 7297–7301, 1995.

BOUSSIF, O.; ZANTA, M. A.; BEHR, J. P. Optimized galenics improve in vitro gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold. **Gene Ther**, v. 3, p. 1074–1080, 1996.

BRILLET, K.; PEREIRA, C. A.; WAGNER, R. Expression of Membrane Proteins in *Drosophila Melanogaster* S2 Cells: Production and Analysis of a EGFP-Fused G Protein-Coupled Receptor as a Model. **Methods in molecular Biology**, v. 601, p. 119-133, 2008.

BROOKS, M. A.; KURTTI, T.J. Insect cell and tissue culture. **Annual Review of Entomology**, v. 16, p. 27-52, 1971.

BRUNNER, S. et al. Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus. **Gene Therapy**, v. 7, p. 401-407, 2000.

BRUNNER, S. et al. Overcoming the nuclear barrier: Cell cycle independent nonviral gene transfer with linear polyethylenimine or electroporation. **Molecular Therapy**, v. 5, n. 1, p. 80-86, 2002.

BUCHS, M. et al. High-Throughput Insect Cell Protein Expression Applications In: **Methods in Molecular Biology: High Throughput Protein Expression and Purification**, vol. 498. Humana Press, Springer Science and Business Media, Totowa, NJ, 2009, p. 498.

BUNCH, T. A.; GRINBLAT, Y.; GOLDSTEIN, L. S. Characterization and Use of the *Drosophila* Metallothionein Promoter in Cultured *Drosophila melanogaster* Cells. **Nucleic Acids Res.**, v. 16, p. 1043-1061, 1988.

BUTTLER, M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 68, p. 283–291, 2005.

CHA, H. J. et al. Comparative production of human interleukin-2 fused with green fluorescent protein in several recombinant expression systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 24, p.225-233, 2005.

CHAN, C. K.; JANS, D. A. Using nuclear targeting signals to enhance non-viral gene transfer. **Immunol. Cell. Biol.**, v. 80, n. 2, p. 119-30, 2002.

CHENUET S. et al. Calcium Phosphate Transfection Generates Mammalian Recombinant Cell Lines With Higher Specific Productivity Than Polyfection. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, No. 5, 2008.

CHERBAS, L.; CHERBAS, P. Transformation of *Drosophila* cell lines: An alternative approach to exogenous protein expression. **Baculovirus Expression Protocols**. 2 ed. Totowa: Humana Press, v. 338, p.317-340, 2007.

CHERBAS, L.; MOSS, R.; CHERBAS, P. Transformation techniques for *Drosophila* cell lines. **Meth. Cell Biol.**, v. 44, p. 161–179, 1994.

COLOSIMO, A. et al. Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. **Biotechniques**, v. 29, p. 314–324, 2000.

COSTA, W. A. et al. **Manual Técnico do Instituto Pasteur: profilaxia da raiva humana**. 2. Ed. São Paulo: Instituto Pasteur, 2000.

DEML, L.; WOLF, H.; WAGNER, R. High level expression of hepatitis B virus surface antigen in stably transfected *Drosophila* Schneider-2 cells. **Journal of Virological Methods**, v.79, p.191-203, 1999.

DEROUAZI, M. et al. Serum-free large-scale transient transfection of CHO cells. **Biotechnol Bioeng**, v. 87(4). p. 537-45, 2004.

DIETZSCHOLD, B. Oligosaccharides of the glycoprotein of rabies virus. **J. Virol.**, v. 23, n. 2, p. 286-93, 1977.

DOMS, R. W. et al. Folding and assembly of viral membrane proteins. **Virology**, v. 193(2) p. 545-62, 1993.

DRINGS, A. et al. Is there an advantage to including the nucleoprotein in a rabies glycoprotein subunit vaccine? **Vaccine**, v. 17, p.1549–1557, 1999.

DUROCHER, Y.; PERRET, S.; KAMEN, A. Highlevel and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. **Nucleic Acids Res.**, v. 30, E9, 2002.

ERTL, H. C. J. Novel Vaccines to Human Rabies. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 3, E9, p. 515, 2009.

FARRELL, P.; IATROU, K. Transfected insect cells in suspension culture rapidly yield moderate quantities of recombinant proteins in protein-free culture medium. **Protein Expression and Purification**, v. 36, p. 177–185, 2004.

FELGNER, P. L. et al.. Lipofection: A highly efficient lipid-mediated DNA transfection procedure. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84. p. 7413–7417, 1987.

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

FREEDMAN, R. Native disulphide bond formation in protein biosynthesis: evidence for the role of protein disulphide isomerase. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 9, p. 438-441, 1984.

GALESI, A. L. et al. Growth of recombinant *drosophila melanogaster schneider 2* cells producing rabies virus glycoprotein in bioreactor employing serum-free medium. **Cytotechnology**, v. 57(1). p. 73-81, 2008.

GAO, X.; HUANG, L. Cationic liposome-mediated gene transfer. **Gene Therapy**. v. 2. p. 710–722, 1995.

GARCIA-ALLES, L. F. et al. Endogenous phosphatidylcholine and a long spacer ligand stabilize the lipid-binding groove of CD1b. **EMBO J.**; v. 25(15), p. 3684–3692, 2006.

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

GAUDIN, Y. et al. Reversible conformational changes and fusion activity of rabies virus glycoprotein. **J. Virol.**, v. 65, n. 9, p. 4853-4859, 1991.

GAUDIN, Y. et al. Soluble ectodomain of rabies virus glycoprotein expressed in eukaryotic cells folds in a monomeric conformation that is antigenically distinct from the native state of the complete, membrane-anchored glycoprotein. **Journal Gen. Virol.**, v. 80, p. 1647-56, 1999.

GAUDIN, Y. Folding of rabies virus glycoprotein: Epitope acquisition and interaction with endoplasmic reticulum chaperones. **J Virol.**, 71(5). p. 3742-50, 1997.

GEISSE, S. Reflections on more than 10 years of TGE approaches. **Protein Expression and Purification**, v. 64. p. 99–107, 2009.

GODBEY W. T. et al. Improved packing of poly(ethylenimine)/DNA complexes increases transfection efficiency. **Gene Ther.**, v. 6, n. 8, p. 1380-1388, 1999a.

GODBEY W. T.; WU K. K.; MIKOS A. G. Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. **Journal Control Release**, v. 60, n. 2-3, p. 149-160, 1999b.

GODBEY W. T.; WU K. K.; MIKOS A. G. Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle. **Journal Biomed. Mater. Res.**, v. 45, n. 3, p. 268-75, 1999c.

GODBEY W. T.; WU K. K.; MIKOS A. G. Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, n. 9, p. 5177-5181, 1999d.

GODBEY, W. T. Poly(ethylenimine)-mediated transfection: a new paradigm for gene delivery. **Journal Biomed. Mater. Res.**, v. 51, n. 3, p. 321-8, 2000.

GORMAN, C. M., et al. The Rous sarcoma virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eukaryotic cells by DNA-mediated transfection. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.79, 6777-6781, 1982.

GRABENHORST, E. et al. Genetic engineering of recombinant glycoproteins and the glycosylation pathway in mammalian host cells. **Glycoconjugate Journal**, v.16, p.81-97, 1999.

GRAHAM, F. L.; VAN DER Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. **Virology**, v. 52(2). p. 456-67, 1973.

GRANADOS, R.; LI, G.; BLISSARD, G. W. Insect Cell Culture and Biotechnology. **Virologia Sinica**, v. 22, p. 83-93, 2007.

GROSJEAN, F. et al. S-phase synchronized CHO cells show elevated transfection efficiency and expression using CaPi. **Cytotechnology**, v. 38, n. 1-2, p. 57-62, 2002.

GROSJEAN, F.; BERTSCHINGER, M.; HACKER, D. L.; WURM, F.M.. Multiple glycerol shocks increase the calcium phosphate transfection of non-synchronized CHO cells. **Biotechnol. Lett.** 28:1827–1833, 2008.

GUNDERSEN-RINDAL D.; SLACK J. M.; LYNN D. E., Transfection of Lymantria dispar insect cell lines. **Meth Cell Sci** 22:257–263, 2001.

GUPTA, P. K. et al. Immunogenic and antigenic properties of recombinant soluble glycoprotein of rabies virus. **Vet. Microbiol.**, v. 108, n. 3-4, p. 207-14, 2005.

HEENEMAN, S.; DEUTZ, N. E; BUURMAN, W. A. The concentrations of glutamine and ammonia in commercially available cell culture media. **J. Immunol Methods**, v. 166, p. 85–91, 1993.

HASSAINE, G. et al. Semliki Forest virus vectors for overexpression of 101 G protein-coupled receptors in mammalian host cells. **Protein Expression Purification**, v. 45, n. 2, p. 343–351, 2006.

HONG, K.; SHERLEY, J.; LAUFFENBURGER, D. A. Methylation of episomal plasmids as a barrier to transient gene expression via a synthetic delivery vector. **Biomolecular Engineering**, v. 18, n. 4, p. 185-192, 2001.

IVEY-HOYLE, M. Recombinant gene expression in cultured drosophila melanogaster cells. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 2, p. 704-707, 1991.

JENTOFT, N. Why are proteins O-glycosylated? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 15, p. 291-294, 1990.

JOHANSSON, D. et al. Efficient expression of recombinant human monoclonal antibodies in Drosophila S2 cells. **Journal of Immunological Methods**, v. 318, n. 1-2, p. 37-46, 2007.

JORDAN, M.; WURM, F. Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate. **Methods**, v. 33, p. 136-143, 2004.

JORGE S.A.C.; SANTOS A. S.; SPINA A.; PEREIRA C. A. Expression of the hepatitis b virus surface antigen in Drosophila S2 cells. **Cytotechnology**, v. 57. p.51-59, 2008.

KANKANAMAGE, P. J. et al. Further characterization of the rabies virus glycoprotein produced by virus-infected and G cDNA-transfected cells using a monoclonal antibody, #1-30-44, which recognizes an acid-sensitive epitope. **Microbiol. Immunol. (extenso)**, v.47, n.5, p. 337–349, 2003.

KEITH M. B. A. et al. Use of flow cytometry to rapidly optimize the transfection of animal cells. **BioTechniques**, v. 28. p.148–154, 2008.

KHOSRAVI-DARANI, K. et al. Calcium Based Non-viral Gene Delivery: An Overview of Methodology and Applications. **Acta Medica Iranica**, v. 48, No. 3, 2010.

KIRKPATRICK R. B. Heavy chain dimers as well as complete antibodies are efficiently formed and secreted from drosophila via a bip-mediated pathway. **J Biol Chem.**, v. 270(34), p. 19800-5, 1995.

LAM, A. M. I.; CULLIS, P. R. Calcium Enhances the Transfection Potency of Cationic Liposome-Plasmid DNA Complexes. **Biochimica et Biophysica Acta** 1463, p. 279-290, 2000.

LANGER, Eric S. On the Horizon: New Expression Systems to Become Common Industry Platforms New expression systems compete for attention. **BioPharm. International**, v. 22, 2009.

LECHARDEUR, D. et al. Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. **Gene Therapy**, v. 6, n. 4, p. 482-497, 1999.

LEE, J. E.; FUSCO, M. L.; OLLMANN, S. E. An efficient platform for screening expression and crystallization of glycoproteins produced in human cells. **Nature Protocols**, v. 4, p. 592–604, 2009.

LIU, C. et al. Transient Transfection Factors for High-Level Recombinant Protein Production in Suspension Cultured Mammalian Cells. **Mol Biotechnol**, v. 39, p. 141–153, 2008.

LOOMIS, K. et al. InsectDirect™ System: rapid, high-level protein expression and purification from insect cells. **Journal of Structural and Functional Genomics**, v. 6, p.189–194, 2005.

LOYTER, A. et al. Mechanisms of DNA entry into mammalian cells. II. Phagocytosis of calcium phosphate DNA co-precipitate visualized by electron microscopy. **Exp Cell Res**, v. 139, p. 223-234, 1982a

LOYTER, A.; SCANGOS, G. A.; RUDDLE, F. H. Mechanisms of DNA uptake by mammalian cells: fate of exogenously added DNA monitored by the use of fluorescent dyes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 79, p. 422-426, 1982b.

LUKACS, G. L. et al. Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. **Journal Biol. Chem.**, v. 275, n. 3, p. 1625-9, 2000.

MAILLARD, A. P.; GAUDIN, Y. Rabies virus glycoprotein can fold in two alternative, antigenically distinct conformations depending on membrane-anchor type. **Journal of General Virology**, v.83, p.1465–1476, 2002.

MAITLAND, N. J.; J. K., McDougall. Biochemical transformation of mouse cells by fragments of herpes simplex virus DNA. **Cell**, v. 11, p. 233-241, 1977.

MANNISTO, M. et al. The role of cell cycle on polyplex-mediated gene transfer into a retinal pigment epithelial cell line. **Journal Gene Med.**, v. 7, n. 4, p. 466-76, 2005.

McCARROLL, L.; KING, L. A. Stable insect cell cultures for recombinant protein production. **Current Opinion in Biotechnology**, v.8, p.590-594, 1997.

MEISSNER, P. et al. Transient gene expression: Recombinant protein production with suspension-adapted HEK293-EBNA cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 75, p. 197–203, 2001.

MENDONÇA, R. Z. et al. Preparation of human rabies vaccine in VERO cell cultures using a microcarrier system. **Bra J Med Biol Res**, v. 26(12). p. 1305–17, 1993.

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

MOCHIZUKI, H. et al. High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells. **J. Virol.**, v. 72, n. 11, p. 8873-8883, 1998.

MORIMOTO, K.; KAWAI, A.; MIFUNE, K. Comparison of rabies virus g proteins produced by cdnatransfected animal cells that display either inducible or constitutive expression of the gene. **J. Gen. Virol.**, v. 73, p. 335-345, 1992.

MORROW, J. Optimizing Transient Gene Expression. **Genetic Engineering & Biotechnology News**, v. 28, n. 5, 2008.

MULLER, N. **Transient gene expression for rapid Protein production: studies & optimizations under serum-free conditions**. 120 f. Tese. (Doutorado em Ciências) - École Polytechnique Fédérale De Lausanne, Lausanne, 2005.

NETTLESHIP, J. E.; RAHMAN-HUQ, N.; OWENS, R. J. The production of glycoproteins by transient expression in mammalian cells. **Methods Mol Biol.**, v. 498, p. 245–263, 2009.

NETTLESHIP, J. et al. Recent advances in the production of proteins in insect and mammalian cells for structural biology. **Journal of Structural Biology**, v. 172, p. 55-65, 2010.

O'CALLAGHAN, P. M.; JAMES, D. C. Systems biotechnology of mammalian cell factories. **Briefings in functional genomics and proteomics**, v. 7, p. 95-110, 2008.

OGAY, I. D. et al. Transfection of insect cell lines using polyethylenimine **Cytotechnology**, v. 51, p. 89–98, 2006.

OMS : **Raiva**. Folha de dados nº 99 revisto em Setembro 2006, disponível no site: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/fr/index.html>> Acesso em: 12 abril 2010.

ORRANTIA, E.; CHANG, P. L. Intracellular distribution of DNA internalized through calcium phosphate precipitation. **Exp Cell Res**, v. 190, p. 170-174, 1990.

PARKA, J. H. et al. Optimization of transfection conditions for expression of green fluorescent protein in *Drosophila melanogaster* S2 cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v.25, 558–563, 1999.

PERRIN, P.; THIBODEAU, L.; SUREAU, P. Rabies immunosome (subunit vaccine) structure and immunogenicity. Pre- and post-exposure protection studies. **Vaccine**, 3, n. 3, p. 325-32, 1985.

PÉREZ, O.; PAOLAZZI, C. C. Production methods for rabies vaccine. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 1997, vol. 18, p. 340-347.

PFEIFER, T. A. Expression of heterologous proteins in stable insect cell culture. **Current Opinion in Biotechnology**, v.9, p.518-521, 1998.

- PHAM, P. L.; KAMEN, A.; DUROCHER, Y. Large-scale transfection of mammalian cells for the fast production of recombinant protein, **Mol Biotechnol**, v. 34, p. 225–237, 2006.
- PICCINNI, S. A. et al. Krüppel-like Factors regulate the *Lama1* gene encoding the Laminin $\alpha 1$ chain. **J. Biol. Chem.**, v. 279, Issue 10, p. 9103-9114, 2004.
- POLLARD, H. et al. Ca²⁺-sensitive cytosolic nucleases prevent efficient delivery to the nucleus of injected plasmids. **Journal of Gene Medicine**, v. 3, n. 2, p. 153-164, 2001.
- PREHAUD, C. et al. Characterization of a new temperature-sensitive and avirulent mutant of the rabies virus. **Journal Gen Virology**, v. 70, p. 133-43, 1989.
- RADFORD, K. M.; REID, S.; GREENFIELD, P. F. Substrate limitation in the baculovirus expression vector system. **Biotechnol. Bioeng.**, v.56, p. 32-44, 1997
- RÄMET, M. et al. JNK signaling pathway is required for efficient wound healing in *Drosophila*. **Dev Biol.**, v. 241, p. 145–156, 2002.
- RÄMET, M. et al. Functional genomics analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. **Nature** 416:644–648, 2002.
- RAMYA R., et al. Expression and solubilization of insect cell based rabies virus glycoprotein and assessment of its immunogenicity and protective efficacy in mice. **Clin Vaccine Immunol**. Aug. 3, 2011.
- RACANIELLO, V. **Architecture of a bullet-shaped virus**. Disponível em: <<http://www.virology.ws/2010/02/23/architecture-of-a-bullet-shaped-virus>>
- SAKAI, M. et al. Studies on the structures required for structural and functional maturation of rabies virus glycoprotein (G) in G cDNA- transfected cells. **Microbiology and Immunology**, v.48, n. 11, p.853-864, 2004.
- SAKAMOTO, S. et al. Studies on the structures and antigenic properties of rabies virus glycoprotein analogues produced in yeast cells. **Vaccine**, v.17, p.205-218, 1999.
- SANTOS, M. G. et al. Improving heterologous protein expression in transfected *Drosophila* S2 cells as assessed by EGFP expression. **Cytotechnology** 54:15–24, 2007
- SCHNEIDER, I. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. **Journal Embryology, Express Morphology**, v. 27, p. 363-365, 1972.
- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS). **Mapas da Raiva no Brasil, 2009**. Disponível em: <www.saude.gov.br/svs>. Acesso em: 12 maio 2010.
- SEGAL, D.; CHERBAS, L.; CHERBAS, P. Genetic transformation of *Drosophila* cells in culture by P element-mediated transposition. **Somatic Cell Molecular Genetic**, v. 22, p. 159-165, 1996.
- SHIN, H. S.; CHAO, H. J. Facile and statistical optimization of transfection conditions for secretion of foreign proteins from insect *Drosophila* S2 cells using green fluorescent protein reporter. **Biotechnology Progress**, v.18, p. 1187-1194, 2002.
- SHIN, H. S.; LIM, H. J.; CHAO, H. J. Quantitative monitoring for secreted production of human interleukin-2 in stable insect *Drosophila* S2 cells using a green fluorescent protein fusion partner. **Biotechnology Progress**, v.19, p.152-157, 2003.

Sigma-Aldrich Life Science. **Cell Culture – Media Expert**. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/Cell_Culture/Key_Resources/Media_Expert.html>. Cited: 15 dez. 2009.

SINCLAIR J. H.; BRYANT L. A. 20-Hydroxyecdysone increases levels of transient gene expression in transfected *Drosophila* cells. **Nucleic Acids Research**, v. 15(22), 1987.

SISSOËFF, L. et al. Stable trimerization of recombinant rabies virus glycoprotein ectodomain is required for interaction with the p75NTR receptor. **J. Gen. Virol.**, v. 86, p. 2543–2552, 2005.

SCHNELL, M. J. et al. The cell biology of rabies virus: Using stealth to reach the brain. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n.1, p. 51-61, 2010.

SODOYER, R. Expression Systems for the Production of Recombinant Pharmaceuticals. **Biodrugs**, v. 18, p. 51-62, 2004.

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

SWIECH, K. et al. Enhanced production of recombinant rabies virus glycoprotein (rrv-gp) by *drosophila melanogaster* s2 cells through control of culture conditions. **Cytotechnology**, v. 57, n.1, p. 67-72, 2008b.

SWIECH, K. et al. Bioreactor culture of recombinant *drosophila melanogaster* s2 cells: Characterization of metabolic features related to cell growth and production of the rabies virus glycoprotein. **Cytotechnology**, v. 57, n.1, p. 61-66, 2008c.

TADEUS, J et al. Antigenic Properties of Rabies Virus Components. **The Journal of Immunology**, v. 110, p. 269-276, 1973.

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

TORDO, N. et al. Walking along the rabies genome: Is the large G-L intergenic region a remnant gene? **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 83, p. 3914-3918, 1986.

TUCHIYA, K. et al. Characterization of rabies virus glycoprotein expressed by recombinant baculovirus. **Virus Research**, v. 25, p. 1-13, 1992.

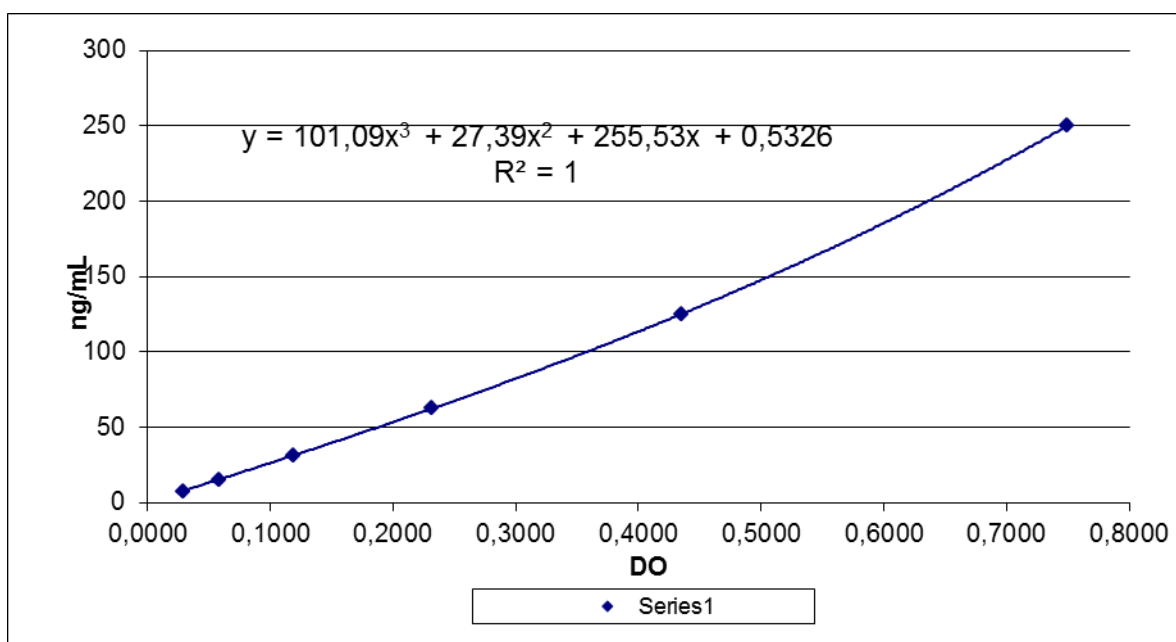
VAN DER, STRATEN A.; JOHANSEN, H.; ROSENBERG, M.; SWEET, R. Introduction and constitutive expression of gene products in cultured *Drosophila* cells using hygromycin B selection. **Curr Methods Mol Cell Biol** 1:1–8, 1989.

VENTINI, D.C. et al. Recombinant rabies virus glycoprotein synthesis in bioreactor by transfected *Drosophila melanogaster* S2 cells carrying a constitutive or an inducible promoter. **Journal of Biotechnology**, v. 146, 169–172, 2010.

VOSS, J. **Boletim do Instituto de Tecnologia do Paraná – Tecpar**. Ano 9 – n° 210 – 18 de febrero de 2008.

- WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2010. **Nature Biotechnology**, v. 28, p.917-24, 2010.
- WIETHOFF, C. M.; MIDDLEAUGH, C. R. Barriers to nonviral gene delivery. **Journal Pharm Science**, v. 92, n. 2, p. 203-17, 2003.
- WIGLER, M. et al. Transfer of Purified Herpes Virus Thymidine Kinase Gene to Cultured Mouse Cells. **Cell**, v. 11, p. 223-232, 1977.
- WILSON S. P.; SMITH L. A. Addition of glycerol during DNA exposure enhances calcium phosphate transfection. **Anal Biochem.**, v. 246, p. 148–150, 1997.
- WOJCZYK, B. S. et al. The role of site-specific N-glycosylation in secretion of soluble forms of rabies virus glycoprotein. **Glycobiology**, v.8, n.2, p.121–130, 1998.
- WULHFARD, S. **Transient Recombinant Protein Expression in Mammalian Cells: the Role of mRNA Level and Stability**. 145 f. Tese. (Doutorado em Ciências) - École Polytechnique Fédérale De Lausanne, Lausanne, 2009
- WUNNER, W. H.; BRIGGS D. J. Rabies in the 21st Century. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v. 4(3), p. 591, 2010.
- WURM, F. M.; BERNARD, A. Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production, **Current Opin. Biotech.** v. 10. p. 56–159, 1999.
- WURM, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v. 22, p. 393–1,398, 2004.
- YANG, J. et al. The specificity of rabies virus RNA encapsidation by nucleoprotein. **Virology**, v. 242, p. 107-117, 1998.
- YELVERTON, E. et al. Rabies virus glycoprotein analogs: biosynthesis in Escherichia coli. **Science**, v. 219, p. 614–619, 1983.
- YIN, J. et al. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. **Journal of Biotechnology**, v. 127, p. 335–347, 2007.
- YOKOMIZO, A. Y. et al. Rabies virus glycoprotein expression in Drosophila S2 cells. I. Functional recombinant protein in stable co-transfected cell line. **Biotechnology Journal**, v. 2, p. 102–109, 2007.

APÊNDICES

Apêndice A- Curva padrão do teste de ELISA – Quantificação de RVGP**Figura A1:** Curva padrao de ELISA.**Tabela A1:** Valores de DO associados a cada valor de RVGP

DO1	DO2	DO médio	VALOR DE RVGP (ng/mL)
0,031	0,026	0,0285	7,8
0,06	0,056	0,0580	15,6
0,123	0,114	0,1185	31,2
0,248	0,215	0,2315	62,5
0,480	0,389	0,4345	125
0,789	0,710	0,7495	250
1,314	1,163	1,2385	500

Apêndice B- Tabelas com os valores de porcentagem de células fluorescentes obtidos nos experimentos 1p e 2p

Tabela B1: Efeito dos diferentes parâmetros para padronização da transfecção transiente da EGFP -Experimento 1p

Método	Densidade celular (cel/mL)	Reagente (µL)	DNA (µg)	Mediana Células fluorescentes (%)
Cellfectin	5×10^5	5	0,5	0,61
			1	0,34
			2	0,51
		15	0,5	0,54
			1	0,55
			2	0,39
	1×10^5	5	0,5	2,59
			1	2,41
			2	3,82
		15	0,5	2,76
			1	2,27
			2	2,3
ExGen500	5×10^5	3,3	0,5	0,50
			1	0,50
			2	0,56
		6,6	0,5	0,52
			1	1,24
			2	0,49
	1×10^5	3,3	0,5	3,55
			1	2,96
			2	1,87
		6,6	0,5	3,23
			1	2,42
			2	2,70
Precipitação com fosfato de cálcio	5×10^5	25	0,5	23,5
			1	24,78
			2	20,48
		50	0,5	11,16
			1	8,88
			2	6,92
	1×10^5	25	0,5	29,39
			1	21,60
			2	13,48
		50	0,5	9,16
			1	9,05
			2	7,94

Tabela B2: Efeito dos diferentes parâmetros para padronização da transfecção transiente da EGFP -Experimento 1p

Método	Inóculo (células/poço)	DNA (µg)	CaCl₂ (µl)	Mediana Células fluorescentes (%)
Precipitação com fosfato de cálcio	1×10 ⁵	2	25	32,38
		2	25 (SFB)	14,35
	3×10 ⁵	2	25	32,28
		2	25 (SFB)	18,43

Apêndice C- Tabelas com os valores de RVGP dos experimentos 3p, 4p e 5p**Tabela C1:** Efeito dos diferentes parâmetros para padronização da transfecção transiente da RVGP - Experimento 3p

Método	Densidade celular (cel/mL)	Reagente (µL)	DNA (µg)	RVGP (ng/10 ⁷ cel)
Cellfectin	8×10 ⁵	8	2	48,40
	1×10 ⁶		2	60,89
			4	71,08
Exgen	8×10 ⁵	6,6	2	55,12
			3	31,11
			5	68,57
	1×10 ⁶	8	2	44,56
			3	46,48
			5	49,36
Fosfato de cálcio	8×10 ⁵	25	2	21,50
	1×10 ⁶		2	11,90
			4	38,79

Tabela C2: Efeito da concentração de DNA na transfecção transiente de RVGP- Experimento 4p

Método	Densidade celular (cel/mL)	Reagente (µL)	DNA (µg)	RVGP (ng/10 ⁷ cel)
Cellfectin	1×10 ⁶	15	5	59,83
			10	79,28
			15	49,72
ExGen500	1×10 ⁶	10	5	51,89
			10	59,82
			15	38,87

Tabela C3: Otimização da transfecção transiente de RVGP com Fosfato de cálcio-Experimento 5p

Método	Densidade celular (cel/mL)	Reagente (µL)	DNA (µg)	RVGP 48 h (ng/10 ⁷ cel)	RVGP 72 h (ng/10 ⁷ cel)
Fosfato de cálcio	1×10 ⁶	25	5	57,86	57,86
			15	65,68	54,20
			15 (Glicerol)	62,11	54,87
Re-ransfecção	1×10 ⁶	25	5	70,64	64,16
			15	69,91	75,67

Apêndice D- Tabelas com os valores de RVGP e volumétrica dos experimentos 1s, 2s, 3s e experimento em frasco “spinner”

Tabela D1: Expressão transiente de RVGP usando o plasmídeo pMTiRVGP -Experimento 1s (Produção (ng/10⁷cel)

Método	Densidade celular (cel/mL)	Reagente (μL)	DNA (μg)	RVGP (ng/10 ⁷ cel)		
				24 h	48 h	72 h
Cellfectin	1×10 ⁶	45	15	115,60	136,64	121,90
ExGen	1×10 ⁶	30	15	121,37	125,85	158,17
JetPEI	1×10 ⁶	30	15	147,58	128,26	167,60
Fosfato de cálcio	1×10 ⁶	50	15	153,45	108,57	110,49

Tabela D2: Expressão transiente de RVGP usando o plasmídeo pMTiRVGP -Experimento 1s (Produção volumétrica (ng/mL)

Método	RVGP (ng/mL)		
	24 h	48 h	72 h
Cellfectin	83,00	166,71	149,94
ExGen	87,79	148,50	186,64
JetPEI	104,58	151,35	197,77
Fosfato de cálcio	86,65	132,09	153,21

Tabela D3: Expressão transiente de RVGP usando o plasmídeo pMTRVGP -Experimento 2s (Produção (ng/10⁷cel)

Método	Densidade celular (cel/mL)	Reagente (μL)	DNA (μg)	RVGP (ng/10 ⁷ cel)			
				24 h	48 h	72 h	48 h
Cellfectin	1×10 ⁶	45	15	37,33	41,83	36,43	38,68
ExGen	1×10 ⁶	30	15	22,91	20,21	46,77	32,37
JetPEI	1×10 ⁶	30	15	112,86	115,56	113,31	106,10
CaPO ₄	1×10 ⁶	50	15	41,38	29,67	27,87	27,00

Tabela D4: Expressão transiente de RVGP usando o plasmídeo pMTRVGP -Experimento 2s (Produção volumétrica (ng/mL)

Método	RVGP (ng/mL)			
	24 h	48 h	72 h	48 h
Cellfectin	19,41	40,58	49,18	54,15
ExGen	11,48	21,12	61,73	48,56
JetPEI	68,51	117,87	155,24	159,15
Fosfato de cálcio	20,36	26,20	33,44	35,10

Tabela D5: Expressão transiente de RVGP usando o plasmídeo pMTiRVGP -Experimento 3s (Produção (ng/10⁷ cel))

Método	Densidade celular (cel/mL)	Reagente (μL)	DNA (μg)	RVGP (ng/10 ⁷ cel)				
				24h	48h	72h	96h	120h
Cellfectin	1×10 ⁶	45	15	77,58	78,66	130,22	140,25	171,21
JetPEI	1×10 ⁶	30	15	85,53	93,16	147,75	172,73	187,51
Fosfato de cálcio	1×10 ⁶	50	15	79,75	67,48	127,30	165,73	224,67

Tabela D6: Expressão transiente de RVGP usando o plasmídeo pMTiRVGP -Experimento 3s (Produção volumétrica (ng/mL))

Método	RVGP (ng/mL)				
	24h	48h	72h	96h	120h
Cellfectin	41,6347149	72,107123	127,61575	148,67001	218,003359
JetPEI	46,1868072	86,0164062	142,826323	196,335306	216,259414
Fosfato de cálcio	41,9198008	65,9059029	140,027773	198,876277	276,342325

Tabela D7: Expressão transiente de RVGP em frasco de cultivo tipo “spinner” (Produção (ng/10⁷ cel))

Método	Densidade celular (cel/mL)	Reagente (μL)	DNA (μg)	RVGP (ng/10 ⁷ cel)						
				24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
JetPEI (60mL)	1×10 ⁶	120	60	46,9	114,3	33,6	107,5	131,5	148,9	46,90
Fosfato de cálcio (60mL)	1×10 ⁶	200	60	73,6	97,28	46,9	124,6	138,5	131,6	66,89
Fosfato de cálcio (100mL)	1×10 ⁶	330	100	63,5	73,60	73,6	128,1	131,6	138,5	90,48

Tabela D8: Expressão transiente de RVGP em frasco de cultivo tipo “spinner” (Produção volumétrica (ng/mL))

Método	RVGP (ng/mL)							
	24	48	72	96	120	144	168	
JetPEI 60mL	21,42	66,33	22,99	74,18	108,46	125,12	45,96	
Fosfato de cálcio 60mL	37,54	56,91	31,42	98,81	114,14	115,27	73,14	
Fosfato de cálcio 150mL	27,01	32,75	35,23	62,94	70,51	75,61	55,65	

Apêndice E- Tabelas com os valores da análise de aminoácidos experimentos 1s, 3s e experimento em frasco tipo “spinner”.

Tabela E1: Análise aminoácidos do experimento 1s.

Tempo mM	T0				T48h				T120h			
	Glu	Ser	Pro	Cys	Glu	Ser	Pro	Cys	Glu	Ser	Pro	Cys
SF900II	45,95	14,8	25,64	3								
Cellfectin	40,7	14,33	21,83	2,48	34,46	7,18	12,48	0,89	28,99	3,96	7,46	0,69
JetPEI	39,5	13,31	21,7	2,48	32,64	6,94	13,55	0,45	31,01	3,42	8,01	0,39
Fosfato de cálcio	37,14	11,93	21,46	2,25	29,12	7,1	13,22	0,95	26,98	6,68	11,07	0,65
ExGen500	41,74	12,65	22,56	2,43	21,27	5,66	12,82	0,38	13,9	1,79	6,64	0

Tabela E2: Análise aminoácidos do experimento 3s.

Tempo mM	T0					T48h					T96h					T144h				
	Glu	Ser	Pro	Cys	Leu	Glu	Ser	Pro	Cys	Leu	Glu	Ser	Pro	Cys	Leu	Glu	Ser	Pro	Cys	Leu
Cellf	17,4	4,3	8,1	0,3	4,2	14,9	2,5	6,7	0,3	2,8	12,4	0,9	3,2	2,9	1,1	10,2	0,6	2,5	3,9	0,8
JetPEI	17,0	4,9	9,3	0,4	4,7	13,6	1,8	5,7	0,2	2,2	13,7	0,8	3,3	2,8	0,9	10,1	0,2	1,6	3,1	0,3
Fosfato de cálcio	17,6	4,5	8,2	0,3	4,3	14,9	1,3	4,8	0,1	1,4	11,9	0,2	3,2	3,1	0,5	10,4	0,2	2,7	3,4	0,3

Tabela E3: Análise aminoácidos do experimento em frasco tipo “spinner”.

Tempo mM	T0					T72h					T168h				
	Glu	Ser	Pro	Cys	Leu	Glu	Ser	Pro	Cys	Leu	Glu	Ser	Pro	Cys	Leu
JetPEI 60mL	18,4	4,6	11,6	0,4	5,3	16,6	4,8	9,8	0,3	5,1	10,8	3,0	7,6	3,2	3,3
Fosfato de cálcio 60mL	18,7	5,0	10,3	0,4	4,7	17,6	4,0	8,8	0,3	3,9	14,3	2,3	5,7	3,4	2,1
Fosfato de cálcio 100mL	18,0	4,1	9,3	0,5	4,4	9,9	1,8	5,0	0,3	1,7	9,7	1,4	4,8	3,5	2,0