

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo
Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP
“Dr. Antônio Guilherme de Souza”
Instituto Butantan

Natalia Vicentino

**Comparação de expressão de proteínas estruturais do vírus Chikungunya
(CHIKV) produzido em células de inseto**

São Paulo

2022

Natalia Vicentino

**Comparação de expressão de proteínas estruturais do vírus Chikungunya
(CHIKV) produzido em células de inseto**

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto Butantan, unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza”, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Biotecnologia para Saúde: Vacinas e Biofármacos

Orientadora: Dra. Soraia Attie Calil Jorge

São Paulo

2022

Dados internacionais de catalogação-na-publicação

Catálogo na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)

Vicentino, Natalia

Comparação de expressão de proteínas estruturais do vírus Chikungunya (CHIKV) produzido em células de inseto / Natalia Vicentino ; orientador(a) Soraia Attie Calil Jorge - São Paulo, 2022.

37 p. : il.

Monografia (Especialização) da Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP "Doutor Guilherme de Souza" - Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos.

1. Células S2 2. Chikungunya. 3. Meio de cultura. 4. Livre de soro fetal bovino I. Jorge, Soraia Attie Calil. II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela equipe da Biblioteca do Instituto Butantan

Esta monografia foi elaborada com base no **Guia prático para elaboração de trabalho acadêmico** desenvolvido pela Biblioteca do Instituto Butantan, de acordo com as normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas)

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Natalia Vicentino, aluno(a) do curso **Biotecnologia, vacinas e biofármacos**, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
- 06 meses
- 12 meses
- Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 31 de janeiro de 2022

Natalia Vicentino

.....
aluno(a)

Sonia Jorge

De acordo:.....
Orientador(a):

A minha família pelo carinho e apoio fundamentais para a minha formação,
em especial à minha mãe que madrugou todos os dias para me deixar na rodoviária
a caminho do Instituto Butantan

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Maria de Fátima por acordar todos os dias cedo e me deixar na rodoviária e ao meu pai Carlos por sempre estar disposto a me buscar.

Quero agradecer a Thaissa Consoni Bernadino por sempre me ensinar e auxiliar nas atividades laboratoriais, a Juliana por toda paciência e amizade, a Priscila pelo seu companheirismo e me fazer rir todos os dias. Um agradecimento e admiração a todos os alunos e funcionários do laboratório de biotecnologia viral por todo suporte, em especial minha orientadora Dra. Soraia Attie Calil Jorge por sanar todas minhas dúvidas e me ensinar muito sobre todo o extenso universo da biotecnologia, serei eternamente grata pelo que aprendi.

Agradeço a todas as amigas que realizei durante a especialização, e pelas maravilhosas conversas durante os cafés da manhã, Lais, Bruna, Lucas e Pri, obrigada por tudo.

E por fim quero agradecer a todos os professores e funcionários do Instituto Butantan e do CEFOR que, durante todo o curso, contribuíram para minha formação como profissional e acadêmico.

Este trabalho teve apoio financeiro da Secretaria da Saúde do Governo do Estado de São Paulo.

“Cada segundo é tempo para mudar tudo para sempre.”

Charlie Chaplin

RESUMO

VICENTINO, Natalia. **Comparação de expressão de proteínas estruturais do vírus Chikungunya (CHIKV) produzido em células de inseto**. 2022 37 p. Trabalho de Conclusão de Curso Especialização em Biotecnologia para Saúde – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; Instituto Butantan, São Paulo, 2022.

O vírus Chikungunya (CHIKV) pertence ao gênero *Alphavirus* da família *Togaviridae* e se espalhou pelos trópicos causando surtos em vários países da África, Ásia, Europa e América. A transmissão para humanos é promovida por mosquitos do gênero *Aedes*, abundantes no Brasil. A febre de Chikungunya manifesta-se primeiro como um estágio agudo de inflamação e doença febril, a qual pode evoluir para um estágio crônico de artrite. Com o crescimento urbano acelerado e a globalização, se vê a necessidade da realização de estudos para o controle e prevenção da infecção pelo CHIKV, uma vez que não existem vacinas ou antivirais contra este arbovírus. A abordagem deste trabalho compreende a adaptação celular de células recombinantes de inseto em meio de cultura livre de soro fetal bovino com intuito da expressão das proteínas imunogênicas do CHIKV. Foram avaliados os parâmetros cinéticos das células S2-CHIKV-Hy em dois diferentes meios de cultura e a expressão das proteínas de CHIKV. As células recombinantes foram cultivadas em 2 diferentes meios de cultura : EX-Cell™ 420 e SF900III. Para isso, as células cultivadas em SF900III foram adaptadas em meio EX-Cell™ 420 , pelo aumento semanal de uma fração de 10 % do meio de cultura final, sendo adicionada ao meio de cultura SF900III, no qual as células estavam crescendo originalmente. Após a adaptação atingir 100% de meio EX-Cell™ 420, as células foram inoculadas em 20 mL de meio e levadas a indução por CuSO₄ e a cinética de crescimento celular foi monitorada diariamente pela análise do crescimento, no qual conclui-se que as células cresceram de maneira similar em ambos os meios utilizados. A análise de expressão das proteínas de CHIKV deverá ser realizada posteriormente.

Palavras-chave: Células S2. Chikungunya. Meio de cultura. Livre de soro fetal bovino

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo de transmissão silvestre e urbana do vírus Chikungunya	14
Figura 2 - Reumatismo associado a Chikungunya..	15
Figura 3 - Frascos do tipo T25 cm ² no processo de adaptação de meio celular, partindo de 50% de cada meio até chegar a 100% de meio EX-Cell TM 420.....	21
Figura 4 - Diagrama representativo da adaptação ao novo meio de cultura EX-Cell TM 420	26
Figura 5 - Cinética de crescimento celular	28
Figura 6 - Consumo de glutamina em células cultivadas em diferentes meios livres de SFB	30

Sumário

1.Introdução	12
1.1 Chikungunya	12
1.2 Manifestações Clínicas	14
1.3 Tratamento	16
1.4 Prevenção	16
1.5 Produção de Vacina	17
1.6 Vacinas VLP	17
1.7 Vacinas de subunidades	18
1.8 Vacinas de ácidos nucleicos	19
2.Objetivos	19
2.1 Objetivos Específicos	19
3. Metodologia	20
3.1 Cultura de células S2 (<i>Drosophila melanogaster Schneider 2</i>) e S2-CHIKV-Hy	20
3.2 Adaptação ao meio de cultura EX-Cell™ 420 – Insect Serum- Free Medium	20
3.3 Determinação da concentração e viabilidade celular	21
3.4 Determinação da curva de crescimento celular nos diferentes meios de cultura	22
3.5 Análise de nutrientes	23
3.6 Expressão das proteínas estruturais do CHIKV	23
3.7 Detecção de proteínas em células	23
3.8 Western blotting	23
3.9 SDS- PAGE	25
4.Resultado	25
4.1 Adaptação das células S2CHIKV-Hy ao meio de cultura EX- Cell™ 420 – Insect Serum- Free Medium	25

4.2 Cinética preliminar de crescimento celular	27
5.Discussão	31
6.Conclusões	33
Referências	34

1. INTRODUÇÃO

Evidências apontam que a primeira vacina surgiu na China no século X e era bem diferente da qual estamos acostumados a utilizar, pois os chineses empregavam a inoculação de varíola, transformavam cascas de feridas em um pó contendo o vírus já inativo, e espalhavam nos ferimentos das pessoas já contaminadas, esse método ficou conhecido como variolação, o procedimento também era praticado na África e na Turquia e depois se espalhou pela Europa e pelas Américas (BATUHAN, 2021; BUTANTAN, 2021).

Alguns séculos depois, no ano de 1796, com as pesquisas do médico inglês Edward Jenner as vacinas passaram a ser semelhantes às atuais. Ao perceber que moradores de áreas rurais que haviam contraído *cowpox*, uma doença semelhante à varíola, não ficavam doentes com a varíola humana, Jenner fez um experimento e aplicou em um menino chamado James Phipps de oito anos, uma pequena dose de varíola bovina. O garoto ficou doente, mas manifestou uma forma branda da doença. Após sua recuperação, Jenner introduziu na criança o vírus da doença humana em sua forma mais fatal, retirado de uma ordenhadeira. O menino, já imune, não desenvolveu a varíola. A palavra “vacina” vem de “vacca”, justamente pelo contexto histórico (BUTANTAN, 2021; SARAIVA; DE FARIA, 2019).

A vacinação é a melhor forma de erradicar doenças e conter a propagação de microrganismos nocivos à saúde, é o motivo pelo qual diversas doenças graves e sem cura estão hoje sob controle ou foram extintas, por isso é necessário sempre o incentivo às pesquisas para novas vacinas para diferentes doenças (BUTANTAN, 2021). Algumas doenças, no entanto, são negligenciadas devido a estarem situadas em países mais pobres e subdesenvolvidos como é o caso da febre do Chikungunya e isso ocasiona um desinteresse, falta de incentivo e lentidão em se descobrir e produzir vacinas e antivirais.

1.1 Chikungunya

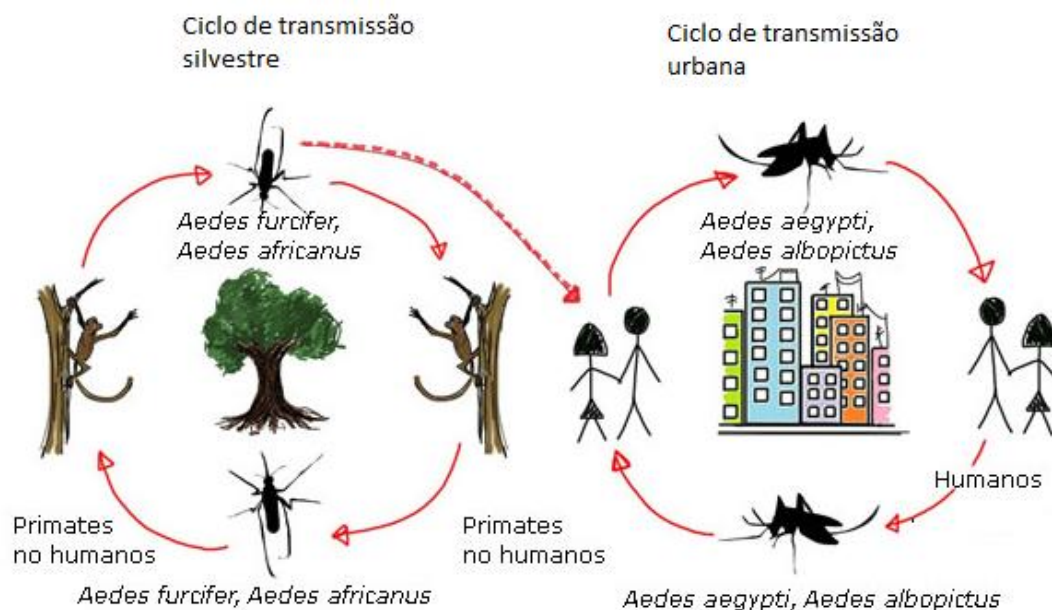
O vírus Chikungunya (CHIKV) tem um genoma de cadeia simples de RNA, pertence ao gênero *Alphavirus* da família *Togaviridae*, do mesmo gênero dos

arbovírus Mayaro e Ross River. O vírus foi detectado pela primeira vez em 1952 na África no Planalto Makonde, onde deram o nome Chikungunya que significa, 'aquele que é contorcido', pois as dores fortes nas articulações causadas pela doença fazem os infectados se contorcerem (CEROL, 2020; SUHANA et al., 2019; TAUIL, 2014).

O vetor do Chikungunya são mosquitos do gênero *Aedes*, sendo *A. aegypti* e *A. albopictus* os principais transmissores que estão presentes nos trópicos e subtropicais; o segundo também se encontra em zonas temperadas do globo, com potencial de causar surtos em zonas atualmente não endêmicas. Apenas os mosquitos fêmea transmitem a doença para humanos e animais, pois é necessário se alimentarem de sangue para a produção de ovos, no entanto machos podem fazer transmissão transovariana do vírus indiretamente e, também, podem transmitir para as fêmeas durante o acasalamento. Suas atividades são mais frequentes no turno diurno, mas podendo estar presente à noite, a reprodução depende de locais que contenham águas paradas, como vasos de plantas, folhagem e recipiente, assim, devido a essas condições o vírus está associado a sanidades e períodos chuvosos (CEROL, 2020; ROUGERON et al., 2015).

O ciclo de transmissão para o CHIKV pode ser o ciclo silvestre (figura 1), documentado nas zonas mais rurais de África e da Ásia. Este ciclo realiza-se entre macacos e pequenos mamíferos, e em mosquitos do gênero *Aedes*, ocasionalmente, o vírus pode passar para a população humana se houverem atividades que impliquem a proximidade com o ambiente silvestre. O segundo ciclo é o urbano, ocorre habitualmente em áreas urbanas de grande densidade populacional, de forma a manter o ciclo mosquito-humano-mosquito, esse último está indiretamente ligado a globalização, mudanças climáticas e o aumento de viagens internacionais por pessoas potencialmente infectadas e a crescente disponibilidade geográfica de vetores competentes. Estes novos cenários criaram condições para a introdução e disseminação de Chikungunya para áreas que antes não eram endêmicas, ou seja, são transmissões autóctones (CEROL, 2020; KHAN et al., 2014; TAUIL, 2014).

Figura 1 - Ciclo de transmissão silvestre e urbana do vírus Chikungunya



Fonte: FERNÁNDEZ; NAVARRO, 2015

No Brasil a febre do CHIKV foi confirmada no estado do Amapá em setembro de 2014 e logo em seguida na Bahia. Ainda em um curto período foram notificados casos da doença em vários estados do Brasil. Entre os anos de 2014 a 2016 teve um elevado número de casos suspeitos, no entanto embora tenha acontecido esse aumento de infecção, se comparada a outros países da América Central os números foram bem menores do que o esperado (SILVA et al., 2018).

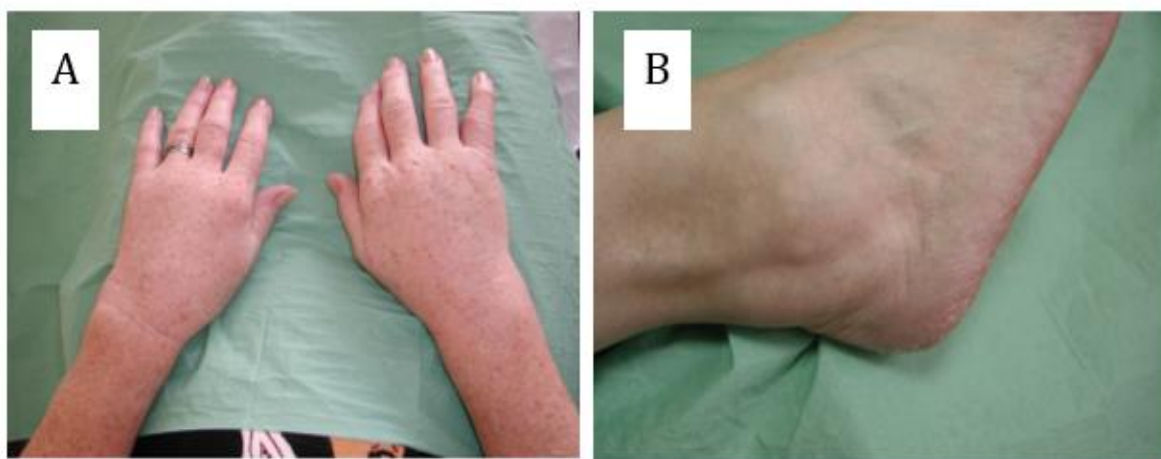
1.2 Manifestações Clínicas

A infecção pelo CHIKV assemelha-se com a da dengue, o seu período de incubação varia de 1 a 12 dias, com início abrupto de febre alta, dores agudas e persistentes nas articulações, cefaleia, fotofobia, mialgia e erupção maculopapular. Em média 25% das pessoas infectadas são assintomáticas, e a poliartralgia caracteriza casos sintomáticos, os sintomas mais agudos da infecção viral se resolvem em torno de 7 a 15 dias, no entanto em 10 a 12% dos casos as dores nas articulações podem durar meses ou anos, com ou sem febre, sendo caracterizada por uma fase crônica (LAERTE; JUNIOR, 2014; TAUIL, 2014).

Os três sintomas que caracterizam a doença são febre alta, erupção e dor nas articulações, normalmente, a erupção é maculopapular e eritematosa, sendo

distribuída na face, membros e tronco. A febre Chikungunya é bilateral caracterizada pelo inchaço nos punhos e tornozelos, podendo atingir as articulações dos joelhos e cotovelos como mostrado na figura 2, nos primeiros dias da doença ocorre a presença da artralgia e gradualmente em poucos dias desenvolve artrites (CAMPOS, 2015; POWERS; LOGUE, 2007).

Figura 2 - Reumatismo associado a Chikungunya.



Fonte: POWERS; LOGUE, 2007

(A) Poliartrite nos punhos e dedos de paciente infectado por CHIKV.(B) Inchaço no tornozelo.

Em crianças o quadro clínico é diferente e as manifestações hematológicas são menos frequentes, no entanto elas fazem parte do grupo de alto risco com manifestações severas e muitas vezes atípicas, possuem uma alta taxa de sintomas dermatológicos, podendo destacar a hiperpigmentação, eritema generalizado e edema maculopapular e, também, complicações neurológicas (THIBERVILLE et al., 2013). Pacientes com caso suspeito de Chikungunya podem não apresentar febre e dor articular, esses casos são classificados como manifestações atípicas. Esses sintomas acontecem devido à resposta imunológica, efeitos diretos do vírus ou pela toxicidade de medicamentos (BRASIL, 2017).

O grupo de risco das manifestações atípicas são pacientes com doenças preexistentes como diabéticos, asmáticos, hipertensos dentre outros, recém nascidos, gestantes e idosos também se encaixam no quadro de risco para doença(CAMPOS, 2015).

Gestantes estão grupo de risco para o vírus Chikungunya pois podem

ocorrer casos de aborto, além de transmissão vertical, situação na qual a mãe é infectada pelo vírus durante o período gestacional e pode passar para o recém-nascido via transplacentária. Os recém-nascidos infectados manifestam febre alta, falta de apetite, edema distal, manifestações cutâneas, convulsões, meningoencefalite e anormalidades ecocardiográficas (BRASIL, 2017; CAMPOS, 2015).

1.3 Tratamento

Não existe um antiviral específico para Chikungunya e não há registro de uma vacina no mercado, a terapia utilizada é de suporte sintomático, hidratação e repouso, sendo o último, um fator protetor para evitar evolução para fase subaguda. Recomenda-se compressas frias como medida analgésica nas articulações acometidas de 4 em 4 horas por 20 minutos (THEES, 2017).

O tratamento é sintomático e tem a utilização de analgésicos, no entanto os anti-inflamatórios não esteroides e a aspirina não devem ser utilizados na fase aguda da doença, devido ao risco de complicações renais e de sangramento. Já os usos de corticoide são indicados nas fases subaguda ou crônica com dores moderadas a intensa, no entanto seu uso é por pouco tempo e em caso de maior duração deve-se atentar ao efeito rebote que pode gerar com seu uso (CAMPOS, 2015; THEES, 2017).

Existem muitos estudos para o desenvolvimento de uma vacina para controlar e erradicar o vírus CHIKV, porém sua produção comercial ainda não aconteceu e não parece ser prioridade pois a taxa de mortalidade do vírus ainda é baixa. Portanto, medidas ambientais e proteção pessoal são passos necessários no controle desta doença. Dentre os estudos publicados destaca-se uma vacina que usa partículas semelhantes ao vírus, também chamadas de VLPs, e esta pode ser a estratégia que vai estimular a produção dos anticorpos que irão neutralizar o vírus e controlar a sua disseminação (CAMPOS, 2015; KUCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012; SEBASTIAN; LODHA; KABRA, 2009).

1.4 Prevenção

A prevenção se deve por ações de controle dos mosquitos, não deixar

possíveis criadouros com água parada, como vasos de plantas, pneus dentre outros objetos e intensificar a fiscalização em parques, escolas e construções. Para evitar infecções do vírus é necessário um bom sistema sanitário e coletivo, por isso além de fiscalizar é importante a cobrança de órgãos públicos para que ocorra essa fiscalização, principalmente em épocas de grandes períodos chuvosos.

Para a proteção individual deve-se usar repelente prevenindo-se de picadas de mosquito infectado e se possível o uso de mosquiteiros principalmente para crianças pequenas menores de dois anos, pois nelas não se pode utilizar repelentes (KUCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012).

1.5 Produção de Vacina

As vacinas são substâncias biológicas que agem na exposição de organismos aos antígenos. Antígenos, por sua vez, são proteínas presentes nos microrganismos que estimulam a produção de anticorpos no corpo humano de forma que este fica imunizado a uma doença (SCHMIDELL et al., 2001). Vacinas podem ser divididas em dois grandes grupos conforme suas características de ação aos patógenos, isto é, as vacinas de origem bacteriana e as de origem viral, porém algumas podem ser aplicadas de uma forma combinada (HERNANDES; DEL VALHE, 2021)

Em geral as vacinas podem ser desenvolvidas por meio de microrganismos atenuados ou inativados, a primeira forma ocorre com os microrganismos vivos, mas sem capacidade de produzir a doença, já na segunda forma os seres vivos são inativados por algum agente físico ou químico.

Outras estratégias para produção de vacina podem envolver muitos processos e inúmeros insumos são necessários. Algumas variáveis de processos são importantes para a eficácia da produção, como a temperatura de cultivo dos microrganismos, meio de cultura, volume e o pH, as variáveis mudam de acordo com a vacina que se tem interesse, bem como as etapas de purificação do antígeno(BOUSADA; PEREIRA, 2017; HERNANDES; DEL VALHE, 2021; SCHMIDELL et al., 2001; SILVA et al., 2020).

1.6 Vacinas VLP

As vacinas de VLP consistem em proteínas estruturais virais automontadas que mimetizam a conformação do vírus do tipo selvagem. Ao exibir epítomos antigênicos que se assemelham ao vírus do tipo selvagem em uma exibição de alta densidade, as vacinas de VLP são imunogênicas e induzem títulos de anticorpos altamente neutralizantes (HERNANDES; DEL VALHE, 2021).

Os VLPs fornecem um perfil de segurança aprimorado, pois são construções não replicantes e não infecciosas. Como o vírus vivo não é usado na fabricação, nem a atenuação viral nem a inativação viral são necessárias durante a produção da vacina, e isso também permite a fabricação de baixa contenção (AKAHATA et al., 2010; SILVA et al., 2020).

O processo de fabricação das vacinas com VLP é complexo, necessita se empregar um sistema de expressão para a produção da vacina VLP que depende do tipo de vírus que será trabalhado, assim como dos requisitos de dobramento de proteínas e modificações pós tradução. Existem diversos sistemas para a expressão das seguintes subunidades: bactéria, leveduras, células mamárias, células de plantas e células de insetos (FUENMAYOR; GÒDIA; CERVERA, 2017; HERNANDES; DEL VALHE, 2021; ROLDÃO et al., 2014).

O sistema baculovírus células de insetos que é dividido em duas fases, infecção e produção é um método rápido e fácil, o que o torna adequado para a produção de vacinas contra vírus cuja proteína de superfície varia a cada surto (ROLDÃO et al., 2014)

1.7 Vacinas de subunidades

Vacina de subunidade é aquela que usa apenas os fragmentos antigênicos de um microrganismo que melhor estimulam uma resposta imune (ANDRADE et al., 2021; FERRAZ, 2021; WHO, 2021).

A produção de vacinas à base de subunidades proteicas exige tecnologia sofisticada, pois envolve organismos vivos, como bactérias e leveduras, que requerem condições especiais para o cultivo afim de evitar a contaminação com outros organismos durante o processo de produção (FERRAZ, 2021).

As vacinas de subunidades produzidas por técnicas de engenharia genética, onde outros microrganismos são programados para produzir a fração antigênica desejada, são chamadas de vacinas recombinantes. As vacinas de subunidades são inerentemente mais seguras porque não se podem reproduzir no receptor. Elas também contêm pouco ou nenhum material estranho e por isso tendem a produzir menos efeitos adversos (ANDRADE et al., 2021)

1.8 Vacinas de ácidos nucleicos

As vacinas de ácido nucleicos ou vacinas de DNA estão entre as vacinas mais modernas e promissoras contra uma variedade de patógenos para os quais os métodos convencionais não têm sido eficientes. Vacinas de DNA são capazes de induzir resposta imune humoral e celular, sem a necessidade de microrganismos vivos (ANDRADE et al., 2021)

Ao contrário das abordagens vacinais que usam um microrganismo inteiro enfraquecido, morto ou partes, uma vacina de ácido nucleico usa apenas uma seção de material genético que fornece as instruções para proteínas específicas (WHO, 2021).

DNA e RNA são as instruções que nossas células usam para fazer proteínas. Uma vacina de ácido nucleico fornece um conjunto específico de instruções às nossas células, seja como DNA ou mRNA, para que elas façam a proteína específica que queremos que nosso sistema imunológico reconheça e responda (MANCIBO et al., 2016; WHO, 2021).

2.OBJETIVOS

Este trabalho visa a comparação de expressão de proteínas estruturais do vírus Chikungunya produzidas em células de inseto S2 recombinantes (*Drosophila melanogaster* Schneider 2), cultivadas em dois meios de culturas livres de soro fetal bovino e proteína animal

2.1 Objetivos Específicos

- Adaptação do cultivo das células S2-CHIKV-Hy em meio EX-Cell™ 420

- Estudo da cinética de crescimento e a expressão das proteínas de Chikungunya em células S2-CHIKV-Hy cultivadas em 2 meios livres de Soro fetal bovino.

3. METODOLOGIA

3.1 Cultura de células S2 (*Drosophila melanogaster* Schneider 2) e S2-CHIKV-Hy

As linhagens de células *Drosophila melanogaster* Schneider 2 selvagem (S2) e S2 recombinante (S2 CHIKV-Hy) foram obtidas no Laboratório de Biotecnologia Viral do Instituto Butantan.

As células estavam congeladas em uma concentração de 10^7 cel/mL, em meio de congelamento (50% de SFB- soro fetal bovino, 40% de SF900™ III SFM (Gibco™), 10% de DMSO (Dimetilsulfóxido)).

Após a retirada dos criotubos contendo as células S2 CHIKV-Hy e S2 selvagem do nitrogênio líquido, esses foram descongelados à temperatura ambiente e depois transferidos para dois frascos do tipo T 25 cm² contendo 4mL de meio de cultura SF900™ III SFM (Gibco™) cada e, posteriormente, colocados em uma estufa de cultivo com a temperatura de 28°C. Depois de 24 horas, ocorreu adesão celular nos frascos de cultivos e ocorreram as trocas de meio para um meio de cultura fresco e as células voltaram a ser mantidas na temperatura 28°C.

3.2 Adaptação ao meio de cultura EX-Cell™ 420 – Insect Serum- Free Medium

Para adaptação das células do meio de cultura SF900™ III SFM (Gibco™) para EX-Cell™ 420, foi necessário fazer um cultivo gradativo, onde no primeiro momento após a contagem das células S2 CHIKV-Hy, transferiu-se 1,50 mL de meio condicionado em um novo frasco T de mesmo volume que o anterior, adicionou-se 1,75 mL de meio novo e mais 1,75 de meio EX-Cell™ 420, contabilizando assim 50% de cada meio e iniciando o processo de adaptação.

Depois de estar com 50% de cada meio, o processo de adaptação seguiu de 10 em 10 por cento, até chegar aos 100% de meio EX- Cell™ 420 (figura 3). Os repiques foram feitos a cada 3 ou 4 dias, mantendo-se uma concentração celular

inicial de cerca de 8×10^5 células viáveis/mL.

Figura 3 - Frascos do tipo T25 cm² no processo de adaptação de meio celular, partindo de 50% de cada meio até chegar a 100% de meio EX-CELL™ 420.



Fonte: Próprio autor, 2022

3.3 Determinação da concentração e viabilidade celular

Os parâmetros de cultivo de concentração e viabilidade foram determinados a partir da contagem de células em câmara de Neubauer, empregando uma diluição adequada da amostra em tampão fosfato salina (PBS), as células viáveis foram quantificadas em paralelo utilizando o método de exclusão por corante. Certos corantes, como o azul de Tripán, não são capazes de penetrar nas membranas intactas, e somente naquelas que tem sua permeabilidade aumentada, um efeito associado com a perda da viabilidade (PUGLIA, 2018).

A concentração celular é determinada pela quantidade de células contadas na câmara de Neubauer com o fator de correção dos cálculos de diluição multiplicado por 10000 e dividido pelo número de quadrantes contabilizados, resultando em o número de células por mililitro de suspensão (cél/mL). Já a viabilidade celular foi determinada pela razão entre o número de células viáveis por número de células totais (viáveis e não viáveis) e multiplicada por 100.

3.4 Determinação da curva de crescimento celular nos diferentes meios de cultura

Após a adaptação das células S2-CHIKV-Hy ao meio de cultura EX- Cell™ 420, estudou-se a cinética de crescimento onde as células foram analisadas em duplicatas em cada um dos meios, o mesmo ocorreu com as células S2 selvagens com meio SF900™ III SFM (Gibco™). Para isso, as células foram cultivadas em frascos agitados do tipo Schott de 100 mL com volume trabalho de 20 mL. Foram inoculadas 1×10^6 células/mL e submetidas à agitação orbital a 120 rpm, a 28 °C em incubadora. Depois de 24h de crescimento, as células foram induzidas com 1 mM de CuSO₄ e sua contagem celular foi realizada a cada 24 horas, durante 120 horas.

Diariamente se obteve a concentração celular (X), e a concentração máxima (X_{máx}) no período analisado. Para o cálculo da velocidade de crescimento celular, μ_x , foram obtidas regressões lineares a partir da plotagem dos dados de LnX x Tempo (h). Selecionando a linha de tendência foi observado comportamento linear, μ_x é dado pelo coeficiente angular da reta aproximada. A velocidade de crescimento calculada refere-se apenas ao período em que as células crescem exponencialmente. O parâmetro μ_x é dado pela média aritmética dos dados coletados de μ_x .

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

$$\frac{dXv}{dt} = \mu t$$

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

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

Plotando os dados do logaritmo neperiano de Xv contra o tempo, temos uma curva de crescimento celular ($\ln(Xv) = f(t)$) que ao se linearizar, representa uma reta durante a fase exponencial de crescimento. A taxa específica máxima de crescimento (μ_{max}) foi obtida através da derivação dessa reta para a obtenção do

coeficiente angular correspondente a μ_{\max} .

3.5 Análise de nutrientes

As concentrações de L-glutamina e de glutamato a partir de amostras de sobrenadante foram medidas utilizando a reação de enzima acoplada e detecção eletroquímica, em um YSI 2700 Select Bioanalyzer (YSI Life Sciences, Yellow Springs, OH, EUA).

3.6 Expressão das proteínas estruturais do CHIKV

Para a análise de expressão das proteínas de CHIKV, células S2-CHIKV-Hy foram inoculadas na concentração 1×10^6 células/mL e cultivadas por 6 dias a 28°C em frasco tipo Schott contendo 20 mL de meio de cultura, sob agitação de 100 rpm. As células foram induzidas após 24 horas por adição de 1 mM de CuSO_4 , e a análise de expressão de proteína foi feita após 120 horas de indução por Western blotting .

Para análise, foram retiradas amostras de cada cultivo e o sobrenadante coletado por ultracentrifugação e armazenado a -80°C até o momento do ensaio.

3.7 Detecção de proteínas em células

A análise de expressão em amostra de célula se faz necessário uma etapa de lise e obtenção de extratos celular. A lise celular foi realizada com agente químico RIPA (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% NP 40 e pH 7,4), este tampão foi definido a partir do trabalho realizado pela Ana Lia Pradella Puglia em 2018, que havia definido com base em trabalhos científicos publicados para extração protéica de células de inseto.

Os pellets contendo 1×10^6 células foram descongelados e foi adicionado 66 μL do tampão de lise, homogeneizados por vortex por 10 segundos e incubados no gelo por 15 minutos depois repetir mais uma vez esse processo de homogeneização e incubação. Passado o período requerido as amostras foram centrifugadas a 8000 g por 30 minutos a 4°C .

3.8 Western blotting

Foram montados dois géis de poliacrilamida, para a realização do processo de *Western Blotting*, com utilização de anticorpo policlonal anti-CHIKV, conforme tabela I. No processo destinado a análise com anticorpo policlonal foram utilizados 20 µL do pellet lisado juntamente com 5 µL de Loading Buffer 6x com β-mercaptoetanol. Após esse procedimento cada amostra foi aplicada em seu respectivo gel. A corrida do gel foi realizada a 0,6 Amperes por cerca de 1,5 hora.

Após a corrida, o gel para Western blotting foi colocado em um aparato específico para realizar a transferência úmida para a membrana de nitrocelulose, a 100 Amperes por cerca de 1 hora. Depois a membrana foi transferida para a solução de bloqueio (leite em pó desnatado 5% em PBS 1x), e incubada por 1 hora com agitação. A membrana para Western blotting foi então lavada duas vezes por 10 minutos com PBS 1x. Logo após, foi adicionado o anticorpo primário diluído 1:250 em 20 mL de BSA 1%, sendo incubado overnight a 4°C. Após esse período, três novos procedimentos de lavagem com PBS 1x foram realizados, e em seguida adicionou-se o anticorpo secundário, diluído 1:5000 em 20 mL de BSA 1%, sendo novamente incubado por 1 hora sob agitação. O mesmo procedimento de lavagem já descrito foi realizado novamente. A membrana foi revelada com o reagente ECL Select, no fotodocumentador Uvitec Cambridge, com análise no aplicativo Alliance.

Tabela 1 - Características dos Anticorpos utilizados no ensaio de *Western blotting*

Anticorpos	Breve descrição	Diluição
Anticorpo Policlonal anti-CHIKV	(ATCC® VR-1241AF™) <i>Hyperimmune ascitic fluid (Mouse)</i> - N.I.H. Research Reference Reagent- produzido em camundongo	1:250
Anticorpo IgG anti-camundongo - HRP	Anti- mouse IgG, conjugado HRP-horseradishperoxidase - Invitrogen	1:5000

Fonte: Próprio autor, 2022

3.9 SDS- PAGE

Para separar a proteína de interesse foi feito dois géis de SDS – poliacrilamida, o pellet foi lisado como descrito anteriormente e foi utilizado 20 µL da amostra junto com 5 µL de Loading Buffer 6x com e sem β-mercaptoetanol (primeiro gel com e segundo gel sem)

Após esse procedimento cada amostra foi aplicada em seu respectivo gel e a corrida do gel foi realizada a 0,6 Amperes por cerca de 2 horas.

Passadas duas horas, o gel foi lavado com água pura por 5 minutos e depois ocorreu uma troca de água por mais 5 minutos. Foi preciso uma etapa de fixação com solução de etanol a 30% e ácido acético a 10% por 15 minutos e em seguida trocado e repetido o processo por mais 15 minutos.

Em seguida o gel foi lavado com uma solução de etanol a 10% por 5 minutos e repetido a etapa pelo mesmo período e posteriormente lavado duas vezes com água por 5 minutos. Foi necessário a preparação de uma solução contendo 50µL de Silver Stain Sensitizer (kit Pierce™ Silver Stain da Thermo Scientific) com 25mL de água pura para incubar o gel por 1 minuto e logo em seguida lavado duas vezes com água por mais um minuto.

Outra solução foi preparada contendo 500µL de Silver Stain Enhancer com 25 mL de Silver Stain no qual o gel foi incubado por 30 minutos, após foi colocado a solução de 500µL de Silver Stain Enhancer com 25 mL de Silver Stain Developer até o aparecimento das bandas em seguida colocado uma solução de ácido acético 5% como solução de parada e lavado duas vezes com água por 20 segundos antes de visualizar no fotodocumentador

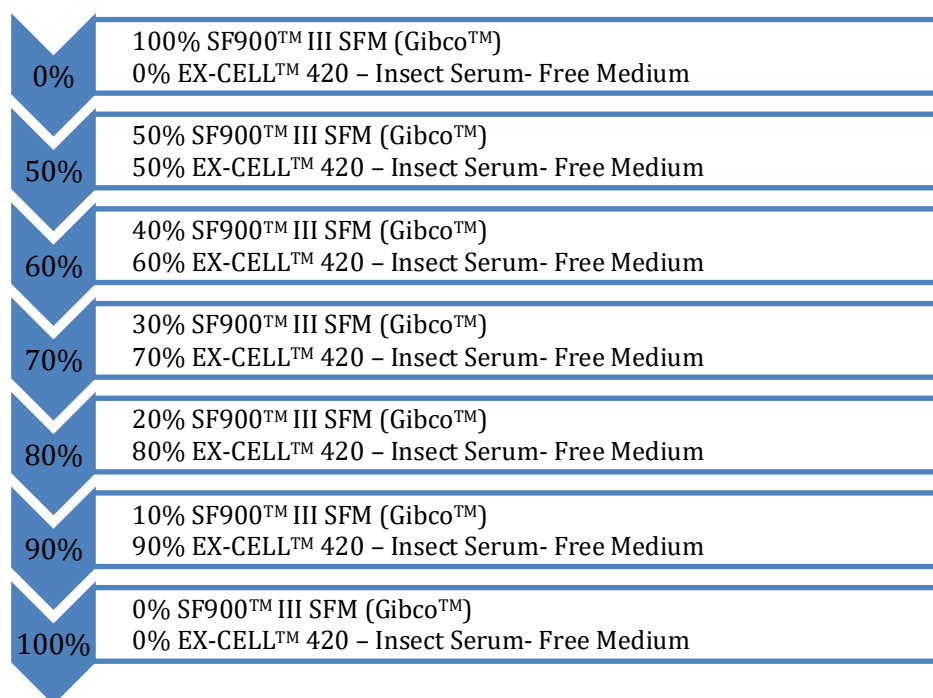
4.RESULTADO

4.1 Adaptação das células S2CHIKV-Hy ao meio de cultura EX- Cell™ 420 – Insect Serum- Free Medium

A adaptação das células S2-CHIKV-Hy foi gradual, inicialmente estavam cultivadas em meio SF900™ III SFM (Gibco™) e para não sofrerem com a mudança de meio, foi necessário três repiques antes de cada alteração de concentração de

meio, sendo assim a cada uma semana e 4 dias ocorria uma nova etapa da adaptação como mostra a figura 4, na qual cada nível representa uma semana e 4 dias.

Figura 4 - Diagrama representativo da adaptação ao novo meio de cultura EX-Cell™ 420



Fonte: Próprio autor, 2022

O processo adaptativo ocorreu bem e foi possível atingir o cultivo em 100% de meio de cultura EX- Cell™ 420 – Insect Serum- Free Medium. Durante o processo e nos cultivos subsequentes não foi notada nenhuma mudança anormal na aparência da célula ou na sua aderência, a sua concentração também não sofreu grandes impactos durante o processo. A tabela II mostra as concentrações celulares das S2-CHIKV-Hy durante 15 semanas em processo de adaptação, no qual para cada adaptação foi realizado três repiques antes de passar para próxima concentração de meio.

Tabela 2- Concentrações de células em diferentes repiques

	100% SF900 III	50% EX- CELL	60% EX- CELL	70% EX- CELL	80% EX- CELL	90% EX- CELL	100% EX- CELL
1º Repique	69,75 x 10 ⁵ cel/mL	68,5 x 10 ⁵ cel/mL	79,75 x 10 ⁵ cel/mL	54,75 x 10 ⁵ cel/mL	60 x 10 ⁵ cel/mL	58,5 x 10 ⁵ cel/mL	50,75 x 10 ⁵ cel/mL
2º Repique	67,25 x 10 ⁵ cel/mL	84,5 x 10 ⁵ cel/mL	77,5 x 10 ⁵ cel/mL	67,75 x 10 ⁵ cel/mL	79 x 10 ⁵ cel/mL	61,5 x 10 ⁵ cel/mL	68 x 10 ⁵ cel/mL
3º Repique	62,25 x 10 ⁵ cel/mL	64,5 x 10 ⁵ cel/mL	54,5 x 10 ⁵ cel/mL	61,25 x 10 ⁵ cel/mL	56,25 x 10 ⁵ cel/mL	46,5 x 10 ⁵ cel/mL	49 x 10 ⁵ cel/mL

Fonte: Próprio autor, 2022

Depois do processo de adaptação celular ter atingido 100% de meio novo, parte da cultura celular foi congelada para a constituição de um banco de trabalho.

4.2 Cinética preliminar de crescimento celular

As células foram inoculadas na concentração de 1×10^6 céls/mL e colocadas em frascos do tipo Schott de 100mL (S2 selvagem e S2 CHIKV-Hy). As células recombinantes foram cultivadas em meio SF900III e EX Cell™ 420 posteriormente induzidas em 24 horas de cultivo com 1 mM CuSO₄.

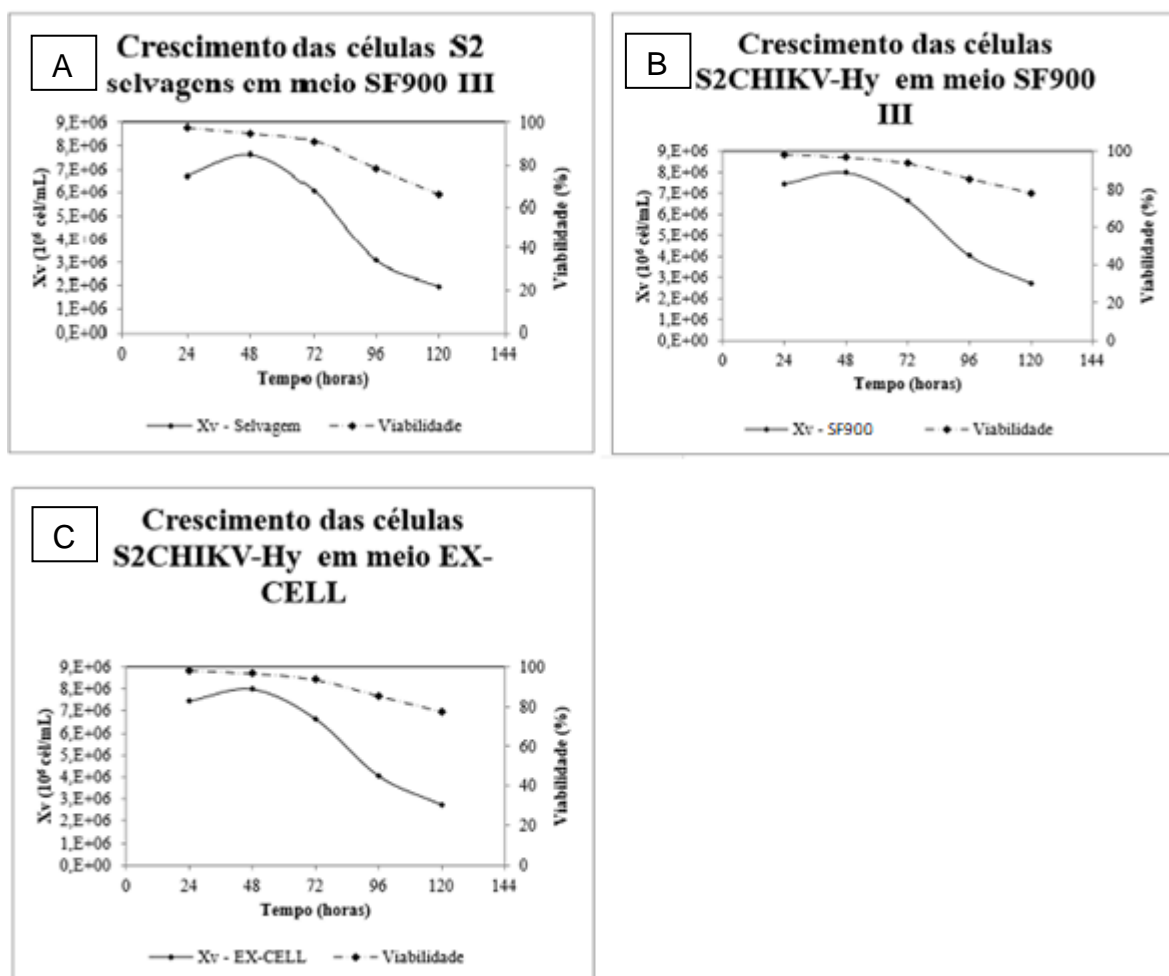
Ao analisar os gráficos (figura 5) de crescimento notamos que houve um crescimento celular até 48h após a indução e depois desse período houve um decréscimo. A curva de crescimento para as três amostras ficou bem semelhante e a viabilidade celular esteve acima de 90% para todas as células e depois desse período ocorreu uma diminuição na viabilidade (tabela 3).

Tabela 3- Porcentagem de viabilidade celular nos períodos de 24 a 120h em diferentes meios de cultivo.

Período pós indução	Células S2 selvagens em meio SF900 III	Células S2CHIKV-Hy em meio SF900 III	Células S2CHIKV-Hy em meio EX-Cell
24h	97,47%	98,35%	97,97%
48h	94,60%	96,82%	95,99%
72h	90,82%	93,66%	90,69%
96h	78,27%	85,45%	85,75%
120h	65,69%	77,58%	75,96%

Fonte: Próprio autor, 2022

Figura 5 - Cinética de crescimento celular



Fonte: Próprio autor, 2022

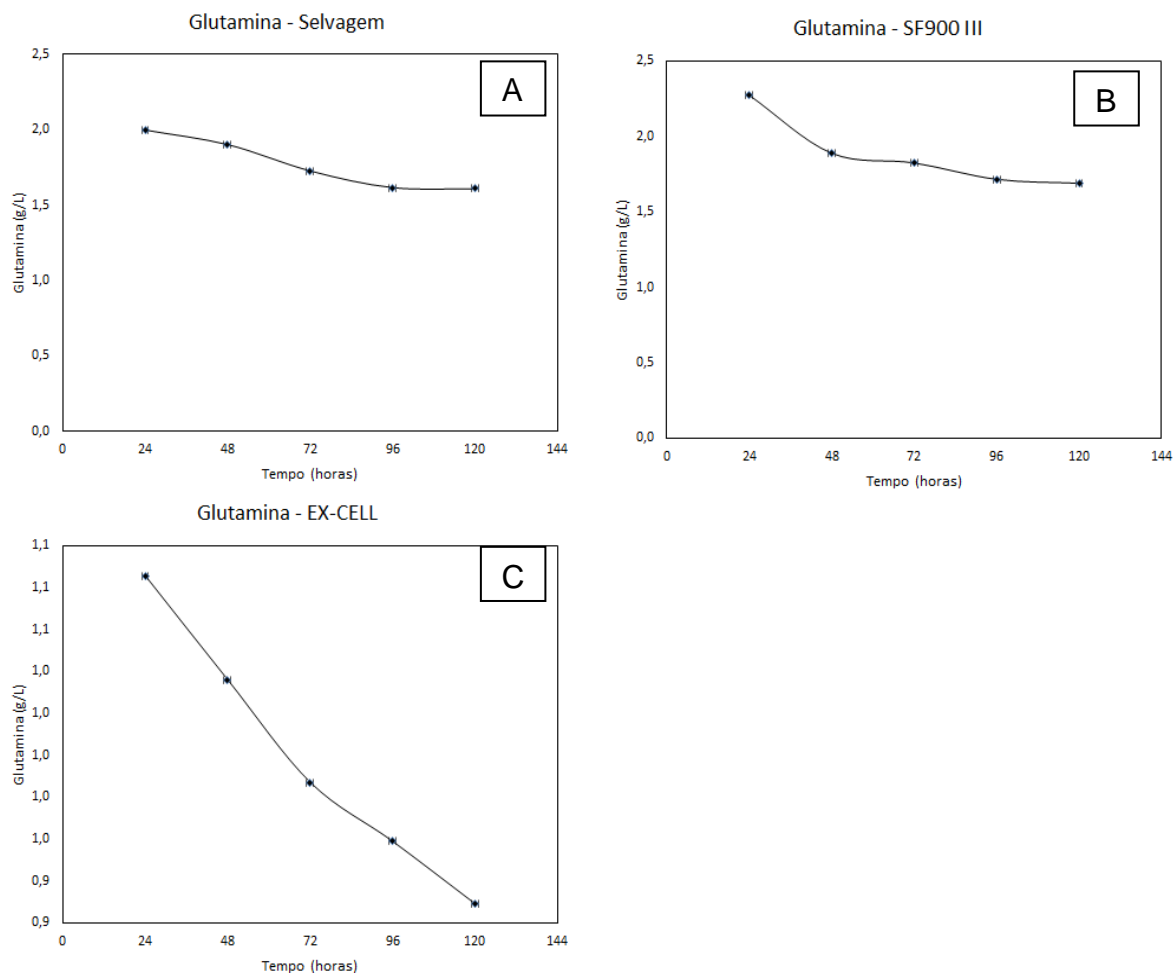
Gráfico representativo da cinética de células S2 e S2 CHIKV-Hy incubadas a 28 °C a 120 rpm. Concentração celular Xv; Viabilidade celular (traços); Indução da expressão em 24 horas de cultivo pela adição de 1 mM de CuSO₄; (A) células S2 selvagens em meio SF900III; (B) S2CHIKV-Hy em meio SF900III e (C) S2-CHIKV-Hy em meio EX-CELL.

As células coletadas no período 120 horas pós inóculo, foram submetidas ao processo de concentração por ultracentrifugação e posteriormente usadas em Western Blotting. Tivemos dificuldades técnicas que não permitiram detectar a expressão das proteínas de CHIKV.

Ainda assim, essas amostras foram lisadas com RIPA e foi feito dois géis de poliacrilamida (SDS) afim de identificar se seria possível detectar proteínas estruturais do CHIKV em SDS-PAGE, porém não obtivemos sucesso.

O consumo de glutamina pelas células foi medido nos sobrenadantes, utilizando a reação de enzima acoplada e detecção eletroquímica, em um YSI 2700 Select Bioanalyzer. A Figura 6 representa os valores obtidos de glutamina em amostras (triplicatas), onde os outliers foram desconsiderados.

Figura 6 - Consumo de glutamina em células cultivadas em diferentes meios livres de SFB



Fonte: Próprio autor, 2022

Gráfico representativo do consumo de glutamina em células S2 e S2-CHIKV-Hy incubadas a 28 °C a 120 rpm. Indução da expressão em 24 horas de cultivo pela adição de 1 mM de CuSO₄; (A) células S2 selvagens em meio SF900III; (B) S2CHIKV-Hy em meio SF900III e (C) S2CHIKV-Hy em meio EX-CELL

Além de ser ter um grande papel como fonte de energia, a glutamina está associada ao metabolismo celular (PAMBOUKIAN, 2013). Seu consumo foi considerado elevado nos cultivos segundo os dados, principalmente em meio EX-Cell. Estudos com meio SF900 III indicam que a falta de glutamina limita o crescimento caracterizando a diminuição da fase exponencial de crescimento (BARRAL, 2010), esse fator pode se observar nas semelhanças entre os gráficos das células selvagens que estão cultivadas em meios SF900 III e as S2-CHIKV-Hy também cultivadas no mesmo meio, a partir do momento onde ocorre maior morte e

baixo crescimento celular, nota-se que a taxa de glutamina tende a permanecer estável. A diferença entre os consumos entre os dois meios pode ser devido a composição dos mesmos, supondo que em meio EX-cell se torne necessário o maior consumo para o metabolismo celular da S2-CHIKV-Hy.

5.DISSCUSSÃO

As células de *Drosophila melanogaster* S2 geralmente crescem em monocamada solta com uma leve tendência a se empilhar. Ao contrário das células de mamíferos, células S2 são vantajosamente cultivadas à temperatura ambiente usando meio simples e não requerem suplementação de CO₂. Uma característica específica das células S2 sobre outras linhagens celulares é sua capacidade de crescer para altas densidades celulares, atingindo rotineiramente 3 x 10⁷ células/mL. Elas podem ser uma alternativa valiosa a linhagens celulares de mamíferos ou outros sistemas de células de inseto infectadas por vírus. O sistema baseado na expressão recombinante a partir da transfecção de um plasmídeo, constitui uma ferramenta celular com grande potencial para a produção de proteínas de membrana em várias aplicações. Dessas aplicações incluímos perfis farmacológicos, kits diagnósticos, análises estruturais e geração de vacinas (BRILLET; PEREIRA; WAGNER, 2010).

Quando se trata de segurança e contaminação, deve-se atentar aos meios de cultura, os que contêm soro animal acabam prejudicando a padronização dos cultivos celulares pois apresenta uma grande variabilidade de um lote para o outro, já que não possui composição quimicamente definida, pode de ser fonte de possíveis contaminações por vírus ou príons, e além disso possui um elevado custo. Isso torna o uso de meios livres de soro e meios quimicamente definidos uma alternativa a esse tipo de suplementação para cultivo de células. As células utilizadas já estavam em meio livre de soro e proteína animal, portanto a adaptação celular do meio SF900TMIII para EX-CellTM 420 foi realizada sem dificuldades.

Com relação ao crescimento celular, as células S2 CHIKV-Hy utilizam o promotor indutível da metalotioneína, existe a necessidade da adição de um metal pesado à cultura celular, para que as células realizem a produção da proteína heteróloga. Nas culturas induzidas com 1 mM de CuSO₄, padrão já estabelecido

pelo laboratório em células S2 CHIKV-Hy (PUGLIA, 2018), as células atingiram uma concentração celular máxima apenas até às 48h, provavelmente esteja associado a toxicidade do indutor o baixo crescimento e o decréscimo da variabilidade após esse período.

A glutamina também pode interferir no crescimento e na curva exponencial celular e pelos gráficos (figura 6) foi notório o que em meio EX-Cell ocorreu um maior consumo em relação ao SF900 III, podendo criar a hipótese que esse meio deva ter menor fonte de glicose e a partir do momento que esse ficou insuficiente ocorreu o consumo de glutamina.

Com relação ao *Western blotting* não foi possível chegar a uma análise com os parâmetros estabelecidos de Puglia 2018 e os resultados foram descartados. Quanto ao SDS-Page não ter detectado proteínas de CHICKV pode ser devido a algum esgotamento de nutrientes fundamental para produção de proteínas no processo de indução.

6. CONCLUSÕES

- As células S2 CHIKV-Hy foram capazes de realizar a adaptação do meio SF900 III para o EX-Cell sem mudar sua morfologia celular.
- O crescimento celular após a indução ocorreu até às 48h e sua viabilidade celular baixou significativamente com 120h.
- Todas as amostras apresentaram uma curva de crescimento bem próxima.
- Não foi possível determinar a expressão proteínicas de CHIKV, o que se criou uma hipótese de se ter pouca concentração celular expressando as proteínas de CHIKV

REFERÊNCIAS

- AKAHATA, W. et al. A virus-like particle vaccine for epidemic Chikungunya virus protects nonhuman primates against infection. **Nature Medicine** 2010 16:3, v. 16, n. 3, p. 334–338, 28 jan. 2010.
- ANDRADE, R. V. DE et al. Vaccines: New Pharmaceutical Challenges. **Saúde em movimento**. v.1, n.1, 2021. Disponível em: <<http://www.saudeemmovimento.com.br/revista/artigos/cienciasfarmaceuticas/v1n1a7.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2022.
- BARRAL, M. F. **Modelo cinético não- estruturado para crescimento e produção de glicoproteína recombinante do vírus da raiva em linhagem S2 de células de *Drosophila melanogaster***.2010. Tese (Doutorado em Biotecnologia)- Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo,2010. Doi: 10.11606/T.87.2018.tde-22102018-180313.Acesso em : 13 jan. 2022
- BATUHAN, A. S. Batuhan: Vaccine skepticism. **Sunstar**, Cebu, 21 set. 2021.Disponível em: <<https://www.sunstar.com.ph/article/1907913/cebu/business/batuhan-vaccine-skepticism>>. Acesso em: 21 dez. 2021.
- BOUSADA, G. M.; PEREIRA, E. L. Produção de vacinas virais parte I: engenharia de bioprocessos. **Revista da universidade vale do rio verde**, v. 15, n. 1, p. 309–332, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Febre Chikungunya: manejo clínico**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.
- 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 (Clifton, N.J.)**, v. 601, p. 119–133, 2010.
- BUTANTAN. **Imunização, uma descoberta da ciência que vem salvando vidas desde o século XVIII - Instituto Butantan**. Disponível em: <<https://butantan.gov.br/noticias/imunizacao-uma-descoberta-da-ciencia-que-vem-salvando-vidas-desde-o-seculo-xviii>>. Acesso em: 18 dez. 2021.
- CAMPOS, C. DE A. **Febre chikungunya: aspectos clínicos e moleculares**. 2015. Tese (Graduação em Biomedicina)-Biomedicina, Centro Universitário de Brasília Faculdade de ciências da educação e saúde, Brasília,2015. Disponível em : <<https://repositorio.uniceub.br/jspui/handle/235/8696>>. Acesso em: 18 dez. 2021.
- CEROL, M. infecção por vírus Chikungunya: Revisão para Clínicos. **Revista da sociedade Portuguesa de Medicina Interna**, Lisboa, v.27, n.1, Jan./mar. 2020. Disponível em : <<https://revista.spmi.pt> – DOI: 10.24950/Revisao/177/19/1/2020> Acesso em: 21 dez. 2021.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

FERNÁNDEZ, L. M.; NAVARRO, Y. P. T. Febre Chikungunya. **Revista Cubana de Medicina**, v.54, n.1, p.74-96,mar. 2015. Disponível em : <http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S003475232015000100008&script=sci_abstract> Acesso em:15 nov. 2021

FERRAZ, L. G. W. Vacinas à base de subunidade proteica para prevenção da covid-19: Mecanismo de ação, ensaios clínicos e pedidos de patentes. **Observatório de tecnologias associadas à covid-19**, Ministério da economia instituto nacional da propriedade industrial, abril 2021 Disponível em : < <https://www.gov.br/inpi/pt-br/servicos/patentes/tecnologias-para-covid-19>> Acesso em:15 nov. 2021

FUENMAYOR, J.; GÒDIA, F.; CERVERA, L. Production of virus-like particles for vaccines. **New Biotechnology**, v. 39, p. 174–180, 25 out. 2017.

HERNANDES, J. R.; DEL VALHE, N. C. **Viabilidade de processos contínuos para a indústria farmacêutica: um estudo de caso sobre vacina VLP**. 22 fev. 2021. Tese (Bacharel em Engenharia Química)- Engenharia Química, Instituto de ciências ambientais, químicas e farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, 2021. Disponível em: < <https://repositorio.unifesp.br/handle/11600/60413>> Acesso em:06 nov. 2021

KHAN, K. et al. Assessing the Origin of and Potential for International Spread of Chikungunya Virus from the Caribbean. **PLoS Curr**, v. 6, n.6 2014.Doi: 10.1371/currents.outbreaks.2134a0a7bf37fd8d388181539fea2da5. Acesso em : 03 nov. 2021

KUCHARZ, E. J.; CEBULA-BYRSKA, I. Chikungunya fever. **European Federation of Internal Medicine**, v.23,p.325-329,2012. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2012.01.009>. Acesso em: 06 nov. 2021

LAERTE, V.; JUNIOR, P. Dengue e Chikungunya: Coexistência possível no Brasil. **Revista de Medicina e Saúde de Brasília**, Brasília, v. 3, n. 1, 1 maio 2014. Disponível em : <<https://portalrevistas.ucb.br/index.php/rmsbr/article/view/4957/3139>> Acesso em : 19 nov.2021

MANCEBO, A. M. et al. **Vacinas de dna e RNA recombinante: revisão de literatura vaccines of recombinant dna and rna: literature review**. (Congresso de iniciação científica, ed.)Ourinhos: 2016. Disponível em : <https://cic.unifio.edu.br/anaisCIC/anais2016/pdf/10_04.pdf>. Acesso em: 22 jan. 2022

PAMBOUKIAN, M. M. **Modelagem metabólica e matemática do comportamento cinético de células s2 de *Drosophila melanogaster* adequada à sua flexibilidade metabólica**. 2012. Tese (Doutorado em Engenharia Química)- Escola Politécnica, Universidade de São Paulo,2012.Doi:10.11606/T.32012.tde-31072013-0000215. Acesso em: 15 jan. 2022

POWERS, A. M.; LOGUE, C. H. Changing patterns of chikunya virus: Re-emergence of a zoonotic arbovirus. **Journal of General Virology**, v.88, p.2363-2377, set. 2007. Doi: 10.1099/vir.0.82858-0. Acesso em : 20 jan. 2022

PUGLIA, A. L. P. **Expressão de proteínas estruturais de Alphavirus em células S2 (*D.melanogaster*)**.2018. Tese (Doutorado em Biotecnologia)- Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. Doi: 10.11606/T.87.2019.tde-30052019-143014. Acesso em: 10 out. 2021

ROLDÃO, A. et al. Virus-like particles in vaccine development. **Expert Review of Vaccines**,v. 9, n. 10, p. 1149–1176, out.2014
Doi:<http://dx.doi.org/10.1586/erv.10.115>. Acesso em: 23 dez. 2021

ROUGERON, V. et al. Chikungunya, a paradigm of neglected tropical disease that emerged to be a new health global risk. **Journal of Clinical Virology**, v. 64, p. 144–152, 1 mar. 2015.Doi : 10.1016/j.jcv.2014.08.032. Acesso em: 12 dez. 2021

SARAIVA, L. J. C.; DE FARIA, J. F. DE. **A Ciência e a Mídia: A propagação de Fake News e sua relação com o movimento anti-vacina no Brasil**. (Congresso Brasileiro de Ciência da Comunicação)Belém-PA 2019. Disponível em:< <https://portalintercom.org.br/anais/nacional2019/resumos/R14-1653-1.pdf>>. Acesso em: 3 jan. 2022

SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia industrial - vol. 2: engenharia bioquímica**. São Paulo: Editora Blucher. v. vol.2. 2001

SEBASTIAN, M. R.; LODHA, R.; KABRA, S. K. Chikungunya infection in children. **Indian journal of pediatrics**, v. 76, n. 2, p. 185–189, fev. 2009.Doi: 10.1007/s12098-009-0049-6. Acesso em: 05 jan. 2022

SILVA, R. J. S. et al. A Flow-Through Chromatographic Strategy for Hepatitis C Virus-Like Particles Purification. **Processes**, v. 8, n. 1, p. 85-88,jan. 2020.Doi: <https://doi.org/10.3390/pr8010085>. Acesso em: 04 jan. 2022

SUHANA, O. et al. Insight into the origin of chikungunya virus in Malaysian non-human primates via sequence analysis. **Heliyon**, v. 5, n. 12, p. e02682, 1 dez. 2019.Doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02682 . Acesso em : 14 dez. 2021

TAUIL, P. L. Condições para a transmissão da febre do vírus chikungunya. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília v. 23, n. 4, p. 773–774, dez. 2014. Disponível em <http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742014000400020&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 20 jan. 2022.

THEES, V. Novo guia clínico para manejo da Chikungunya - **PEBMED**.jul.2017.Disponível em: <<https://pebmed.com.br/novo-guia-clinico-para-manejo-da-chikungunya/>>. Acesso em: 7 jan. 2022.

THIBERVILLE, S. D. et al. Chikungunya fever: Epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. **Antiviral Research**, v. 99, n. 3, p. 345–370, 1 set. 2013. Doi: 10.1016/j.antiviral.2013.06.009. Acesso em: 10 jan. 2022

WHO. **Os diferentes tipos de vacinas COVID-19**.jan 2021. Disponível em:
<<https://www.who.int/pt/news-room/feature-stories/detail/the-race-for-a-covid-19-vaccine-explained>>. Acesso em: 22 jan. 2022.