

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ
Centro de Ciências da Matemática e da Natureza – CCMN
Instituto de Química – IQ
Departamento de Bioquímica

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DO VÍRUS DA FEBRE AMARELA

Luiz Fernando Carvalho de Almeida

Rio de Janeiro

2019

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ
Centro de Ciências da Matemática e da Natureza – CCMN
Instituto de Química – IQ
Departamento de Bioquímica

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DO VÍRUS DA FEBRE AMARELA

Luiz Fernando Carvalho de Almeida

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadores: Leda dos Reis Castilho

Rodrigo Coelho Ventura Pinto

Yvonne Genzel

Rio de Janeiro

2019

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DO VÍRUS DA FEBRE AMARELA

Luiz Fernando Carvalho de Almeida

Orientadores: Leda dos Reis Castilho

Rodrigo Coelho Ventura Pinto

Yvonne Genzel

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada por:

Presidente, Prof. Leda dos Reis Castilho, Dr. Ing. (Orientadora)

Dr. Rodrigo Coelho Ventura Pinto (Coorientador)

Prof. Anderson de Sá Pinheiro, D.Sc.

Prof. Luciana Pizzatti Barboza, D.Sc.

Dra. Elena Caride, D.Sc.

Professora Luciana Barros de Arruda, D.Sc.

Rio de Janeiro
Novembro/2019

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares (LECC) do Programa de Engenharia Química no Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Coppe/UFRJ), pelo apoio institucional para o desenvolvimento e realização deste trabalho.

Aos orientadores Profa. Dra. Leda dos Reis Castilho, Dr. Rodrigo Coelho Ventura Pinto, Dr. Rer. Nat. Yvonne Genzel e ao Dr. Manuel Carrondo, orientadores e amigos, que sempre acreditaram na conclusão deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Bioquímica do Instituto de Química da UFRJ que contribuíram para a minha formação acadêmica.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem participar da análise desta tese.

Aos amigos da Vice Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (VDTEC/Bio-Manguinhos), Marcos da Silva Freire, Elena Caride e Luciane Pinto Gaspar, pela colaboração no fornecimento da cepa 17DD do vírus de febre amarela utilizado neste trabalho.

Aos amigos do LECC, Mateus, Túlio, Rymenis, Luizinho, Maycon, Thayana, Juvisan, Gabriela, Ioná, Nathalia e Alexandre, pelas conversas confortantes nos momentos de dificuldade durante a realização deste trabalho.

Aos amigos do Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (iBET), Antonio Roldão e Marcos Souza pelo treinamento, paciência e visão que ajudaram na execução deste estudo.

E aos amigos do Instituto Max Planck (MPI), Felipe Tápia, Pavel Marichal Gallardo, Reza Mahour, Thomas Bissinger e Renata Malkes, sem os quais as atividades desenvolvidas no MPI não teriam sido tão prazerosas.

Aos meus familiares, pela compreensão de minha ausência durante a realização deste trabalho e, em particular, aos meus pais, Maria Lúcia e Dirceu, por terem sempre mostrado a importância do conhecimento para a realização individual.

À memória do amigo e principal incentivador do meu desenvolvimento pessoal e profissional, George Forbes Mann.

“We no longer have the learning of the ancients, the age of giants is past!” “We are dwarfs”, William admitted, “but dwarfs who stand on the shoulders of those giants, and small though we are, we sometimes manage to see farther on the horizon than they.”

Umberto Eco

Produção e Purificação do Vírus da Febre Amarela

Luiz Fernando Carvalho de Almeida

Orientadores: Leda dos Reis Castilho, Rodrigo Coelho Ventura Pinto e Yvonne Genzel

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

A vacina contra o vírus da febre amarela (VFA) produzida em ovos embrionados foi descrita em 1937 por Theiler & Smith. Desde então, esta vacina é produzida em ovos embrionados e foi usada para imunizar mais de cem milhões de pessoas, com um histórico de alta eficácia e segurança. O aumento da demanda e a escassez desta vacina observada recentemente em Angola (2016) e Brasil (2017-2018) demonstram claramente a necessidade de desenvolvimento de tecnologias de produção de VFA mais avançadas e escalonáveis. A primeira parte deste trabalho foi o desenvolvimento de um processo de cultura celular de alto rendimento em células Vero (banco de células da OMS, ECACC) usando microcarregadores *Cytodex 3* (2 g L^{-1}) em frascos rotativos de 250 mL nos modos de colheita única (SH) e múltipla (MH) em meio livre de soro fetal bovino (Opti MEM, Gibco, EUA) e o estabelecimento de uma estratégia eficiente de infecção para produzir o vírus da febre amarela. Diferentes estratégias de infecção e colheita foram avaliadas para as cepas 17DD e 17D-204 usadas nas vacinas FA atualmente aprovadas, foram avaliados diferentes tempo de infecção (TOI), multiplicidade de infecção (MOI) e tempos (TOH) e diferentes modos de colheita (SH e MH)). A cromatografia de exclusão estérica (SXC) foi avaliada como principal operação de recuperação e purificação do vírus, utilizando-se três concentrações de PEG-6000 (6%, 8% e 10% v v⁻¹). As variáveis operacionais foram investigadas e as condições cromatográficas selecionadas (10% de PEG-6000) sugerem uma recuperação total das partículas virais obtidas da etapa de cultivo. Foram também alcançados níveis residuais de DNA de acordo com as recomendações do Organização Mundial da Saúde ($<10 \text{ ng dose}^{-1}$). O padrão de glicosilação do vírus da febre amarela produzido foi investigado por cromatografia de interação hidrofílica (HILIC-HPLC). Amostras do VFA purificadas foram tratadas com PNGase F, para liberar os glicanos e estes foram marcados com 2-aminobenzamida. A análise por HILIC-HPLC, das duas cepas de VFA usadas atualmente na produção da vacina, foi realizada utilizando uma coluna TSKgel Amide-80 e foi possível propor estruturas glicosiladas com base no banco de dados GlycoBase 3.2.4. Os resultados mostram uma homologia nos perfis de glicosilação encontrados nas duas cepas vacinais, sugerindo que picos encontrados nas cepas testadas possuem as mesmas estruturas de glicanos. No geral, o desenvolvimento de uma plataforma de células de mamíferos baseada na colheita múltipla para propagar o vírus da febre amarela usando a linha celular Vero em condições livres de soro, sua purificação por SXC e a caracterização do perfil de glicosilação nesta plataforma é um passo importante para a produção de uma nova vacina usando uma tecnologia escalonável e econômica.

Palavras-chave: Febre amarela, produção, purificação, colheita múltipla, cromatografia de exclusão estérica e glicosilação.

Yellow Fever Virus Production and Purification

Luiz Fernando Carvalho de Almeida

Leda dos Reis Castilho, Rodrigo Coelho Ventura Pinto and Yvonne Genzel

Abstract da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

The yellow fever virus (YFV) vaccine produced in embryonated eggs was described in 1937 by Theiler & Smith. Since then, this vaccine has been produced in embryonated eggs and has been used to immunize over one hundred million people with a history of high efficacy and safety. The increasing demand and shortage of this vaccine observed recently in Angola (2016) and Brazil (2017-2018) clearly demonstrates the urge for the development of more advanced and scalable VFA production technologies. The first part of this work was the development of a high yield Vero cell culture process (WHO cell bank, ECACC) using *Cytodex 3* microcarrier (2 g L^{-1}) in 250 mL spinner flasks in single harvest (SH) and multiple harvest modes (MH) using serum free media (Opti MEM, Gibco, USA) and the establishment of an efficient infection strategy to produce yellow fever virus. Different infection and harvesting strategies were evaluated for 17DD and 17D-204 strains used in currently approved YF vaccines, different infection time (TOI), multiplicity of infection (MOI) and times (TOH) and different harvesting modes (SH and MH). Steric exclusion chromatography (SXC) was evaluated as the main virus recovery and purification operation using three concentrations of PEG-6000 (6%, 8% and 10% v v^{-1}). Operational variables were investigated and the selected chromatographic conditions (10% PEG-6000) suggest a total recovery of viral particles produced during the culture step. It was also observed that the residual DNA levels achieved were in accordance with the World Health Organization recommendations ($<10 \text{ ng dose}^{-1}$). The glycosylation pattern of the yellow fever virus produced was investigated by hydrophilic interaction chromatography (HILIC-HPLC). Purified YFV samples were treated with PNGase F to release the glycans which were labeled with 2-aminobenzamide. HILIC-HPLC analysis of the two strains of YFV currently used in vaccine production was performed using a TSKgel Amide-80 column and it was possible to propose glycosylated structures based on the GlycoBase 3.2.4 database. The results show a homology in the glycosylation profiles found in the two vaccine strains, suggesting that peaks found in the tested strains have the same glycan structures. Overall, the development of a multi-harvest mammalian cell platform to propagate the yellow fever virus using the Vero cell line under serum free conditions, its purification by SXC and the characterization of the glycosylation profile on this platform is an important step for the production of a new vaccine using scalable and cost-effective technology.

Keywords: Yellow fever, production, purification, multiple harvest, steric exclusion chromatography and glycosylation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema apresentando a história das passagens do vírus da febre amarela cepa Asibi. A barra colorida indica as passagens executadas a partir da cepa Asibi. Adaptado de (BRÈS & KOCH, 1987).

Figura 2: Esquema apresentando a evolução das passagens realizadas com o vírus 17D. A linha à esquerda representa o número de passagens a partir da cepa Asibi. À direita estão destacadas nas caixas as nomenclaturas definidas para as diferentes passagens. Fonte: STAPLES, 2018.

Figura 3: Esquema apresentando sistema de lote semente de febre amarela 17DD. Este esquema demonstra os níveis de passagens e suas derivações na produção vacinal contra febre amarela no Brasil a partir de 1939. Pode-se observar que, a partir de 1942, ocorreu a produção de vários lotes sementes. O lote semente P3 de 1962, apresentando 41 passagens em ovos embrionados (EP) e 284 passagens (SC) da cepa Asibi, originou o lote semente utilizado atualmente (em amarelo), este com duas passagens adicionais em ovos embrionados. Adaptado de (HOMMA, 2002).

Figura 4: Organização estrutural dos flavivírus. O esquema mostra a partícula viral em suas formas intracelular imatura (lado direito) e extracelular madura (lado esquerdo). O capsídeo do vírus tem a simetria icosaédrica, com o genoma associado à face interna do capsídeo. Estão representadas a proteína de envelope (E) em sua forma dimérica, a proteína de membrana (M), presente na forma extracelular, e seu precursor (prM), presente no envelope na forma intracelular. Adaptado de (CHAMBERS et al., 1990).

Figura 5: Ciclo de replicação dos flavivírus. Os números de 1 a 8 indicam por meio de setas na figura as etapas desde a adsorção até a liberação de partículas virais. FA: vírus da febre amarela; RER: retículo endoplasmático rugoso; as estruturas pequenas e pretas ao longo do RER perinuclear são ribossomas. Adaptado de (RICE, 1996).

Figura 6: Organização genômica dos flavivírus. Desenho esquemático mostrando a organização genômica dos flavivírus. No topo, está o genoma típico dos flavivírus, com as extremidades 5' e 3' não traduzidas (UTR) e as regiões traduzidas em proteínas estruturais e não estruturais. Em seguida, vemos a poliproteína, os precursores e as proteínas maduras geradas pelo processamento proteolítico. As estrelas (★) representam a glicosilação ligada à asparagina das proteínas, mas não indicam o número ou a posição dos sítios de N-glicosilação. As setas pretas representam os sítios de clivagem pela protease viral. As setas brancas representam os sítios de clivagem pela sinalase celular. As figuras escuras representam as proteínas maduras, após o último passo do processamento (CHAMBERS et al., 1990; RICE, 1996).

Figura 7: Distribuição mundial da febre amarela. Em (a), a distribuição da doença na África e, em (b), a existência de zonas endêmicas na América Latina. Fonte (STAPLES, 2018).

Figura 8: Distribuição do vetor *Aedes aegypti* nas Américas: 1930, 1970 e 2001. A figura demonstra a reinfestação pelo vetor da doença, nas regiões marcadas em verde, nos mapas. Fonte: (GUBLER, 2002).

Figura 9: Gráfico do número de casos de Febre Amarela no Brasil, entre 1950 e 2003. Este gráfico demonstra o número de casos da doença por região (adaptado de VASCONCELOS et al., 2004).

Figura 10: Série histórica do número de casos humanos confirmados para Febre Amarela e a letalidade, segundo o ano de início dos sintomas, Brasil, de 1980 a junho de 2018 (SAÚDE, 2018).

Figura 11: Municípios com registro de casos humanos no Brasil (a) casos humanos, (b) epizootias de primatas não humanos - PNH (c), de acordo com a classificação, e; áreas afetadas e de vacinação, Brasil, 2016/2017 (SAÚDE, 2018).

Figura 12: Estratégia de purificação em quatro etapas e seus principais objetivos. Adaptado de (SCIENCES, 2015).

Figura 13: Vias de glicosilação de N-glicanos. Na figura se encontra descrita no RNAm o motif da N-glicosilação (Asn-Xaa-Ser/Tr) e o início do processo no retículo endoplasmático e a migração para o complexo de Golgi onde em seu processo podem se converter em alta manose ou híbridas e continuar o processo de maturação nas diferentes vias de glicosilação. O processo utiliza as transferases (Sialil, Galactosil, fucosil e N-acetilglicosaminil) e os substratos utilizados pelas glicosiltransferases são os açúcares de nucleotídeos (UDP-GlcAc, UDP-Gal, GDP-Fuc, CMP-NANA e CMP-NGNA). Fonte: (ARIZA, 2017).

Figura 14: Sílica covalentemente ligada aos grupos carbamóil não iônicos. Adaptado de (TOSOHBIOSCIENCE, 2016).

Figura 15: Análise de Glicanos. (A) Perfil HILIC-HPLC de N-glicanos liberados a partir de IgG de soro humano. (B) A escala das unidades de glicose (UG) baseia-se na eluição do hidrolisado de dextrana marcado com 2AB. Fonte: (ARIZA, 2017).

Figura 16: Representação esquemática dos microcarregadores Cytodex. Adaptado de (SCIENCES, 2015).

Figura 17: Preparo das amostras para análise de N-glicosilação: liberação dos glicanos com PGNase F, derivatização com 2AB e análise por HILIC-HPLC para propor estruturas com base na Glycobase 3.2.4. Fonte: (ARIZA, 2017).

Figura 18: Especificidade de corte das exoglicosidases usadas nas amostras de glicanos. Fonte: (ARIZA, 2017).

Figura 19: Adaptação das células Vero B4 a diferentes meios de cultura suplementados com 10% SFB. P1) Primeira Passagem. P2) Segunda Passagem. P3) Terceira Passagem. P4) Quarta Passagem e P5) Quinta Passagem. A primeira coluna mostra os dados de concentrações de células totais, enquanto na segunda os de concentração de glicose (g L⁻¹) e na terceira de lactato (g L⁻¹).

Figura 20: Adaptação das células Vero B4 a condições livres de SFB em frascos T - Primeira passagem (5% SFB). (A) concentração celular (10⁵ céls cm⁻²), (B) concentração de glicose (g L⁻¹) e (C) concentração de lactato (g L⁻¹).

Figura 21: Adaptação das células Vero B4 a condições livres de SFB em frascos T - Segunda passagem (2,5% SFB). (A) concentração celular (105cél/s cm-2), (B) concentração de glicose (g L-1) e (C) concentração de lactato (g L-1).

Figura 22: Adaptação das células Vero B4 a condições livres de SFB em frascos T - Terceira passagem (1,25% SFB). (A) concentração celular (105cél/s cm-2), (B) concentração de glicose (g L-1) e (C) concentração de lactato (g L-1).

Figura 23: Adaptação das células Vero a condições livres de SFB - Quarta Passagem (0,6% SFB). (A) concentração celular (105cél/s cm-2), (B) concentração de glicose (g L-1) e (C) concentração de lactato (g L-1).

Figura 24: Adaptação das células Vero a condições livres de SFB - Quinta Passagem (0% SFB). (A) concentração celular (105cél/s cm-2), (B) concentração de glicose (g L-1) e (C) concentração de lactato (g L-1).

Figura 25: Primeira infecção das células Vero nos dois diferentes meios de cultura livres de SFB (Opti MEM e ProVero 1) em duas temperaturas (34 e 37°C). Segue conforme as condições experimentais indicadas nas tabelas 2.

Figura 26: Perfil de replicação do vírus da febre amarela em células Vero em dois diferentes meios de cultura livres de SFB: Opti MEM (OM) e ProVero 1 (PV) em duas temperaturas 34 e 37°C. As linhas pontilhadas indicam os TOI.

Figura 27: Perfil de replicação do vírus da febre amarela (17D 204 RKI) em frascos do tipo roller usando o meio Opti MEM em três diferentes condições. Todo o processo produtivo na temperatura de 34°C (azul) e 37°C (vermelho). E utilizando as duas temperaturas 34/37°C (cinza).

Figura 28: Perfil de adesão e crescimento celular em frascos agitados do tipo Spinner a 37 °C usando o meio Opti MEM e Cytodex 1 (2 g L-1). Na parte superior podem ser encontrados os resultados da cinética de adesão celular e, na parte inferior, o perfil da concentração celular durante a cultura.

Figura 29: Perfil de adesão, concentração celular e produção de vírus da febre amarela em frascos agitados do tipo spinner usando o meio Opti MEM e Cytodex 1 (agitação intermitente). Na parte superior está a cinética de adesão celular e na parte inferior o perfil de concentração celular e de replicação do vírus da febre amarela. A linha pontilhada indica o dia da infecção com o vírus da febre amarela.

Figura 30: Perfil de adesão, concentração celular e produção de febre amarela em frascos agitados do tipo spinner usando o meio Opti MEM e Cytodex 3 (33-50 céls. por microcarregador), sob agitação contínua. Na parte superior está a cinética de adesão celular e na parte inferior o perfil de concentração celular e perfil de replicação do vírus da febre amarela.

Figura 31: Perfil de adesão, concentração celular e produção de febre amarela em frascos agitados do tipo Spinner usando o meio Opti MEM e Cytodex 3 (33-50 céls. por microcarregador). Na parte superior está a cinética de adesão celular e na parte inferior o perfil de concentração celular e perfil de replicação do vírus da febre amarela. A seta vermelha indica o dia da troca de 75% do meio de cultivo.

Figura 32: Perfil de concentração celular da Vero WHO utilizando Cytodex 3 e produção do vírus de febre amarela (17DD) em frascos agitados do tipo spinner (34 e 37/34^o C). As condições testadas foram: TOI = 5 dias, MOI = 0,002, TOH = 4 dias e uma colheita. A linha pontilhada vermelha indica a troca de 75 % do meio de cultivo, enquanto a linha pontilhada preta indica a infecção com o vírus da febre amarela e a seta verde indica o dia da colheita.

Figura 33: Perfil de concentração celular e produção de febre amarela em frascos agitados do tipo spinner com microcarregadores Cytodex 3 em modo colheita múltipla: duas colheitas (37/34 °C). A linha pontilhada vermelha indica a troca de 75 % do meio de cultivo, enquanto a linha pontilhada preta indica a infecção com o vírus da febre amarela e as setas verde indicam os dias das colheitas.

Figura 34: Perfil de concentração celular e produção do vírus de febre amarela em frascos agitados do tipo spinner em modo colheita múltipla: três colheitas (37/34 °C). A linha pontilhada vermelha indica a troca de 75 % do meio de cultivo, enquanto a linha pontilhada preta indica a infecção com o vírus da febre amarela e as setas verde indicam os dias das colheitas.

Figura 35: Perfil de concentração celular e produção do vírus de febre amarela em frascos agitados do tipo spinner usando microcarregadores Cytodex 3 em modo colheita múltipla: cinco colheitas (37/34 °C). A linha pontilhada vermelha indica a troca de 75 % do meio de cultivo, enquanto a linha pontilhada preta indica a infecção com o vírus da febre amarela e as setas verde indicam os dias das colheitas.

Figura 36: Comparativo das produções do vírus da febre amarela em batelada (SH) a 37 °C e múltipla colheita (MH2, MH3 e MH5) em frascos do tipo agitado (spinner) utilizando Vero WHO em microcarregadores Cytodex 3.

Figura 37: Gráfico de superfície de resposta da estabilidade infecciosa do vírus da febre amarela variando o número de ciclos de congelamento-descongelamento e concentração de sacarose. O título viral foi determinado pelo ensaio de placa e expresso como percentual de recuperação do produto em valores normalizados de unidades formadoras de placa (PFU mL⁻¹). A amostra foi a colheita de vírus clarificada por centrifugação não purificada (cepa 17DD).

Figura 38: Comparação do uso de diferentes concentrações de PEG-6000 em cromatografia de exclusão estérica (SXC) para purificação de vírus da febre amarela (cepas 17DD e 17D204) produzidos em células Vero em meio isento de soro, usando um leito de 100 cm² de membranas de celulose regenerada com tamanho de poro de 1,0 µm. O título de vírus infeccioso foi determinado por ensaio de placa e expresso aqui como percentagem relativa à quantidade total de partículas alimentadas ao leito de membranas. O sobrenadante clarificado contendo os vírus foi misturado em diferentes proporções a uma solução estoque de 32% (m v⁻¹) de PEG-6000 para obter as concentrações de alimentação mostradas acima. As partículas de vírus purificadas foram recuperadas por um passo de eluição para uma solução aquosa de Tris-HCl 50 mM, cloreto de sódio 150 mM, pH 7,4. Os valores do gráfico são médias aritméticas ± erro padrão de réplicas analíticas (n = 2).

Figura 39: Cromatografia de exclusão estérica (SXC) de partículas do vírus da febre amarela (cepa 17DD) produzidas em células Vero em meio isento de soro, utilizando membranas de celulose regenerada com tamanho de poro de 1,0 μm . (a) cromatograma típico. A região sombreada indica as partículas do vírus purificadas e recuperadas por eluição com um degrau de tampão de Tris-HCl 50 mM, cloreto de sódio 150 mM, pH 7,4. (b) Distribuição do tamanho das partículas por sedimentação centrífuga diferencial (DCS) antes (cinza) e depois (vermelho) da purificação por SXC. A amostra alimentada foi suspensão viral clarificada e inativada antes da adição de PEG. As curvas mostram um pico monodisperso de 25 - 55 nm, sem indicação da presença de agregados. (c) Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) de partículas de vírus da febre amarela purificadas por SXC. As partículas virais (setas brancas) são homogêneas em forma e tamanho, com um diâmetro aproximado de 35 nm. Impurezas residuais (setas pretas), como estruturas vesiculares, podem ser observadas.

Figura 40: Cromatograma obtido por análise de HILIC-HPLC de amostra de glicanos liberados do vírus da febre amarela (Cepas 17DD e 17D 204). Os resultados mostram os perfis cromatográficos das duas cepas vacinais de FA: em preto a cepa 17D 204 e cepa 17DD em magenta são similares.

Figura 41: Continuação da Tabela 16.

Figura 42: Continuação da Tabela 17.

Figura 43: Continuação da Tabela 17.

Figura 44: Análise com exoglicosidases (17DD). Os N-Glicanos foram liberados, marcados com o fluoróforo 2-aminobenzamida (2-AB) e analisados por HILIC-HPLC. Cromatograma: 1) Amostra não digerida, 2) ABS, sialidase, 3) ABS/ BTG, β -galactosidase, 4) ABS/BTG/ JBH, β -N-acetil-hexosaminidase, 5) ABS/BTG/JBH/ BKF, α -fucosidase e 6) JBM, α -manosidase.

Figura 45: Continuação da Tabela 19.

Figura 46: Abundância relativa das glicoformas encontradas na cepa 17DD. Estas glicoformas foram detectadas utilizando HILIC após liberação de PNGase F e marcação com 2-AB, conforme análise global (Tabela 17). Os dados estão representados como média e desvio padrão (duplicata analítica da mesma amostra).

Figura 47: Abundância relativa das glicoformas encontradas na cepa 17D 204. Estas glicoformas foram detectadas utilizando HILIC após liberação de PNGase F e marcação com 2-AB, conforme análise global (Tabela 18). Os dados estão representados como média e desvio padrão (duplicata analítica da mesma amostra).

Figura 48: Cromatograma obtido e estruturas de glicanos propostas pela análise por HILIC-HPLC de amostra de glicanos liberados da cepa 17DD. O tempo de retenção dos picos de glicanos foram comparados com o ladder de dextrana, convertendo o tempo de retenção dos picos em unidades de glicose (UG). As estruturas de glicanos propostas após a digestão com as exoglicosidases foram indicadas para os diferentes picos obtidos na análise global.

Figura 49: Cromatograma obtido e estruturas de glicanos propostas pela análise por HILIC-HPLC de amostra de glicanos liberados da cepa 17D 204. O tempo de retenção dos picos de glicanos foram comparados com o ladder de dextrana, convertendo o tempo de retenção dos picos em unidades de glicose (UG). As estruturas de glicanos propostas após a digestão com as exoglicosidases foram indicadas para os diferentes picos obtidos na análise global.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais características físicas dos microcarregadores Cytodex 1 e 3.
Fonte (SCIENCES, 2015).

Tabela 2: Condições experimentais do planejamento experimental, utilizando células Vero WHO dois diferentes meios de cultura (Opti MEM e ProVero 1).

Tabela 3: Condições dos experimentos realizados com Vero WHO em condições isentas de SFB em frascos T, Roller e frascos agitados.

Tabela 4: Condições experimentais do planejamento experimental, utilizando dois diferentes parâmetros para estabilidade da partícula viral.

Tabela 5: Adaptação das células Vero B4 a condições livres de SFB em frascos T - Primeira passagem (5 % SFB).

Tabela 6: Adaptação das células Vero B4 a condições livres de SFB em frascos T - Segunda passagem (2,5 % SFB).

Tabela 7: Adaptação das células Vero B4 a condições livres de SFB em frascos T - Terceira passagem (1,25 % SFB).

Tabela 8: Adaptação das células Vero a condições livres de SFB - Quarta Passagem (0,6 % SFB).

Tabela 9: Adaptação das células Vero B4 a condições livres de SFB em frascos T - Quinta passagem (0 % SFB).

Tabela 10: Adaptação das células Vero WHO em frascos T ao meio de cultura Opti MEM.

Tabela 11: Adaptação das células Vero WHO em frascos T ao meio de cultura ProVero 1.

Tabela 12: Passagens sucessivas de células Vero WHO em frascos T em meio Z com 10 % de SFB (controle).

Tabela 13: Estudo de infecção da célula Vero WHO com febre amarela (YFV 17D 204) usando o meio Opti MEM e ProVero 1.

Tabela 14: Quantidades calculadas de doses de vacina de febre amarela a partir de execuções por cromatografia de exclusão estérica (SXC) do vírus da febre amarela produzidas em culturas de células Vero. As colheitas de vírus clarificadas foram tratadas com nuclease para digestão de DNA antes da cromatografia. O SXC foi procedido em membranas com uso único, estas constituídas de coluna de celulose regenerada de 100 cm² com tamanho de poro de 1,0 µm e a alimentação ajustada para 10% de PEG-6000. As partículas de vírus purificadas foram recuperadas por um passo de eluição para uma solução tampão de Tris-HCl 50 mM, cloreto de sódio 150 mM, pH 7,4. Os valores indicados são médias aritméticas ± erro padrão das réplicas analíticas.

Tabela 15: Balanços de massa e recuperações obtidas para a cromatografia de exclusão estérica (SXC) do vírus da febre amarela (FA) produzido em células Vero em meio isento de soro animal. A SXC foi realizada utilizando membrana de celulose regenerada (100 cm²) com tamanho com tamanho de poro de 1,0 µm e ajustando a alimentação para 10% de PEG-6000.

Tabela 16: Possíveis N-glicanos principais da cepa 17DD representados por nomenclatura e estruturas preliminares. A amostra viral purificada foi desnaturada, foi clivada com PNGase F, separada por HILIC-HPLC e comparada com ladder de dextrana hidrolisada e feita busca na Glycobase 3.2.4 para possíveis estruturas.

Tabela 17: Possíveis N-glicanos da cepa 17D 204 representados por nomenclatura e estruturas preliminares (Global). A amostra viral purificada foi desnaturada, foi clivada com PNGase F, separada por HILIC-HPLC e comparada com ladder de dextrana hidrolisada e feita busca na Glycobase 3.2.4 para possíveis estruturas.

Tabela 18: N-glicanos propostos para a cepa 17DD do vírus FA. Após confirmação por digestão sequencial com diferentes exoglicosidases e análise das amostras digeridas por HILIC-HPLC, e comparados com a Glycobase 3.2.4. **Tabela 19: N-glicanos propostos para a cepa 17D 204 do vírus FA.** Após confirmação por digestão sequencial com diferentes exoglicosidases e análise das amostras digeridas por HILIC-HPLC, e comparados com a Glycobase 3.2.4.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2AB: 2-aminobenzamina

AG: Aparelho de Golgi

Asn: Asparagina

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC: *American Type Culture Collection* (Coleção de Tipos de Cultura Americana)

BSA: *Bovine Serum Albumin* (Albumina do Soro Bovino)

C: Proteína do Capsídeo

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention* (Centro para Controle e Prevenção de Doenças)

CIGB: *Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia*

CMA: Membrana Adsorviva de Celulose

CMC: carboximetilcelulose

conc.: Concentração

CV: Volume de Coluna

D: Diluição da amostra

Da: Dáltons

DCS: *Differential Centrifugal Sedimentation* (Sedimentação por Centrifugação Diferencial)

DEAE: Dietilaminoetil

DMEM: *Dulbecco Modified Essential Medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

DSMZ: *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*

DTT: Ditioneitol

E: Proteína do Envelope

ECACC: *European Collection of Animal Cell Cultures* (Coleção Europeia de Culturas de Célula Animal)

EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético

EGF: *Epidermal Growth Factor* (Fator de Crescimento Epidérmico)

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (**ensaio** de imunoabsorção enzimática)

EPP: *Egg Passage* (Passagem no Ovo)

GlcNAc: Acetiglicosamina

GMEM: *Glasgow Modified Essential Medium*

GnT: N-acetilglicosaminiltransferases

HCP: *Host Cell Proteins* (Proteínas da Célula Hospedeira)

HILIC-HPLC: *Hydrophilic interaction liquid chromatography - High performance liquid chromatography*

HSA: *Human Serum Albumin* (Albumina do Soro Humano)

IgG: Imunoglobulina G

LECC: Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares

M: Proteína da Membrana

Man: Manose

MEM: *Minimum Essential Medium*

MOI: *Multiplicity of Infection* (Multiplicidade de Infecção)

MWCO: *Molecular Weight Cut Off* (Massa molecular de corte)

nm: nanômetros

NP: Número de Plaques de Lise

NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5: Proteínas não Estruturais do Vírus Amarelão

OMS: Organização Mundial de Saúde

OST: Oligossacariltransferase

ORF: *Open Reading Frame* (Matriz de Leitura Aberta)

Pa: Pressão de alimentação

Pc: Pressão do concentrado

PBS: *Phosphate Buffered Saline* (Solução Salina Tamponada)

PFU: *Plaque-forming Units* (Unidade Formadora de Placa)

pI: Ponto Isoelétrico

PEG: Polietilenoglicol

PNH: Primatas Não Humanos

prM: Proteína Percursora da Proteína M

PS: Epitélio Renal de Porco

PSD: *Particle Size Distribution* (Distribuição de Partículas por Tamanho)

SFB: Soro Fetal Bovino

RE: Retículo Endoplasmático

rec.: Recuperação

RKI: *Robert Koch Institute*

RNA: Ácido Ribonucleico

RNA_m: RNA mensageiro

SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate* (Dodecil Sulfato de Sódio)

Ser: Serina

SFM: *Serum Free Medium*

SV: Suspensão Viral

SXC: Cromatografia de Exclusão Estérica

TEM: Microscopia Eletrônica de Transmissão

Thr: treonina

TOI: *Time of Infection* (Tempo de Infecção)

TOH: *Time of Harvest* (Tempo para Colheita)

Tris: Tris Hidroximetil Aminometano

UG: Unidades de Glicose

UNICEF: *United Nations Children's Fund* (Fundo das Nações Unidas para a Infância)

UNRRA: United Nations Relief and Rehabilitation Administration

UV: Ultravioleta

Vol: Volume de amostra

VP-SFM: Virus Production Serum Medium

VVF: Vírus Viscerotrópico Francês

WCB: *Working Cell Bank*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
2. REVISÃO DA LITERATURA	27
2.1 FEBRE AMARELA.....	27
2.2 HISTÓRICO DA VACINA CONTRA FEBRE AMARELA.....	28
2.2.1 A Vacina.....	28
2.2.2 A Vacina no Brasil.....	31
2.2.3 Produção do Vírus 17DD em Células de Embrião de Galinha.....	33
2.2.4 O Vírus	35
2.2.5 Ciclos de Replicação.....	36
2.2.6 O Genoma	38
2.2.7 Epidemiologia da Febre Amarela	39
2.2.8 Cultivo de Células Animais na Produção de Vacinas Virais.....	45
2.2.9 Produção de Vacinas em Meios de Cultura Isentos de SFB.....	47
2.2.10 Cultivo de Células Animais em Biorreatores.....	50
2.2.11 Produção de Vacinas Virais em Biorreatores Agitados.....	52
2.3 ESTRATÉGIAS DE PURIFICAÇÃO DE VACINAS VIRAIS.....	54
2.3.1 Clarificação	56
2.3.2 Captura	57
2.3.3 Membranas de Adsorção	59
2.3.4 Purificação Intermediária	60
2.3.5 Polimento.....	60
2.4 GLICOSILAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA FINS TERAPÊUTICOS	62
2.4.1 N-Glicosilação	62
3. OBJETIVOS.....	73
3.1 GERAL	73
3.2 ESPECÍFICOS	74
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	74
4.1 MATERIAIS	74
4.1.1 Cepas Virais.....	74
4.1.2 Linhagem Celular.....	75
4.1.3 Microcarregadores	75
4.1.4 Meios de Cultivo	76
4.1.5 Solução de Tripsina/Verseno.....	77
4.1.6 TrypLE™ Select.....	77
4.1.7 Solução Inibidora de Tripsina.....	77

4.2	SISTEMAS DE CULTIVO.....	77
4.2.1	Frascos do Tipo T.....	78
4.2.2	Frascos Rotativos do Tipo <i>Roller</i>	78
4.2.3	Frascos Agitados do Tipo <i>Spinner</i>	78
4.3	METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	78
4.3.1	Estoque Celular	78
4.3.2	Crescimento Celular	79
4.3.3	Produção do Vírus Amarelão.....	82
4.3.4	Clarificação	85
4.3.5	Estabilidade do Vírus da Febre Amarela.....	85
4.3.6	Purificação do Vírus por Técnicas Cromatográficas	86
4.4	METODOLOGIA ANALÍTICA.....	87
4.4.1	Determinação da Concentração Celular	87
4.4.2	Determinação da Concentração de Células nos Microcarregadores.....	87
4.4.3	Concentração de Nutrientes e Metabólitos	87
4.4.4	Título Viral.....	88
4.4.5	Quantificação de DNA	89
4.4.6	Quantificação de Proteínas Totais	89
4.4.7	Medição de Distribuição de Tamanho da Partícula Viral.....	89
4.4.8	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Utilizando Dodecil-Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)	90
4.4.9	Determinação do perfil de Glicosilação do Vírus da Febre Amarela	90
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
5.1	CULTIVO DE CÉLULAS VERO A MEIOS ISENTOS DE SORO ANIMAL.....	97
5.1.1	Adaptação da Linhagem Celular Vero-B4 (DSMZ) a Meios Isentos de Soro Animal	97
5.1.2	Adaptação da linhagem celular Vero WHO (ECACC) a meios isentos de soro animal.....	109
5.2	INFECÇÃO VIRAL.....	112
5.2.1	Ensaio Iniciais em frascos T.....	112
5.2.2	Avaliação da Replicação Viral em Sistemas com Garrafas do Tipo <i>Roller</i>	115
5.2.3	Avaliação da Replicação Viral em Frascos Agitados do Tipo <i>Spinner</i>	116
5.2.4	Estudo de Diferentes Temperaturas para a Produção Viral e de Múltiplas Colheitas de Vírus com Duas Cepas Virais Vacinais	121
5.3	INVESTIGAÇÃO DA ESTABILIDADE DO VÍRUS AMARILHO	128
5.4	PURIFICAÇÃO DO VÍRUS DA FEBRE AMARELA.....	130
5.4.1	Avaliação Inicial de Diferentes Concentrações de PEG-6000	130

5.4.2	Estabelecimento do Processo de Purificação por SXC	132
5.5	AVALIAÇÃO DO PERFIL DE N-GLICOSILAÇÃO DAS CEPAS VACINAIS DE FA	137
5.5.1	Análise do Perfil Global de N-glicosilação de FA por HILIC-HPLC	137
5.5.2	Digestão Sequencial com Exoglicosidases para Determinação dos Glicanos Presentes.....	143
6.	CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	154
6.1	CONCLUSÕES.....	154
6.2	SUGESTÕES	155
7.	REFERÊNCIAS	157

1. INTRODUÇÃO

Jenner combatendo a varíola em 1789, e Pasteur combatendo a raiva em 1889, demonstraram diversas doenças poderiam ser prevenidas por meio da vacinação. Isto contribuiu para que vários pesquisadores buscassem desenvolver uma vacina contra a febre amarela (FA).

Em 30 de novembro de 1936, ocorreu um grande marco no desenvolvimento da vacina atenuada contra o vírus da febre amarela. Foi descrito que após a passagem do vírus da febre amarela em polpa de embrião de galinha e utilização desta suspensão viral produzida em funcionários da Fundação Rockefeller, a preparação vacinal apresentou uma alta imunogenicidade (THEILER; SMITH, 1937a).

No final da década de 30, a vacina contra febre amarela foi utilizada, pela primeira vez, no Brasil e na África (FOX; PENNA, 1943). A partir do ano de 1937, a vacina contra febre amarela começou a ser produzida, com sucesso, no Instituto Oswaldo Cruz, no Brasil. Desde então, é reconhecida como uma das vacinas mais seguras e eficazes, pois induz imunidade duradoura e apresenta poucos efeitos colaterais. Além disso, possui custos relativamente baixos e o processo produtivo está bem estabelecido (MONATH, 1999; STAPLES, 2018).

No entanto, o aumento da demanda por esta vacina, bem como a escassez de estoques deste produto evidenciados em surtos recentes em Angola (2016) e no Brasil (2017-2018), demonstrou a necessidade de desenvolver tecnologias mais avançadas e escalonáveis. As novas tecnologias podem permitir para a produção desta vacina um maior rendimento e consequentemente uma maior produtividade, como alternativa à produção tradicional baseada em ovos embrionados, processo produtivo que tem 82 anos passou por poucos aprimoramentos desde então.

O aumento de demanda para este produto está relacionado com o quadro epidemiológico da doença, pois recentemente, entre 2017/2018, foi registrado o mais expressivo surto da doença no Brasil, que afetou principalmente os estados da região Sudeste, quando foram registrados 1.376 casos humanos e 483 óbitos, além de 864 epizootias por FA no Brasil. No período de monitoramento seguinte as informações repassadas pelas secretarias estaduais de saúde sobre a situação da doença no Brasil, no período de 1º de julho de 2017 a 03 de abril de 2018, foram confirmados 1.127 casos de febre amarela no país, sendo que 328 vieram a óbito, ao todo, foram notificados 4.548 casos suspeitos (BRASIL, 2018).

Por outro lado, a produção mundial de vacinas vem sofrendo um processo de reformulação de suas plataformas e das tecnologias empregadas na última década, sendo observada uma tendência de uso de sistemas baseados no cultivo de células animais com o emprego de meios isentos de componentes de origem animal, em especial de soro fetal bovino (JOSEFSBERG; BUCKLAND, 2012). O uso de linhagens estabelecidas de células animais na produção de vacinas apresenta a possibilidade de cultivo sob condições monitoradas e controladas em biorreatores, que podem propiciar melhor reprodutibilidade do processo produtivo, consistência lote a lote, melhores condições para a replicação viral e conseqüentemente, resulta em maior produtividade. Além disto, os processos de cultivo em biorreatores permitem maior facilidade no escalonamento, facilitando a resposta as epidemias.

Dentre as linhagens celulares contínuas utilizadas para a produção de vacinas virais de uso humano, a linhagem celular Vero foi muito estudada para diferentes processos produtivos para vacinas virais (FRAZZATI-GALLINA et al., 2001; GASPAR et al., 2008; MATTOS et al., 2015; PEREIRA et al., 2015; SOUZA et al., 2009) e é considerada adequada pela OMS para a produção de imunobiológicos de uso humano (MENDONÇA; PEREIRA, 1995; WHO, 2010).

Existe uma orientação das agências regulatórias em evitar o uso de componentes de origem animal nos processos de produção há mais de vinte anos (BUTLER et al., 2000; LUBINIECKI, 1998), com o objetivo de garantir a qualidade e segurança do produto vacinal final (DELLEPIANE; GRIFFITHS; MILSTIEN, 2000), o que levou as agências regulatórias a encorajar os fabricantes de produtos biológicos de uso humano a reduzirem ou eliminarem o uso de substâncias de origem animal em seus processos de fabricação (KALLEL et al., 2002).

Os processos de purificação (*Downstream Processing*) são fundamentais na obtenção dos antígenos vacinais, e um dos objetivos é a redução das impurezas residuais aos níveis preconizados pelas agências regulatórias, reduzindo, desta forma, os riscos à saúde humana. Estes processos devem ser e reprodutíveis, economicamente viáveis, robustos e capazes de manter as propriedades da molécula de interesse, neste caso, a imunogenicidade da partícula viral.

Os avanços na área de purificação de antígenos virais foram menos significativos e impactantes do que nos processos de cultivo celular (*Upstream Processing*) para o aumento da produtividade. Por este motivo, nos últimos anos, o estabelecimento de processos de purificação eficientes e escalonáveis tem sido objetivo de diferentes grupos,

prevenindo que esta etapa seja limitante da capacidade produtiva (MARICHAL-GALLARDO et al., 2017; PATO et al., 2014; VICENTE et al., 2011).

A utilização de membranas adsorptivas como suporte cromatográfico foi proposta como uma alternativa eficaz em etapas de purificação de proteínas para fins terapêuticos, pelo fato de que o seu uso pode acarretar em redução de custos, o tempo de processo, utilização de insumos (tampões, por exemplo), além de ser de fácil ampliação de escala, por se tratarem de sistemas modulares (VAN REIS; ZYDNEY, 2007).

Os N-glicanos são formas estruturais importantes, pois eles conferem importantes propriedades biológicas e estruturais a uma glicoproteína. Os N-glicanos contêm um pentassacarídeo central, composto por 2 resíduos de acetilglicosamina (GlcNAc) e 3 resíduos de manose (Man), ligado através de uma ligação N-glicosídica a um resíduo de asparagina (Asn). Os sítios de N-glicosilação podem ser previstos pela sequência de aminoácidos consenso Asn-X-Ser/Thr, sendo que “X” pode ser qualquer aminoácido, exceto uma prolina (BUTLER, 2008). Este padrão de glicosilação das proteínas é produzido pela atividade de várias enzimas glicosiltransferases, estas se encontram no complexo de Golgi das células onde se inicia o processo e é posteriormente transportado para o complexo de Golgi onde o processo tem continuidade, gerando uma série de diferentes glicoformas (BUTLER, 2008).

Neste trabalho, foi estudado o perfil de glicanos do vírus da febre amarela produzido em células Vero liberados pelo uso da enzima PNGase F. Após a liberação dos glicanos, os mesmos foram derivatizados com o fluoróforo (2AB) e identificados por cromatografia de interação hidrofílica de alto desempenho. A HILIC-HPLC é atualmente a tecnologia usada por diversos grupos de pesquisa e capaz de separar diferentes glicanos polares e hidrofílicos com alta resolução (MARINÑO et al., 2010).

Atualmente, a vacina de febre amarela é produzida em ovos embrionados e caso a partícula viral venha ser produzida em plataforma de células de mamíferos, como, por exemplo a célula Vero, existe uma possibilidade de que as partículas virais sejam produzidas com diferentes padrões de glicosilação. Por estas razões, o presente trabalho teve como objetivo propor novas estratégias de produção e purificação do vírus da febre amarela, assim como a caracterização da glicosilação do vírus obtido. Acredita-se que os conhecimentos gerados nesse trabalho possam contribuir para o estabelecimento de um processo eficiente de produção de uma nova vacina para febre amarela.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FEBRE AMARELA

Nos séculos XVIII e XIX, epidemias de febre amarela assolaram os Estados Unidos. Como exemplo deste fato, em 1793, uma delas dizimou 10 % da população da Filadélfia e outra causou mais de 13 000 óbitos no vale do Mississipi. Posteriormente, em 1905, ocorreu a última grande epidemia em Nova Orleans, que foi responsável pela morte de 908 pessoas (COLEMAN, 1987; DUFFY, 1966; MONATH, 1999; POWELL, 1949; STAPLES, 2018).

Em 1881, Carlos Finlay sugeriu que o mosquito do gênero *Aedes aegypti* fosse o vetor envolvido na transmissão da febre amarela (FINLAY, 2011). Duas décadas depois, Walter Reed verificou que o agente etiológico causador da febre amarela era um agente filtrável e provou o envolvimento do *Aedes aegypti* como vetor na transmissão da febre amarela. No continente americano, desde o século XVII, tanto o vetor urbano *Aedes aegypti*, como o vírus da febre amarela, já podiam ser encontrados, oriundos de viagens resultantes das colonizações no continente africano. Entre os anos de 1647 e 1649, o vetor também foi encontrado no México, Cuba, Guadalupe, Barbados e outras regiões costeiras dos Estados Unidos e Europa, usualmente trazidos pelos navios provenientes de portos da África Ocidental (MONATH, 1999; STAPLES, 2018).

Após o conhecimento sobre o vetor e o agente viral, William C. Gorgas desenvolveu o combate ao vetor e obteve como resultado a eliminação do *Aedes aegypti* e, consequentemente, a eliminação da febre amarela em Cuba e no Panamá.

No Brasil, em 1903, Oswaldo Cruz, utilizando a experiência de William C. Gorgas, em Cuba, organizou as brigadas “caça-mosquitos”, conseguindo a erradicação do vetor, em 1908, e a eliminação da febre amarela urbana no Rio de Janeiro (CALHEIROS, 1988).

O conhecimento do agente viral aconteceu de forma gradual, quando as características da transmissão do vírus começaram a serem descritas. Em 1898, Adolfo Lutz e Emílio Ribas sustentaram a possibilidade de que a febre amarela pudesse ser contraída fora da área urbana (RIBAS, 1903a, 1903b, 1903c). Apenas no início da década de 1930, estudos realizados por Andrade, Oliveira e Soper, no vale do Canaã, no Espírito Santo, descreveram o ciclo silvestre de transmissão do vírus (SOPER, 1936). Após esta descoberta, toda a estratégia de combate à febre amarela teve que ser alterada. A

impossibilidade de erradicação da doença, devido à presença de vetores existentes em florestas tropicais, tornou fundamental a busca pela sua prevenção.

2.2 HISTÓRICO DA VACINA CONTRA FEBRE AMARELA

2.2.1 A Vacina

No século XX, a descoberta da possibilidade de utilização de primatas não humanos como modelo experimental para inoculação do vírus da febre amarela forneceu novas possibilidades para investigações do desenvolvimento da vacina. Este fato foi demonstrado por meio da constatação de que o macaco rhesus (*Macaca mullata*) era susceptível ao vírus da febre amarela (BAUER; HUDSON; STOKES, 1928).

Em 1927, duas linhagens do vírus da febre amarela foram isoladas, originando cepas vacinais para uso humano. A primeira, a cepa Asibi, foi isolada de um paciente africano, cujo nome deu origem ao da cepa. A segunda, originada do vírus viscerotrópico francês (VVF), foi isolada de um paciente no Senegal (MATHIS; SELLARDS; LAIGRET, 1928).

O primeiro isolamento do vírus da febre amarela foi obtido por Mahaffy e Bauer, pesquisadores da Fundação Rockefeller, em Gana, a partir da inoculação do sangue de um indivíduo doente, de 28 anos, em um macaco rhesus. O animal morreu após 4 dias, apresentando sintomas e lesões hepáticas condizentes com a doença.

O sangue do animal foi novamente inoculado em outro macaco rhesus, via intraperitoneal, e transportado imediatamente para Yaba, na Nigéria, onde chegou com sintomas clínicos de febre amarela. Posteriormente, 52 novas passagens deste vírus foram realizadas, sendo então estabelecida a cepa Asibi (BAUER; HUDSON; STOKES, 1928).

Em 1930, Theiler realizou uma importante descoberta ao descrever o camundongo como um novo modelo animal altamente susceptível ao vírus da febre amarela (THEILER, 1930). No início da década de 30, técnicas de cultura de tecido embrionário de camundongo “*in vitro*” foram utilizadas para o estudo da replicação viral.

Posteriormente, o vírus isolado pelos pesquisadores do Instituto Pasteur, em Dakar, em 1927, foi utilizado em passagens sucessivas por meio da via intracerebral em modelo murino. Este fato permitiu a atenuação viral, tornando-o incapaz de produzir lesões

viscerais em macaco rhesus. Esta cepa foi denominada cepa neurotrópica francesa (MONATH, 2004).

Em 1931, este vírus foi administrado, sendo considerada a primeira vacina de vírus atenuado contra febre amarela. Essa preparação vacinal foi utilizada na imunização de funcionários da Fundação Rockefeller no Brasil, nas cidades do Rio de Janeiro, Salvador e Recife e, também, na Argentina e na Colômbia. Todavia, esta formulação vacinal apresentava vários problemas. Aliada à dificuldade em se produzir soro imune, existia um risco potencial para a vacinação em larga escala de humanos, uma vez que a preparação vacinal podia produzir encefalite em macacos (SAWYER; KITCHEN; LLOYD, 1932).

Em 1935, a cepa Asibi, já com 54 passagens em macaco rhesus, teve sua replicação adaptada para cultura de tecido embrionário de camundongo. Após 18 passagens em cultivo de tecido, o vírus sofreu mais 58 passagens em tecido embrionário de galinha contendo tecido nervoso e, a partir daí, mais 128 passagens em tecido embrionário de galinha sem tecido nervoso e foi denominado 17D, representando a décima sétima série de experiências em cultura de células embrionárias de camundongos (Figura 1).

Este fato originou a identificação do vírus proveniente da cepa Asibi com o número 17 e a letra D, para diferenciação da série e da ordem na qual o ensaio foi realizado (LOYD; THEILER; RICCI, 1936; THEILER; SMITH, 1937a). Neste estágio, na passagem 204, foi detectada uma marcante redução do neuro e viscerotropismo viral, através de inoculação intracerebral em macacos rhesus.

Posteriormente, em 30 de novembro de 1936, ocorreu um grande marco a ser destacado no desenvolvimento da vacina atenuada contra o vírus da febre amarela. Após a passagem desse vírus em polpa de embrião de galinha e utilização em funcionários da Fundação Rockefeller, a preparação vacinal apresentou uma alta imunogenicidade (THEILER; SMITH, 1937b).

Em meados de 1937, duas subculturas derivadas do vírus 17D foram obtidas de forma independente: uma delas, a partir da passagem 195, chamada de 17DD, foi enviada ao Brasil; e a outra, denominada de 17D-204, que teve origem na passagem 204, foi enviada para a Colômbia (Figura 1). As subculturas 17D-204 e 17DD são utilizadas até os dias atuais, como sementes virais, pelos produtores mundiais de vacinas, pelo fato de apresentarem boa imunogenicidade e atenuação em sua virulência, quando utilizadas em primatas (STAPLES, 2018).

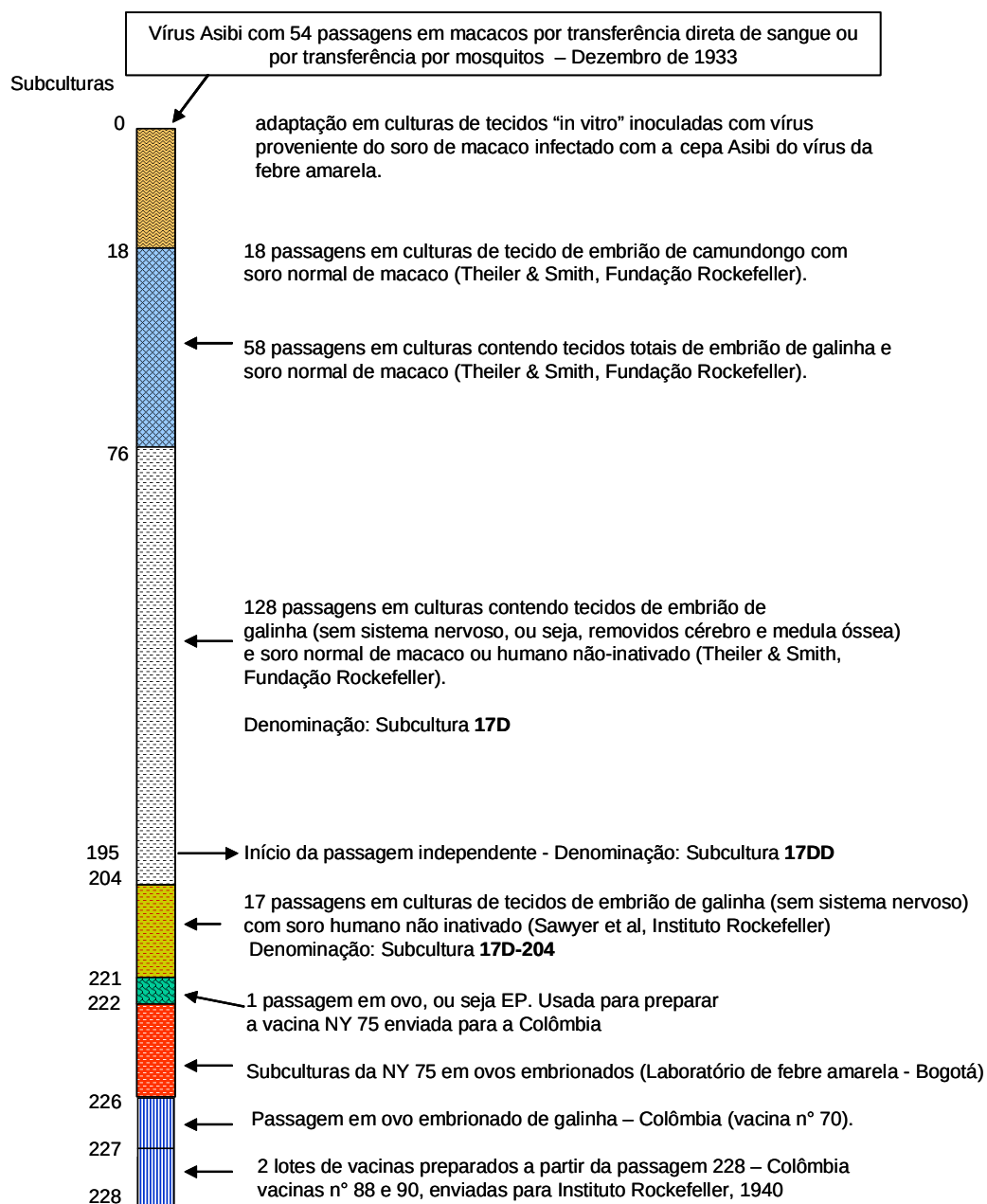


Figura 1: Esquema apresentando a história das passagens do vírus da febre amarela cepa Asibi. A barra colorida indica as passagens executadas a partir da cepa Asibi. Adaptado de (BRÈS & KOCH, 1987).

Na figura 2, pode-se observar um resumo esquemático das passagens seriadas do vírus 17D.

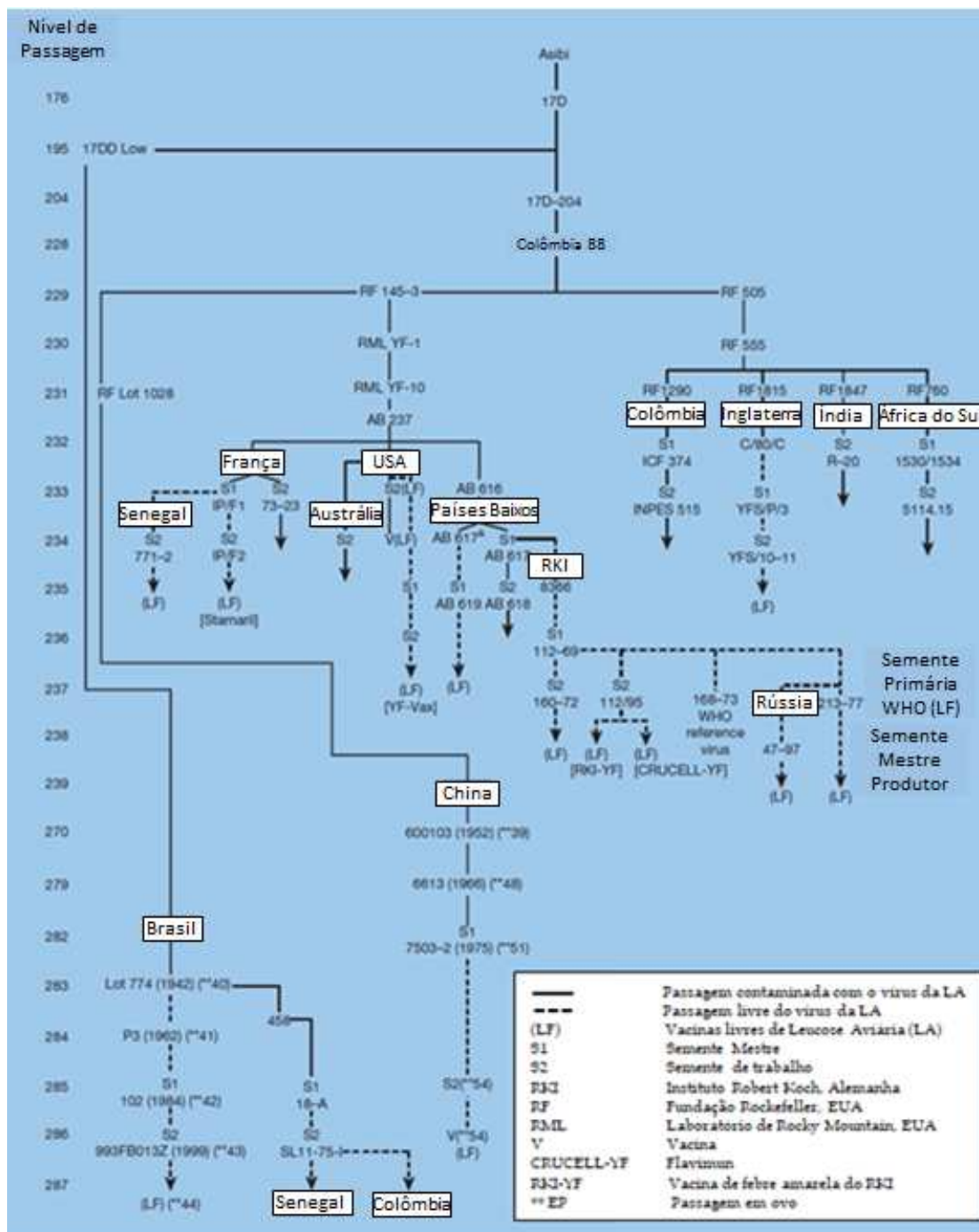


Figura 2: Esquema apresentando a evolução das passagens realizadas com o vírus 17D. A linha à esquerda representa o número de passagens a partir da cepa Asibi. À direita estão destacadas nas caixas as nomenclaturas definidas para as diferentes passagens. Fonte: STAPLES, 2018.

2.2.2 A Vacina no Brasil

No final dos anos 30, a vacina contra febre amarela foi utilizada pela primeira vez no Brasil e na África (FOX; PENNA, 1943). Desde 1937, a vacina contra febre amarela começou a ser produzida com sucesso no Instituto Oswaldo Cruz. Desde então é

reconhecida como uma das mais seguras e eficazes, pois induz imunidade duradoura e apresenta poucos efeitos colaterais. Além disso, possui custos relativamente baixos e os processos produtivos estão bem estabelecidos (MONATH, 1999; STAPLES, 2018).

Em janeiro de 1937, Hugh Smith trouxe para o Brasil várias ampolas, contendo 200 doses de vacina 17D cada. Esta vacina proveniente da Fundação Rockefeller foi obtida em cultura de células de embrião de galinha. As primeiras vacinações no Brasil foram realizadas com esta preparação vacinal (SMITH; PENNA; PAOLIELLO, 1938). Os resultados iniciais se mostraram satisfatórios, de forma que, por volta de 1939, mais de um milhão de indivíduos haviam sido vacinados com o vírus 17D no Brasil (MONATH, 1999, 2004; POST et al., 2001; STAPLES, 2018).

As diferentes linhagens da cepa parental 17D foram modificadas em diferentes níveis de passagens. Várias subculturas dessa cepa foram testadas entre 1937 e 1942 e a mudança da cepa utilizada na área produtora do Instituto Oswaldo Cruz ocorria de acordo com os resultados obtidos no processo de produção e controle de qualidade, por meio da inoculação em macacos e de testes clínicos em humanos. Foram testadas outras subculturas virais, denominadas: 17D-Rio, 17D *low*-Rio, 17D2-Rio, 17D3-Rio, 17D NY 102, 17D NY 104, 17D 310, 17D 318, 17DD *low*, 17DD *high*, 17DD1-8, EP *low* e EP *high*, até a seleção da sub-cultura EP *low* (Figura 2) (POST et al., 2001).

A vacina produzida no Brasil, sub-cultura 17DD, foi trazida do Instituto Rockefeller na forma de vacina NY 41, correspondente à 230ª sub-cultura dessa amostra. Assim, foi usada na preparação do inóculo a partir da cultura de tecido embrionário de galinha sem tecido nervoso até a passagem 519, em 28 de dezembro de 1939. Após a seleção de uma sub-cultura, a com um baixo nível de passagem em ovos embrionados (EP *low*), para a produção da vacina, esta amostra 17DD, proveniente da vacina NY 41, originou o vírus a ser utilizado como semente viral na produção até os dias atuais (POST et al., 2001).

No início da produção da vacina contra febre amarela no Brasil, em 1937, foi utilizada a cepa 17D na 150ª passagem. Foram produzidos diversos lotes vacinais em diferentes níveis de passagens. Estas vacinas foram inicialmente utilizadas com resultados favoráveis e com indicativos de alta proteção. A partir de 1942, a produção da vacina passou a ser realizada com a cepa 17DD. A produção da vacina por meio da utilização de fragmentos de tecido embrionário de pinto era muito complexa, pois a operação era difícil e apresentava baixo rendimento. O rendimento não era adequado, e por isso apresentava uma limitação para o escalonamento do processo produtivo (POST et al., 2001).

Para que houvesse a otimização do processo de produção, passou-se a fazer a última passagem do vírus diretamente em ovo embrionado com seis dias de incubação. Depois deste período, o embrião era coletado, macerado e homogeneizado. Este procedimento aumentou consideravelmente o rendimento da produção e permitiu um aumento na produtividade da vacina. Esta metodologia conhecida como “passagem em ovo” foi então adotada. A suspensão viral obtida era filtrada e adicionadas substâncias estabilizadoras. Posteriormente, adicionava-se soro humano normal para a criopreservação viral. O envase e o congelamento eram realizados em ampolas de vidro. Após a dessecação a vácuo, as ampolas eram fechadas com maçarico e armazenadas à temperatura de 2 – 4 °C e voluntários foram vacinados com esta formulação vacinal (SMITH; PENNA; PAOLIELLO, 1938).

2.2.3 Produção do Vírus 17DD em Células de Embrião de Galinha

As vacinas produzidas no Brasil, até a década de 40, eram preparadas com o vírus 17D contendo soro humano normal em sua formulação. Parte de cada lote produzido era reservado para servir como lote semente para as futuras produções (SMITH; PENNA; PAOLIELLO, 1938). Na época, não havia evidências de que passagens sucessivas pudessem acarretar mutações no vírus implicando uma perda em sua imunogenicidade. Esse fato foi somente detectado ao se preparar um lote vacinal com 386 passagens, no ano de 1938 quando, no ano seguinte, pessoas vacinadas no Espírito Santo desenvolveram a febre amarela, com alguns casos fatais. Os testes de proteção revelaram que para determinados lotes vacinais, apenas 20 % dos vacinados apresentavam soroconversão (BICA, 1988). Isto constituiu um fator determinante para o estabelecimento de um critério limitando o número de passagens e, posteriormente, o desenvolvimento do sistema de lote-semente.

O sistema de lote-semente que foi estabelecido no Brasil tem 41 passagens em ovos embrionados (“*Egg Passage*” – EP), para o lote principal, e 43 passagens para o lote-semente atualmente utilizado para a produção da vacina, usando o vírus 17DD (FOX; PENNA, 1943; HOMMA, 2002; NICOLAU, 1998) (Figura 3).

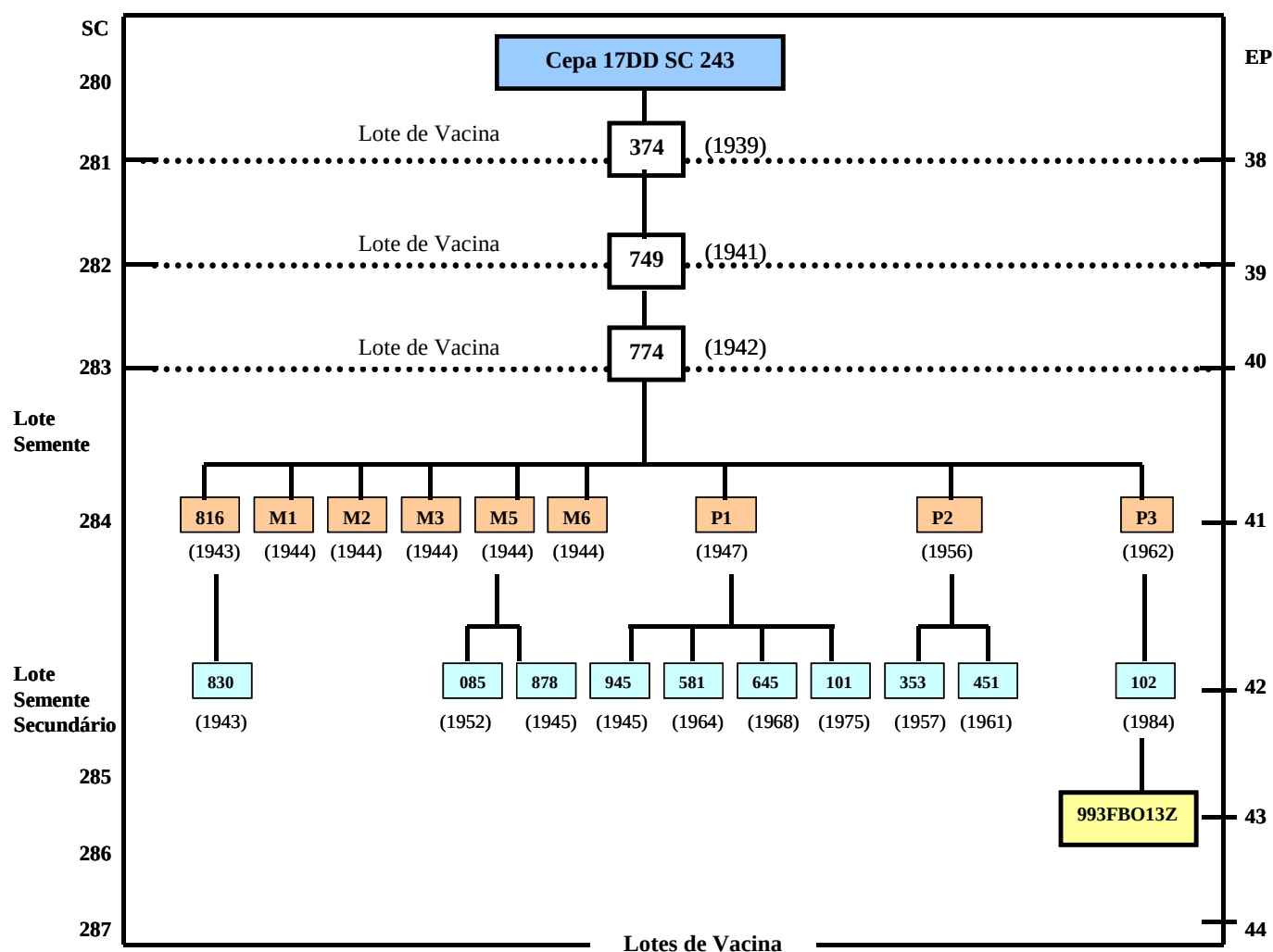


Figura 3: Esquema apresentando sistema de lote semente de febre amarela 17DD. Este esquema demonstra os níveis de passagens e suas derivações na produção vacinal contra febre amarela no Brasil a partir de 1939. Pode-se observar que, a partir de 1942, ocorreu a produção de vários lotes sementes. O lote semente P3 de 1962, apresentando 41 passagens em ovos embrionados (EP) e 284 passagens (SC) da cepa Asibi, originou o lote semente utilizado atualmente (em amarelo), este com duas passagens adicionais em ovos embrionados. Adaptado de (HOMMA, 2002).

Originalmente, a via de inoculação no ovo embrionário de seis dias era a cavidade amniótica; porém, este procedimento provocava lesões no embrião no momento da inoculação e, por esta razão, o índice de mortalidade entre os embriões inoculados era de aproximadamente 25 %. Em 1961, ocorreu uma mudança na via de inoculação do vírus da febre amarela com a finalidade de reduzir as lesões no embrião passando-se a utilizar a via vitelínica. Como consequência desta mudança, houve uma redução do índice de mortalidade para aproximadamente 8 %, com obtenção dos mesmos títulos virais que a via anterior (NICOLAU, 1998).

2.2.4 O Vírus

O vírus da febre amarela é o protótipo da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* (do latim *Flavus* = amarelo). Neste mesmo gênero e família, estão incluídos: o vírus da dengue, o vírus da febre do Oeste do Nilo, o vírus do Rocio e o vírus da encefalite de Saint Louis.

As partículas do vírus da febre amarela são formadas por um capsídeo icosaédrico, composto pela proteína de capsídeo (C), envolvido por um envelope lipídico onde estão presentes as proteínas M e E (CHAMBERS, 1990). Para a formação da partícula viral, o genoma de ácido ribonucleico (RNA) interage com a proteína C do capsídeo formando o nucleocapsídeo viral. A proteína prM é um precursor glicosilado da proteína de membrana e está presente na superfície de partículas virais imaturas. Esta proteína é clivada por proteases celulares, do tipo furina, antes da liberação das partículas virais, resultando em vírus maduros (ROBY; FUNK; KHRONYKH, 2012; STADLER et al., 1997).

Na figura abaixo está representada a estrutura de partículas virais imaturas (forma intracelular) e maduras (forma extracelular) (Figura 4).

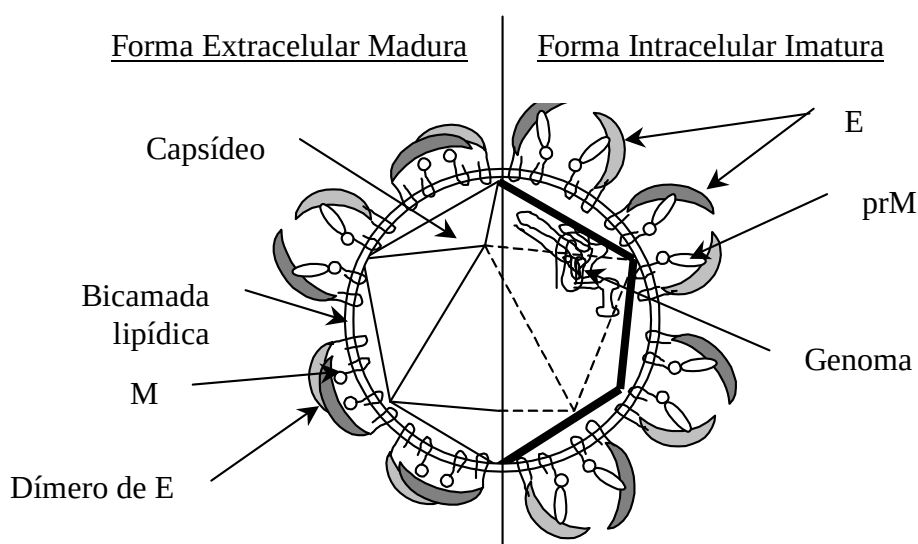


Figura 4: Organização estrutural dos flavivírus. O esquema mostra a partícula viral em suas formas intracelular imatura (lado direito) e extracelular madura (lado esquerdo). O capsídeo do vírus tem a simetria icosaédrica, com o genoma associado à face interna do capsídeo. Estão representadas a proteína de envelope (E) em sua forma dimérica, a proteína de membrana (M), presente na forma extracelular, e seu precursor (prM), presente no envelope na forma intracelular. Adaptado de (CHAMBERS et al., 1990).

A proteína E desempenha um papel chave na infecção viral e é o principal componente do envelope, sendo responsável pela ligação a receptores glicoproteicos na superfície celular e pelo processo de fusão dependente de pH ácido. Esta proteína possui múltiplos determinantes antigênicos, sendo o principal alvo da resposta imune. A elucidação da estrutura tridimensional da proteína E do vírus da encefalite transmitida por carrapato revelou que esta proteína, de cerca de 110 kDa, encontra-se na forma de homodímeros glicosilados, contendo três domínios ancorados pela parte hidrofóbica na superfície do envelope (FA et al., 1995). Além deste, diferentes estudos foram feitos e algumas estruturas da proteína E de diferentes flavivírus foram também elucidadas, como por exemplo, para o vírus da dengue, encefalite japonesa e o vírus do oeste do Nilo (KANAI et al., 2006; LI et al., 2008; LUCA et al., 2012; MODIS et al., 2003; NYBAKKEN et al., 2006). Estes modelos foram aplicados aos flavivírus, contribuindo principalmente para a determinação de marcadores antigênicos e para o estudo das mutações ligadas ao aumento ou à diminuição da virulência (KOLASKAR; KULKARNI-KALE, 1999; LEE; WEIR; DALGARNO, 1997; ROBY et al., 2015; RYMAN et al., 1997; VAN DER MOST; COVER; STRAUSS, 1999).

2.2.5 Ciclos de Replicação

O ciclo de replicação viral ocorre no citoplasma das células infectadas. Os flavivírus entram nas células por endocitose mediada por receptor, provavelmente pela ligação da proteína E a receptores da membrana plasmática presentes na célula hospedeira (GOLLINS; PORTERFIELD, 1985; ROBY; FUNK; KHROMYKH, 2012). A ligação da proteína E a receptores celulares induz a formação de vesículas endocíticas recobertas por clatrina, o baixo pH do endossoma induz a fusão do envelope viral com membranas celulares. Após a internalização, os vírus são liberados no citoplasma por mudanças conformacionais induzidas por pH ácido, que levam à exposição de um peptídeo de fusão (ALLISON et al., 2001; HEINZ; ALLISON, 2001; ROBY; FUNK; KHROMYKH, 2012). Estas alterações causam a trimerização da proteína E (ROBY et al., 2015; STIASNY et al., 1996). Em seguida, o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma por meio de fusão do envelope com a membrana de vesículas endocíticas (GOLLINS; PORTERFIELD, 1986a, 1986b; ROBY; FUNK; KHROMYKH, 2012). No citoplasma da célula hospedeira, o genoma de RNA do vírus serve como mensageiro (RNAm) para a tradução das proteínas estruturais e não estruturais. Além disso, o RNA serve como molde para a síntese de uma fita complementar negativa que, por sua vez, servirá de

molde para a síntese de mais fitas positivas, a serem utilizadas na montagem de novas partículas virais (CLEAVES; RYAN; WALTER SCHLESINGER, 1981).

A montagem das partículas virais ocorre em associação com o retículo endoplasmático (RE) das células hospedeiras. Durante a montagem do vírus, o domínio citoplasmático altamente básico da proteína C interage com o RNA genômico viral para formar o nucleocapsídeo. As proteínas prM e E são deslocadas para o RE, posicionando seus domínios carboxi terminal hidrofóbicos na bicamada lipídica. A formação das partículas virais ocorre por meio do envolvimento do nucleocapsídeo viral com as proteínas do envelope ancoradas na membrana do RE celular. A clivagem da proteína prM ocorre, provavelmente, durante a liberação do vírus, já que não se detecta proteína M nas partículas intracelulares e ela está relacionada com o desencadeamento de mudanças no envelope, que promovem a infecciosidade (WENGLER & WENGLER, 1989). As partículas brotam para a luz do RE adquirindo uma membrana lipídica (envelope). A progênie viral é transportada em vesículas através do complexo de Golgi e para a membrana plasmática e, daí liberadas por exocitose (CHAMBERS, 1990) (Figura 5).

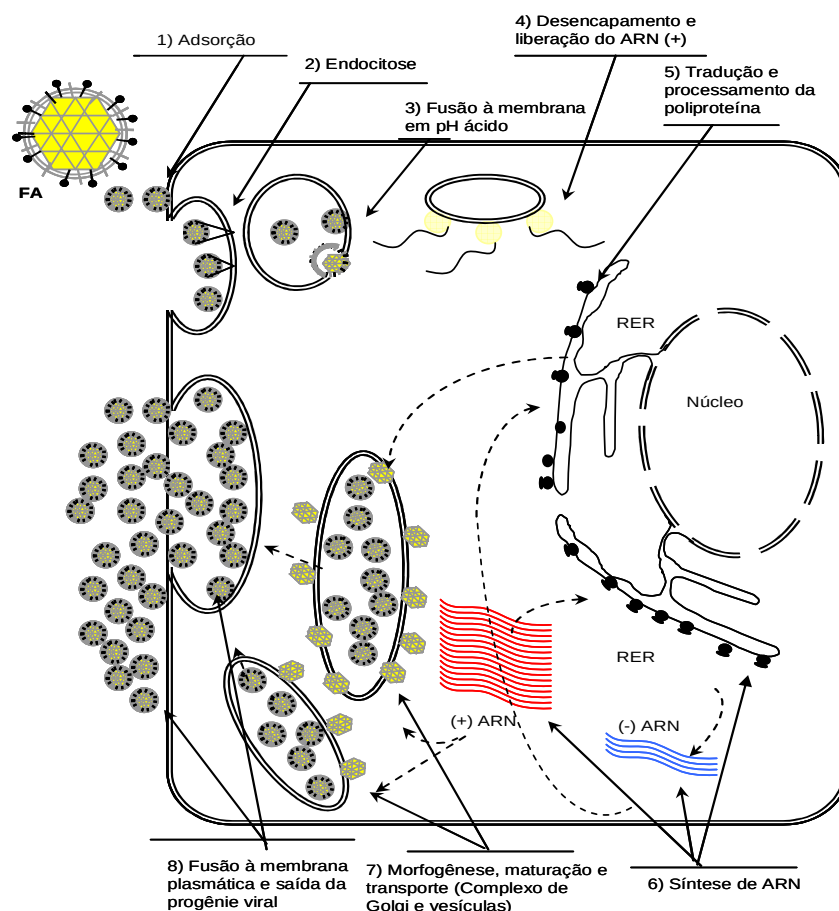


Figura 5: Ciclo de replicação dos flavivírus. Os números de 1 a 8 indicam por meio de setas na figura as etapas desde a adsorção até a liberação de partículas virais. FA: vírus da febre amarela; RER: retículo endoplasmático rugoso; as estruturas pequenas e pretas ao longo do RER perinuclear são ribossomas. Adaptado de (RICE, 1996).

2.2.6 O Genoma

O genoma dos flavivírus é constituído por uma molécula de RNA, fita simples e polaridade positiva, com cerca de 11 Kb (RICE, 1996). A estrutura genômica é composta por uma região curta 5' não codificante, uma única faixa de leitura aberta, de 10 233 nucleotídeos, e uma região 3' não codificante, sendo estas regiões não codificantes importantes para a circularização do genoma durante a replicação viral. Da mesma forma como observado em RNA mensageiros de eucariotos, o RNA viral possui um resíduo “cap”, de 7-metil-guanosina, associado a sua extremidade 5', no entanto, a extremidade 3' não é poliadenilada. O genoma é traduzido em uma única poliproteína, processada co- e pós- traducionalmente, originando, no sentido do amino- para o carboxi- terminal as três proteínas estruturais: do capsídeo (C), de membrana (prM/M) e do envelope (E), e as

7 proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (CHAMBERS, 1990) (Figura 6).

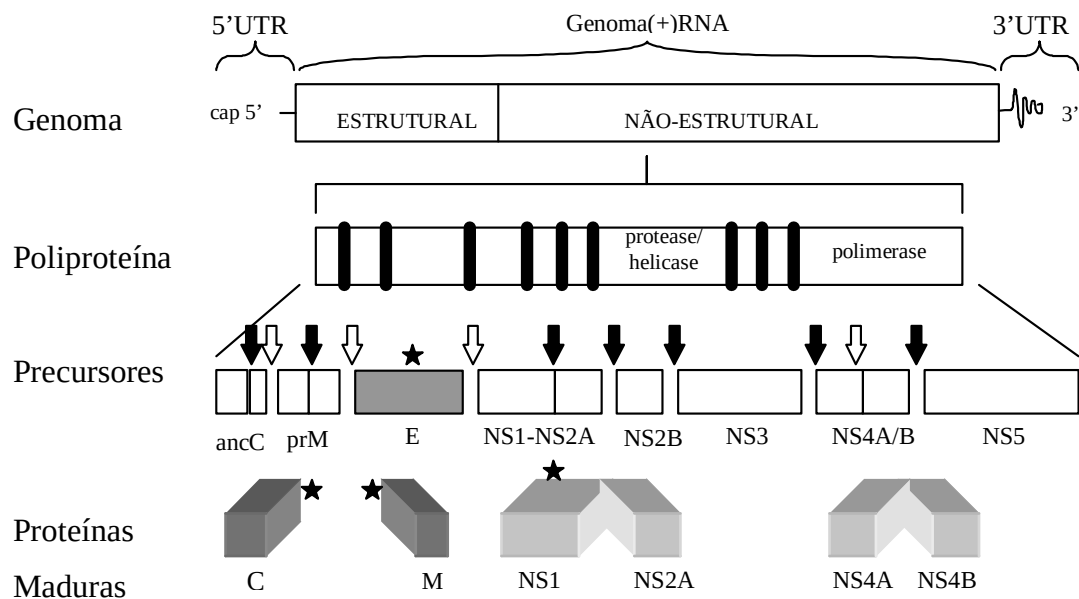


Figura 6: **Organização genômica dos flavivírus.** Desenho esquemático mostrando a organização genômica dos flavivírus. No topo, está o genoma típico dos flavivírus, com as extremidades 5' e 3' não traduzidas (UTR) e as regiões traduzidas em proteínas estruturais e não estruturais. Em seguida, vemos a poliproteína, os precursores e as proteínas maduras geradas pelo processamento proteolítico. As estrelas (★) representam a glicosilação ligada à asparagina das proteínas, mas não indicam o número ou a posição dos sítios de N-glicosilação. As setas pretas representam os sítios de clivagem pela protease viral. As setas brancas representam os sítios de clivagem pela sinalase celular. As figuras escuras representam as proteínas maduras, após o último passo do processamento (CHAMBERS et al., 1990; RICE, 1996).

2.2.7 Epidemiologia da Febre Amarela

Atualmente, a febre amarela ocorre na América do Sul e na África subsaariana, onde a transmissão envolve diversos gêneros de mosquitos e primatas não humanos (PNH). Uma boa compreensão da distribuição geográfica da febre amarela é considerada crítica para o uso da vacina, tanto no aspecto de política de saúde pública, quanto na proteção de pessoas que possuam um risco potencial durante viagens a áreas com risco de infecção. O primeiro mapa descrevendo as regiões endêmicas foi feito em 1946 por uma comissão internacional, “*International Quarantine Commission*”, e publicada pela “*United Nations Relief and Rehabilitation Administration*” (UNRRA). Este mapa se modifica de tempos em tempos baseado em novos dados, mas não reflete de forma fidedigna a atividade da doença, pois em algumas áreas, por exemplo Somália e

Tanzânia, a incidência da doença é baseada em dados sorológicos e não em casos humanos notificados (STAPLES, 2018).

Informações sobre a febre amarela são frequentemente publicadas pela OMS (*WHO's Weekly Epidemiological Record*) e pela Divisão de Quarentena do Centro de Controle de Doenças e sua Prevenção “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC).

Na América, existem áreas de alto risco de introdução da doença e disseminação pelo *A. aegypti*, incluindo regiões costeiras e no interior de cidades infestadas pelo vetor, como, por exemplo: Argentina, Brasil, Peru, Bolívia, Equador, Venezuela, Colômbia, as Guianas, Panamá, América Central, México, Trinidad - Tobago e Estados Unidos. Estas são áreas historicamente afetadas pela febre amarela no passado, entre as quais Trinidad – Tobago, América Central e México possuem a capacidade de manter a transmissão do ciclo silvestre (MONATH, 2004; STAPLES, 2018) (Figuras 7a e 7b).

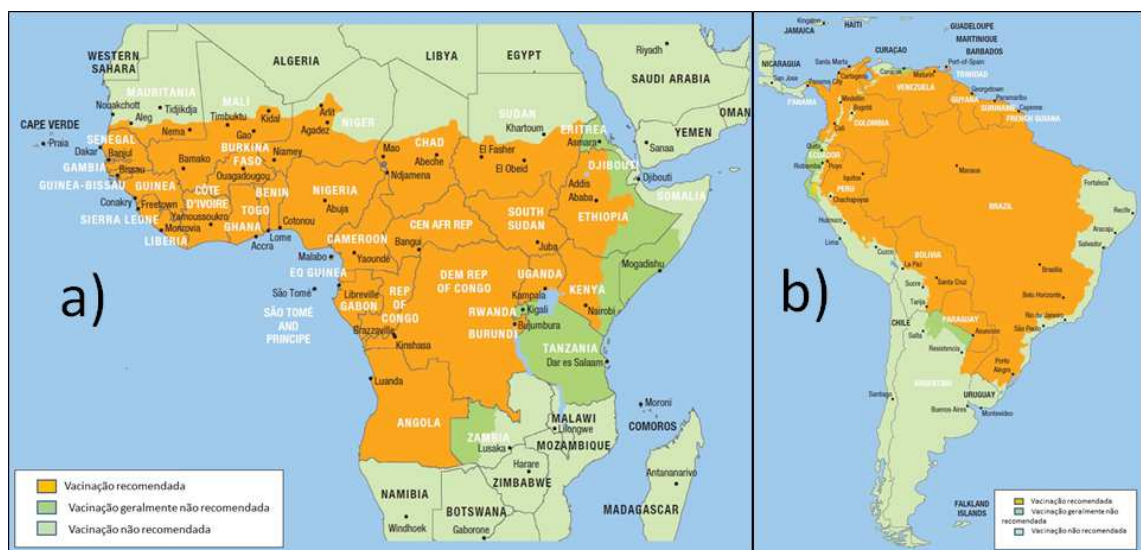


Figura 7: Distribuição mundial da febre amarela. Em (a), a distribuição da doença na África e, em (b), a existência de zonas endêmicas na América Latina. Fonte (STAPLES, 2018).

Outras regiões infestadas por *A. aegypti* são parte da Europa, Oriente Médio, Ásia, Austrália e Oceania, que são consideradas áreas de risco para a introdução da febre amarela. As possíveis razões para esta ausência incluem os fatores demográfico e biológico (MONATH, 1999, 2004). O vírus da febre amarela nunca havia sido encontrado na Ásia, porém no ano de 2016 foram reportados 9 casos da doença “exportados” para a China (PAHO/WHO, 2016).

A manutenção do vírus ocorre através de dois ciclos: silvestre e urbano. No primeiro, a transmissão é feita por intermédio de mosquitos do gênero *Haemagogus* ou *Aedes* (*Sylvan Aedes spp.* ou *A. africanus*), pela infecção de macacos e através da transmissão transovariana do vírus no próprio mosquito (AITKEN et al., 1979).

Na febre amarela silvestre, os gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* são os mais importantes na América Latina. No Brasil, a espécie *Haemagogus janthinomys* é a que se destaca na manutenção do vírus na natureza. O homem susceptível pode ser infectado ao penetrar em áreas de florestas, tornando-se fonte de infecção para mosquitos (*Aedes aegypti*) ao retornar à área urbana. Dessa forma, com a infecção do mosquito, tem-se a manutenção do ciclo urbano (MONATH, 2004; ROMANOS, 2002).

O mosquito da espécie *Aedes aegypti* é o principal transmissor da febre amarela urbana. No final da década de 50, alguns países sul-americanos, incluindo o Brasil, foram considerados livres do vetor urbano; porém, no ano de 1967, ocorreu a reinfestação no estado do Pará. Esta foi controlada apenas em 1972 (FRAHIA NETO, 1967). Em 1977 e no ano seguinte, houve a reinfestação dos estados da Bahia e do Rio de Janeiro. O mesmo fato ocorreu em países da América do Norte e Central (Figura 8).

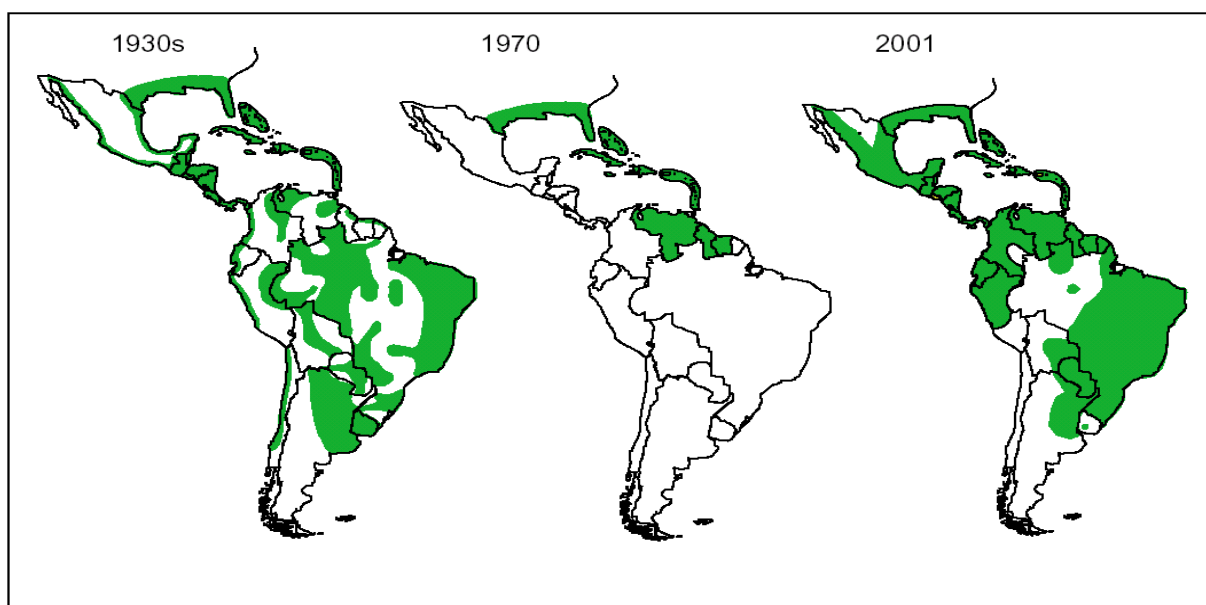


Figura 8: **Distribuição do vetor *Aedes aegypti* nas Américas: 1930, 1970 e 2001.** A figura demonstra a reinfestação pelo vetor da doença, nas regiões marcadas em verde, nos mapas. Fonte: (GUBLER, 2002).

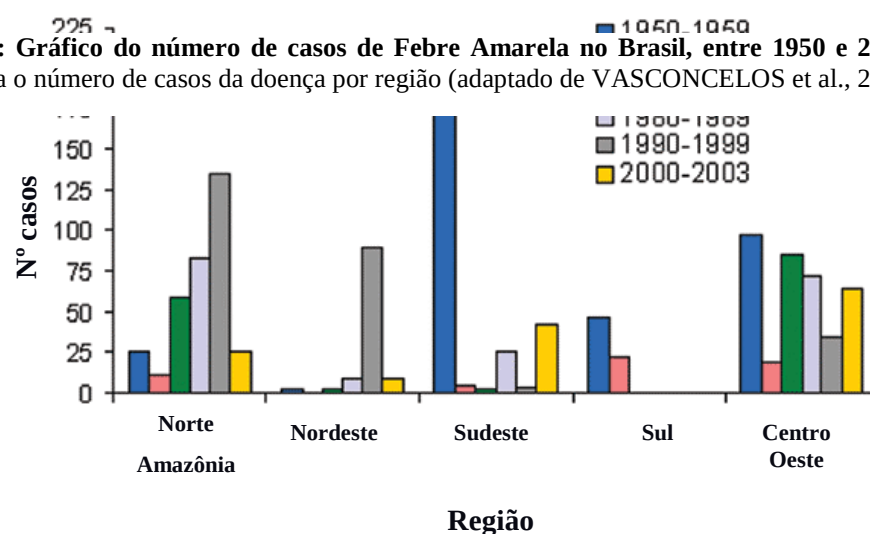
O modo pelo qual ocorre a permanência do vírus da febre amarela durante a estação onde há uma baixa incidência pluviométrica, quando o vetor silvestre se encontra aparentemente ausente, permanece parcialmente descrito. Tanto os ovos do mosquito *Aedes*, quanto os do *Haemagogus*, podem sobreviver durante os períodos de estiagem até

o retorno da estação chuvosa (AITKEN et al., 1979; DIALLO; THONNON; FONTENILLE, 2000; DUTARY; LEDUC, 1981; FONTENILLE et al., 1997; HASE; SUMMERS; ECKELS, 1989). Baixos níveis de transmissão horizontal por meio de vetores resistentes a climas secos, como também ciclos de transmissão horizontal e vertical envolvendo carrapatos, têm sido sugeridos como mecanismo auxiliar (GERMAIN et al., 1979). Têm sido descritas infecções persistentes em experimentos com primatas não humanos, porém, estas infecções provavelmente não são acompanhadas por viremias a níveis suficientes para infectar vetores (MONATH, 2004; PENNA; BITTENCOURT, 1943; STAPLES, 2018).

A perspectiva mais alarmante, para o futuro, envolve o reaparecimento da febre amarela urbana na América do Sul e a disseminação da doença na população, principalmente nas áreas do mundo livres da doença, porém infestadas por *Aedes aegypti*. Estas regiões incluem as áreas historicamente afetadas (as regiões costeiras da América do Sul, Caribe e América do Norte) e regiões que são consideradas receptivas, incluindo o Oriente Médio, a costa leste da África, Índia, Ásia e Austrália (MONATH, 2004; PAHO/WHO, 2016; STAPLES, 2018).

A incidência da febre amarela no Brasil até o ano de 2003 se manteve com registro de casos em praticamente todas as regiões brasileiras, com exceção do Sul do país, que desde a década de 70 não havia registrado casos da doença. As regiões Norte e Centro-Oeste são mais afetadas. No gráfico a seguir (Figura 9) mostra o número de casos ocorridos nas regiões do país desde 1950, destacando-se o elevado número de casos observados na região Sudeste do Brasil, entre os anos 1950 – 1959 (VASCONCELOS et al., 2004).

Figura 9: Gráfico do número de casos de Febre Amarela no Brasil, entre 1950 e 2003. Este gráfico demonstra o número de casos da doença por região (adaptado de VASCONCELOS et al., 2004).



Porém, nos últimos vinte anos, foram registradas transmissões do vírus da febre amarela fora dos limites da área considerada endêmica (região amazônica). Diversos casos humanos e/ou epizootias de PNH foram descritos em Minas Gerais, Bahia, São Paulo, Paraná e no Rio Grande do Sul e representam a maioria dos casos registrados de febre amarela neste período, o que caracterizou uma expansão da área de circulação do vírus amarílico, afetando áreas consideradas livres até então, onde não havia registro da doença há décadas (BRASIL, 2018).

O aumento nos números de casos de febre amarela produziu um importante impacto na saúde pública, representado pelos mais extensos surtos em humanos e/ou epizootias em PNH pela doença nas últimas décadas. Os mais recentes entre o ano de 1998 e 2003 na região Norte (Pará: 1998/1999), no Sudeste (Minas Gerais: 2002/2003) e Sul (Rio Grande do Sul: 2002/2003), e entre 2007 e 2009 no Norte/Centro-Oeste, na região Sudeste (São Paulo: 2008/2009 e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul: 2008/2009) (Figura 10). O período anual de monitoramento da febre amarela se inicia em julho e encerra em junho do ano seguinte (BRASIL, 2018).

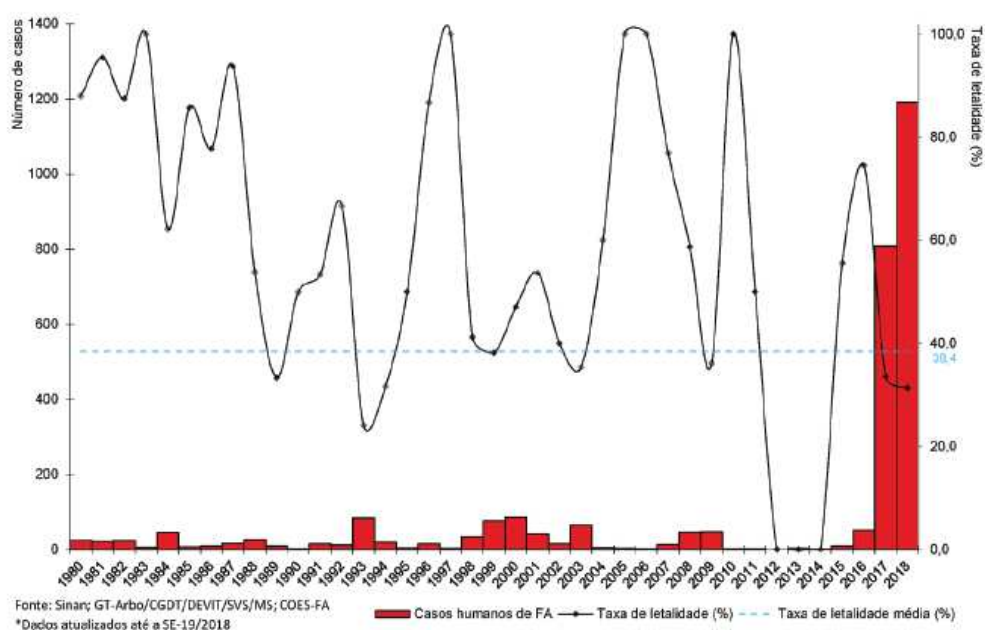


Figura 10: Série histórica do número de casos humanos confirmados para Febre Amarela e a letalidade, segundo o ano de início dos sintomas, Brasil, de 1980 a junho de 2018 (SAÚDE, 2018).

A detecção do vírus da febre amarela foi registrada novamente fora da área endêmica, e se manifestou por epizootias em PNH confirmadas por testes laboratoriais (Tocantins em julho de 2014). Novos registros de epizootias e casos humanos isolados na região Centro-Oeste (Goiás, Minas Gerais e São Paulo) demonstraram o aumento da área

de circulação do vírus se aproximando de grandes regiões metropolitanas densamente povoadas, com populações não vacinadas e infestadas por *Aedes aegypti* (SAÚDE, 2018).

Nos anos de 2016 e 2017, foi registrado um dos eventos mais expressivos da história da febre amarela no Brasil. A dispersão do vírus amarílico alcançou a costa leste brasileira, na região da Mata Atlântica, que abriga uma grande diversidade de PNH, de potenciais vetores silvestres e onde o vírus não era registrado há décadas. De acordo com o monitoramento dos números de casos de febre amarela no período de julho de 2016 a junho de 2017, foram confirmados 777 casos humanos e 261 óbitos, além de 1412 epizootias confirmadas em PNH (Figura 11).

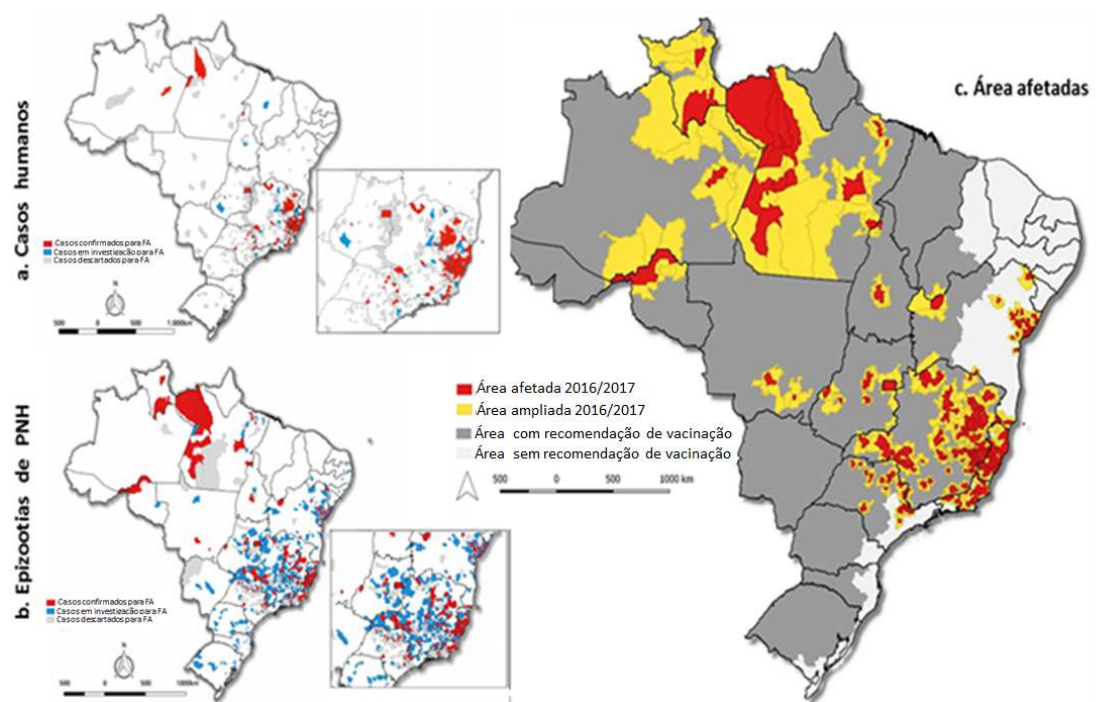


Figura 11: Municípios com registro de casos humanos no Brasil (a) casos humanos, (b) epizootias de primatas não humanos - PNH (c), de acordo com a classificação, e; áreas afetadas e de vacinação, Brasil, 2016/2017 (SAÚDE, 2018).

Recentemente, entre 2017/2018, foi registrado o mais expressivo surto da doença no Brasil, que afetou principalmente os estados da região Sudeste, quando foram registrados 1.376 casos humanos e 483 óbitos, além de 864 epizootias por FA no Brasil. No período de monitoramento seguinte as informações repassadas pelas secretarias estaduais de saúde sobre a situação da doença no Brasil, no período de 1º de julho de 2017 a 03 de abril de 2018), foram confirmados 1.127 casos de febre amarela no país, sendo que 328 vieram a óbito, ao todo, foram notificados 4.548 casos suspeitos (SAÚDE, 2018).

Na América do Sul o cenário epidemiológico da febre amarela foi descrito em dezembro de 2015, foram registradas epizootias em PNH confirmadas para febre amarela na Bolívia (fronteira com Acre, Rondônia, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), no município de Monteagudo (Departamento de Chuquisaca), sem a detecção de casos humanos. Por outro lado, no Peru (fronteira com Acre e Amazonas), até junho de 2016, foram confirmados 37 casos humanos de febre amarela e outros 42 casos foram classificados como “prováveis”. Os casos confirmados e “prováveis” concentram-se no Departamento de Junin (58 casos), com registros também em Ayacucho (6 casos), San Martin (5 casos), Cusco (3 casos), Huanuco (3 casos), Amazonas (2 casos) e Ucayali (2 casos). Em maio de 2016, foi registrado um caso fatal de febre amarela silvestre na Colômbia (PAHO/WHO, 2016).

Em Angola, uma epidemia de febre amarela urbana (transmitida por *Aedes aegypti*) acomete o país desde dezembro de 2015. Até 24 de junho de 2016, 3464 casos suspeitos foram notificados, e destes 868 foram confirmados em testes laboratoriais, com 353 óbitos. Os casos ocorreram em 16 das 18 províncias do país e casos importados de Angola foram registrados em outros 3 países da África e Ásia. Na República Democrática do Congo foram 59 casos, no Quênia foram descritos 2 casos e na República Popular da China foram reportados 9 casos (WHO, 2016).

Além do registro de casos importados de Angola na República Democrática do Congo, outros 9 casos autóctones foram registrados, com expectativa de dispersão da transmissão para outras províncias do país. Em Uganda, 7 casos foram confirmados, sem relação com a epidemia em Angola. Outros países como: Gana, Chade e Guiné também reportam casos suspeitos (WHO, 2016).

2.2.8 Cultivo de Células Animais na Produção de Vacinas Virais

O desenvolvimento de técnicas de cultivo celular após a década de 50 foi um marco na produção de vacinas. A disponibilidade de culturas de células estacionárias foi fundamental no desenvolvimento de diferentes vacinas para a prevenção de doenças virais, como por exemplo, o sarampo, rubéola, caxumba, adenovírus, poliomielite e hepatite A.

A utilização de culturas de células como substrato para a replicação do vírus é de extrema relevância no desenvolvimento de novas vacinas virais e também no

aperfeiçoamento de vacinas existentes, com o foco em produtos com maior grau de pureza e menores riscos aos vacinados (ULMER; VALLEY; RAPPUOLI, 2006).

A produção mundial de vacinas vem sofrendo um processo de reformulação de suas plataformas e tecnologias empregadas, observando-se uma tendência no uso de sistemas baseados em cultivo de células animais empregando meios isentos de componentes de origem animal, em especial de soro fetal bovino (JOSEFSBERG; BUCKLAND, 2012). O uso de linhagens estabelecidas de células animais na produção de vacinas apresenta, entre outras vantagens, uma melhor reprodutibilidade do processo produtivo, maior consistência, assim como a possibilidade de cultivo sob condições monitoradas e controladas em biorreatores, que podem propiciar melhores condições para a replicação viral, e conseqüentemente, resultar em maior produtividade. Além disto, permitiria aumento da produção em situações de epidemias com maior rapidez, tornando desnecessária a manutenção de grandes estoques estratégicos de algumas vacinas, como ocorre hoje em dia.

O cultivo de células animais tem sido utilizado na fabricação de uma ampla variedade de produtos destinados para a saúde humana, em especial para a produção de proteínas terapêuticas e vacinas (BARRETT et al., 2009; WALSH, 2014).

Algumas linhagens são preconizadas pela OMS para a fabricação de vacinas virais de uso humano. Entre as linhagens apropriadas para este fim estão inclusas as de células diploides (MRC-5, FRhL-2 e WI-38) e linhagens celulares contínuas, como por exemplo Vero e MDCK (WHO, 2010).

Entre as linhagens celulares contínuas utilizadas para a produção de vacinas virais de uso humano, a linhagem celular Vero é uma das mais estudadas (FRAZZATI-GALLINA et al., 2001; GASPAR et al., 2008; MATTOS et al., 2015; PEREIRA et al., 2015; SOUZA et al., 2009) e qualificada pela OMS para a produção de imunobiológicos de uso humano (MENDONÇA; PEREIRA, 1995; WHO, 2010).

A célula Vero é uma linhagem aderente, oriunda de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) e passível de ser infectada por uma ampla variedade de vírus (DOYLE; GRIFFITHS, 1998). Por este motivo tem sido estudada para a produção de diversas vacinas virais de uso humano por diferentes grupos, entre os quais se pode citar: influenza (YUEN; CHAN; TAMBYAH, 2012), raiva (YU et al., 2012), poliomielite (SIMIZU et al., 2006), sarampo (LANGFIELD et al., 2011), encefalite japonesa (SRIVASTAVA et al., 2001), dengue (MANTEL et al., 2011), enterovírus (WU; LIU; LIAN, 2004), hepatite A (SUN et al., 2004), hantavírus (CHOI et al., 2003) e febre

amarela (GASPAR et al., 2008; MATTOS et al., 2015; PEREIRA et al., 2015; SOUZA et al., 2009). Em escala comercial, células Vero cultivadas em microcarregadores vêm sendo empregadas na produção das vacinas inativadas contra a poliomielite (BUTLER et al., 2000) e encefalite japonesa (SCHULLER et al., 2011).

Com a reconhecida habilidade em produzir complexas modificações pós tradução, as células de mamíferos em cultura estão sendo usadas para a produção de proteínas para diagnóstico e uso terapêutico. As modificações pós tradução incluem diferentes reações de formação ou quebra de ligações covalentes e, conseqüentemente, a cadeia poli peptídica formada é convertida em uma proteína funcional (HAN; MARTINAGE, 1992a, 1992b; WALSH, 2010; WALSH; JEFFERIS, 2006).

A utilização de linhagens estabelecidas de células animais na produção de produtos biológicos permite a expressão de moléculas complexas e, aliado aos sistemas de cultivo empregados industrialmente, propiciam uma melhor produtividade e consistência. A presença de soro fetal bovino (SFB) no meio de cultura possui diferentes funções, como auxiliar na adesão das células à superfície e também fornecer fatores de crescimento e hormônios que promovam a proliferação celular (HIMES; HU, 1987). O soro fetal bovino possui elevado custo, dificulta a purificação do produto e apresenta uma grande variabilidade de um lote para o outro, já que não possui composição quimicamente definida, além de ser fonte de possíveis contaminações por vírus, micoplasmas ou príons (GENZEL; FISCHER; REICHL, 2006).

2.2.9 Produção de Vacinas em Meios de Cultura Isentos de SFB

Existe uma orientação regulatória mundial em evitar o uso de componentes de origem animal nos processos de produção (BUTLER et al., 2000; LUBINIECKI, 1998), com o objetivo de garantir a qualidade e segurança do produto vacinal final (DELLEPIANE; GRIFFITHS; MILSTIEN, 2000). As agências regulatórias encorajam os fabricantes de biológicos a reduzirem ou eliminarem o uso de substâncias de origem animal em seus processos de fabricação há mais de uma década (KALLEL et al., 2002).

Apesar da disponibilidade de uma variedade de meios de cultura livres de componentes de origem animal no mercado, existe a necessidade de adaptação de linhagens celulares a esses meios de cultivo, inclusive a linhagem Vero, que apesar de na literatura ser descrita a sua utilização para produção de vírus em meio livre de soro fetal bovino, tais como reovírus (BUTLER et al., 2000), influenza (GENZEL; FISCHER;

REICHL, 2006; KISTNER et al., 2007) e raiva (FRAZZATI-GALLINA et al., 2001), requer uma adaptação ao meio de cultivo.

O desenvolvimento de meios de cultivo livres de soro fetal bovino e de outros componentes de origem animal possibilita esta eliminação, além de facilitar o processo de recuperação e purificação do produto para a obtenção do grau de pureza exigido (SOUZA, 2007).

Historicamente, diferentes meios de cultivo isentos de soro foram desenvolvidos para a produção de anticorpos monoclonais (CHEN; KE; CHEN, 1993; GLASSY; THARAKAN; CHAU, 1988; KIM; KIM; LEE, 1998), proteínas recombinantes (CASTRO et al., 1992; LEE et al., 1999; LIU; CHU; HWANG, 2001; ZANG et al., 1995) e vírus (BUTLER et al., 2000; FRAZZATI-GALLINA et al., 2001; MERTEN et al., 1997; SAKODA et al., 1998). Alguns desses meios de cultivo são formulados sem qualquer componente derivado de origem humana ou animal e são capazes de sustentar o crescimento de várias linhagens de interesse, seja para a produção de vírus ou outros produtos biológicos (FRAZZATI-GALLINA et al., 2004).

Diferentes meios de cultura têm sido empregados para a produção de vacinas virais utilizando a linhagem celular Vero, como o meio de cultivo M-VSFM (BUTLER et al., 2000) empregado para a produção de reovírus, os meios MDSS2 e MDSS2N (Axcell Biotechnologies) e VP-SFM (Gibco), que foram usados na produção de vacinas contra a raiva (FRAZZATI-GALLINA et al., 2004; FRAZZATI-GALLINA et al., 2001; MERTEN et al., 1994, 1999).

Em 1994, Merten e colaboradores avaliaram o crescimento de diferentes linhagens celulares, entre elas a linhagem Vero, utilizando o meio de cultura MDSS2 (Axcell Biotechnologies), em frascos estáticos e em frascos agitados com microcarregadores. Não foi observada diferença significativa no crescimento celular nos dois sistemas de cultivo usados com a linhagem celular Vero, quando foram empregados o meio de cultivo livre de soro MDSS2 e o meio contendo soro (DMEM suplementado com 2% de soro de bezerro neonato). Os autores também avaliaram o meio livre de soro para a produção do vírus contra raiva utilizando células Vero. Os valores máximos de títulos virais foram mais elevados em cultivo em meio isento de soro (4×10^7 PFU mL⁻¹) do que em cultivo em meio suplementado com soro ($2,7 \times 10^7$ PFU mL⁻¹). Utilizando os valores encontrados de densidade celular, o uso de meio isento de soro aumentou a produtividade específica do vírus em aproximadamente 1,75 vezes, quando comparada com o cultivo em meio contendo soro: 0,178 e 0,101 PFU célula⁻¹ hora⁻¹.

Após três anos, Merten e colaboradores (1997) utilizaram novamente o meio de cultura isento de soro MDSS2 para a cultura da linhagem Vero para a produção do vírus da poliomielite (Sabin do tipo 1) em cultura estática e em modo perfusão em microcarregadores. Uma pequena diferença foi encontrada nas taxas específicas de crescimento celular, a taxa para a cultura estática em meio de cultura contendo soro (DMEM suplementado com 2% de soro de bezerro neonato) foi de $0,0120 \text{ h}^{-1}$, enquanto a da cultura com meio isento de soro foi de $0,0106 \text{ h}^{-1}$. O título viral encontrado na condição livre de soro foi de $10^{6,75} \text{ TCID}_{50} 50 \mu\text{L}^{-1}$, enquanto na condição contendo soro foi de $10^{6,67} \text{ TCID}_{50} 50 \mu\text{L}^{-1}$, resultando em uma produtividade específica de 0,89 e 1,07 $\text{TCID}_{50} \text{ célula}^{-1}$, respectivamente.

Merten e colaboradores (1999) realizaram modificações no meio isento de soro MDSS2, substituindo os componentes derivados de proteínas animais por substâncias extraídas de plantas. O principal objetivo foi a obtenção de um meio de cultura mais seguro e eficiente para a produção de vacinas. Este novo meio de cultivo MDSS2N foi utilizado de forma eficiente em diferentes linhagens celulares, inclusive a linhagem Vero. As alterações realizadas para o desenvolvimento do meio MDSS2N não afetaram a capacidade de crescimento da linhagem Vero em frascos estáticos e em cultivos agitados utilizando microcarregadores. A produção viral não foi avaliada nas condições agitadas para as células Vero, porém os resultados obtidos em cultivo estático mostraram que os títulos do vírus da poliomielite, resultantes do cultivo no meio modificado MDSS2N, foram semelhantes aos obtidos no meio MDSS2.

No ano de 2001, Frazzati-Gallina e colaboradores utilizaram o meio de cultura VP-SFM ou o meio Leibovitz 15 (L15) para a produção do vírus da raiva em células Vero cultivadas em biorreatores e empregando microcarregadores. Foram testadas as condições de crescimento celular e a replicação viral contendo soro de bezerro neonato e em condições isentas de soro. A melhor condição testada, objetivando o maior título viral, foi sempre obtida nas culturas iniciadas em VP-SFM suplementadas com 1% de soro de bezerro neonato (SBN) e em VP-SFM apenas após a inoculação das células com o vírus da raiva, e o título viral obtido foi de $10^{4,7} \text{ FFD}_{50} 0,05\text{mL}^{-1}$.

Em 2007, Rourou e colaboradores utilizaram os meios de cultura VP-SFM e MEM suplementado com 10% de SBN para a produção do vírus rábico na linhagem Vero em microcarregadores. A cinética de crescimento celular e a produção do vírus da raiva foram investigadas em frascos agitados do tipo *spinner* e em biorreatores. Nos frascos *spinner* a densidade celular máxima ($X_{\text{máx}}$) foi de $1,85 \times 10^6 \text{ células mL}^{-1}$ e o título viral

máximo foi de 2×10^7 FFU mL⁻¹. Por outro lado, em biorreatores do tipo tanque agitado, a $X_{\text{máx}}$ foi $2,6 \times 10^6$ células mL⁻¹ e o título viral máximo foi $2,4 \times 10^7$ FFU mL⁻¹.

Em 2010, Genzel e colaboradores testaram as linhagens celulares MDCK e Vero para a produção de diferentes cepas do vírus da influenza. As células foram propagadas em sistemas de garrafas do tipo T, garrafas do tipo *Roller* e em biorreatores do tipo tanque agitado e do tipo de ondas (*Wave*). Os perfis de replicação das diferentes cepas de influenza produzidas com dois meios de cultura, o suplementado com soro (GMEM) e em condições livres de soro (Episerf), foram analisadas e apresentaram títulos virais semelhantes.

2.2.10 Cultivo de Células Animais em Biorreatores

Entre os diferentes sistemas de cultivo celular disponíveis, podem ser citados os frascos tipo T, frascos tipo *spinner*, garrafas *rotatórias* e biorreatores tipo tanque agitado, os quais são empregados conforme suas características de manuseio, condições fisiológicas celulares e obtenção do produto de interesse com a qualidade requerida para diferentes propósitos.

A adaptação de células Vero ao crescimento em suspensão já foi descrita (DAELLI et al., 2006), porém não existe na literatura outros grupos que tenham reportado a adaptação bem-sucedida e não existe no mercado nenhum produto proveniente dessa tecnologia.

O cultivo de células Vero aderente necessita o emprego de uma superfície suporte onde as células irão se fixar e proliferar. A superfície pode ser um fator limitante do método a ser empregado no cultivo celular em larga escala, pois a quantidade de células obtida está diretamente relacionada à superfície disponível para o seu crescimento, o que tornaria imprescindível a utilização de um grande número garrafas do tipo *Roller* ou frascos T para obter grande quantidade de células. Uma forma de solucionar esse fator limitante foi através do desenvolvimento dos microcarregadores (VAN WEZEL, 1967), permitindo a realização de cultivos de células aderentes em altas concentrações, empregando sistemas agitados. Neste caso, as células crescem aderidas aos microcarregadores, os quais, devido à sua densidade relativamente baixa, podem ser mantidos em suspensão mesmo a baixas velocidades de agitação. Com isto, é possível não apenas o crescimento das células em sistemas agitados, por exemplo em biorreatores

de grande volume (GENZEL; FISCHER; REICHL, 2006; MONTAGNON, 1989), mas também obter cultivos com concentrações celulares bem superiores às obtidas em frascos estáticos (MATTOS et al., 2015; PEREIRA et al., 2015).

A produção de diversas vacinas virais, anticorpos monoclonais e proteínas recombinantes em biorreatores já foi estabelecida, sendo que a utilização deste sistema para a obtenção de produtos biológicos está amplamente descrita na literatura (LUBINIECKI, 1990; TOKASHIKI; YOKOYAMA, 1997; WALSH, 2014; WANG et al., 2005). O desafio da utilização dos biorreatores é garantir um ambiente físico-químico homogêneo para toda a população celular, de forma que os biorreatores dispõem de sistema de monitoramento e controle, que através de sensores específicos permitem o controle do pH do meio de cultivo, temperatura, velocidade de agitação, concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo, entre outras variáveis. Embora os biorreatores de tanque agitado sejam utilizados para culturas de células em suspensão sem microcarregadores, neste tipo de biorreator também podem ser cultivadas linhagens de células dependentes de ancoragem, utilizando-se suportes sólidos, tais como os microcarregadores.

Os biorreatores do tipo tanque agitado são bastante utilizados atualmente e uma grande variedade de produtos é produzida com base nesta tecnologia devido à menor complexidade de escalonamento e controle do bioprocessamento (BIRCH; RACHER, 2006; CHU; ROBINSON, 2001; WALSH, 2014). São constituídos basicamente de um vaso, válvulas e um motor ligado a um eixo de agitação para promover a mistura do meio de cultivo e das células, cuja velocidade de agitação deve ser suficiente para garantir a uniformidade do sistema. Nos biorreatores de tanque agitado, a forma de aeração mais comum é através do borbulhamento de gases no meio de cultivo, normalmente a uma taxa de 0,005 – 0,2 vvm (volume de gases por volume de meio por min) (OH et al., 1992).

Os cultivos de células podem ser conduzidos, basicamente, de quatro modos distintos: batelada, batelada alimentada, contínuo simples e em perfusão (contínuo com retenção celular). Estes sistemas de cultivo de células se diferem basicamente no modo de alimentação dos nutrientes e remoção dos metabólitos. A escolha dependerá das características do produto, por exemplo, um produto lábil não deve ser produzido em batelada. Além disto, irá depender também da linhagem celular utilizada (perfil de crescimento celular, padrão de secreção, estabilidade da proteína de interesse, capacidade de resistência às concentrações de metabólitos tóxicos, resistência a tensões de cisalhamento), capacidade de produção para atender à demanda, experiência da equipe

no desenvolvimento e operação do processo, demanda esperada, da eficiência e do rendimento do processo de purificação e a aplicação dos conhecimentos sobre os aspectos regulatórios (CHICO; RODRÍGUEZ; FIGUEIREDO, 2008).

2.2.11 Produção de Vacinais Virais em Biorreatores Agitados

O desenvolvimento de processos de produção de vacinas virais usando biorreatores é uma tendência mundial. Diferentes grupos têm estudado, em diversas escalas, a utilização de processos de produção de vacinas virais em biorreatores agitados operados em diferentes modos, empregando diversas linhagens celulares. As células que geralmente são utilizadas na produção de vacinas virais são aderentes, isto é, dependente de ancoragem e necessitam de um suporte para a sua adesão.

Normalmente são descritas duas etapas nos processos de produção de vacinas virais com base na tecnologia de cultivo celular. A primeira etapa é a fase da proliferação celular, onde o crescimento é exponencial e são geradas as células que irão ser infectadas e produzirão as partículas virais. Por outro lado, a segunda etapa é a de replicação viral, com manutenção celular e a multiplicação do vírus. A produção de partículas virais em cultivo celular é dependente da concentração de células na cultura no momento da infecção. Ao atingir uma alta densidade celular durante a primeira etapa do processo, maior será a quantidade de vírus produzida na fase de infecção/replicação (TRABELSI; ROUROU; LOUKIL, 2005). Outros fatores também determinam o sucesso de um processo de produção de antígenos virais. As variáveis importantes na otimização de um processo de produção de vírus são o momento de infecção viral, a concentração celular no momento da infecção e a multiplicidade de infecção (MOI), está definida como a relação entre a concentração de inóculo viral e de células no momento da infecção. O uso de uma estratégia empregando um baixo MOI é desejável nos processos produtivos de vacinas virais, uma vez que existe a necessidade de evitar o rápido término do lote semente viral, este tem um elevado custo de produção e validação para o produtor (MARANGA et al., 2004).

Foi estudado por Mendonça & Pereira (1995) o cultivo da linhagem Vero em alta densidade celular utilizando microcarregadores Cytodex 1, em biorreatores operados nos modos batelada, batelada alimentada e em perfusão. Neste trabalho, os autores compararam as concentrações celulares obtidas nos diferentes modos de operação, utilizando uma baixa concentração de microcarregador (2 g L^{-1}). A constante substituição

do meio de cultura usado, quando o biorreator foi operado em modo perfusão, proporcionou um aumento contínuo da concentração celular até 4×10^9 células totais no modo de operação batelada, a densidade celular máxima obtida foi de $2,1 \times 10^9$ células totais enquanto operada no modo batelada alimentada a concentração celular máxima obtida foi $2,8 \times 10^9$ células totais.

No ano de 1997, Merten e colaboradores estudaram o cultivo da linhagem celular Vero em microcarregadores, em biorreator operado em modo perfusão, para a produção do vírus da poliomielite (Sabin tipo 1). Os autores descreveram que a produção de altos títulos de poliovírus foi obtida usando um processo com meio de cultura isento de soro, em modo perfusão. Quando comparado com o processo de produção padrão deste vírus em modo batelada, a operação em perfusão proporcionou, além de títulos virais mais altos, produtividade específica mais elevada também. Com a possibilidade de aumento na concentração celular usando um processo de cultivo em modo perfusão, e mantendo alta a taxa específica de produtividade viral, permitindo um incremento na produtividade do processo.

Diversas vantagens foram reportadas para processos em modo perfusão, mas uma das limitações a este modo de operação é a obtenção de um equipamento de retenção celular adequado ao processo, pois a retenção das células no biorreator é a etapa crucial para a obtenção de altas densidades celulares, altas concentrações de produto e consequentemente altas produtividades. Portanto, para o desenvolvimento de um processo de produção de uma vacina em biorreator operado em perfusão, é imprescindível o emprego de uma técnica de retenção celular eficiente, confiável e que não prejudique a viabilidade das células (VOISARD et al., 2003).

No ano de 2009, Souza e colaboradores descreveram um processo de produção do vírus da febre amarela cultivado na linhagem Vero em biorreatores utilizando o microcarregador Cytodex 1 (3 g L^{-1}) em modo batelada. O meio de cultura usado neste estudo foi o VP-SFM e foram investigados diferentes MOI e TOI na produção da progênie viral. O título viral máximo encontrado $2,5 \times 10^8 \text{ PFU mL}^{-1}$ foi obtido utilizando um MOI de 0,02 em um TOI de 3 dias no meio do cultivo isento de soro.

Mattos e colaboradores descreveram no ano de 2015 um estudo para otimização do processo de incremento da concentração celular da linhagem Vero em Cytodex 1 (3 g L^{-1}) em biorreatores operados em modo batelada. Novamente foi utilizado o meio de cultivo isento de soro VP-SFM e um MOI de 0,02, o título viral máximo encontrado foi de $3,1 \times 10^8 \text{ PFU mL}^{-1}$.

2.3 ESTRATÉGIAS DE PURIFICAÇÃO DE VACINAS VIRAIS

Os processos de purificação são fundamentais na obtenção dos antígenos vacinais e o objetivo é a redução das impurezas residuais aos níveis preconizados pelas agências regulatórias, reduzindo os riscos à saúde humana. Estes processos devem ser economicamente viáveis, reprodutíveis, robustos e capazes de manter a atividade biológica da molécula de interesse, no presente caso, a partícula viral.

Os avanços na área de purificação foram menos significativos comparado aos processos de *upstream* para o aumento da produtividade. Por este motivo, o desenvolvimento de processos de purificação mais eficientes e de fácil ampliação de escala tem sido o alvo de grupos dedicados à otimização de processos, evitando que esta etapa se torne um limitador da capacidade produtiva em decorrência do incremento da carga de produto proveniente da etapa de cultivo (VICENTE et al., 2011).

Para a escolha adequada das técnicas ou combinações de técnicas para obtenção do produto purificado, a abordagem tradicional de purificação contendo quatro etapas (clarificação, captura, purificação intermediária e polimento) tem sido utilizada para a simplificação do planejamento e a execução dos processos (SCIENCES, 2015). A Figura 12 apresenta um esquema representativo desta abordagem para o desenvolvimento de uma metodologia com foco em incremento dos rendimentos de recuperação e homogeneidade dos antígenos ou moléculas terapêuticas.

Geralmente, é utilizada uma etapa que proporcione um alto fator de concentração para a molécula de interesse já no início do processo, proporcionando uma redução do volume de trabalho. E são necessárias etapas prévias de separação de células e agregados sólidos, como também etapas de inativação/remoção viral.

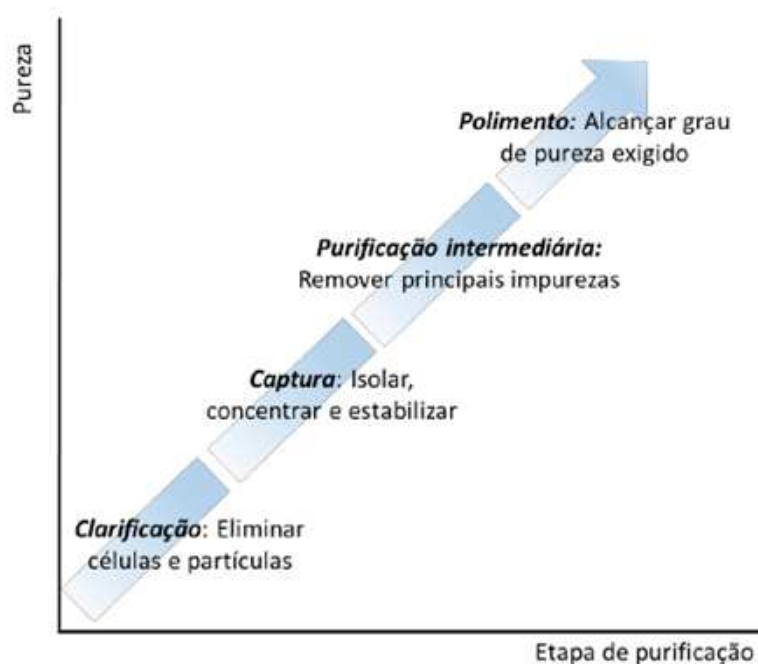


Figura 12: Estratégia de purificação em quatro etapas e seus principais objetivos. Adaptado de (SCIENCES, 2015).

Vale destacar que a realização de cada etapa do processo de purificação não consiste necessariamente na execução de uma única operação. A razão disto é a alta complexidade dos processos de purificação onde o objetivo é a obtenção de insumos com finalidades vacinais ou terapêuticas. Estes processos completos envolvem tipicamente de 3 a 10 operações unitárias e apresentam um rendimento global na faixa de 50-80%. Baixos níveis de recuperação do produto podem impactar a viabilidade econômica do processo de purificação e têm sido uma das motivações para a sua contínua melhoria. Além disto, outros motivadores são a limitação de algumas técnicas ao escalonamento do processo a volumes industriais e o seu elevado custo, que pode representar 70-90% do total gasto para a obtenção do produto final (MELLADO; CUNHA, 2013; MORENWEISER, 2005; PESSOA; KILIKIAN, 2005; VICENTE et al., 2008, 2011).

Exemplos de melhorias que podem ser estabelecidas no processo de purificação são: (a) utilização de técnicas cromatográficas adequadas e em sequência otimizada; eliminando a necessidade de ajustes entre estas; (b) redução do número de etapas; (c) escolha ou desenvolvimento de novos suportes cromatográficos; (d) otimização de cada etapa para obtenção de elevados rendimentos, melhorando consequentemente o

rendimento global do processo de purificação (PESSOA; KILIKIAN, 2005; VICENTE et al., 2008, 2011).

A robustez deve ser umas das características dos processos de purificação, pois tem que lidar com a variabilidade intrínseca nos cultivos celulares, com diferenças nas suas características, como por exemplo: o título viral, a relação entre as partículas virais infecciosas e totais, mudanças na composição do envelope viral, alterações quantitativas e qualitativas nas impurezas (RODRIGUES et al., 2007).

A seguir, serão abordados os quatro passos da estratégia de purificação: clarificação, captura, purificação intermediária e polimento. A clarificação não foi o foco do presente estudo, pois em processos industriais é frequentemente associada ao processamento *upstream*.

2.3.1 Clarificação

Os principais objetivos desta etapa são: eliminação de particulados (células e seus debris) preparando o material para a etapa de captura e prevenção de contaminação do produto em processamento.

Esta etapa é caracterizada pela separação das células, seguida de uma filtração para a retirada de partículas residuais.

A separação das células pode ser feita por sedimentação, centrifugação, filtração ou combinação delas. O processo de centrifugação foi o método mais utilizado, todavia, necessita de um investimento inicial alto e a validação da limpeza por usualmente utilizar sistemas reutilizáveis. A separação por filtração é outro processo amplamente utilizado e capaz de ser linearmente ampliado de acordo com a capacidade filtrante das unidades e sua multiplicação direta, além disso, sua operação é relativamente mais simples comparada a sistemas mecânicos (KALFBUSS-ZIMMERMANN; REICHL, 2005; VICENTE et al., 2011).

O processo de filtração pode ocorrer em membranas usando diferentes fluxos (perpendicular ou tangencial) ou utilizando filtros de profundidade. Estes utilizados na eliminação de material particulado, após separação das células, pela sua maior eficiência. Quando utilizado em biorreatores podem ser usados diretamente após a coleta, depois de um período de sedimentação, neste caso são dispostos em série com capacidade de retenção de partículas de tamanhos decrescentes. Como a manutenção da esterilidade do

efluente clarificado é de vital importância, filtros esterilizantes (0,22 μm) são acoplados a cascata de filtração.

Filtros de profundidade são feitos de materiais poliméricos e podem possuir em sua constituição compostos de terra de diatomácea, entre outros, que reduzem a compressibilidade ou a compactação, tornando o leito mais permeável. A utilização da resina polimérica proporciona resistência e um caráter catiônico. Alguns filtros podem possuir característica hidrofóbica. Destaca-se que a separação não ocorre exclusivamente pelo tamanho, pois propriedades de adsorção são igualmente importantes (KALFBUSS-ZIMMERMANN; REICHL, 2005).

A filtração em profundidade tem um baixo investimento e simplicidade operacional, por este motivo tem sido priorizada em comparação à filtração tangencial. A filtração tangencial proporciona melhor controle de incrustação e apresenta maior capacidade, por outro lado, aumenta a complexidade do processo (necessidade do controle da pressão transmembrana e de longos períodos de sanitização). Os filtros em profundidade estão alinhados com o crescente interesse em tecnologias descartáveis, que dispensam a necessidade de validação de limpeza, o que é impossível com membranas de fluxo tangencial, devido ao seu custo mais elevado (KALFBUSS-ZIMMERMANN; REICHL, 2005; VICENTE et al., 2011).

2.3.2 Captura

Os principais objetivos da etapa de captura são: isolar rapidamente, concentrar e estabilizar a molécula de interesse.

Em um processo de purificação existem quatro parâmetros de desempenho que devem ser observados e a importância de cada parâmetro de desempenho deverá oscilar com o processo de purificação em questão (SCIENCES, 2015). Estes parâmetros são definidos como: resolução (medida da habilidade em separar dois componentes); capacidade (quantidade máxima de amostra que pode ser empregada, geralmente expressa em massa de proteína por volume de resina ou área da membrana); velocidade (medida da rapidez da separação, geralmente expressa pela velocidade linear (cm h^{-1}) ou vazão volumétrica (L h^{-1}) e recuperação (razão entre a quantidade da molécula de interesse obtida após a etapa de purificação e a quantidade inicial).

Os objetivos da etapa de captura são o de isolar rapidamente a molécula de interesse de possíveis enzimas proteolíticas e também diminuir o volume de processo, facilitando com isto as etapas posteriores. Em função disto, os parâmetros importantes a serem considerados são capacidade e velocidade. Além disso, a concentração do produto aumenta a segurança do processo, pois as preparações virais podem exigir áreas de biossegurança com níveis elevados para a sua manipulação (VICENTE *et al.*, 2011).

O fator de concentração deve ser tão alto quanto possível. Por outro lado, problemas de agregação das partículas virais devem ser analisados, verificando a necessidade de aditivos para sua prevenção (VICENTE *et al.*, 2011).

As agências regulatórias, preconizam que os níveis de DNA devem ser inferiores a 10 ng por dose da vacina. Em alguns casos antes da etapa cromatográfica de captura tem sido utilizada a digestão com benzonase, para fragmentos com menos de 200 pb (pares de base), seguida de uma diafiltração para troca de solução-tampão. Este tratamento tem como objetivo não somente a redução dos níveis de DNA, como também do tamanho de seus fragmentos. Uma etapa de concentração anterior à digestão é necessária para reduzir a quantidade de nucleases utilizadas. A desvantagem deste procedimento é a necessidade de remoção da enzima que pode adicionar complexidade ao processo de purificação (FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION, 2010; VICENTE *et al.*, 2011; WEIGEL *et al.*, 2014).

As cromatografias de troca iônica, afinidade e pseudoafinidade são as melhores opções para a etapa de captura, reunindo poder de concentração e eliminação de impurezas. A cromatografia de interação hidrofóbica, apesar de apresentar parâmetros de desempenho adequados, tem como desvantagem a necessidade de condições especiais para a aplicação da amostra, como uma alta concentração salina para a adsorção da molécula de interesse pelo ligante.

A filtração tangencial é uma alternativa para a etapa de captura pela sua capacidade de concentração e baixo investimento inicial, mas a redução do nível de impurezas não é tão eficaz, o que torna a cromatografia a técnica mais adequada.

Os processos cromatográficos convencionais, com resinas empacotadas em leito fixo, apresentam limitações, como por exemplo: dependência da difusão intrapartícula para o transporte das moléculas até os sítios de adsorção, o que aumenta o tempo de processo e *beads* com tamanhos de poros reduzidos, isto dificulta o acesso de macromoléculas ou partículas virais. Por esta razão, novos suportes cromatográficos têm

sido desenvolvidos a fim de reduzir estas limitações, como as membranas microporosas adsorptivas e os monolitos (KALFBUSS, 2007).

2.3.3 Membranas de Adsorção

O uso de membranas microporosas como suporte cromatográfico foi proposto (MARICHAL-GALLARDO et al., 2017; WEIGEL et al., 2014) como uma alternativa à cromatografia convencional, em função das vantagens que apresenta:

- a. Fluxo predominantemente convectivo possibilita a utilização de altas vazões sem perda da capacidade dinâmica, consequentemente o resultado é uma diminuição significativa do tempo de processo;
- b. Dispositivos prontos para o uso, o que reduz o tempo de preparo com empacotamento da coluna e gastos;
- c. O limite de exclusão molecular é da ordem de 10^7 Da devido ao tamanho dos poros (3-5 μm), enquanto na cromatografia em coluna este limite é inferior a 10^6 Da;
- d. Fácil escalonamento com o aumento da área de membrana;
- e. Pode ser utilizada como produto descartável, dispensando a necessidade de validação de sanitização.

O tempo de residência é reduzido com a utilização de membranas, uma vez que o acesso aos poros é facilitado proporcionando uma eluição mais rápida. A utilização de membranas reduz o tempo de processo em aproximadamente 10 vezes se comparada ao uso de resinas empacotadas (CHARCOSSET, 1998; ZOU; LUO; ZHOU, 2001).

A utilização de membranas adsorptivas é proposta como uma alternativa eficaz em etapas de purificação de proteínas para fins terapêuticos, pelo fato que pode acarretar em economia de custos, pois reduz o tempo de processo, diminui a utilização de insumos (tampões, por exemplo) e é de fácil escalonamento, pois são sistemas modulares (VAN REIS; ZYDNEY, 2007).

A utilização de membranas de adsorção na etapa de captura foi estudada pelo grupo de pesquisa da Engenharia de Bioprocessos liderado pelo Professor Udo Reichl do Instituto Max-Planck, de Magdeburgo, na Alemanha, este grupo publicou diversos trabalhos com o vírus da influenza.

No primeiro trabalho, os autores testaram uma membrana de adsorção aniônica forte com sucesso, pois foram descritas recuperações de até 86% (KALFBUSS, 2007).

No segundo, a utilização de membranas de celulose sulfatada resultou em recuperações de até 94% e com uma redução de DNA e proteínas totais em 32% e 43%, respectivamente (OPITZ et al., 2009). No último trabalho, os autores utilizaram uma membrana de celulose regenerada com uma nova técnica denominada cromatografia de exclusão estérica e obtiveram como resultado uma recuperação maior que 95% e uma redução do DNA de dupla fita de 99,7% e de proteínas totais de 92,4% (MARICHAL-GALLARDO et al., 2017).

Foi descrita na literatura uma boa recuperação de partículas do vírus da influenza (> 50%) ao aplicar 4 - 10% de PEG-6000 á alimentação em cromatografia de exclusão estérica (SXC), utilizando membrana como suporte. Bons resultados foram obtidos também com vários outros vírus com faixa de tamanho de 20 a 300 nm (MARICHAL-GALLARDO et al., 2017).

Em outro estudo, a troca aniônica forte foi usada na captura de adenovírus, com uma recuperação relatada de 62% (PEIXOTO et al., 2008), enquanto a troca aniônica fraca foi utilizada na captura de partícula pseudo viral do rotavírus (VICENTE *et al.*, 2008). Neste trabalho, os autores descreveram um aumento da pureza de 12,5% para 55,0%, com uma depleção de 90% do DNA e a recuperação foi de 55,2%.

2.3.4 Purificação Intermediária

O objetivo principal desta etapa no processo é a redução de impurezas, no entanto no processo produtivo de vacinas virais, esta etapa é usualmente suprimida do protocolo de purificação. E a condição prévia para isto é a necessidade que a etapa de captura seja suficientemente eficaz, necessitando apenas de um passo de polimento posterior para a obtenção do grau de pureza preconizado (MELLADO; CUNHA, 2013).

O principal objetivo desta etapa, quando necessária, é eliminar a maior parte de impurezas e, por este motivo, o parâmetro de desempenho mais importante é a resolução, aliado à capacidade. A velocidade nesta etapa não é tão impactante, uma vez que impurezas que poderiam ter efeitos deletérios sobre a molécula alvo foram reduzidas na etapa de captura (SCIENCES, 2015).

2.3.5 Polimento

Os principais objetivos desta etapa são a remoção de vestígios de impurezas residuais e ajustes das condições físico-químicas para estocagem e/ou formulação do antígeno, que será a apresentação comercial da vacina.

Esta etapa do processo de purificação é crítica, pois o foco é a remoção de resíduos de impurezas para que o produto atenda aos critérios preconizados pelas agências regulatórias, cada vez mais restritivas e especificações de qualidade da vacina (MELLADO; CUNHA, 2013).

Nesta fase final do processo de purificação, a maioria dos contaminantes já foi removida, o que resta se resume a eliminação de traços residuais de proteínas, ácidos nucleicos ou fragmentos do antígeno alvo. A técnica selecionada para esta etapa necessita apresentar uma resolução suficiente para estes fins. A alta recuperação da molécula de interesse é outro parâmetro desejável, pois perdas do produto nesta etapa são mais impactantes economicamente do que nas etapas anteriores (SCIENCES, 2015).

A obtenção do produto em solução tampão adequada para a formulação do produto nesta fase é de grande importância, por esta razão, a filtração tangencial ou cromatografia de exclusão molecular são recomendadas, pois, além da remoção de fragmentos ou agregados, condicionam o antígeno para a solução adequada e apresentam altos rendimentos (MELLADO; CUNHA, 2013).

No ano de 2014, foi publicado um trabalho de purificação do vírus influenza, usando a resina multimodal Capto™ Core 700 na etapa de polimento (WEIGEL et al., 2014). O rendimento global do processo foi de 68% e os níveis residuais de DNA obtidos se encontravam dentro do limite preconizado pelas agências regulatórias ($< 10 \text{ ng dose}^{-1}$). A resina Capto™ Core 700 foi desenvolvida pela empresa GE Healthcare para as etapas de purificação intermediária e polimento de vírus e macromoléculas. Esta resina é composta por um núcleo com características hidrofóbicas e possui cargas positivas (octilamina), de dupla funcionalidade, revestido por uma camada porosa que exclui grandes moléculas.

Membranas com ligante de troca aniônica tolerante ao sal são comumente utilizadas nesta etapa, uma vez que a etapa anterior do processo consiste geralmente na dessorção do antígeno em alta concentração salina, que proporcionam excelentes resultados na remoção de DNA (LEUTHOLD; FABER; FISCHER-FRÜHHOLZ, 2010) e proteínas contaminantes (KANG, 2012). O desenvolvimento do ligante resistente ao sal tornou possível a eliminação de uma etapa de dessalinização entre as técnicas, o que colabora para o aumento do rendimento global (MELLADO; CUNHA, 2013).

O uso de colunas monolíticas tem sido descrito para esta finalidade. Os monolitos são suportes caracterizados por uma rede de canais de amplo diâmetro, que, assim como as membranas adsorptivas, fornecem acesso para grandes moléculas e escoamento convectivo, permitindo a utilização de altas vazões e com ótima resolução. Por estas características, também é aplicável na etapa de captura (FORCIC et al., 2011).

A técnica de troca iônica é um dos métodos mais utilizados industrialmente e também tem sido descrita na etapa final de purificação, bem como a interação hidrofóbica (BURDEN, 2012; VICENTE et al., 2011).

2.4 GLICOSILAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA FINS TERAPÊUTICOS

O padrão de glicosilação das proteínas é resultado da atividade de diferentes enzimas glicosiltransferases, estas podem ser encontradas no complexo de Golgi das células, produzindo uma série de diferentes glicoformas (BUTLER, 2008).

Para a segurança do produto produzido é importante a garantia na consistência do perfil de glicosilação de proteínas terapêuticas durante seu cultivo celular. Porém, durante este processo alguns parâmetros como o crescimento celular, metabolismo e produtividade da molécula de interesse podem afetar a qualidade da proteína produzida (BYRNE, 2014). Por outro lado, as condições de cultivo, como temperatura, pH, concentrações de oxigênio dissolvido, amônia, osmolalidade, composição do meio de cultivo, depleção de glicose e/ou glutamina, acúmulo de metabólitos, estratégia de alimentação utilizada e modo de operação no processo podem impactar o perfil de glicosilação da molécula de interesse, resultando em variações entre lotes produzidos (BUTLER, 2008).

2.4.1 N-Glicosilação

Dos diferentes tipos de glicosilação, a N-glicosilação é a mais estudada, justamente por ser a de maior importância para a atividade biológica de glicoproteínas para fins farmacêuticos. Esta modificação pós-traducional é característica das células eucariotas superiores e consiste na adição de um oligossacarídeo (glicano) a um aminoácido presente numa sequência específica da cadeia polipeptídica (BUTLER, 2008).

2.4.1.1 Formação de N-Glicanos

Os N-glicanos são estruturas importantes, pois conferem propriedades biológicas e estruturais a uma glicoproteína. Estas estruturas possuem um pentassacarídeo central, composto por 2 resíduos de acetilglicosamina (GlcNAc) e 3 resíduos de manose (Man) (Man3GlcNAc2), ligado por uma ligação N-glicosídica a um resíduo de asparagina (Asn). Os sítios de N-glicosilação são previstos pela sequência de aminoácidos consenso Asn-X-Ser/Thr, sendo que “X” pode ser qualquer aminoácido, exceto uma prolina (BUTLER, 2008).

O processo é iniciado com a síntese do carreador dolicol-fosfato (Dol-P). No citossol do retículo endoplasmático (RE), é sintetizada uma estrutura oligossacarídica de 14 unidades monoméricas pelo acréscimo de monossacarídeos provenientes de açúcares de nucleotídeos e guanossina difosfato manose (GDP-Man) ou a partir de intermediários lipídicos dolicol-fosfato manose (Dol-P-Man) e dolicol-fosfato glicose (Dol-P-Glc) ao Dol-P para a formação do precursor dolicol-oligossacarídeo contendo duas moléculas de GlcNAc e cinco de manose Man5GlcNAc2-P-P-dolicol. Então, o oligossacarídeo é transportado para o lúmen do RE, onde são adicionados ao oligossacarídeo quatro resíduos de manose e três de glicose, para a formação do complexo Glc3Man9GlcNAc2-P-P-dolicol. Após a formação do complexo, este é transferido durante o processo de tradução para a sequência consenso Asn-X-Ser/Thr no polipeptídeo em construção durante sua translocação ao RE, através de uma reação catalisada pela enzima oligosacaril transferase (OST) (BUTLER, 2008).

2.4.1.2 Síntese de N-Glicanos no Retículo Endoplasmático (RE)

Na sequência, ocorre a retirada das moléculas de glicose pela ação das glicosidases I e II e das manosidases, ambas localizadas na membrana do RE. Esta etapa é iniciada pela enzima α -1,2 glicosidase I (Gluc I), sua função é a remoção da unidade terminal de glicose. Então, as próximas duas unidades de glicose são retiradas na sequência por meio de uma reação catalisada pela enzima α -1,3 glicosidase II (Gluc II). A N-glicosilação funciona como um ponto de verificação do correto enovelamento da proteína nesta etapa, seguido da retirada do último resíduo de glicose somente a caso proteína tenha sido enovelada corretamente. O processo tem continuidade, quando um

resíduo de manose é removido pela ação da manosidase I (α -Man I), etapa esta onde a estrutura glicídica será transportada para o compartimento *cis* do aparelho de Golgi e na qual podem ser gerados glicanos do tipo alta manose (BUTLER, 2008).

2.4.1.3 Processamento de N-Glicanos no Aparelho de Golgi (AG)

Na etapa de processamento no aparelho de Golgi, os N-glicanos podem ser modificados pela ação das exoglicosidases, que removem resíduos de manose. A estrutura é submetida a um processamento complexo nos compartimentos *Cis*, *Medial* e *Trans* Golgi (LIU, 2015). Diferentes enzimas glicosiltransferases encontradas no aparelho de Golgi podem adicionar monossacarídeos, entre eles: N-acetil-glicosamina, galactose, fucose e ácido siálico.

As N-acetilglicosaminiltransferases (GnT), possuem um papel de destaque, pois convertem os glicanos intermediários do tipo alta manose em glicanos complexos por meio da adição de antenas no núcleo da estrutura glicídica (BUTLER, 2006). Os substratos utilizados pelas glicosiltransferases são os açúcares de nucleotídeos (UDP-GlcAc, UDP-Gal, GDP-Fuc, CMP-NANA e CMP-NGNA), como pode ser observado na Figura 13.

No ano de 2006, Butler e colaboradores descreveram a ação das GnTs. A etapa é iniciada com a GnTI, que transfere uma unidade de GlcNAc do substrato UDP-GlcNAc para a antena α -1,3 manose da estrutura glicídica de alta manose Man5, produzindo uma estrutura híbrida. Após isto, pela ação da manosidase II (α -Man II), é produzida uma estrutura híbrida de Man, ficando uma antena livre. A GnTII transfere então uma unidade de GlcNAc para a antena α -1,6 manose livre, resultando num glicano biantenário complexo. Na via de N-glicosilação, a enzima (1,4) -N-acetilglicosaminiltransferase III (GnTIII) poderá produzir um glicano bissectado. Outras GnT's, como por exemplo, as GnTIV e GnTV, podem continuar a adicionar mais antenas para a formação de glicanos complexos (tri e tetra-antenários). Após à ação das N-acetilglicosaminiltransferases, acontece a fucosilação dos glicanos complexos biantenário, tri ou tetra-antenários. A enzima α 1,6 fucosiltransferase é a responsável pela transferência de um resíduo de fucose do substrato de GDP-fucose para a GlcNAc ligada ao resíduo de asparagina. Depois da fucosilação, os N-glicanos são transportados para o AG, onde ocorrem as reações de galactosilação e sialilação dos mesmos, catalisadas pelas enzimas galactosil e α 2,3 sialil transferases, respectivamente (Figura 13) (BUTLER, 2006; BYRNE, 2014).

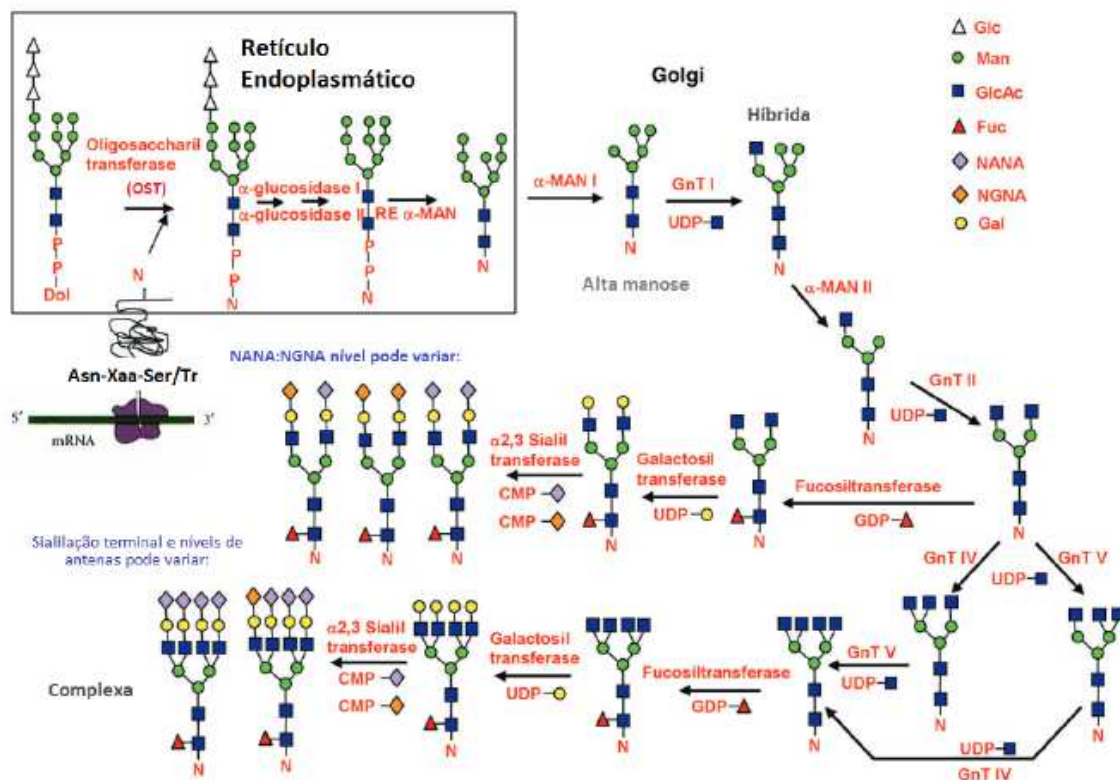


Figura 13: Vias de glicosilação de N-glicanos. Na figura se encontra descrita no RNAm o motif da N-glicosilação (Asn-Xaa-Ser/Tr) e o início do processo no reticulo endoplasmático e a migração para o complexo de Golgi onde em seu processo podem se converter em alta manose ou híbridas e continuar o processo de maturação nas diferentes vias de glicosilação. O processo utiliza as transferases (Sialil, Galactosil, fucosil e N-acetilglicosaminil) e os substratos utilizados pelas glicosiltransferases são os açúcares de nucleotídeos (UDP-GlcAc, UDP-Gal, GDP-Fuc, CMP-NANA e CMP-NGNA). Fonte: (ARIZA, 2017).

A última adição no processo de glicosilação é a reação de sialilação, este ocorre na região trans do AG. A enzima sialiltransferase transfere o ácido siálico do ácido citidiníco-5'-monofosfo-N-acetilneuramínico (CMP-NANA), para o resíduo de galactose na estrutura do glicano (BYRNE, 2014). As enzimas sialil α 2,3 e α 2,6 transferases catalisam duas reações para a formação das ligações α 2,3 e α 2,6, respectivamente. Estas enzimas sialiltransferases requerem como substratos os açúcares de nucleotídeos, estes possuem complexas rotas de síntese, e podem ser consideradas limitantes ou podem incrementar o nível de sialilação.

As glicoproteínas montadas são secretadas e exportadas da célula usando vesículas de transporte pela rota secretora.

2.4.1.4 Estratégias para a Análise da Glicosilação

Não existe um método único que seja rápido e confiável para a caracterização estrutural de glicanos. Por isto, são desenvolvidas novas tecnologias analíticas, mais precisas, robustas e sensíveis. De acordo com Mariño e colaboradores (2010) o padrão de glicosilação pode ser analisado de três formas: (a) caracterização de glicanos em glicoproteínas intactas, (b) caracterização de glicopeptídeos e (c) análise estrutural de glicanos liberados quimicamente ou enzimaticamente.

2.4.1.5 Cromatografia de Interação Hidrofílica (HILIC)

Após a liberação dos glicanos, por tratamentos enzimáticos ou por hidrólise química, eles podem ser derivatizados com fluoróforo e posteriormente identificados por cromatografia de interação hidrofílica (HILIC) de alto desempenho. O HILIC é atualmente a tecnologia usada por muitos grupos de pesquisa, capaz de separar diferentes glicanos polares e hidrofílicos com alta resolução (MARIÑO et al., 2010).

A coluna cromatográfica de fase normal TSKgel Amide-80 da empresa Tosoh Bioscience é utilizada para este tipo de análise. A fase estacionária desta coluna consiste em grupos carbamoyl não iônicos que estão quimicamente ligados às partículas de gel de sílica (Figura 14). A fase estacionária não iônica proporciona excelente estabilidade química. O átomo de hidrogênio no grupo $-NH_2$ ou o grupo carbonila na fase estacionária, pode se ligar ao hidrogênio dos átomos de oxigênio nos grupos hidroxila do analito, interações dipolo-dipolo com os grupos funcionais polares dos analitos e interações eletrostáticas com os grupos funcionais ionizados dos analitos também podem ser formados (TOSOHBIOSCIENCE, 2016).

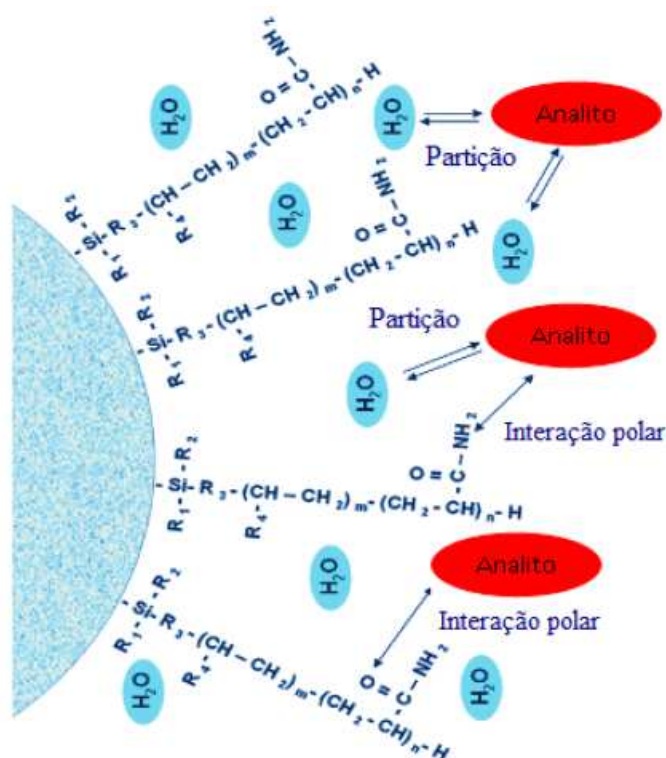


Figura 14: Sílica covalentemente ligada aos grupos carbamoil não iônicos. Adaptado de (TOSOHBIOSCIENCE, 2016).

A análise por HILIC se inicia com a aplicação de uma fase móvel, que é uma mistura de água/solvente orgânico, tipicamente acetonitrila, este solvente orgânico em alta concentração e baixa concentração de água ou de tampão aquoso (por exemplo, tampão de formiato de amônia). Em HILIC é utilizada uma fase estacionária polar e existe a formação de uma camada de água superficialmente imobilizada ou adsorvida, que retém os glicanos igualmente polares por meio de interações hidrofílicas, conforme um equilíbrio de partição. Os compostos mais polares são os mais retidos (SILVA; BOTTOLI; COLLINS, 2016).

A ordem de eluição dos glicanos, depende das propriedades como: tamanho, número de grupos polares, carga, composição, estrutura, ligação e ramificação dos oligossacarídeos. Uma das principais vantagens desta técnica é a separação de isômeros estruturais. Como a maioria dos oligossacarídeos não absorvem na região do UV, é necessário realizar uma derivatização com fluoróforos para poder detectar os glicanos por meio de detectores de fluorescência (WATERS, 2013).

2.4.1.6 Derivatização dos glicanos com o fluoróforo 2-aminobenzamina (2AB)

O 2AB é um fluoróforo estável que é frequentemente utilizado na análise de glicanos e quando ligado aos mesmos podem ser detectados em concentrações femtomolares (SIGMA-ALDRICH, 2017). Uma vantagem do uso deste fluoróforo é que os glicanos marcados com o mesmo são compatíveis com diferentes técnicas analíticas, como por exemplo a espectrometria de massa.

A análise por HILIC permite a determinação quantitativa relativa dos glicanos carregados e neutros, quando marcados com o 2-AB (MARIÑO et al., 2010). Para esta análise, é usado um padrão de dextrana hidrolisada marcada com 2-AB. O tempo de retenção de cada tipo de glicanos presente no hidrolisado é correlacionado por regressão polinomial ou usando softwares, para a obtenção das respectivas unidades de glicose (UG). Então, são usados estes valores de UG como valores padrão de referência da dextrana-2AB (calibração), podendo ser determinados valores de UG para as espécies presentes nas amostras de glicanos com base nos respectivos tempos de retenção. Desta maneira, são minimizadas as variações da análise, tornando os dados comparáveis e robustos (Figura 15) (WATERS, 2012).

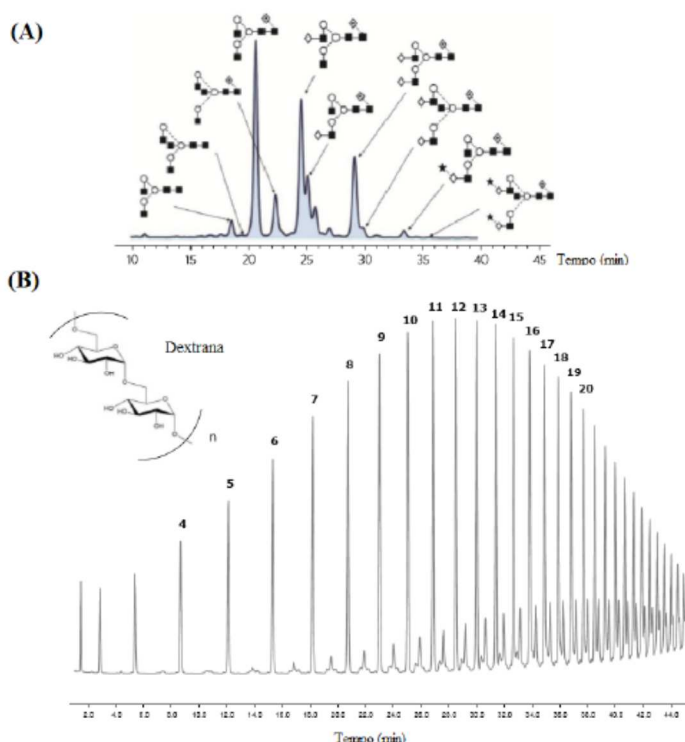


Figura 15: Análise de Glicanos. (A) Perfil HILIC-HPLC de N-glicanos liberados a partir de IgG de soro humano. (B) A escala das unidades de glicose (UG) baseia-se na eluição do hidrolisado de dextrana marcado com 2AB. Fonte: (ARIZA, 2017).

2.4.1.7 Glicosilação de flavivírus

As culturas celulares quando infectadas com os flavivírus secretam três glicoproteínas virais: prM (CALVERT et al., 2012; GOTO et al., 2005; KIM et al., 2008), E (BEASLEY et al., 2005; GOTO et al., 2005; HANNA et al., 2005; LEE et al., 2010; LI et al., 2006; MONDOTTE et al., 2007; ROBY et al., 2015) e NS1 (MULLER & YOUNG, 2012; MUYLAERT et al., 1996; SOMNUKE et al., 2011). As modificações de carboidratos ligados a Asn estão sempre presentes e se apresentam relativamente conservadas em prM e NS1 com uma a três modificações na porção pr de prM (que se acredita ser importante na proteção do peptídeo de fusão na proteína E durante a saída da partícula viral) (GOTO et al., 2005; HANNA et al., 2005; HEINZ; MANDL, 1993; LI et al., 2008; ROYLE et al., 2008) e modificação em dois ou três resíduos em NS1 (importante para a multimerização da NS1) (MULLER & YOUNG, 2012; MUYLAERT et al., 1996; SOMNUKE et al., 2011). A glicosilação da proteína de envelope (E) é mais variável, geralmente ocorrendo nos resíduos 153/154 e no resíduo 67 nos quatro sorotipos de DENV (LEE et al., 2010). No entanto, não possuem modificação de carboidratos na proteína de envelope (E) algumas cepas do vírus do oeste do Nilo-WNV (BEASLEY et al., 2005; VIJAYASANKARAN et al., 2010), incluindo o vírus de Kunjin-KUNV (ADAMS et al., 1995), bem como as cepas do vírus da encefalite de Saint Louis-SLEV (VORNDAM et al., 1993) e o vírus da febre amarela-YFV-17D (POST et al., 1992). Portanto, essa glicosilação não é absolutamente necessária para a replicação de flavivírus.

O significado da glicosilação prM em flavivírus parece ser duplo, impactando tanto na montagem e liberação de partículas. A glicosilação da proteína prM (no resíduo N15 no WNV) parece ser absolutamente necessária para a montagem das partículas virais. A remoção do sítio de glicosilação ligado a N da proteína prM pode resultar em um desenovelamento completo da proteína E e uma incapacidade na formação da prM/E de forma eficiente (GOTO et al., 2005; HANNA et al., 2005; KIM et al., 2008). Uma mutação T20D na prM do WNV também mostrou reduzir (mas não prevenir completamente) a glicosilação do prM (CALVERT et al., 2012).

No contexto da infecção, a perda de glicosilação prM no vírus da encefalite japonesa-JEV levou a uma redução de aproximadamente 20 vezes na produção de

partículas virais encontrada no meio extracelular. Estes possuíam composições proteicas e infectividades similares ao dos vírus do tipo selvagem. A redução da produção de partículas virais parece ter ocorrido no estágio de liberação do vírus, em vez da montagem (KIM *et al.*, 2008). A remoção do sítio de glicosilação prM em uma linhagem I ou II de WNV também diminuiu significativamente a liberação de partículas PRM/E (redução de 97-99% em comparação com a cepa selvagem) (HANNA *et al.*, 2005). Em um vírus mutante da encefalite transmitida por carrapato-TBEV deficiente em glicosilação da prM, o nível de proteína E segregada foi reduzido para 60% se comparada com a cepa selvagem. Por outro lado, nos mutantes deficientes em glicosilação de proteína E ou PRM/E, o nível de proteína E segregada foi reduzido para 10% do nível encontrado na cepa selvagem (GOTO *et al.*, 2005). Assim, parece que a glicosilação prM pode ser mais significativa em relação à secreção de partículas virais do que a glicosilação da proteína E.

A glicosilação da proteína E foi associada ao aumento da virulência em modelos de infecção de mamíferos e aviários (BEASLEY *et al.*, 2005)(BRAULT *et al.*, 2011; KARIWA *et al.*, 2013; MURATA *et al.*, 2010; SHIRATO *et al.*, 2004b; TOTANI *et al.*, 2011) e transmissão eficiente por mosquitos (MOUDY *et al.*, 2009). A glicosilação na proteína E é proposta para potencializar estes fenótipos de virulência, facilitando a entrada de vírus mediada pelo receptor (DAVIS *et al.*, 2006a, MARTINA *et al.*, 2008; MONDOTTE *et al.*, 2007; POKIDYSHEVA *et al.*, 2006; TASSANEETRITHEP *et al.*, 2003), uma maior eficiência de montagem e saída de partículas (GOTO *et al.*, 2005; HANNA *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2006), aumento da estabilidade do pH (BEASLEY *et al.*, 2005; LEE; WEIR; DALGARNO, 1997) e, possivelmente, a dissimulação de epítomos imunogênicos (ZHANG *et al.*, 2011). Dois dos mais caracterizados receptores para flavivírus dependem quase exclusivamente da glicosilação da proteína E para interação com a prM em partículas virais imaturas/parcialmente maduras as proteínas transmembranares tetraméricas de tipo II que contêm domínios de reconhecimento de carboidratos dependentes de Ca^{2+} + DCSIGN e DC-SIGNR (DAVIS *et al.*, 2006a, b; FERNANDEZ-GARCIA *et al.*, 2009; MARTINA *et al.*, 2008; MONDOTTE *et al.*, 2007; POKIDYSHEVA *et al.*, 2006; TASSANEETRITHEP *et al.*, 2003). As células dendríticas e os macrófagos expressam DC-SIGN em seres humanos, com receptores de lectina dependentes de Ca^{2+} + (C-tipo) homólogos em camundongos que apresentam padrões distintos de expressão (KOPPEL *et al.*, 2005; KWAN *et al.*, 2008; NAVARRO- SANCHEZ *et al.*, 2003; TASSANEETRITHEP *et al.*, 2003). Este

receptor de lectina reconhece glicanos com alto teor de manose e antígenos de Lewis^x contendo frutose (KOPPEL *et al.*, 2005) e foi demonstrado como parte da ligação celular primária com o vírus da dengue-DENV e WNV (DAVIS *et al.*, 2006a, b; KWAN *et al.*, 2008; LOZACH *et al.*, 2005; MARTINA *et al.*, 2008; NAVARRO-SANCHEZ *et al.*, 2003; TASSANEETRITHEP *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2011). As reconstruções feitas a partir das imagens de microscopia eletrônica de transmissão criogênica da proteína E de DENV ligadas ao domínio de reconhecimento de carboidratos dependentes de DC-SIGN demonstraram que os glicanos ligados a N67 na proteína E, em vez dos encontrados no resíduo N153/4 conservado nos flavivírus, são necessários para a ligação do vírus (POKIDYSHEVA *et al.*, 2006). Isto é baseado em experiências que demonstraram aumento da ligação do WNV a DC-SIGN quando a proteína E foi mutada para introdução da glicosilação no resíduo 67 (DAVIS *et al.*, 2006a). No entanto, isso pode não representar a única forma para que os flavivírus glicosilados interajam com DC-SIGN, pois não contabilizam o impacto observado de polimorfismos na infecção TBEV (BARKHASH *et al.*, 2012) ou a capacidade do WNV glicosilado do tipo selvagem para usá-lo como um receptor (DAVIS *et al.*, 2006b; MARTINA *et al.*, 2008), uma vez que ambos apenas contêm o glicano N154. Existe a possibilidade que a glicosilação de alto teor de manose das partículas virais dos flavivírus derivados de artrópodes facilite uma melhor interação DC-SIGN com o resíduo N153/4 (DAVIS *et al.*, 2006b, NAVARRO-SANCHEZ *et al.*, 2003). DC-SIGNR é um homólogo próximo de DC-SIGN (77% de identidade de sequência de aminoácidos) e é expresso em células endoteliais microvasculares no fígado humano, nódulos linfáticos e placenta (DAVIS *et al.*, 2006b, KOPPEL *et al.*, 2005; POHLMANN *et al.*, 2001). As evidências da incubação experimental de WNV com células K562 que superexpressam os receptores de lectina demonstraram um uso preferencial de DC-SIGNR sobre DC-SIGN para adesão e infecção (DAVIS *et al.*, 2006b). Curiosamente, enquanto o aumento da infecção foi mais pronunciado com partículas virais derivadas de células de mosquito, o WNV derivado de células de mamífero demonstrou uma infecção marcadamente aumentada de células K562-SIGNR em comparação com células K562-SIGN e controle K562. Assim, parece que o DC-SIGNR é capaz de ligar os carboidratos complexos gerados pelo hospedeiro de vertebrados, além dos padrões moleculares associados ao patógeno com alto teor de manose reconhecidos pelo DC-SIGN. Além disso, a preferência observada para DC-SIGNR foi mantida ao infectar com uma linhagem de IIVNV deficiente na glicosilação

da proteína de E, indicando que os carboidratos na prM residual que ainda não tenha sido clivado por furina provavelmente tomarão parte ativa nessa interação.

As experiências com DENV demonstraram um grau heterólogo de maturação dos glicanos que podem ser dependentes do tipo de célula utilizado para produção dos estoques virais, bem como, possivelmente o grau de clivagem da proteína prM (DEJNIRATTISAI *et al.*, 2011). Os autores demonstraram que o DENV cultivado em células dendríticas primárias (C6/36), de mamíferos imortalizadas (Vero) e primárias (células dendríticas derivadas de monócitos) continham glicanos na proteína E com diferentes graus de complexidade (o vírus derivado de insetos era do tipo alta manose, derivado de DC- o vírus continha apenas glicanos complexos e o vírus derivado de Vero foi descrito como de complexidade intermediária (entre os dois estados). Os vírus derivados de células de insetos e mamíferos imortalizados foram capazes de utilizar DC-SIGN como receptor, no entanto, o DENV cultivado em células primárias e contendo apenas glicanos complexos só pode se ligar aos receptores de lectina relacionado ao fígado/linfonodo, L-SIGN. Este fenótipo pode, no entanto, ser apenas específico de DENV, uma vez que o WNV cultivado em células Vero foi demonstrado conter glicosilação complexa da proteína E (como demonstrado pela falta de sensibilidade à endoglicosidase H - endoH, que reconhece especificamente glicanos contendo três ou mais resíduos de manose terminal) (HANNA *et al.*, 2005). A expressão ectópica de partículas prM/E de WNV em células HEK-293T e DENV-2 em células COS também demonstraram insensibilidade à digestão endoH e, portanto, uma maturação completa de glicanos complexos (HANNA *et al.*, 2005; PRYOR *et al.*, 2004).

O trabalho de Dejnirattisai *et al.* (2011) também revelou que a utilização de ambos os sites de glicosilação no DENV-2 E ocorre apenas em aproximadamente 50% dos casos, demonstrado por uma banda de migração mais rápida em imunoblots de amostras do vírus selvagem não tratadas correspondendo a proteína E com glicosilação em apenas em único resíduo. Um estudo anterior pesquisou os quatro sorotipos de DENV não mostrou a mesma população heterogênea de proteína de E individualmente e duplamente glicosilada em amostras DENV-2 não tratadas (HACKER *et al.*, 2009). Este estudo, no entanto, revelou que, para os vírus cultivados em células Vero, a digestão endógena da proteína E de DENV do tipo 1, 3 e 4 eliminou a glicosilação em um único local, enquanto a digestão endoH de DENV-2 resultou em uma população mista de proteína E sem glicosilação ou glicosilada em um único local. Assim, parece que os locais de glicosilação N67 e N153 em DENV E são utilizados em diferentes graus e os glicanos posicionados em cada local

são amadurecidos de forma distinta. Considerando que os estudos estruturais de prM e E de DENV demonstraram a oclusão parcial de um ou ambos os glicanos da proteína E pelo peptídeo pr (LI *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2008) e que o DENV tem uma tendência para a clivagem incompleta do prM por furina (RODENHUIS-ZYBERT *et al.*, 2011). Esses resultados levantam a possibilidade de que o grau de processamento da prM controla o estado de maturação de um ou ambos os glicanos.

Há também evidências de que os receptores de lectina que reconhecem flavivírus glicosilados podem desempenhar papel na infecção de espécies de mosquitos vetoriais (ARJONA *et al.*, 2011; CHENG *et al.*, 2010). Nos mosquitos *Aedes* e *Culex*, o receptor de lectina específica de galactose solúvel mosGCTL-1 liga-se a WNV glicosilada (mas aparentemente não a DENV) na hemolinfa e depois coordena com um homólogo de fosfatase CD45 de superfície celular mosPTP-1 para facilitar a entrada de vírus (CHENG *et al.*, 2010).

Os flavivírus glicosilados, em alguns casos, demonstraram exibir virulência aumentada em modelos animais. Com relação à virulência de mamíferos, foi demonstrado que a glicosilação da proteína E é importante para a replicação periférica e a neuroinvasão de WNV (BEASLEY *et al.*, 2005; SHIRATO *et al.*, 2004b) e MVEV (PROW *et al.*, 2011) em camundongos. As cepas de WNV que não possuem glicosilação também foram demonstradas como atenuadas para replicação em aves (MURATA *et al.*, 2010; TOTANI *et al.*, 2011) e em mosquitos *Culex* (MOUDY *et al.*, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

O objetivo geral do presente trabalho é o estudo das condições para o cultivo de células Vero utilizando microcarregadores em meios de cultivo isentos de soro fetal bovino (SFB), visando à obtenção de um processo eficiente de produção e purificação do vírus da febre amarela e a investigação do perfil de glicosilação.

3.2 ESPECÍFICOS

- I. Adaptação das células Vero a diferentes meios de cultivo livres de soro fetal bovino e seleção do meio de cultura mais adequado;
- II. Avaliação do cultivo da linhagem de células Vero em frascos do tipo T, em garrafas *Roller* e em frascos agitados, visando a caracterização de seus requerimentos nutricionais e seu metabolismo;
- III. Investigação das condições operacionais para o cultivo e infecção das células Vero em microcarregadores, analisando variáveis que influenciam a cultura celular e a propagação viral, visando maximizar a produção de partículas virais;
- IV. Estudo da purificação do vírus da febre amarela obtido por processos cromatográficos e caracterização do perfil de glicosilação do mesmo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Cepas Virais

Foram produzidos dois diferentes lotes de trabalho do vírus da febre amarela em meio de cultura livre de soro fetal bovino. A produção dos lotes de trabalho, empregados nos experimentos, foi realizada com o vírus da febre amarela das cepas vacinais denominadas 17D 204 (RKI), proveniente do Instituto Robert Koch (Alemanha), e 17DD, oriunda do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/Bio-Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro/RJ, Brasil).

Dois bancos de trabalho foram produzidos em garrafas rotatórias (*roller bottle*) usando meio Z em um volume de trabalho de 200 mL a uma rotação de 0,7 rpm, infectadas com uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,002 PFU célula⁻¹ e incubadas a temperatura de 37 °C tanto para a infecção quanto para a fase de propagação viral. A semente viral produzida com a cepa 17D 204 (RKI) apresentou um título viral de $1,4 \times 10^7$ PFU mL⁻¹, enquanto a produzida com a cepa 17DD o título viral foi de $5,0 \times 10^7$ PFU

mL⁻¹. As alíquotas foram armazenadas em criotubos contendo 1,8 mL da suspensão viral, em freezer a -70°C.

4.1.2 Linhagem Celular

A linhagem celular empregada foi a Vero, estabelecida a partir do rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) adulto normal por Yasumura & Kawakita, em 1963. Esta linhagem celular possui uma deleção cromossomal e não possui a capacidade de produção do interferon (DESMYTER; MELNICK; RAWLS, 1968).

As células Vero utilizadas neste estudo foram obtidas do *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ – Vero B4 ACC 33) e da *European Collection of Animal Cell Cultures* (ECACC 88020401 – Vero WHO). Esta linhagem celular é preconizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para a produção de vacinas virais para uso humano (WHO, 2010).

4.1.3 Microcarregadores

Os microcarregadores foram utilizados como suporte para a adesão das células Vero nos cultivos em frascos agitados do tipo Spinner e foram testados dois microcarregadores microporosos (Cytodex 1 e Cytodex 3), ambos comercializados pela GE Healthcare.

As principais características físicas dos microcarregadores testados podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1: Principais características físicas dos microcarregadores Cytodex 1 e 3. Fonte (SCIENCES, 2015).

<i>Característica</i>	<i>Cytodex 1</i>	<i>Cytodex 3</i>
Densidade (g mL ⁻¹)	1,03	1,04
Tamanho (µm)	190	175
Área (cm ² g ⁻¹)	4400	2700
Nº de microcarregadores/g	3,4 × 10 ⁶	3,0 × 10 ⁶

Os dois microcarregadores testados são microesferas microporosas constituídas por uma matriz polimérica de dextrana contendo grupamentos DEAE (N, N-dietilaminoetil). O Cytodex 1 é carregado positivamente, enquanto o Cytodex 3 é recoberto por uma fina camada de colágeno (Figura 16).

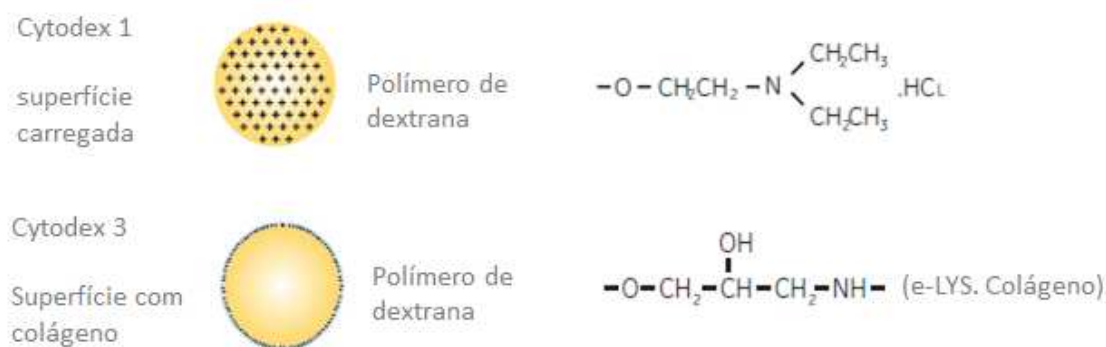


Figura 16: Representação esquemática dos microcarregadores Cytodex. Adaptado de (SCIENCES, 2015).

Os microcarregadores foram utilizados na concentração de 2 g L⁻¹ como suporte para adesão celular nos cultivos agitados em frasco do tipo Spinner. Os microcarregadores foram pesados em tubos cônicos de 50 mL e hidratados com PBS (30 a 50 mL de PBS por grama de microcarregador) por um período de 4 horas. Em seguida, foram lavados mais duas vezes com o mesmo volume de PBS e esterilizados por autoclavação a uma temperatura de 121 °C por 15 minutos. Anteriormente ao uso do microcarregador no cultivo celular, o PBS foi removido por centrifugação e os microcarregadores foram lavados 3 vezes com o meio de cultura em questão.

4.1.4 Meios de Cultivo

Os meios de cultivo testados utilizando a linhagem celular Vero B4 ACC 33 proveniente do banco alemão (DSMZ) foram: RPMI (Cultilab), VP SFM (Invitrogen), Opti PRO SFM (Invitrogen), Opti MEM SFM (Invitrogen), SFM 4 Megavir (GE) e ProVero 1 (Lonza). Somente os meios de cultura Opti MEM SFM (Invitrogen) e ProVero 1 (Lonza) foram selecionados para a continuidade do trabalho com a linhagem celular Vero WHO.

Nos cultivos em frascos agitados do tipo Spinner, o meio de cultivo (Opti MEM SFM) foi suplementado com Pluronic F-68® (Sigma Aldrich) para uma concentração final de uso de 0,01% (m/v).

4.1.5 Solução de Tripsina/Verseno

Nos cultivos da célula Vero B4 ACC 33 (DSMZ), foi utilizada uma solução de trabalho de EDTA na concentração de 0,1% (m/v) em PBS. Esta foi preparada a partir de uma solução estoque aquosa (5% m/v de EDTA e 1% m/v de vermelho de fenol, pH 7,6. Após ajustar o pH da solução de trabalho, ela foi fracionada em alíquotas de 50 mL, esterilizadas a 121 °C por 20 minutos e estocadas à temperatura ambiente. À cada alíquota de foi adicionado um volume 500 µL de solução estoque de tripsina derivada de pâncreas suíno (Gibco Invitrogen) preparada na concentração de 5% (m/v), resultando em uma concentração final de tripsina de 0,05% (m/v).

4.1.6 TrypLE™ Select

Nos cultivos em que foi utilizada a linhagem celular Vero WHO, não foi usada a solução de tripsina/EDTA para a dissociação celular, mas a solução comercial de TrypLE™ Select (Gibco - nº de catálogo: 12563011), que é uma enzima recombinante utilizada para dissociar uma ampla gama de células de mamífero aderentes. Os frascos de TrypLE™ Select foram armazenados de 2 a 8 °C.

4.1.7 Solução Inibidora de Tripsina

A solução inibidora de tripsina de soja (Sigma Aldrich - nº de catálogo: T 6522) foi preparada em meio de cultivo (Opti MEM SFM e ProVero 1), utilizando 1 g de inibidor de tripsina de soja para cada litro de meio de cultura. A solução inibidora de tripsina foi submetida a uma filtração esterilizante e possuía pH $7,4 \pm 0,2$ e osmolalidade de 280 ± 20 mOsm kg⁻¹, sendo armazenada na faixa de 2-8 °C. Esta solução foi utilizada quando o processo de dissociação celular era feito com a solução de TrypLE™ Select.

4.2 SISTEMAS DE CULTIVO

4.2.1 Frascos do Tipo T

Foram utilizados frascos estacionários para cultivo celular do tipo T de 75 e 175 cm² com tampas ventiladas para a cultura da linhagem Vero em monocamada utilizando um volume de trabalho de 40 e 80 mL, respectivamente. A cultura celular foi incubada a uma temperatura de 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂. As células Vero cultivadas em frascos estáticos do tipo T, ao apresentarem 90% de confluência, foram tripsinizadas, ressuspensas em meio de cultura e usadas como inóculo celular inicial para os frascos do tipo *Roller*.

4.2.2 Frascos Rotativos do Tipo *Roller*

As garrafas do tipo *Roller* para cultivo celular de 850 cm² foram usadas com um volume de trabalho de 200 mL a uma rotação de 0,7 RPM, temperatura de 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂. Estas células cultivadas em garrafas *Roller*, ao apresentarem 90% de confluência, foram tripsinizadas, ressuspensas em meio de cultivo e usadas como inóculo celular inicial para os frascos agitados do tipo *Spinner*.

4.2.3 Frascos Agitados do Tipo *Spinner*

Os frascos agitados do tipo *Spinner* (Wheaton® 356879 Celstir® 250 mL) foram usados para a definição das condições de cultivo das células Vero em microcarregadores e na definição das condições de infecção das células em meio de cultivo livre de SFB. Para a agitação dos frascos de cultura foi utilizado um agitador magnético múltiplo com controle de agitação, o qual foi instalado em uma incubadora a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. O volume de trabalho utilizado nos experimentos foi de 250 mL.

4.3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.3.1 Estoque Celular

Inicialmente, as células Vero foram propagadas em frascos do tipo T. Após 48 horas de cultivo, as células foram tripsinizadas e ressuspensas em meio de cultura contendo 20% (v/v) de SFB e dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) 10% (v/v) previamente mantido em banho de gelo. A suspensão celular foi ajustada para uma concentração de $5,0 \times 10^7$ células mL⁻¹ e fracionada em criotubos com capacidade de 1,0 mL. Os criotubos

foram mantidos em um recipiente *Mr. Frosty™ Freezing Container* (Thermo Scientific™ - nº catálogo: 5100-0001) contendo isopropanol dentro de um freezer à -70 °C por 24 horas, proporcionando um congelamento lento das alíquotas. Após esse período, os criotubos foram transferidos para o tanque de nitrogênio líquido a -196 °C, gerando assim os bancos células de trabalho que foram utilizados nos experimentos.

4.3.2 Crescimento Celular

4.3.2.1 Descongelamento e Propagação das Células em Monocamada

O descongelamento das células foi realizado de forma rápida, transferindo o criotubo do banco de trabalho do tanque de nitrogênio líquido imediatamente para um banho maria a 37°C. As células foram transferidas para um tubo cônico estéril de centrifuga contendo 10 mL de meio de cultivo a 37°C e centrifugadas a 220 *g* por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado para a remoção do DMSO e as células foram ressuspensas em um volume apropriado e transferidas para frascos estáticos (garrafas do tipo T), sendo mantidos em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂.

Nos experimentos referentes a primeira adaptação da linhagem celular Vero B4 foram utilizados cinco diferentes meios de cultivo isentos de SFB, os quais, contudo, foram suplementados com SFB, após o estabelecimento de uma monocamada confluenta, os sobrenadantes das culturas foram descartados e a monocamada celular lavada com uma solução de EDTA 0,1% (m/v) acrescida de 0,05 % (m/v) de tripsina. O excesso desta solução tripsina/EDTA foi removido e esta solução foi mantida em contato com as células a 37°C, por aproximadamente 4 minutos ou até o início do desprendimento celular nas garrafas de cultivo, visualizado em microscópio ótico invertido. Os frascos do tipo T foram submetidos a suaves batidas com as mãos para facilitar o desprendimento da monocamada das células aderidas em suas paredes. As células foram ressuspensas em meio de cultivo suplementado com 10% SFB para a inativação da tripsina.

Na segunda adaptação da célula Vero DSMZ, a qual teve como objetivo o estabelecimento de condições de cultivo livre de SFB, o procedimento foi o mesmo que na primeira adaptação até a etapa de neutralização da tripsina. No processo de inativação da tripsina, foi utilizado meio condicionado segregado de cultivos anteriores realizados em condições livres de SFB.

Na adaptação da linhagem Vero WHO, foi utilizada a enzima TrypLE™ Select para dissociação celular e utilizada uma solução inibidora de tripsina de soja ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$) (Gibco) para a neutralização da mesma. Depois de inativar a TrypLE™ e ressuspender as células em meio de cultivo pré-aquecido, foram feitas as contagens das células e um volume da suspensão celular contendo a concentração desejada foi utilizado como inóculo, sendo transferido para novas garrafas de cultura ou para frascos agitados do tipo *Spinner*.

4.3.2.2 Propagação das Células em Microcarregadores em Frascos Agitados do Tipo Spinner

Foram realizados experimentos em frascos agitados do tipo *Spinner* com os microcarregadores Cytodex 1 e Cytodex 3 (GE Healthcare/Amersham Biosciences). Os microcarregadores foram utilizados em uma concentração de 2 g L^{-1} e após a remoção do PBS dos microcarregadores, os mesmos foram lavados com meio de cultura. Os frascos *Spinner* foram acrescidos de 100 mL do meio de cultivo e mantidos a 37°C , sob agitação de 50 RPM , em estufa de 5% de atmosfera de CO_2 por aproximadamente 3 horas antes da adição do inóculo celular, para equilíbrio de pH e temperatura. A concentração de inóculo utilizada foi de $2 - 3 \times 10^5 \text{ células mL}^{-1}$ para cultivo utilizando o Cytodex 1 e $0,6 - 1,2 \times 10^5 \text{ células mL}^{-1}$ para o Cytodex 3.

Após a inoculação, foi utilizado um volume de trabalho de 250 mL e uma velocidade de agitação de 50 RPM . Foram realizadas amostragens diárias para acompanhamento do crescimento celular, produção viral e análise do consumo de glicose e produção de metabólitos.

4.3.2.3 Adaptação das Células ao Crescimento em Meios de Cultivo Livres de Soro Fetal Bovino (SFB)

Inicialmente, a linhagem celular Vero B4 foi adaptada a cinco diferentes meios de cultura suplementados com 10% de soro fetal bovino e posteriormente adaptada a condições livres de soro.

O meio RPMI é o meio onde as células Vero B4 se encontravam (recomendado pelo DSMZ) e os demais são cinco meios de cultura isentos de SFB selecionados para a comparação. Os meios de cultura testados foram: RPMI (Cultilab), VP SFM (Invitrogen),

Opti PRO SFM (Invitrogen), Opti MEM SFM (Invitrogen), SFM 4 Megavir (Hyclone) e ProVero 1 (Lonza).

Na primeira etapa da adaptação das células Vero B4 aos novos meios de cultura, foi utilizada uma técnica clássica que substitui gradualmente o meio de cultura utilizado pelo novo meio de cultura. A cada passagem, 25% do volume do meio usado foi substituído pelo novo meio de cultura. Após cinco passagens, a célula foi considerada adaptada e congelada (confeção do banco de trabalho). Ao final da adaptação com os meios testados, inicialmente suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB), os cultivos foram congelados e produzido seis diferentes bancos de trabalho a partir das respectivas suspensões celulares.

Após a confecção dos bancos de trabalho com as células adaptadas aos novos meios na presença de SFB, foi iniciado um novo processo da adaptação. Com este objetivo, foi feito um descongelamento de cada banco e a cada passagem a concentração do SFB foi reduzida em 50%, até sua completa eliminação na quinta passagem. Cinco diferentes bancos celulares de trabalhos foram produzidos com os meios isentos de soro fetal bovino (SFB), pois o cultivo celular em condições isentas de SFB não foi possível ao ser usado o meio RPMI.

Na primeira passagem, da segunda etapa de adaptação, cada meio de cultura utilizado foi suplementado com 5% de SFB. Diariamente, foram retiradas amostras para a contagem celular (concentração celular) e quantificação de glicose e lactato.

Posteriormente, foi obtida a linhagem Vero dos bancos de células de referência da OMS. Este banco celular foi estabelecido pela OMS no ano de 1987 e foi submetido a testes de controle de qualidade para certificar que eram adequados para uso na produção de vacinas (STAPLES, 2018).

Esta linhagem celular foi obtida da coleção do *European Collection of Animal Cell Cultures* (Vero WHO – ECACC), cujo banco foi produzido pela OMS e depositado não somente na ECACC como também na *American Type Culture Collection (ATCC)* sendo fornecido apenas para os produtores de vacinas virais qualificados. Esta linhagem celular é aceita para a produção e padronização de vacinas virais de uso humano (MENDONÇA; PEREIRA, 1995; WHO, 2010).

Para a adaptação das células Vero WHO aos dois meios de cultura selecionados com as células Vero B4, foi utilizada uma técnica rápida que substitui 50% do meio de cultura na primeira passagem 100% do meio na segunda passagem. Outra técnica direta

também foi utilizada, onde as células foram cultivadas diretamente em 100% do meio novo.

Após cinco passagens, em cada técnica, a célula foi considerada adaptada e foi congelada (confecção de banco de trabalho).

Dois diferentes bancos de trabalho da célula Vero WHO foram produzidos com os meios utilizados nesta etapa, com os seguintes meios de cultura: Opti MEM SFM (Invitrogen) e ProVero 1 (Lonza).

Os resultados foram analisados por uma comparação direta do crescimento celular nos diferentes meios de cultivo, e, como controle, foi utilizado o meio de cultivo Z (GMEM suplementado com 5% de SFB), pois este foi o meio de cultura utilizado para a confecção do banco mestre da célula Vero WHO obtida na ECACC utilizadas neste estudo.

4.3.3 Produção do Vírus Amarílico

Inicialmente foram descongeladas amostras dos dois bancos de células Vero WHO, produzidos com os diferentes meios de cultura (Opti MEM e ProVero 1), e propagadas em monocamada utilizando frascos estáticos para cultivo (frascos do tipo T).

As células Vero foram propagadas utilizando microcarregadores Cytodex 1 e Cytodex 3 (GE Healthcare) em meio livre de soro fetal bovino contendo 0,1% de Pluronic F68 (Sigma Aldrich Co.) (SOUZA et al., 2009).

Os microcarregadores foram utilizados na concentração de 2 g L^{-1} , após a adição das células, o volume de meio era completado a 250 mL mantidos à temperatura controlada, em uma agitação a 50 rpm, pH 7,2 em estufa com 5% de CO_2 .

Com o objetivo de avaliar diferentes variáveis que pudessem influenciar na produção de partículas virais, foi realizado um planejamento experimental, onde foram avaliados: Multiplicidade de Infecção (MOI), Tempo da Infecção (TOI) e Tempo de Colheita (TOH). Estas variáveis foram avaliadas para os dois meios de cultivo selecionados e para as duas temperaturas pós infecção (34 e 37 °C).

Foi realizado um planejamento experimental do tipo fatorial fracionado 2^{3-1} , onde foram realizados seis experimentos para cada meio e cada temperatura, sendo o ponto central realizado em duplicata.

As condições experimentais empregadas para cada meio de cultivo no primeiro experimento de infecção viral são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Condições experimentais do planejamento experimental, utilizando células Vero WHO dois diferentes meios de cultura (Opti MEM e ProVero 1).

Condição	MOI (PFU cél⁻¹)		TOI (dias)		TOH (dias)	
1	0,002	(-1)	3	(-1)	5	(+1)
2	0,002	(-1)	5	(+1)	3	(-1)
3	0,2	(+1)	3	(-1)	5	(+1)
4	0,2	(+1)	5	(+1)	3	(-1)
5	0,1	(0)	4	(0)	4	(0)
6	0,1	(0)	4	(0)	4	(0)

Após a análise dos resultados da primeira infecção foram selecionadas as variáveis: multiplicidade de infecção de 0,002 PFU célula⁻¹, tempo de colheita de 4 dias e diferentes momentos para a infecção (TOI) para os meios testados (5 dias para o OptiMEM e 3 dias para o ProVero 1).

As variáveis selecionadas foram utilizadas para uma segunda infecção na qual foram testadas em frascos do tipo T as duas temperaturas (34 e 37°C) não somente pós infecção com o vírus da febre amarela, como também na fase do cultivo celular.

Ao serem utilizadas garrafas do tipo *Roller* para o cultivo celular, as células Vero WHO adaptadas ao meio de cultura ProVero 1 não foram capazes de aderir à parede da garrafa. Por este motivo, experimentos de infecção utilizando os frascos do tipo *Roller* e frascos agitados do tipo *Spinner* foram conduzidos somente com o meio de cultura Opti MEM.

Adotando as condições selecionadas para o cultivo da célula em meio Opti MEM (MOI de 0,002 PFU célula⁻¹, TOH de 4 dias e TOI de cinco dias) foram testadas três condições de temperatura para a produção do vírus da febre amarela: 34°C, 37°C e a combinação destas duas temperaturas. O processo produtivo selecionado foi o que utilizou a combinação de temperaturas, usando a temperatura de 37°C para a fase de crescimento celular e 34 °C para a infecção e produção viral.

Para avaliar a produção viral para as cepas virais 17DD e 17D 204, frascos do tipo *Spinner* foram inoculados com células Vero WHO e incubados em modo batelada até a infecção viral com as duas cepas vacinais do vírus da febre amarela, para avaliação comparativa da produção de partículas virais para ambas as cepas.

A infecção viral foi realizada utilizando MOI de 0,002 e TOI de 5 dias para o modo batelada e de 4 dias para o modo colheita múltipla. Em todos os experimentos,

houve redução da temperatura de processo de 37 °C para 34 °C no momento da infecção viral até sua colheita.

Após seleção das condições de infecção, avaliou-se a possibilidade de realizar múltiplas coletas de sobrenadante com substituição por meio de cultivo fresco. O volume do sobrenadante colhido no modo batelada foi de 250 mL, ou seja, o volume total de trabalho do frasco agitado do tipo *Spinner*. Por outro lado, no modo de colheita múltipla apenas a última colheita foi do volume total de trabalho, enquanto as colheitas prévias consistiram de 80% do volume de trabalho (200 mL).

A Tabela 3 resume as condições de todos os experimentos realizados.

Tabela 3: Condições dos experimentos realizados com Vero WHO em condições isentas de SFB em frascos T, Roller e frascos agitados.

Sistema de cultivo	célula	Meio	Cepa viral	MC	Inoculo (cél/s µcarregador ⁻¹)	MOI	TOI (dias)	TOH (dias)	Temperatura (°C)	Colheitas
Frasco T										
Infecção 1	WHO	OM/PV	17D 204	Não	Não	0,2/0,1/0,002	3, 4 e 5	3, 4 e 5	34, 37 e 34/37°C	1
Infecção 2	WHO	OM/PV	17D 204/17DD	Não	Não	0,2/0,1/0,002	3, 4 e 5	3, 4 e 5	34, 37 e 34/37°C	1
Roller										
Infecção 1	WHO	OM	17D 204/17DD	Não	Não	0,002	5	5	34, 37 e 34/37°C	1
Fracos Spinner										
1	WHO	OM	Não	1	24_35	0,002	Não	Não	37	Não
2	WHO	OM	Não	1	24_35	0,002	Não	Não	37	Não
3	WHO	OM	17D204	1	24_35	0,002	5	5	37	1
4	WHO	OM	17D204	1	24_35	0,002	5	5	37	1
1	WHO	OM	Não	3	33_50	0,002	Não	Não	37	Não
2	WHO	OM	Não	3	33_50	0,002	Não	Não	37	Não
3	WHO	OM	Não	3	33_50	0,002	Não	Não	37	Não
4	WHO	OM	Não	3	33_50	0,002	Não	Não	37	Não
5	WHO	OM	17D204	3	10_20	0,002	5	5	37	1
6	WHO	OM	17D204	3	10_20	0,002	5	5	37	1
7	WHO	OM	17D204	3	10_20	0,002	5	5	37/34	1
8	WHO	OM	17D204	3	10_20	0,002	5	5	37/34	1
9	WHO	OM	17D204	3	10_20	0,002	4	4 e 5	37/34	2
10	WHO	OM	17D204	3	10_20	0,002	4	4 e 5	37/34	2
11	WHO	OM	17DD	3	10_20	0,002	5	5	37	1
12	WHO	OM	17DD	3	10_20	0,002	5	5	37	1
13	WHO	OM	17DD	3	10_20	0,002	5	5	34	1
14	WHO	OM	17DD	3	10_20	0,002	5	5	34	1
15	WHO	OM	17DD	3	10_20	0,002	4	4 e 5	37/34	2
16	WHO	OM	17DD	3	10_20	0,002	4	4 e 5	37/34	2
17	WHO	OM	17DD	3	10_20	0,002	4	4, 5 e 6	37/34	3
18	WHO	OM	17DD	3	10_20	0,002	4	4, 5 e 6	37/34	3
19	WHO	OM	17D204	3	10_20	0,002	4	4, 5 e 6	37/34	3
20	WHO	OM	17D204	3	10_20	0,002	4	4, 5 e 6	37/34	3
21	WHO	OM	17DD	3	10_20	0,002	4	3, 4, 5, 6 e 7	37/34	5
22	WHO	OM	17D 204	3	10_20	0,002	4	3, 4, 5, 6 e 7	37/34	5

4.3.4 Clarificação

O sobrenadante de cultura coletado das diferentes infecções com o vírus da febre amarela (17DD e 17D 204 RKI) foi clarificado por um processo constituído por duas etapas de centrifugação e uma posterior filtração.

A primeira centrifugação foi feita a 300 *g* a 4 °C durante cinco minutos. Posteriormente, após a transferência do sobrenadante para um novo tubo cônico, foi realizada uma nova etapa de centrifugação a 4 °C e 8 000 *g* por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi então 4 °C e filtrado em membranas de 0,22 µm.

Após o término do processo de clarificação, as suspensões virais foram fracionadas em tubos de centrifuga com aproximadamente 50 mL cada e armazenadas em freezer a -70°C até a sua utilização. Este material foi denominado de suspensão viral (SV).

4.3.5 Estabilidade do Vírus da Febre Amarela

Os açúcares têm um papel destacado como crioprotetores em formulações vacinais um exemplo disto é o uso de um açúcar (sorbitol) como estabilizador amplamente utilizado na produção de vacinas virais, tendo como principal função a de impedir os efeitos deletérios da liofilização (WASSERMAN, 2015).

Por este motivo, foi investigada a adição de sacarose como estabilizador da SV.

Para a análise das variáveis com o objetivo de proporcionar a preservação da maior quantidade de partículas virais (título viral) nas amostras testadas, foi realizado um planejamento experimental, onde foram estudadas duas variáveis: concentração de sacarose (0, 4.25 e 8.5 %) e número de ciclos de congelamento e descongelamento sofridos pelas amostras de SV (2, 3 e 4 ciclos).

A quantificação do título infeccioso das amostras testadas após os ciclos de descongelamento/congelamento foi realizada por titulação e este valor foi comparado com o título da SV que não sofreu ciclo repetido de congelamento/descongelamento.

Foi realizado um planejamento experimental onde foram realizados dez experimentos testando as três concentrações de sacarose e os diferentes números de ciclos de congelamento/descongelamento das amostras, sendo o ponto central realizado em duplicata (Tabela 34).

Tabela 4: Condições experimentais do planejamento experimental, utilizando dois diferentes parâmetros para estabilidade da partícula viral.

Condição	Concentração de sacarose (% m/v)	Número de Ciclos
1	0	2
2	8.5	2
3	0	4
4	8.5	4
5	0	3
6	8.5	3
7	4.25	2
8	4.25	4
9	4.25	3
10	4.25	3

4.3.6 Purificação do Vírus por Técnicas Cromatográficas

Todos os ensaios de cromatografia foram realizados em um sistema de cromatografia líquida ÄKTA Pure 25 (GE Healthcare). A absorbância foi monitorada a um comprimento de onda de 280 nm. Todas as corridas de cromatografia foram realizadas à temperatura ambiente em duplicatas, salvo indicação em contrário.

Para os módulos de membrana adsorviva de celulose (CMA), as membranas de celulose regenerada com tamanho de poro de 1 μm (GE Healthcare) foram cortadas em disco com diâmetro de 25 mm. As membranas foram empilhadas sem telas adicionais em suportes de filtro de aço inoxidável. Foi utilizado um suporte de 25 mm (Whatman) com 15 membranas empilhadas (75 cm^2 de superfície total, 0,28 mL de volume de coluna – CV) os ensaios foram conduzidos a 10 mL min^{-1} (122 cm h^{-1}). A purificação cromatográfica de partículas do vírus da febre amarela foi realizada no modo de ligação e eluição, conforme as seguintes etapas:

- Equilíbrio: a coluna foi lavada com ≥ 10 CV de água ultrapura seguido de ≥ 10 CV de tampão de equilíbrio. O tampão de equilíbrio utilizado foi o Tris (50 mM de Tris-HCl, 150 mM de cloreto de sódio, pH 7,4).
- Injeção de amostra: a amostra contendo PEG-6000 foi alimentada ao leito de membranas e seguiu-se um passo de lavagem com tampão de equilíbrio até a absorbância retornar a um valor basal.

- c) Eluição: a recuperação de partículas virais foi realizada reduzindo a concentração de PEG na fase móvel até 0% (eluição gradual em gradiente).

Inicialmente, foram testadas três concentrações do PEG 6000: 6, 8 e 10%, e as corridas cromatográficas foram realizadas à temperatura ambiente em duplicatas.

4.4 METODOLOGIA ANALÍTICA

4.4.1 Determinação da Concentração Celular

A contagem de células foi realizada utilizando o contador automático Vi-Cell, que opera de forma automática a contagem segundo o método de exclusão de trypan com o corante azul (SANFORD et al., 1951).

4.4.2 Determinação da Concentração de Células nos Microcarregadores

Nos cultivos celulares usando os microcarregadores, a concentração de células foi determinada empregando o método de coloração de núcleos com cristal violeta (DOYLE & GRIFFITHS, 1998).

Diariamente foram retiradas amostras de 1 mL dos experimentos e transferidas para microtubo de 1,5 mL. As amostras eram submetidas a um processo de centrifugação por 15 minutos a 100 g. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e adicionado o mesmo volume de uma solução de cristal violeta 0,1% (m/v) em ácido cítrico 0,1 M. Após a homogeneização, as amostras foram incubadas a 37°C durante uma hora. A contagem de núcleos corados com o cristal violeta foi realizada ao microscópio em câmara de Neubauer, após a diluição da amostra.

4.4.3 Concentração de Nutrientes e Metabólitos

A análise da concentração de glicose e lactato foi realizada nos sobrenadantes dos cultivos. As amostras das culturas foram centrifugadas durante 3 minutos a 100 g para análise dos sobrenadantes são analisados e as células foram posteriormente descartadas.

Na adaptação das células Vero B4, as análises das concentrações de glicose e lactato nos sobrenadantes foram determinadas utilizando o analisador bioquímico 2700 Select (YSI) imediatamente após a centrifugação das amostras. Este equipamento se baseia no uso de biosensores com glicose oxidase e lactato oxidase imobilizadas para a determinação da concentração de glicose e de lactato, respectivamente.

Na adaptação das células Vero WHO foram analisados as concentrações de glutamina, glutamato, glicose, lactato e amônio. As concentrações de nutrientes e metabólitos nos sobrenadantes foram determinadas com o analisador bioquímico BioProfile 100 Plus (Nova Biomedical) imediatamente após a centrifugação das amostras.

Para a determinação da concentração de amônio presente no meio de cultivo, o equipamento usa um eletrodo potenciométrico. Estes potenciômetros medem íons carregados e possuem uma membrana sensível seletiva ao íon que está sendo medido. O potencial de membrana é diretamente proporcional ao logaritmo da concentração do amônio no meio de cultura.

Na determinação das concentrações de glutamina, glutamato, glicose e lactato o equipamento usa dispositivos que possuem enzimas imobilizadas em suas membranas permeáveis. Na presença de oxigênio e do substrato a ser medido, estas membranas enzimáticas produzem peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é então oxidado num anodo de platina mantido a um potencial constante. O fluxo resultante de elétrons e a alteração da corrente é proporcional à concentração do analito na amostra.

4.4.4 Título Viral

A quantificação dos títulos virais foi realizada pela contagem do número de placas de lise produzidas em monocamadas de células PS (epitélio renal de porco). Com este objetivo foram usadas placas de 24 orifícios, com células semeadas em meio Z à densidade de 3×10^5 células cm^{-2} , e imediatamente infectadas com diluições seriadas das amostras do vírus da febre amarela.

Para a infecção, foram feitas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-8}) da suspensão viral em meio de cultura e inoculação de 200 μL das diluições 10^{-2} a 10^{-7} , com uma incubação de 4 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 . Após a incubação foi adicionado 0,4 mL de meio Z contendo 1,6% (m/v) de CMC em cada orifício da placa de cultura, incubando-se por 4 dias, sob as mesmas condições.

Após este período, as células infectadas foram fixadas com 600 µL de uma solução de formaldeído 3,7% (v/v) em PBS por no mínimo 1 hora e coradas com Naphtol blue black 0,1% (m/v).

Após secagem, as placas de lise formadas na monocamada dos orifícios da placa foram contadas e os títulos virais calculados (CAUFOUR et al., 2001).

4.4.5 Quantificação de DNA

A concentração de DNA residual de células hospedeiras na forma de DNA de cadeia dupla (dsDNA) foi determinada usando o kit comercial Quant-iT™ PicoGreen® (Life Technologies) que é baseado em uma tecnologia fluorimétrica, usando corantes, que apresentam fluorescência quando ligados ao DNA de fita dupla. A curva padrão foi feita com DNA de bacteriófago lambda ou DNA de timo de bezerro (Promega) na faixa de 4 - 1000 ng mL⁻¹. Para a realização do ensaio foram seguidas as instruções do fabricante.

4.4.6 Quantificação de Proteínas Totais

A concentração do teor de proteína total foi determinada pelo método de Bradford usando o kit comercial Bradford BioRad protein assay (denominado doravante "Bradford" – BioRad), que é baseado na utilização do azul brilhante de *Coomassie*, possuindo faixa de detecção entre 20 e 2000 µg mL⁻¹ de proteína, utilizando albumina do soro bovino (BSA) como padrão. O reagente azul brilhante de *Coomassie*, ao reagir com as proteínas presentes na amostra, causa uma visível mudança de coloração, inicialmente castanha, para tons de azul, conforme a concentração de proteínas. Esta mudança de coloração é quantificada a 595 nm. Para a realização do ensaio foram seguidas as instruções do fabricante.

4.4.7 Medição de Distribuição de Tamanho da Partícula Viral

A distribuição de tamanho de partícula (PSD do termo em inglês *particle size distribution*) foi determinada baseada em um método diferencial de sedimentação centrífuga (DCS do termo em inglês *Differential Centrifugal Sedimentation*) descrito anteriormente por Pieler e colaboradores (PIELER et al., 2017).

Para a determinação da distribuição de tamanho das partículas virais produzidas foi utilizada uma centrífuga de disco CPS DC24000 UHR (CPS Instruments Inc., LA, EUA)

a 24000 rpm com um gradiente de sacarose de 4-16% (m/v) em tampão de diálise. O gradiente consistiu em nove fases de 1,6 mL, com concentrações de 16%, 14,5%, 13%, 11,5%, 10%, 8,5%, 7%, 5,5% e 4% de sacarose (m/v), com um volume total de 14,4 mL. Após a injeção do gradiente, sua qualidade foi avaliada pela injeção de um padrão de partículas de 239 nm (CPS Instruments Inc., LA, EUA). Em seguida, o gradiente foi equilibrado durante 10 min, seguido por outra injeção padrão de partículas de 239 nm para calibração. Finalmente, 100 µL de amostra foi injetado para as medições de PSD da suspensão viral e das amostras dos ensaios de cromatografia.

4.4.8 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Utilizando Dodecil-Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

As amostras foram incubadas com solução tampão Tris-HCl 60 mM, contendo SDS 2%, DTT 0,25 mM (ditiotreitól), glicerol 25% e azul de bromofenol 0,1%, pH 6,8 e fervidas por 5 minutos.

Em seguida, foram aplicados 15 µL de cada amostra em cada raia do gel de poliacrilamida 4-12% NuPAGE® Novex (Life Technologies). Para as estimativas de massa molecular (MM) foram utilizados os padrões protéicos Precision Dual Color (Bio-Rad) cujos valores de MM são 25.000, 35.000, 40.000, 55.000, 70.000, 100.000, 130.000 e 180.000 Da.

A corrida eletroforética foi realizada no sistema XCell SureLock da Invitrogen, com voltagem fixa de 200 V, corrente elétrica de 60 mA e potência de 10 W, com duração de 45 minutos. A revelação foi realizada de acordo com o método de Blum et al. (1987) de impregnação por nitrato de prata. Após coloração, o gel foi digitalizado.

4.4.9 Determinação do perfil de Glicosilação do Vírus da Febre Amarela

O vírus da febre amarela foi produzido em frascos agitados do tipo *Spinner* com temperatura, agitação e pH monitorados. Após a produção das partículas virais, foi utilizada a cromatografia de exclusão estérica (SXC) para purificação do vírus.

Os perfis de N-glicosilação das duas cepas virais de febre amarela foram avaliados seguindo o protocolo adotado no Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares

(LECC) do PEQ/COPPE/UFRJ, com base em técnica desenvolvida pelo Dr. José Cremata, do Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB, Cuba).

O vírus purificado foi desnaturado por aquecimento da amostra e digerido com a enzima PNGase F para a separação da porção glicídica das partículas do vírus amarelo. Após a separação, os glicanos foram derivatizados com o fluoróforo 2AB e separados por interação hidrofílica de alto desempenho (HILIC-HPLC). A coluna cromatográfica de HILIC possui grupos funcionais polares que interagem com grupos hidroxila dos glicanos. A amostra contendo os glicanos-2AB foi injetada em uma elevada concentração de solvente orgânico, sendo adsorvidos à superfície da coluna e eluídos em um gradiente aquoso. Desta forma, os glicanos são removidos a partir da coluna e separados com base na sua hidrofiliicidade. Um esquema ilustrando o protocolo é mostrado na Figura 17 e mais detalhes sobre cada etapa são fornecidas a seguir.

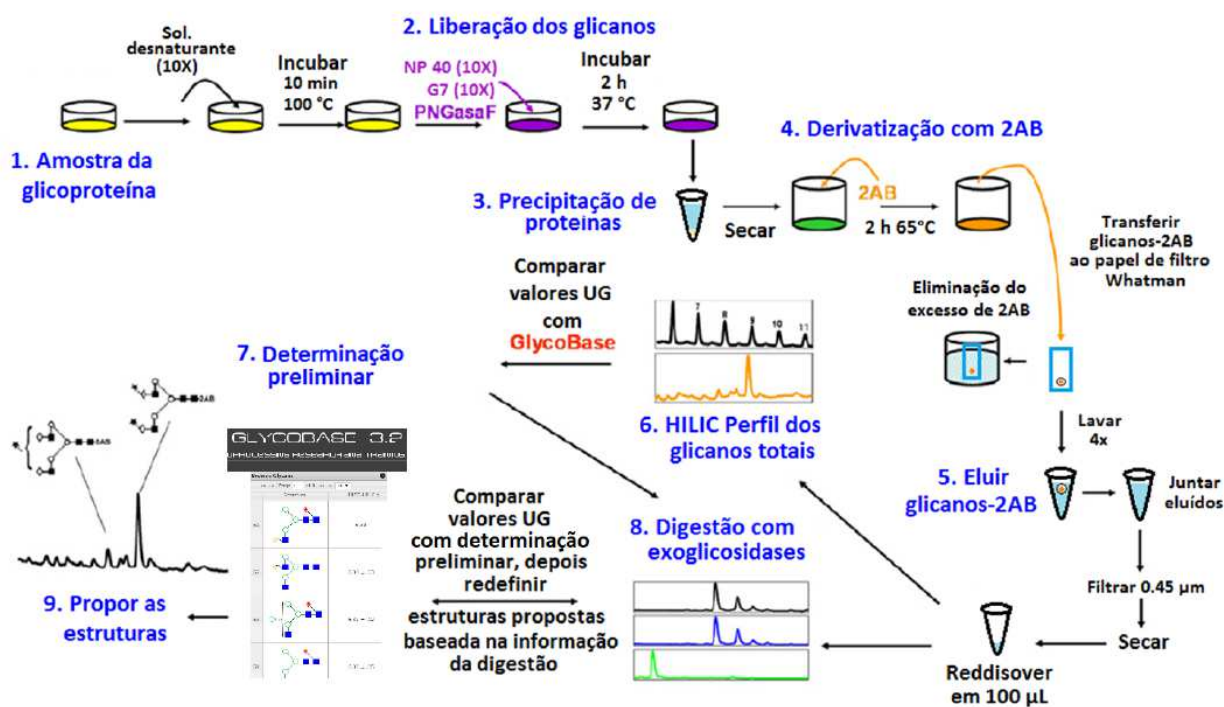


Figura 17: Preparo das amostras para análise de N-glicosilação: liberação dos glicanos com PNGase F, derivatização com 2AB e análise por HILIC-HPLC para propor estruturas com base na GlycoBase 3.2.4. Fonte: (ARIZA, 2017).

4.4.9.1 Clivagem dos Glicanos com PNGase F

A enzima PNGase F cliva a ligação entre o núcleo GlcNAc e o resíduo asparagina de todas as classes de N-glicanos (complexos, híbridos e alta manose), à exceção de N-

glicanos específicos que contêm fucose α (1,3) ligada ao resíduo GlcNAc ligado à proteína (frequentemente encontrados em glicoproteínas de plantas e insetos) (MARIÑO et al., 2010). No presente estudo, os glicanos foram liberados da cadeia polipeptídica, processando-se 300 μ g da suspensão viral (SV) purificada em tampão fosfato 0,1M pH 7 com o kit de deglicosilação (Biolabs, #P0705L). As amostras virais purificadas foram transferidas para um microtubo, onde foram colocados 10 μ L de solução desnaturante (10X) (Biolabs, # B1704S). Na sequência, as amostras foram incubadas por 10 min a 100°C sem agitação e depois incubadas por mais 10 min à temperatura ambiente. Depois, foi adicionado 10 μ L da solução NP-40 (10X) (Biolabs # B2704S), 10 μ L da solução G7 (10X) (Biolabs, # B3704S), e os N-glicanos foram clivados pela adição de 1 μ L de PNGase F 500 U/mL (Biolabs, # P0705L) e incubação durante 2 h a 37°C sem agitação.

Foi preparada uma amostra de 20 μ L, nesta continha 300 μ g de uma IgG de soro humano comercial (>95% pura, Sigma-Aldrich # 14506) como controle positivo para a análise do perfil de glicosilação. Esta amostra foi preparada com mesmo procedimento que as amostras das SV purificadas.

4.4.9.2 Precipitação das Proteínas e Recuperação dos Glicanos

Para a precipitação das proteínas foi usado um volume de etanol a -20°C na razão de 3 vezes o volume final da reação na etapa de clivagem com a PNGase F, nas amostras virais em estudo foi utilizado um volume final de 270 μ L enquanto na IgG controle foi 150 μ L. Este volume foi adicionado e os microtubos foram incubados por 15 min a -20°C. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 10000 *g* por 10 min e o precipitado foi lavado com 200 μ L de etanol a -20°C. Esta etapa foi repetida por mais duas vezes e os sobrenadantes contendo os glicanos, oriundos das repetidas etapas, foram combinados. Os glicanos liberados pela ação da PNGase F foram secos em concentrador centrífugo a vácuo sem aquecimento (Eppendorf) durante a noite.

4.4.9.3 Derivatização com 2-aminobenzamina (2AB) e eliminação do excesso do 2AB

As amostras analisadas por HILIC-HPLC foram derivatizadas com 2-aminobenzamida (2AB), doravante denominada 2AB. Foi adicionado um volume de 5 μ L da solução de 2AB (Sigma-Aldrich, Catálogo # A89804) em cada microtubo com as amostras dos N-glicanos secos na etapa anterior. As amostras foram ressuspensas,

centrifugadas e incubadas por 2 h a 65°C sem agitação. Para garantir a completa derivatização dos glicanos liberados para uma posterior quantificação é usualmente utilizado um excesso do marcador de fluorescência. Este excesso de 2AB foi removido utilizando cromatografia de papel (Papel filtro Whatman No.1, Whatman®). Este papel de filtro foi previamente cortado em fitas de 10 cm de comprimento por 20 cm de altura e as tiras foram lavadas 3 vezes com água ultrapura e secas a 50°C em estufa.

As fitas foram identificadas com lápis e as amostras aplicadas com uma micropipeta de 10 µL. A mistura glicano-2AB foi aplicada a aproximadamente 2 cm da extremidade inferior da fita de papel. As amostras foram secas com um secador de cabelos após cada aplicação. Depois de secas, as fitas foram colocadas em capela de exaustão, de forma vertical em becher de vidro contendo acetonitrila (o ponto de aplicação da amostra estava acima do nível da acetonitrila) e mantidas por 2 horas para a eliminação do excesso do 2AB.

Foi observada na extremidade superior da fita de papel uma mancha do excesso do fluoróforo (2AB) com a ajuda de uma lâmpada UV no final da separação. Depois da separação, as fitas foram secas por 30 minutos à temperatura ambiente em uma capela de exaustão. O local onde a amostra foi previamente aplicada, marcado com lápis sob iluminação de uma lâmpada UV, foi cortado e os fragmentos do papel foram transferidos para microtubos de 1,5 mL. Nos microtubos contendo os fragmentos do papel, foi adicionado 500 µL de água ultrapura para a eluição dos glicanos por meio de incubação à temperatura ambiente por 10 min (sem agitação). O eluído foi transferido para um novo microtubo e foi adicionado novamente, ao tubo contendo o fragmento de papel, 500 µL de água ultrapura e este procedimento foi repetido mais uma vez, totalizando três repetições.

Para cada amostra, eluatos foram unidos (*pool*) e este *pool* foi filtrado utilizando um filtro de 0,45 µm (Millipore) acoplado a uma seringa. Depois, os glicanos derivatizados com 2AB foram secos em concentrador centrífugo a vácuo sem aquecimento (Eppendorf) durante a noite. As amostras foram posteriormente dissolvidas com 100 µL de água ultrapura. A solução de glicanos marcados com 2AB foi armazenada a -20°C até o momento da injeção no HPLC.

4.4.9.4 Análise dos Glicanos por HILIC-HPLC

4.4.9.4.1 Preparo das Amostras para Injeção

Para o preparo das amostras de glicanos foi feita uma mistura de 40 μ L da solução de glicanos marcados com 2AB e 160 μ L de acetonitrila 100 % (filtrada). Esta mistura então foi colocada em um microtubo de 1,5 mL e homogeneizada de forma suave com as mãos. Neste momento, a mistura foi transferida para um frasco 12×32 mm (Waters), com cuidado para evitar a formação de bolhas de ar e posteriormente injetada no HPLC (200 μ L).

Para o preparo da amostra do *ladder* de dextrana hidrolisada marcada com o fluoróforo (2AB), adicionou-se 240 μ L de acetonitrila 100% (filtrada), 57 μ L de água ultrapura e 3 μ L do *ladder* de dextrana-2AB. A mistura foi transferida para um frasco 12×32 mm (Waters), com cuidado para evitar a formação de bolhas de ar e posteriormente injetada no HPLC (200 μ L).

4.4.9.4.2 Preparo do Sistema HILIC-HPLC

Foi utilizada a coluna TSKgel Amide-80 de 5 μ m (25.0 cm x 4.6 mm) (TOSOH BIOSCIENCE, Catálogo #13071). Esta coluna foi acondicionada em 100% de acetonitrila por 1 h a 30°C e a análise foi realizada no sistema de HPLC com detecção de fluorescência (módulo RF-10AXL, Prominence, Shimadzu) e um tempo de corrida de 162 minutos. Os comprimentos de onda de excitação e emissão utilizados foram de 330 e 420 nm, respectivamente. Uma solução de formiato de amônio 50 mM em pH 4,4 foi utilizada como tampão A e acetonitrila como tampão B.

Entre as corridas cromatográficas das amostras, o sistema foi calibrado com o *ladder* de dextrana-2AB. Este é um homopolímero de glicose obtido por hidrólise ácida de dextrana, resultando em homopolímeros entre 1 - 22 resíduos de glicose. Depois da obtenção do perfil do *ladder*, os tempos de retenção destes homopolímeros de diferentes tamanhos foram usados para calibrar os valores expressos como unidade de glicose (UG). Na sequência, os tempos de retenção dos picos dos glicanos foram convertidos em UG usando o software Glyco 2 (este software foi desenvolvido pelo Dr. Cremata do CIGB, Cuba).

O valor UG do pico do glicano está diretamente relacionado à estrutura do mesmo. Os glicanos foram propostos com base nos valores experimentais de UG e nos valores de

UG presentes na Glycobase 3.2.4
(<https://glycostore.org/displayCollection/Published%20Glycans>).

Na análise do perfil global do N-glicanos liberados (PNGase F) das amostras virais tratadas, os dados das corridas cromatográficas foram usados e foi determinado o tempo de retenção, a área do pico correspondente a cada espécie de glicano e a área total dos picos dos cromatogramas das duas cepas vacinais do vírus da febre amarela (17DD e 17D 204 RKI).

Com os resultados obtidos, foram avaliadas as glicoformas das proteínas virais de interesse, com base nos dados depositados na “Glycobase 3.2.4”, para a proposição das possíveis estruturas glicosiladas presentes na amostra.

Para os métodos baseados em HILIC-HPLC, os tempos de retenção ou valores de UG sozinhos, em geral, não são suficientes para a identificação das estruturas dos glicanos, uma vez que diferentes estruturas possíveis podem corresponder a um determinado valor de UG.

4.4.9.4.3 Digestões Sucessivas com Exoglicosidases

Uma nova análise foi feita, utilizando um conjunto de enzimas exoglicosidases para promover digestões sequenciais prévias dos glicanos, que então foram analisados para confirmar o tipo de monossacarídeos e ligação de resíduos de açúcar.

Cada exoglicosidase possui uma diferente especificidade (Figura 18), resultando na clivagem de um monossacarídeo distinto. As enzimas usadas foram (com os tipos de ligação que clivam entre parênteses): ABS, sialidase de *Arthrobacter ureafaciens* (α 2-3,6,8 ácido siálico); BKF, α -fucosidase de rim bovino (α 1-2,3,4,6); BTG, β -galactosidase de testículos bovinos (β 1-3,4,6) ou SPG, β -galactosidase de *Streptococcus pneumoniae* (β 1-4); JBH, β -N-acetil-hexosaminidase de *Canavalia ensiformis* (β 1-2,3,4,6) ou GUH, β -N-acetil-hexosaminidase de *Streptococcus pneumoniae* expressada em *E. coli* (GlcNAc β 1-2,4,6); JBM, α -manosidase de *Canavalia ensiformis* (α 1-2,3,4,6). Todas as enzimas foram obtidas da empresa Prozyme (Reino Unido).

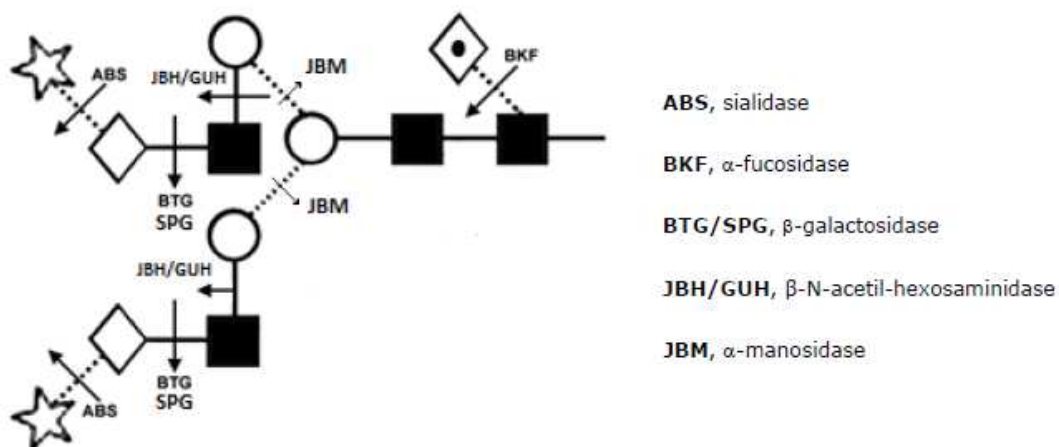


Figura 18: Especificidade de corte das exoglicosidases usadas nas amostras de glicanos. Fonte: (ARIZA, 2017).

4.4.9.4.4 Preparo da Mistura de Reação

Para o preparo da mistura de reação da digestão sequencial com as exoglicosidases foram usados seis tubos de 200 μ com um volume final de 20 μ L por digestão. Foi utilizado 10 μ L dos glicanos marcados com 2AB por digestão (5 ao total) a realizar e de uma amostra controle (não digerida). O volume total de cada tubo foi de 20 μ L (10 μ L de amostra mais 10 μ L de enzima), exceto na reação com manosidase, em que seu volume final foi de 24 μ L. O tampão acetato de sódio 500 mM pH 5,0 foi usado para todas as enzimas e a única exceção foi para a exoglicosidase JBM, onde foi utilizado o tampão fornecido no kit.

Depois da adição de todos os reagentes e amostras dos glicanos nos tubos, as misturas foram homogeneizadas em vórtex e centrifugadas. Estas amostras foram incubadas por 16 h a 37°C. Para a digestão com a manosidase, mais 4 μ L da enzima foram adicionados e incubados à mesma temperatura por mais 18 h.

4.4.9.4.5 Remoção das Enzimas Após Digestão

Após a digestão com as exoglicosidases, as enzimas foram removidas utilizando filtros Amicon Micropure-EZ (Millipore, # 42530). Os filtros foram previamente lavados com 200 μ L de água ultrapura, centrifugados a 18000 *g* durante 10 min a 10 °C. Após a lavagem, 20 μ L da amostra foram aplicados no meio do filtro e os dispositivos foram

centrifugados a 18000 *g* por 10 min. Na sequência, 100 µL de água ultrapura foi adicionada ao filtro e os dispositivos foram centrifugados novamente a 18000 *g* por 10 min a 10 °C. Em seguida, as amostras foram secas em concentrador centrífugo à temperatura ambiente, por aproximadamente 3 h. A solução de glicanos foi armazenada a -20°C até o momento da injeção no HPLC.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CULTIVO DE CÉLULAS VERO A MEIOS ISENTOS DE SORO ANIMAL

Com o objetivo de desenvolvimento de novos produtos e processos voltados para área de saúde humana, é de suma importância que o cultivo de células animais usadas nestes processos seja desenvolvido em meios de cultura isentos componentes de origem animal (GENZEL *et al.*, 2006 e WHO, 2010). Nesta seção, cinco meios de cultivo comerciais livres de soro ou livres de proteínas de origem animal foram testados para adaptação e crescimento da linhagem celular Vero, usando diferentes protocolos, citados na literatura ou recomendados pelos fabricantes dos meios de cultura. O principal objetivo dos experimentos foi a seleção de meios de cultura nos quais a célula Vero, fosse capaz de crescer aderida aos microcarregadores sem a necessidade de suplementação do meio de cultivo com SFB e de produzir elevados títulos do vírus da febre amarela.

5.1.1 Adaptação da Linhagem Celular Vero-B4 (DSMZ) a Meios Isentos de Soro Animal

Inicialmente, a linhagem celular empregada Vero-B4 (DSMZ ACC 33) foi obtida da coleção do DSMZ (*Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*), sendo que o meio de cultura utilizado na manutenção desta linhagem pela DSMZ, era o RPMI suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino (SFB).

Com o objetivo de desenvolver um processo baseado em meio isento de componentes de origem animal, esta linhagem celular foi adaptada a diferentes meios de cultivo: VP SFM (Invitrogen), Opti PRO SFM (Invitrogen), Opti MEM SFM

(Invitrogen), SFM 4 Megavir (Hyclone) e ProVero 1 (Lonza). Como controle, o mesmo procedimento foi realizado com o meio RPMI (Cultilab) recomendado pela DSMZ.

Ao final da primeira etapa do processo de adaptação, utilizando os meios testados meios testados, inicialmente suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB), foram congelados, após cinco passagens nos novos meios, bancos de trabalho da célula Vero em cada meio de cultivo.

Manteve-se inicialmente o uso de soro fetal bovino no meio de cultura, pois o mesmo possui diversas funções importantes, como auxiliar na adesão celular à superfície e fornecimento de fatores de crescimento e hormônios que promovam a proliferação celular.

Para a adaptação inicial das células Vero aos meios de cultivo foi utilizada uma técnica clássica que substitui a cada passagem 25% do meio de cultura em uso pelo novo meio de cultura.

Os resultados foram analisados por uma comparação direta da concentração celular obtida nos diferentes meios de cultivo ao longo das primeiras cinco passagens para a adaptação aos novos meios de cultivo suplementados com 10% de SFB. Os perfis de concentração de glicose, lactato e concentração celular são mostrados na Figura 19.

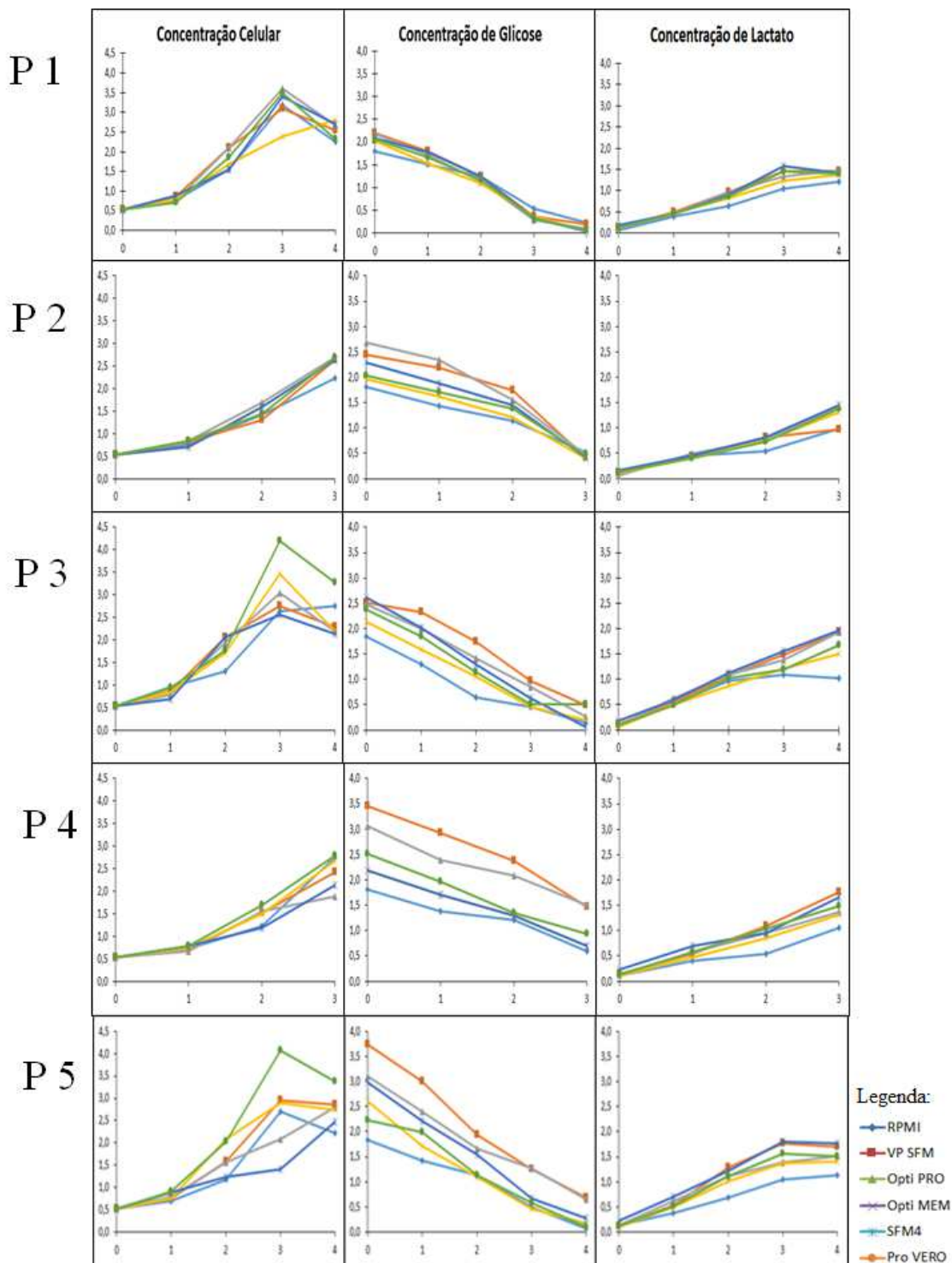


Figura 19: Adaptação das células Vero B4 a diferentes meios de cultura suplementados com 10% SFB. P1) Primeira Passagem. P2) Segunda Passagem. P3) Terceira Passagem. P4) Quarta Passagem e P5) Quinta Passagem. A primeira coluna mostra os dados de concentrações de células totais, enquanto na segunda os de concentração de glicose (g L⁻¹) e na terceira de lactato (g L⁻¹).

Após a confecção dos bancos de trabalho com as células adaptadas aos novos meios na presença de SFB, foi iniciado com as células oriundas dos bancos uma nova

etapa de adaptação, desta vez a crescimento no respectivo meio de cultura livre de SFB. Com este objetivo, havia troca completa de meio a cada passagem e a concentração do SFB era reduzida em 50% a cada passagem, até sua completa eliminação na quinta passagem. Cinco diferentes bancos celulares de trabalhos foram produzidos com os meios testados, com os cinco meios isentos de soro fetal bovino (SFB).

Na primeira passagem, cada meio de cultura utilizado foi suplementado com 5% de SFB. Diariamente, foram retiradas amostras para a contagem celular (concentração celular) e quantificação de glicose e lactato. Os resultados podem ser encontrados na Figura 20, na qual pode ser observado o perfil de crescimento celular, os níveis de glicose e lactato na primeira passagem da linhagem Vero B4 nos diferentes meios de cultura.

Nesta passagem, os meios ProVero1, Opti MEM e VP SFM se destacaram. O meio de cultura VP SFM apresentou a maior concentração celular dentre os meios testados ($3,8 \times 10^5$ céls cm^{-2}) no terceiro dia. Por outro lado, a maior concentração de lactato foi de $2,2 \text{ g L}^{-1}$ no terceiro dia utilizando o meio de cultivo SFM4 Megavir. Concentrações de lactato, segundo a literatura, podem se tornar inibitórias as células a partir de $2,0 \text{ g L}^{-1}$ (OZTURK; RILEY; PALSSON, 1992).

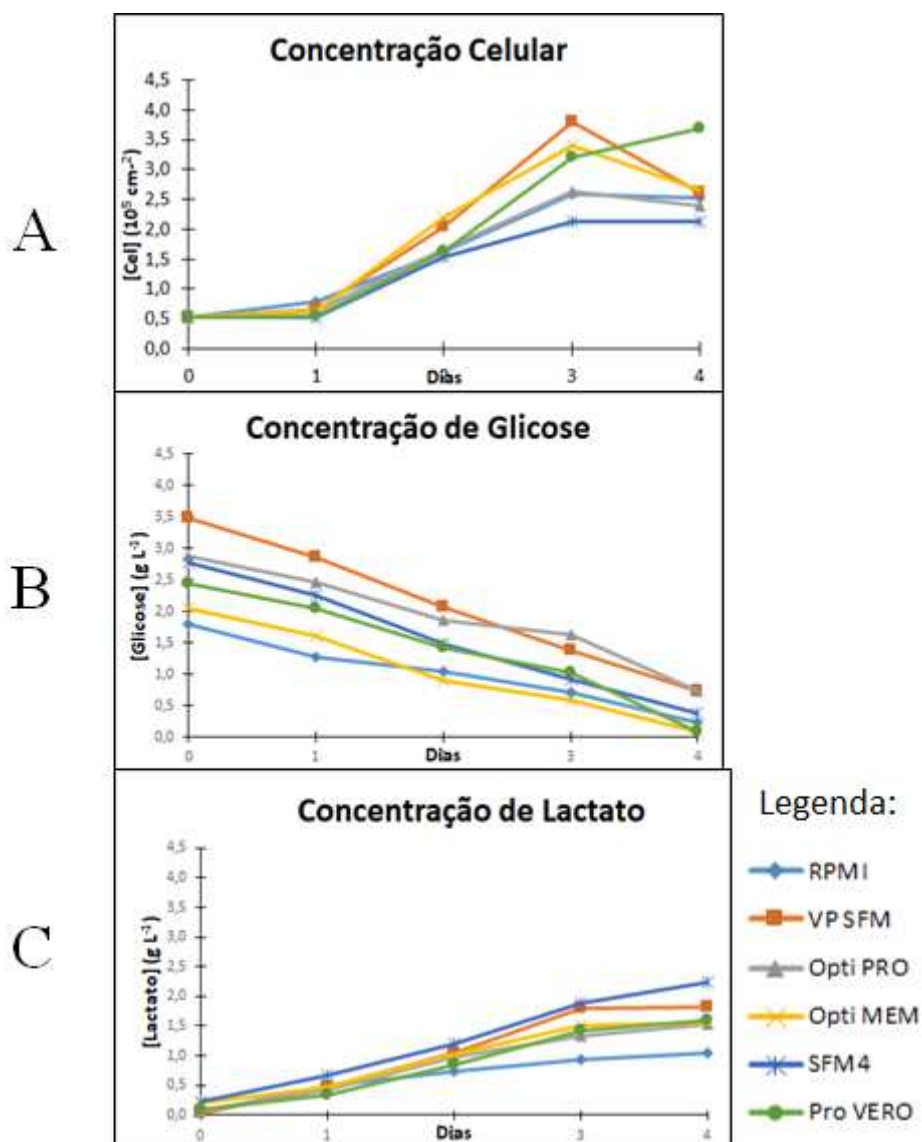


Figura 20: Adaptação das células Vero B4 a condições livres de SFB em frascos T - Primeira passagem (5% SFB). (A) concentração celular (10^5 céls cm^{-2}), (B) concentração de glicose (g L^{-1}) e (C) concentração de lactato (g L^{-1}).

Pode ser notado que a maioria dos meios utilizados apresentou perfis passa por um máximo no dia 3 nesta primeira passagem, sendo a única exceção o meio de cultura Pro Vero 1, em que não ocorreu redução na concentração celular após o terceiro dia de cultura. Na Tabela 5 pode se encontrar um resumo dos dados importantes dos cultivos nos diferentes meios na primeira passagem deste novo processo de adaptação celular.

Tabela 5: Adaptação das células Vero B4 a condições livres de SFB em frascos T -Primeira passagem (5 % SFB).

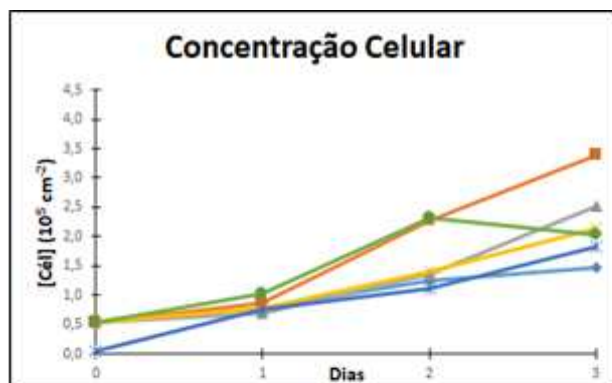
<i>Meios</i>	<i>[Xv Máx]</i>	μ_{exp} (d ⁻¹)	<i>Glicose (g L⁻¹)</i>		<i>Lactato (g L⁻¹)</i>
	(10 ⁵ cels cm ⁻²)		[Inicial]	[Final]	[Final]
RPMI	2,6	0,6	1,8	0,2	1,1
VP SFM	3,8	0,9	3,5	0,7	1,8
Opti Pro	2,6	0,7	2,9	0,7	1,5
Opti MEM	3,4	0,8	2,1	0,1	1,6
SFM4 Megavir	2,1	0,7	2,8	0,4	2,2
ProVero 1	3,7	0,9	2,5	0,1	1,6

Na segunda passagem do processo de adaptação, a concentração de SFB foi reduzida a 2,5%, mediante troca completa do meio de cultivo. A Figura 21 mostra os resultados da segunda passagem do novo processo de adaptação celular.

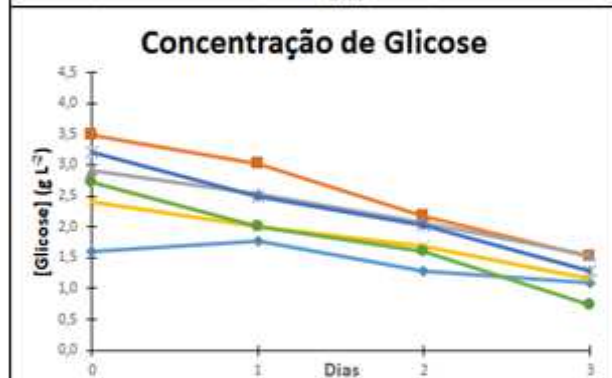
Nesta passagem, o meio de cultura que propiciou o melhor crescimento celular foi novamente o VP SFM, com $3,4 \times 10^5$ céls cm⁻². As concentrações de lactato ao longo do cultivo chegaram a uma concentração máxima na faixa de 0,46 a 1,9 g L⁻¹. Para glicose, a concentração inicial era diferente nos vários meios e, no 3º dia, a concentração observada estava na faixa de 0,7 a 1,5 g L⁻¹.

A partir dos resultados obtidos, foi calculada a taxa específica de crescimento celular (μ_{exp}), a qual foi determinada na fase exponencial de crescimento.

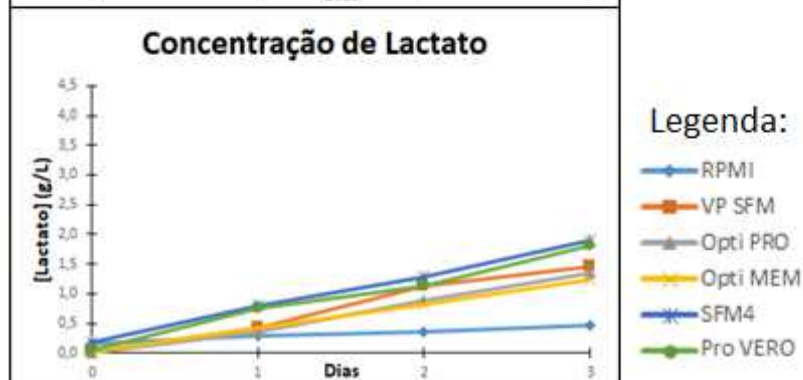
A



B



C



Legenda:

- RPMI
- VP SFM
- ▲— Opti PRO
- ★— Opti MEM
- ✱— SFM4
- Pro VERO

Figura 21: Adaptação das células Vero B4 a condições livres de SFB em frascos T - Segunda passagem (2,5% SFB). (A) concentração celular ($10^5 \text{ céls cm}^{-2}$), (B) concentração de glicose (g L^{-1}) e (C) concentração de lactato (g L^{-1}).

Na Tabela 6, podem ser observados os diferentes valores das concentrações celulares máximas dos meios testados, a taxa específica de crescimento, a concentração de glicose (inicial e final) e a concentração final de lactato.

Tabela 6: Adaptação das células Vero B4 a condições livres de SFB em frascos T - Segunda passagem (2,5 % SFB).

Meios	[Xv Máx]	μ_{exp}	Glicose (g L⁻¹)		Lactato (g L⁻¹)
	(10⁵ cels cm⁻²)		[Inicial]	[Final]	[Final]
RPMI	1,5	0,3	1,6	1,1	0,5
VP SFM	3,4	0,7	3,5	1,5	1,5
Opti Pro	2,5	0,6	2,9	1,5	1,4
Opti MEM	2,1	0,5	2,4	1,2	1,2
SFM4 Megavir	2,1	0,4	3,2	1,3	1,9
ProVero 1	2,3	0,3	2,7	0,7	1,8

Na terceira passagem avaliada, o meio de cultura continha 1,25% de SFB. O meio de cultura VP SFM novamente propiciou maior concentração celular, como pode ser observado na Figura 22.

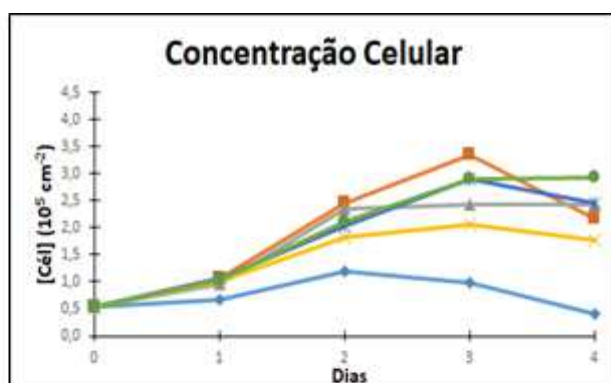
O meio de cultivo VP SFM apresentou uma maior concentração celular, com $3,4 \times 10^5$ céls cm⁻² no dia 3, e a maior concentração de lactato foi de 2,2 g L⁻¹ com o meio de cultura SFM4 Megavir no dia 4, conforme mostrado na Tabela 7.

Nesta passagem os meios de cultura VP SFM e o SFM4Megavir apresentaram concentrações de lactato superiores a 2,0 g L⁻¹, esta concentração pode ser inibitória ao crescimento da célula Vero. Por outro lado, estes meios foram os que apresentaram maiores valores de taxa específica de crescimento (μ_{exp}). Estes resultados podem ser observados na Tabela 7.

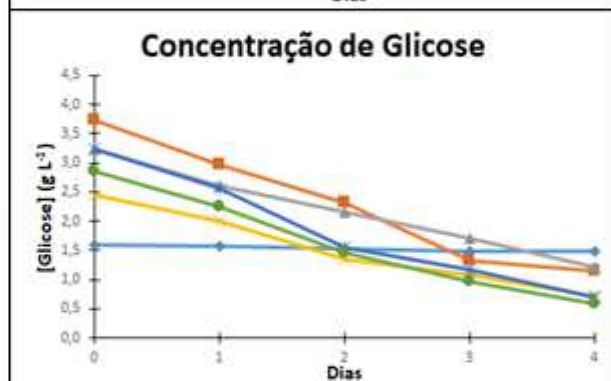
Tabela 7: Adaptação das células Vero B4 a condições livres de SFB em frascos T - Terceira passagem (1,25 % SFB).

Meios	[Xv Máx]	μ_{exp}	Glicose (g L⁻¹)		Lactato (g L⁻¹)
	(10⁵ cels cm⁻²)		[Inicial]	[Final]	[Final]
RPMI	1,0	0,2	1,6	1,5	0,3
VP SFM	3,4	0,6	3,7	1,1	2,1
Opti Pro	2,4	0,5	3,3	1,2	1,7
Opti MEM	2,1	0,4	2,5	0,7	1,6
SFM4 Megavir	2,9	0,5	3,3	0,7	2,2
ProVero 1	2,9	0,5	2,9	0,6	1,9

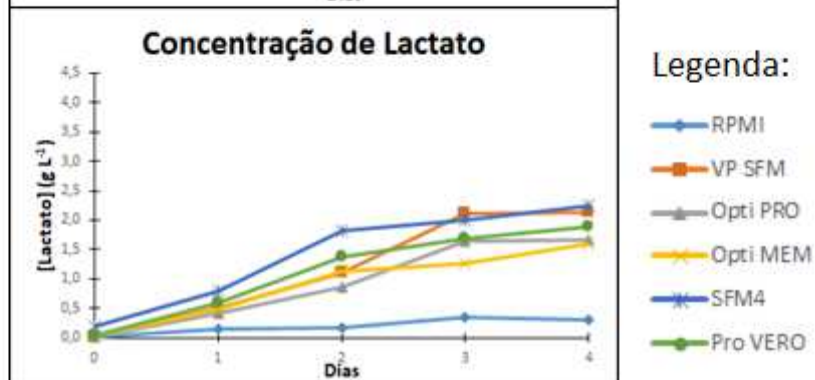
A



B



C



Legenda:

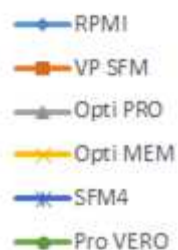
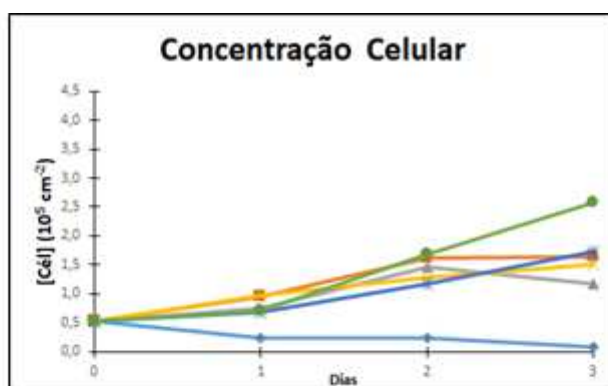


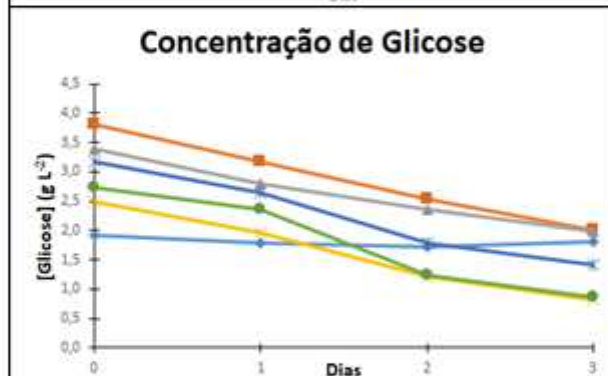
Figura 22: Adaptação das células Vero B4 a condições livres de SFB em frascos T - Terceira passagem (1,25% SFB). (A) concentração celular (10^5 céls cm^{-2}), (B) concentração de glicose (g L^{-1}) e (C) concentração de lactato (g L^{-1}).

Na quarta passagem, o meio de cultura utilizado continha 0,6% de SFB. O destaque desta passagem foi o meio de cultura ProVero 1, com a concentração celular de $2,6 \times 10^5$ céls cm^{-2} (Figura 23). A concentração de lactato mais elevada foi de $1,9 \text{ g L}^{-1}$ no dia 3, utilizando o meio VP SFM, conforme mostrado na Tabela 8.

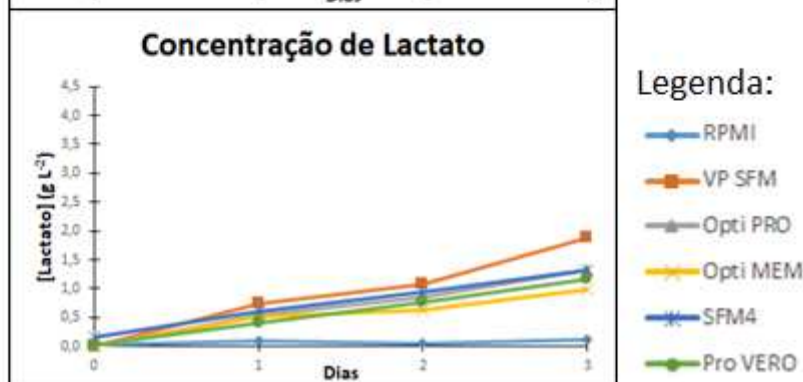
A



B



C



Legenda:

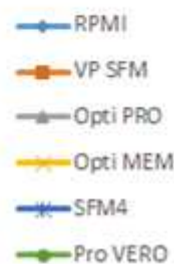


Figura 23: Adaptação das células Vero a condições livres de SFB - Quarta Passagem (0,6% SFB). (A) concentração celular ($10^5 \text{ céls cm}^{-2}$), (B) concentração de glicose (g L^{-1}) e (C) concentração de lactato (g L^{-1}).

Verificou-se uma queda no desempenho do meio VP SFM, com X_v máxima de apenas $1,64 \times 10^5 \text{ céls cm}^{-2}$, indicando que ele apresenta deficiências, quando se aproxima a condições isentas de SFB. Já o meio RPMI não propiciou nenhuma proliferação celular sob suplementação de apenas 0,6% de SFB e seu uso foi descontinuado. Por outro lado, no meio ProVero 1 pareceu ocorrer adaptação das células às novas condições de baixa concentração de SFB, visto que o X_v máximo se manteve acima de $2 \times 10^5 \text{ céls cm}^{-2}$.

Tabela 8: Adaptação das células Vero a condições livres de SFB - Quarta Passagem (0,6 % SFB).

Meios	$[X_v \text{ Máx}]$	μ_{exp}	Glicose ($g L^{-1}$)		Lactato ($g L^{-1}$)
	($10^5 \text{ cels cm}^{-2}$)		[Inicial]	[Final]	[Final]
RPMI	0,5	0,0	1,9	1,8	0,1
VP SFM	1,6	0,3	3,8	2,0	1,9
Opti Pro	1,2	0,2	3,4	2,0	1,3
Opti MEM	1,5	0,2	2,5	0,8	1,0
SFM4 Megavir	1,7	0,5	3,2	1,4	1,3
ProVero 1	2,6	0,6	2,7	0,9	1,2

Na quinta e última passagem antes do congelamento e, conseqüentemente, antes da produção de um lote de trabalho de células Vero adaptadas ao crescimento livre de SFB; o meio testado que apresentou destaque com relação à proliferação celular foi o ProVero 1, como pode ser observado na Figura 24 e na Tabela 9.

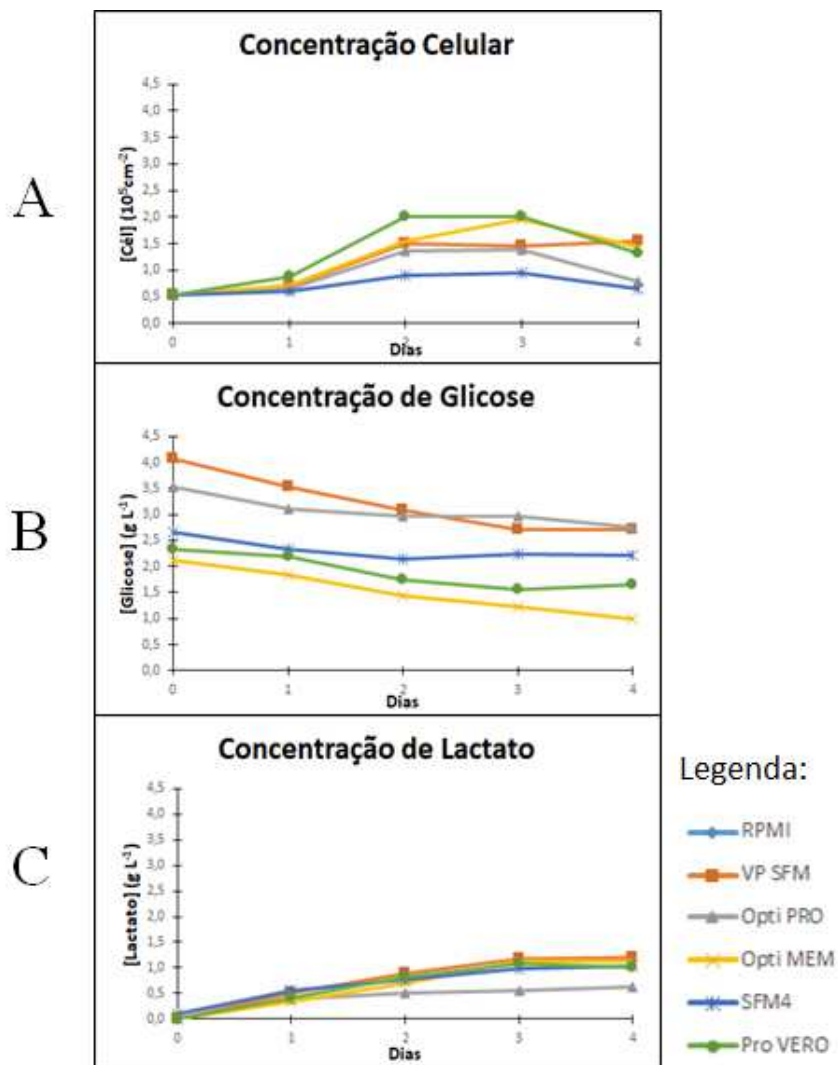


Figura 24: Adaptação das células Vero a condições livres de SFB - Quinta Passagem (0% SFB). (A) concentração celular ($10^5 \text{ céls cm}^{-2}$), (B) concentração de glicose (g L^{-1}) e (C) concentração de lactato (g L^{-1}).

A concentração celular máxima foi de $2,0 \times 10^5 \text{ céls cm}^{-2}$ no dia 3 usando os meios Pro Vero 1 e Opti MEM a maior concentração de lactato foi de $1,2 \text{ g L}^{-1}$ com VP SFM no mesmo dia. O meio Opti MEM apresentou a maior taxa específica de crescimento ($0,49 \text{ d}^{-1}$, enquanto o meio que apresentou a menor concentração celular máxima e a menor taxa específica de crescimento (μ_{exp}) foi o SFM4 Megavir ($1,0 \times 10^5 \text{ céls cm}^{-2}$ e $0,2 \text{ d}^{-1}$), conforme a Tabela 9.

Tabela 9: Adaptação das células Vero B4 a condições livres de SFB em frascos T - Quinta passagem (0 % SFB).

Meios	[Xv Máx]	μ_{exp}	Glicose ($g\ L^{-1}$)		Lactato ($g\ L^{-1}$)
	($10^5\ cels\ cm^{-2}$)		[Inicial]	[Final]	[Final]
RPMI					
VP SFM	1,5	0,4	4,1	2,7	1,2
Opti Pro	1,4	0,4	3,5	2,8	0,6
Opti MEM	2,0	0,5	1,8	1,0	1,1
SFM4 Megavir	1,0	0,2	2,3	2,2	1,0
ProVero 1	2,0	0,4	2,2	1,7	1,0

Após a quinta passagem, as células adaptadas ao crescimento em meios de cultura livres de SFB foram congeladas para a produção de um banco de trabalho para a continuidade do estudo, que teve como foco o desenvolvimento de um processo de produção das células em altas concentrações em microcarregadores, utilizando os dois meios de cultura considerados mais promissores após as adaptações: ProVero 1 e Opti MEM.

5.1.2 Adaptação da linhagem celular Vero WHO (ECACC) a meios isentos de soro animal

A cepa de células Vero obtida da coleção da *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (Vero WHO - ECACC 88020401) encontrava-se no meio de cultura utilizado na manutenção no Instituto Max Planck: meio de Glasgow (E- MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (doravante denominado de Meio Z).

Com o objetivo de desenvolver um processo baseado em meio isento de componentes de origem animal, esta linhagem celular foi adaptada a dois diferentes meios de cultivo selecionados na etapa anterior: Opti MEM SFM (Invitrogen) e ProVero 1 (Lonza). Como controle, o mesmo procedimento foi realizado com o meio Z.

Para a adaptação das células Vero aos novos meios de cultura foi utilizada uma técnica rápida (α) na primeira passagem é adicionado 5 % de SFB (v/v) e na segunda passagem desta técnica foi utilizado 100% do novo meio de cultura. E foi usada uma técnica direta (β), onde as células foram cultivadas na primeira passagem diretamente em 100% do meio novo.

Ao final do processo de adaptação das células (5 passagens seriadas) aos dois meios testados, foram produzidos dois diferentes bancos de trabalho e congelados. Os resultados podem ser analisados por uma comparação direta da concentração celular obtida nos dois meios de cultivo e nas cinco passagens para a adaptação aos novos meios de cultivo (Tabela 10 e 11).

A partir dos resultados obtidos, foi calculada a taxa específica de crescimento celular (μ_{exp}), a qual foi determinada na fase exponencial de crescimento.

Tabela 10: Adaptação das células Vero WHO em frascos T ao meio de cultura Opti MEM.

Opti MEM					
<i>Passagem</i>	<i>[% SFB]</i>	<i>Adaptação</i>	<i>[Xv Máx]</i> <i>(10⁶ cels/cm²)</i>	<i>μ_{exp}</i> <i>(h⁻¹)</i>	<i>TD</i> <i>(horas)</i>
1	5	α	0,48 ± 0,10	0,038	18,1
	0	β	0,26 ± 0,04	0,031	22,3
2	0	α	0,21 ± 0,08	0,031	22,1
	0	β	0,17 ± 0,01	0,027	26,0
3	0	α	0,20 ± 0,02	0,026	27,1
	0	β	0,16 ± 0,07	0,024	29,4
4	0	α	0,17 ± 0,10	0,027	26,0
	0	β	0,10 ± 0,06	0,021	32,9
5	0	α	0,20 ± 0,09	0,020	35,2
	0	β	0,19 ± 0,10	0,019	35,9

Para ambos os meios, observou-se uma queda em [Xv] máx e μ_{exp} ao longo das passagens. Por outro lado, para o meio Z suplementado com 10 % de SFB (v/v) (Tabela 12), esta queda sucessiva não foi observada.

Tabela 11: Adaptação das células Vero WHO em frascos T ao meio de cultura ProVero 1.

ProVero 1					
Passagem	[% SFB]	Adaptação	[Xv Máx] (10⁶ cels/cm²)	μ exp (h⁻¹)	TD (horas)
1	5	α	0,43 ± 0,11	0,038	18,4
	0	β	0,20 ± 0,09	0,032	21,5
2	0	α	0,36 ± 0,13	0,025	27,5
	0	β	0,32 ± 0,03	0,036	19,1
3	0	α	0,52 ± 0,15	0,029	23,6
	0	β	0,41 ± 0,06	0,029	24,2
4	0	α	0,25 ± 0,08	0,039	17,8
	0	β	0,19 ± 0,09	0,028	24,9
5	0	α	0,40 ± 0,24	0,022	31,5
	0	β	0,3 ± 0,12	0,025	27,6

Para fins de comparação, na Tabela 12 podem ser observados os resultados das cinco passagens da célula Vero em meio Z suplementado com 10 % (v/v) SFB para o qual não se observa alterações significativas no crescimento celular ao longo das cinco passagens.

Tabela 12: Passagens sucessivas de células Vero WHO em frascos T em meio Z com 10 % de SFB (controle).

Z Medium			
Passagem	[Xv Máx] (10⁶ cels/cm²)	μ exp (h⁻¹)	DT (hours)
1	0,44 ± 0,12	0,039	18,0
2	0,36 ± 0,10	0,037	18,6
3	0,40 ± 0,08	0,035	20,0
4	0,35 ± 0,09	0,037	18,6
5	0,49 ± 0,09	0,0271	25,6

Diferentes grupos estudaram a adaptação ao cultivo em meios isentos de soro de diferentes células de mamíferos, tais como: BHK-21 (KALLEL et al, 2002), MDCK (GENZEL et al, 2006), CHO (SCHRODER et al, 2004) e Vero (BUTLER et al., 2000; LIU et al., 2007; QUESNEY et al., 2003). As principais observações destas publicações são as reduções das taxas de crescimento celular nos cultivos em meios livre de soro (GENZEL; FISCHER; REICHL, 2006). Nos resultados do presente trabalho, referente à adaptação às condições isentas de soro pode-se notar também uma redução das taxas de crescimento celular.

Em 2001, Frazzati-Gallina e colaboradores estudaram a produção do vírus rábico em células Vero em microcarregadores (Biorreator). Ao contrário dos resultados do presente trabalho, estes autores não conseguiram o estabelecimento de um processo de produção totalmente isento de soro, pois na etapa de crescimento das células Vero o crescimento celular somente ocorreu com a adição de 1% de soro no meio VP SFM usado no cultivo (FRAZZATI-GALLINA *et al.*, 2001).

A produção de diferentes vírus utilizando a linhagem celular vero tem sido descrita utilizando diversos meios de cultura livres de soro na literatura. Estudos para a produção do vírus da poliomielite na linhagem Vero foram conduzidos por Merten e colaboradores (1994, 1997), que desenvolveram os meios de cultivo isentos de soro MDSS2 e MDSS2N. Além destes, no ano de 2014, Thomassen e colaboradores descreveram diferentes métodos de cultivo da linhagem Vero para a produção do antígeno D do vírus da poliomielite utilizando o meio de cultura VP SFM (THOMASSEN *et al.*, 2014). Nos estudos de Frazzati-Gallina e colaboradores (2001, 2004) foi utilizado o meio de cultura VP SFM na produção do vírus da raiva utilizando linhagem Vero. Rourou e colaboradores também investigaram a produção do vírus da raiva em células Vero em meio de cultura livre de proteínas animais (ROUROU *et al.*, 2007). Yuk *et al.* (2006) estudaram a produção de um vírus quimérico contra parainfluenza e sincicial respiratório utilizando os meios VP SFM e OptiPRO SFM. A produção do vírus da encefalite japonesa foi estudada utilizando a linhagem Vero nos meios de cultivo VP SFM (TORINIWA; KOMIYA, 2007) e M-VSFM (WU; HUANG, 2002). O meio de cultura M-VSFM foi utilizado também na produção do enterovírus (LIU *et al.*, 2007; WU; LIU; LIAN, 2004) e reovírus (BUTLER *et al.*, 2000).

5.2 INFECÇÃO VIRAL

5.2.1 Ensaios Iniciais em frascos T

As células Vero adaptadas aos novos meios de cultura foram infectadas com o vírus da febre amarela cepa 17D 204 e importantes variáveis que impactam na replicação viral foram estudadas, empregando como ferramenta o planejamento estatístico de experimentos, com o intuito de selecionar condições apropriadas maximizar a produção de vírus. A Tabela 13 mostra os títulos virais obtidos para o vírus da febre amarela nas

diferentes condições de infecção. Os cultivos foram conduzidos a 34 e 37 °C, sendo avaliados durante oito dias. As cinéticas de crescimento celular e produção do vírus são mostradas na Figura 25 e o título viral máximo alcançado é indicado nas tabelas 10 e 11.

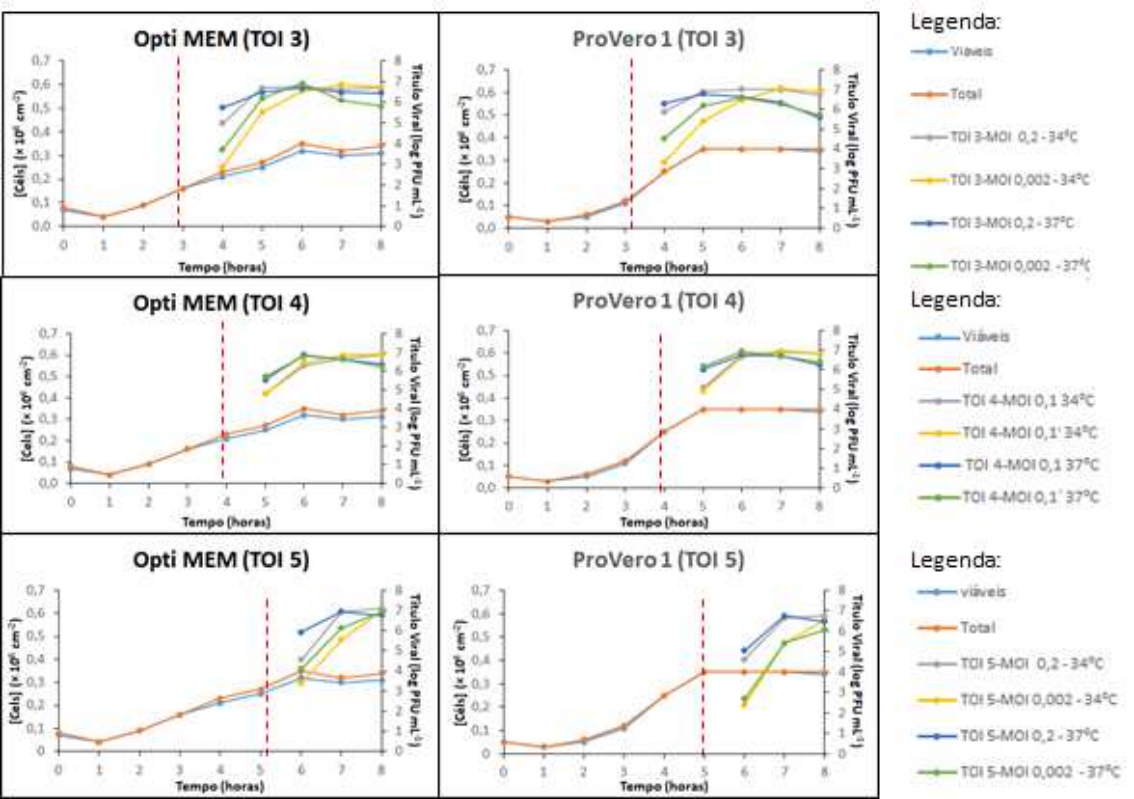


Figura 25: Primeira infecção das células Vero nos dois diferentes meios de cultura livres de SFB (Opti MEM e ProVero 1) em duas temperaturas (34 e 37°C). Segue conforme as condições experimentais indicadas nas tabelas 2.

Tabela 13: Estudo de infecção da célula Vero WHO com febre amarela (YFV 17D 204) usando o meio Opti MEM e ProVero 1.

Condição	MOI	TOI (dias)	TOH (dias)	Opti MEM		ProVero 1	
				Maximum Virus titer		Maximum Virus titer	
				(PFU mL ⁻¹)		(PFU mL ⁻¹)	
				34 °C	37 °C	34 °C	37 °C
1	-1	-1	+ 1	7,0E+06	8,0E+06	1,2E+07	5,3E+05
2	-1	+ 1	-1	1,0E+07	8,8E+06	3,8E+06	1,2E+06
3	+ 1	-1	+ 1	5,5E+06	5,0E+06	1,0E+07	6,0E+06
4	+ 1	+ 1	-1	1,3E+07	8,8E+06	5,8E+06	5,8E+06
5	0	0	0	7,0E+06	7,3E+06	7,5E+06	5,8E+06
6	0	0	0	8,0E+06	6,3E+06	9,5E+06	8,8E+06

Pode ser observado para o meio Opti MEM, na Tabela 13 que os maiores títulos virais encontrados foram a 34 °C, nas condições 2 e 4. Ambas as condições foram sob o TOI normalizado (+1), ou seja, um tempo de infecção de 5 dias e tempo de coleta mais baixo (-1). Já o MOOI foi indiferente (+1 ou -1). O título máximo de 1×10^7 PFU mL⁻¹ a 34°C e de 9×10^6 PFU mL⁻¹ a 37°C.

Já para o meio ProVero 1, os maiores títulos virais encontrados foram a 34 °C nas condições 1 e 3, as quais possuem o tempo para a coleta mais longo (+1) e TOI normalizado (-1), ou melhor, um tempo de infecção de 3 dias. O título máximo foi de 1×10^7 PFU mL⁻¹ nestas condições.

Após a análise dos resultados da primeira infecção foram selecionadas as variáveis: MOI de 0,002 PFU cel.⁻¹, TOH de 4 dias (0) e diferentes momentos para a infecção (TOI) para os meios testados, visto que os resultados mostram que para o meio de cultura ProVero 1 o melhor momento de infecção é o dia 3, enquanto que para o meio Opti MEM é o dia 5.

Estas variáveis definidas foram utilizadas na segunda infecção, onde foram testadas também as duas temperaturas (34 e 37°C) não somente pós-infecção com o vírus da febre amarela, como também na fase do cultivo celular. Os resultados obtidos na segunda infecção podem ser observados na Figura 26.

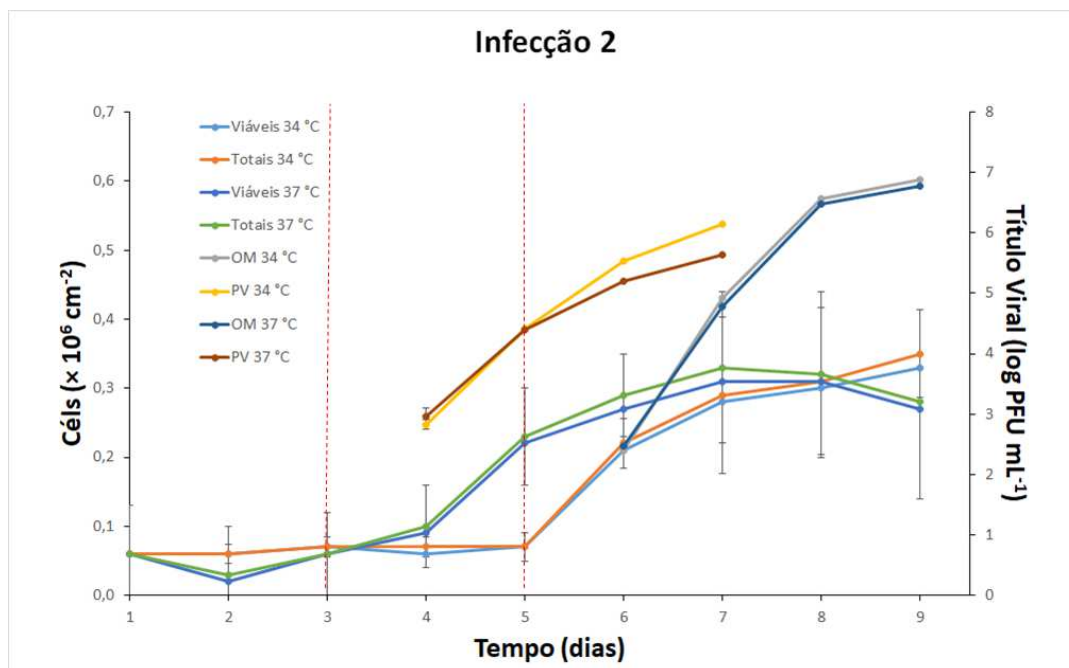


Figura 26: Perfil de replicação do vírus da febre amarela em células Vero em dois diferentes meios de cultura livres de SFB: Opti MEM (OM) e ProVero 1 (PV) em duas temperaturas 34 e 37°C. As linhas pontilhadas indicam os TOI.

Pode ser observado, nas duas temperaturas testadas, que o meio de cultura Opti-MEM apresentou os maiores títulos virais e a concentração viral máxima encontrada foi aproximadamente de 10^7 PFU mL⁻¹.

5.2.2 Avaliação da Replicação Viral em Sistemas com Garrafas do Tipo *Roller*

A replicação do vírus da febre amarela 17D 204 RKI foi também estudada em garrafas do tipo *roller*. E ao utilizar estas garrafas para o cultivo celular, contudo as células Vero adaptadas ao meio de cultura ProVero 1 não foram capazes de aderir à parede da garrafa impossibilitando a sua utilização. Este resultado é indicativo de que, provavelmente, a adesão das células à parede interna das garrafas é menos eficiente e quando sob agitação no sistema *roller*, acarreta desprendimento das células. Por este motivo, todos os experimentos nesta seção dizem respeito ao meio de cultura Opti MEM.

Nesta infecção, foram utilizadas as variáveis previamente definidas para o meio Opti MEM (MOI= 0,002; TOI= 5 dias e TOH= 4), tendo-se estudadas nas temperaturas de 34 e 37°C para todo o processo de cultivo celular e produção viral ou para a

combinação das duas temperaturas (37 °C até o momento da infecção e 34 após este ponto). Os títulos alcançados nestes experimentos são mostrados na Figura 27.

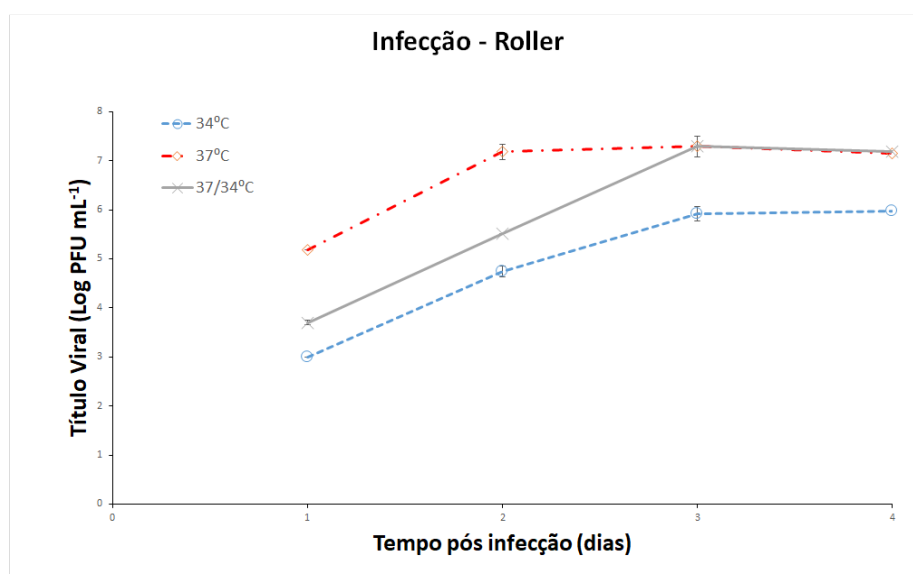


Figura 27: Perfil de replicação do vírus da febre amarela (17D 204 RKI) em frascos do tipo roller usando o meio Opti MEM em três diferentes condições. Todo o processo produtivo na temperatura de 34°C (azul) e 37°C (vermelho). E utilizando as duas temperaturas 34/37°C (cinza).

Os resultados apresentados mostram que as melhores condições para a replicação do vírus da febre amarela em garrafas do tipo *roller* são as que usam a temperatura de 37°C ou a combinação das temperaturas 37/34 °C. O título viral máximo foi de 2×10^7 PFU mL⁻¹, alcançado no 2º dia pós infecção para experimento conduzido integralmente a 37 °C e no 3º dia pós infecção para o experimento conduzido a 37 °C durante a fase de propagação celular e 34 °C após a infecção viral.

5.2.3 Avaliação da Replicação Viral em Frascos Agitados do Tipo *Spinner*

As linhagens celulares usadas para a produção de vacinas virais de uso humano em larga escala, geralmente, possuem a característica de crescerem aderidas a um suporte. Este é um fator limitante na técnica a ser empregada no cultivo em escala industrial, pois a concentração celular por volume de meio obtida está relacionada diretamente à área de superfície por volume de meio disponível para o crescimento celular. O desenvolvimento de microcarregadores permitiu a realização de cultivo de células aderentes em altas densidades. Estas células crescem aderidas aos microcarregadores, os quais, devido à sua

densidade relativamente baixa, podem ser mantidos em suspensão, mesmo a baixas velocidades de agitação. Isto torna possível a obtenção de cultivos com concentrações celulares bem superiores aquelas obtidas em garrafas do tipo T, devido à grande área de superfície disponível por volume de meio de cultura proporcionado pelos microcarregadores.

Em 1995, Mendonça e Pereira descreveram o cultivo de células Vero em biorreatores utilizando microcarregadores *Cytodex 1* a uma concentração de 2 g L^{-1} e, usando um inóculo de 8 células por microcarregador, obtiveram uma concentração celular máxima de $1,8 \times 10^6$ células mL^{-1} .

Em outro estudo, que utilizou a linhagem celular Vero para o desenvolvimento de um processo produtivo para o vírus da febre amarela, empregando também o microcarregador *Cytodex 1*, foi utilizada a concentração de 3 g L^{-1} de microcarregador. O inóculo celular utilizado foi de aproximadamente 16 células por microcarregador, tendo-se obtido uma concentração máxima de células mL^{-1} (SOUZA et al., 2009).

Em 2015, foi publicado um estudo pelo mesmo grupo, onde o objetivo foi o aumento da concentração de células viáveis da linhagem Vero cultivadas em biorreatores em condições livres de soro para a produção do vírus da febre amarela. No trabalho, foram testadas duas diferentes concentrações do microcarregador *Cytodex 1*: $1,5$ e 3 g L^{-1} , com o inóculo de $0,2 \times 10^6$ células por mL^{-1} em ambas as concentrações de microcarregador. Como consequência, o inóculo celular foi de aproximadamente 34 células por microcarregador na concentração de 3 g L^{-1} e de 68 células por microcarregador quando utilizada a concentração de $1,5 \text{ g L}^{-1}$. A concentração celular máxima obtida foi de $1,77 \times 10^6$ céls mL^{-1} na concentração de $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de microcarregadores (MATTOS et al, 2015)

Neste trabalho, a concentração de microcarregadores foi mantida em 2 g L^{-1} em todos os experimentos. De acordo com as informações do fabricante dos microcarregadores (GE Healthcare) em cada grama de microcarregadores (massa seca) existem aproximadamente $4,3 \times 10^6$ microesferas de *Cytodex 1* e aproximadamente $3,0 \times 10^6$ microesferas de *Cytodex 3*. As faixas de inóculo estudadas neste trabalho foram de 24 – 35 células por microcarregador quando usado *Cytodex 1* e 10 – 20 células por microcarregador quando usado *Cytodex 3*.

Inicialmente, foram feitos experimentos para investigar a cinética de adesão da célula ao microcarregador nas seis primeiras horas de cultivo, assim como o perfil de crescimento celular a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ao longo de uma semana (Figura 28). São mostrados dois spinners para cada condição investigada (duplicata do experimento).

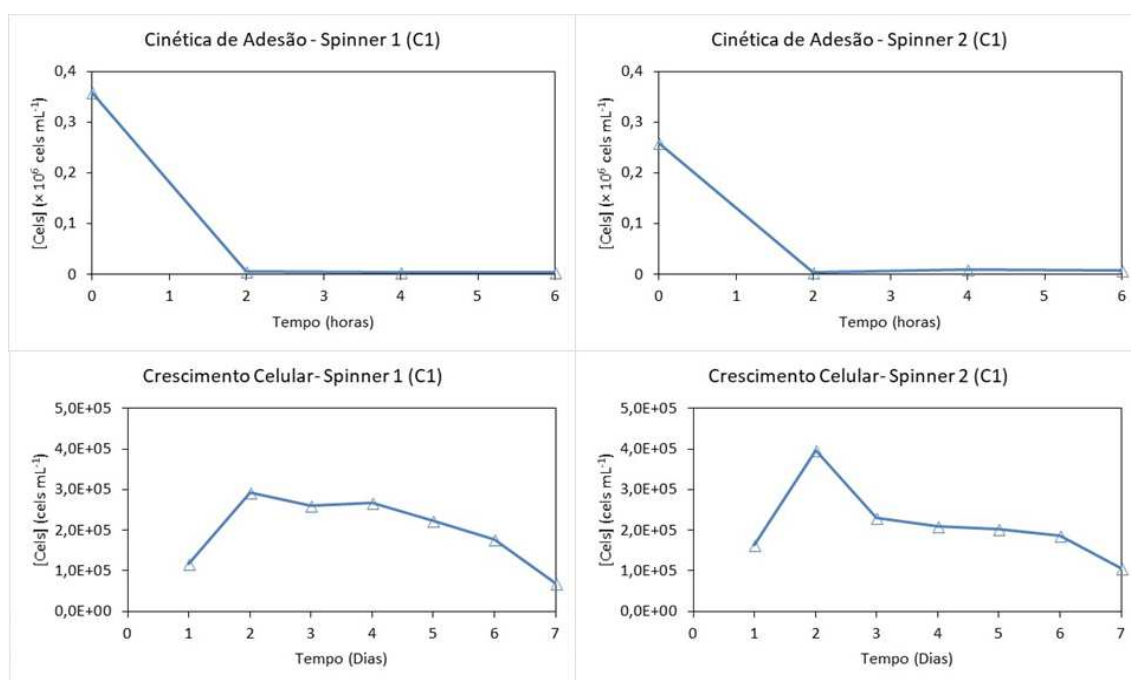


Figura 28: Perfil de adesão e crescimento celular em frascos agitados do tipo Spinner a 37 °C usando o meio Opti MEM e Cytodex 1 (2 g L⁻¹). Na parte superior podem ser encontrados os resultados da cinética de adesão celular e, na parte inferior, o perfil da concentração celular durante a cultura.

Com base nos resultados apresentados, a adesão das células Vero ao *Cytodex 1* acontece nas duas primeiras horas do cultivo visto que, entre 2h e 6h após a inoculação, não foram encontradas células em suspensão. Contudo, após um período de 48 horas, pode ser notado um aumento do número de células em suspensão no sobrenadante e uma diminuição da concentração celular da cultura. A concentração celular máxima foi obtida em 48h foi de $3 - 4 \times 10^5$ céls mL^{-1} .

Com o objetivo de evitar o desprendimento das células dos microcarregadores após um período de quarenta e oito horas, foi proposta e testada uma nova estratégia para a adesão celular.

Foi usada no período imediatamente posterior à inoculação dos frascos contendo os microcarregadores, uma agitação intermitente, com ciclos compostos por um minuto de agitação e 19 minutos sem agitação da suspensão celular, totalizando 20 minutos em cada ciclo. Este procedimento foi executado durante as quatro horas iniciais do cultivo em frascos do tipo *spinner*.

Esta nova estratégia de adesão celular foi avaliada em duplicata experimental (frascos *spinner* 3 e 4), tendo-se conseguido evitar o desprendimento das células após 48

horas, como ocorrido antes: a adesão celular em 4 h pós inoculação foi eficiente na concentração celular máxima encontrada foi de aproximadamente 5×10^5 céls. mL⁻¹, os frascos foram infectados com o vírus da febre amarela (17D 204 RKI) e títulos virais máximos de $7,04 \times 10^6$ PFU mL⁻¹ e $1,4 \times 10^7$ PFU mL⁻¹ foram obtidos no terceiro dia pós infecção. Na Figura 29 podem ser observados os resultados obtidos nestes experimentos.

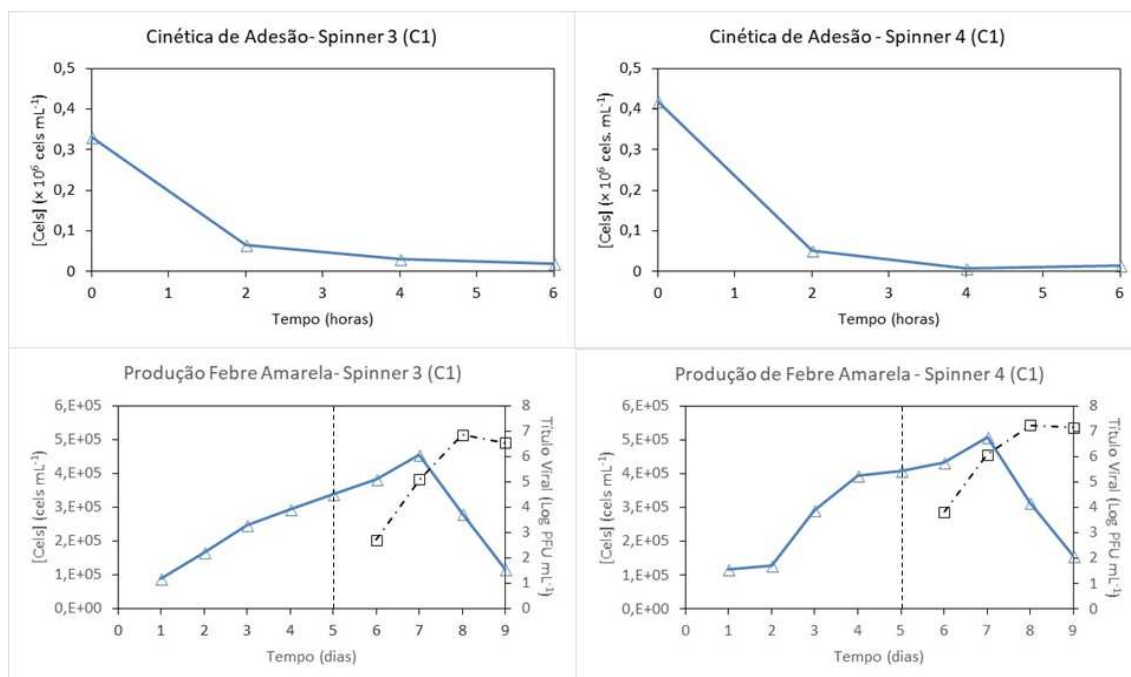


Figura 29: Perfil de adesão, concentração celular e produção de vírus da febre amarela em frascos agitados do tipo spinner usando o meio Opti MEM e Cytodex 1 (agitação intermitente). Na parte superior está a cinética de adesão celular e na parte inferior o perfil de concentração celular e de replicação do vírus da febre amarela. A linha pontilhada indica o dia da infecção com o vírus da febre amarela.

A adesão da maior parte das células Vero ao *Cytodex 1* aconteceu novamente nas duas primeiras horas do cultivo e, após este período, foram encontradas muito poucas células em suspensão.

Apesar dos bons resultados alcançados com a agitação intermitente, a maior complexidade operacional para execução da desta estratégia (realizada manualmente nestes experimentos, pois para os experimentos executados motivou a investigação de um microcarregador diferente. Escolheu-se o microcarregador *Cytodex 3*, cuja superfície é recoberta por uma camada de colágeno destinada a adesão celular.

Na Figura 30 são apresentados os resultados dos *spinner 1 e 3* (duplicata experimental) utilizando o microcarregador *Cytodex 3* sob agitação contínua após a inoculação. Vale ressaltar que existe uma diferença de área nos microcarregadores

usados: o *Cytodex 1* tem $4400 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ e o *Cytodex 3* tem $2700 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ de massa seca. Como *Cytodex 3* tem uma área superficial 1,7 vezes menor que o *Cytodex 1* e como foi usada a mesma concentração volumétrica do inóculo, o inóculo destes experimentos foi de 33-50 células por microcarregador.

A adesão celular ao *Cytodex 3* sob agitação contínua acontece principalmente nas duas primeiras horas do cultivo, após este período, não foram encontradas poucas células em suspensão no sobrenadante da cultura.

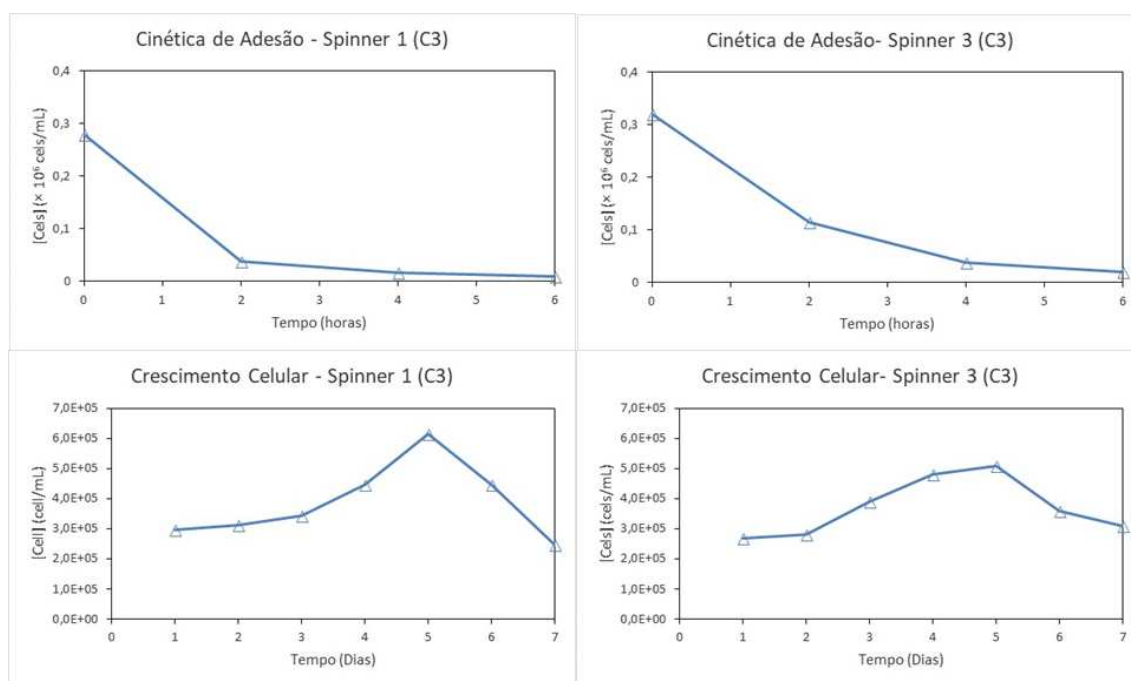


Figura 30: Perfil de adesão, concentração celular e produção de febre amarela em frascos agitados do tipo spinner usando o meio Opti MEM e Cytodex 3 (33-50 céls. por microcarregador), sob agitação contínua. Na parte superior está a cinética de adesão celular e na parte inferior o perfil de concentração celular e perfil de replicação do vírus da febre amarela.

Como pode ser observado na Figura 29, a concentração celular máxima obtida foi de $(5,63 \pm 0,52) \times 10^5 \text{ céls. mL}^{-1}$, atingindo um máximo no dia 5 do cultivo.

Para avaliar a causa para o decréscimo de concentração celular após 5 dias de cultivo, foram realizados a 37°C ensaios em duplicata experimental (*spinners* 2 e 4 – C3) com uma troca de aproximadamente 75% do meio de cultura dos frascos *spinners* no quarto dia de cultivo (Figura 31). Os resultados apresentados indicam que a adesão das células Vero ao *Cytodex3* aconteceu nas duas primeiras horas do cultivo e não foram encontradas células em suspensão no meio de cultura após este período.

A troca de meio de cultura no quarto dia de cultivo permitiu que a concentração celular não decrescesse após do quinto dia. A concentração celular aumentou continuamente até o sétimo dia de cultura, decrescendo após este ponto. A concentração celular máxima foi de $(7,84 \pm 1,21)$ céls. mL⁻¹.

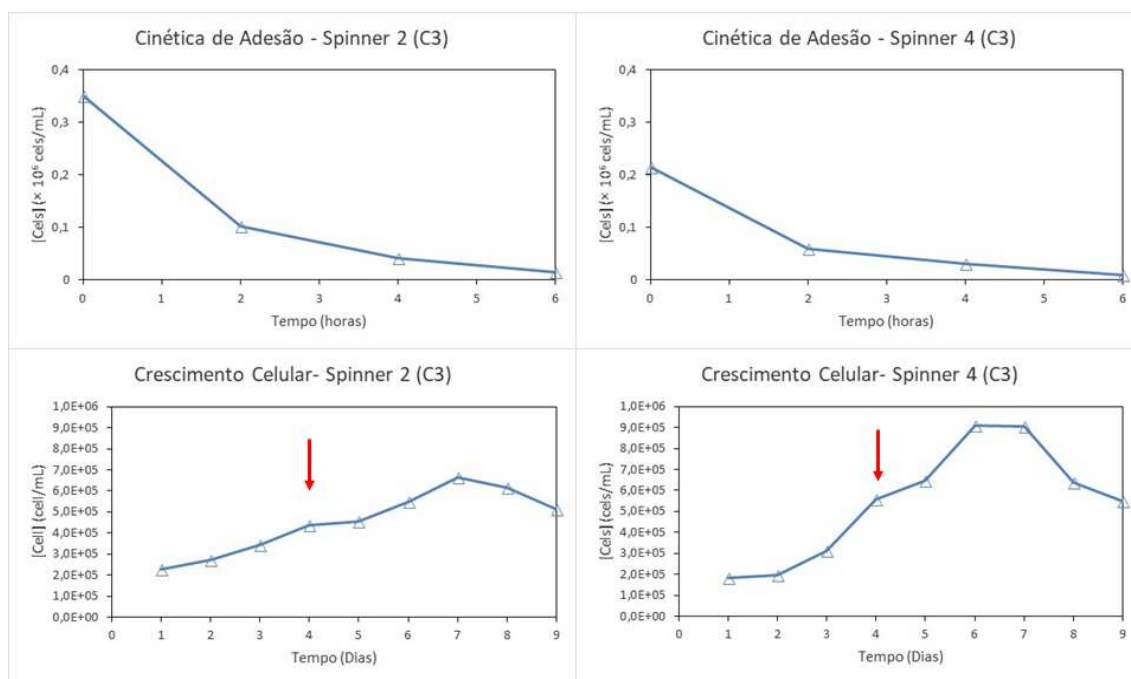


Figura 31: Perfil de adesão, concentração celular e produção de febre amarela em frascos agitados do tipo Spinner usando o meio Opti MEM e Cytodex 3 (33-50 céls. por microcarregador). Na parte superior está a cinética de adesão celular e na parte inferior o perfil de concentração celular e perfil de replicação do vírus da febre amarela. A seta vermelha indica o dia da troca de 75% do meio de cultivo.

5.2.4 Estudo de Diferentes Temperaturas para a Produção Viral e de Múltiplas Colheitas de Vírus com Duas Cepas Virais Vacinais

Nesta seção, aplicando as condições previamente nas condições previamente definidas de TOI, MOI e TOH, também foram comparadas duas temperaturas para o processo de infecção e produção viral (34 e 37 °C), com uma ou mais colheitas de vírus ao longo do processo, comparando-se duas cepas virais usadas em processos industriais: 17D 204 e 17DD.

Todos os experimentos mostrados a partir daqui foram feitos em duplicata para as diferentes condições testadas. A primeira comparação feita foi a produção do vírus da febre amarela (17DD) a 37 °C com o decréscimo da temperatura para 34 °C após infecção

viral, ou a 34 °C para todo o processo, em todos os experimentos, foi feita uma troca de meio de cultura 48 horas após inoculação celular. Os resultados podem ser observados na Figura 32.

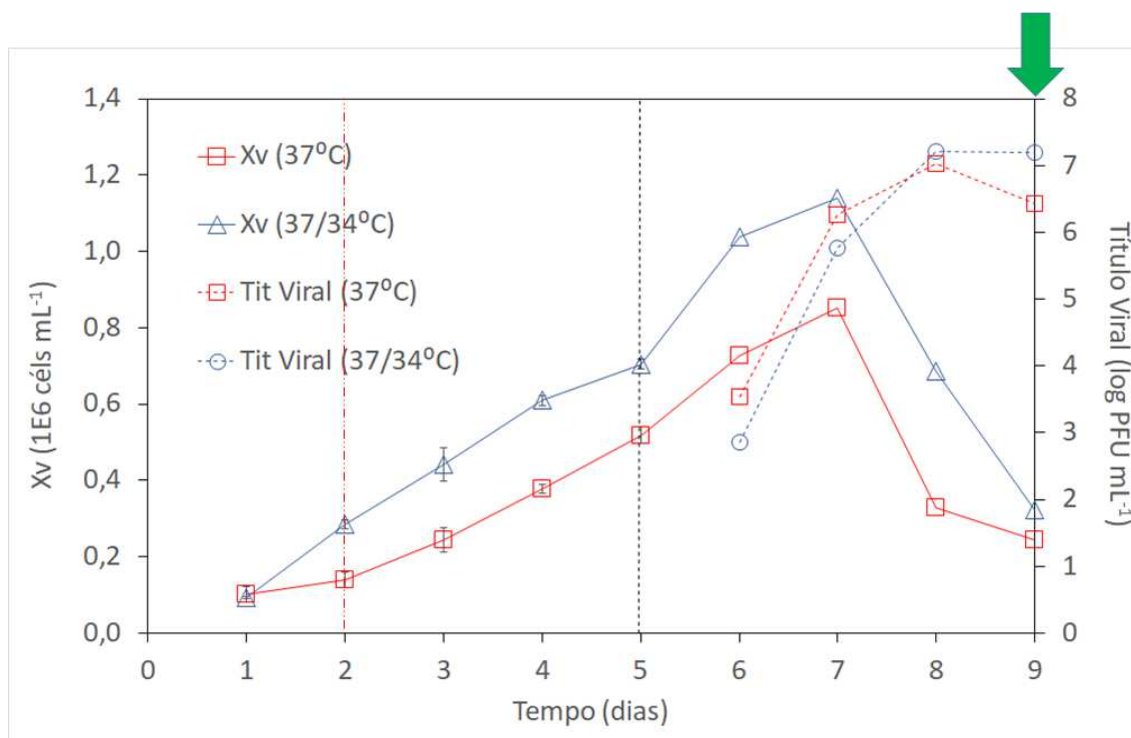


Figura 32: Perfil de concentração celular da Vero WHO utilizando Cytodex 3 e produção do vírus de febre amarela (17DD) em frascos agitados do tipo spinner (34 e 37/34 °C). As condições testadas foram: TOI = 5 dias, MOI = 0,002, TOH = 4 dias e uma colheita. A linha pontilhada vermelha indica a troca de 75 % do meio de cultivo, enquanto a linha pontilhada preta indica a infecção com o vírus da febre amarela e a seta verde indica o dia da colheita.

O uso de temperatura inferiores a 37 °C para a fase de infecção e produção viral já foi descrita por Frazzati-Gallina e colaboradores (2004) para a produção do vírus da raiva em microcarregadores *Cytodex 3* em células Vero. Neste estudo, foram inoculadas 16 células por microcarregador e após 4 dias de fase de crescimento celular a 37 °C a temperatura foi alterada para 34 °C. As células foram infectadas com o vírus rábico e apresentaram um maior título viral quando comparadas ao processo à 37 °C (FRAZZATI-GALLINA *et al.*, 2004).

Na Figura 32, observa-se que, para a cepa vacinal 17DD, o pico da produção viral em ambas as condições de temperatura testadas ocorreu o terceiro dia, após a infecção com título viral de 7,2 Log PFU mL⁻¹ para a temperatura de 34 °C, e de 7,0 Log PFU mL⁻¹ a 37/34 °C. No quarto dia após a infecção o título viral a 34 °C se manteve constante, enquanto o título viral da cultura a 37 °C decresceu para 6,4 Log PFU mL⁻¹.

O grupo de Trabelsi e colaboradores descreveu uma comparação entre diferentes modos de operação do vírus rábico em biorreator utilizando células Vero em *Cytodex 1*: o contínuo e o em batelada. No modo contínuo, depois da infecção viral e decréscimo da temperatura para 34 °C, a perfusão era iniciada com a taxa de troca de meio de cultivo de 0,5 volume de trabalho do biorreator por dia. Os parâmetros MOI (0,1 ou 0,3 PFU cél⁻¹) e concentração de glicose (≥ 1 g L⁻¹) foram analisados e o maior impacto na produção viral foi a não regulação da concentração de glicose e ao usar estes parâmetros em biorreator de 2 L o título viral máximo foi de $2,1 \times 10^7$ FFU mL⁻¹ no quarto dia após a infecção viral (TRABELSI *et al.*, 2005).

Visando avaliar possíveis estratégias para maximizar a produção de vírus, foi investigada a realização de mais que uma colheita de vírus a partir de dada cultura. Com este objetivo foi definido que, nos experimentos de múltiplas colheitas (MH), o dia da infecção (TOI) seria antecipado para o quarto dia de cultura (ao invés do quinto dia) que seriam feitas duas colheitas (H1 e H2) nos dias 4 e 5 pós-infecção, respectivamente. A colheita intermediária (quarto dia) consisti na parada da agitação do frasco do tipo *spinner* por 4 minutos para completa sedimentação dos microcarregadores e na retirada de 80% do volume de trabalho do *spinner* (≈ 200 mL). Depois disto, foi adicionado meio de cultivo novo para completar o volume de trabalho e os *spinners* foram novamente colocados na incubadora. Na colheita final o volume total de trabalho foi coletado após sedimentação dos microcarregadores.

A partir deste ponto, foi estabelecido um acordo de transferência de material com o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos/Fiocruz, e a cepa vacinal 17DD foi fornecida para a continuidade da pesquisa, permitindo uma comparação com a cepa 17D 204 RKI, ambas cepas vacinais usadas na produção de vacinas registradas para uso humano.

Quando testado o modo de duas colheitas (denominado 2×) para produção do vírus da febre amarela (Figura 33), a primeira colheita H1 ($\approx 80\%$ do volume de trabalho) foi feita no quarto dia pós infecção e a segunda colheita H2 (100% do volume de trabalho) seria realizada no dia seguinte, contudo, com o objetivo de investigar o processo de produção viral por mais tempo, foi retirada apenas uma amostra no dia 5 pós-infecção ao invés da colheita do volume total dos *spinners*. Este procedimento permitiu que o processo de produção das partículas virais fosse acompanhado por mais dois dias, totalizando sete dias após a infecção e onze dias do total do processo produtivo.

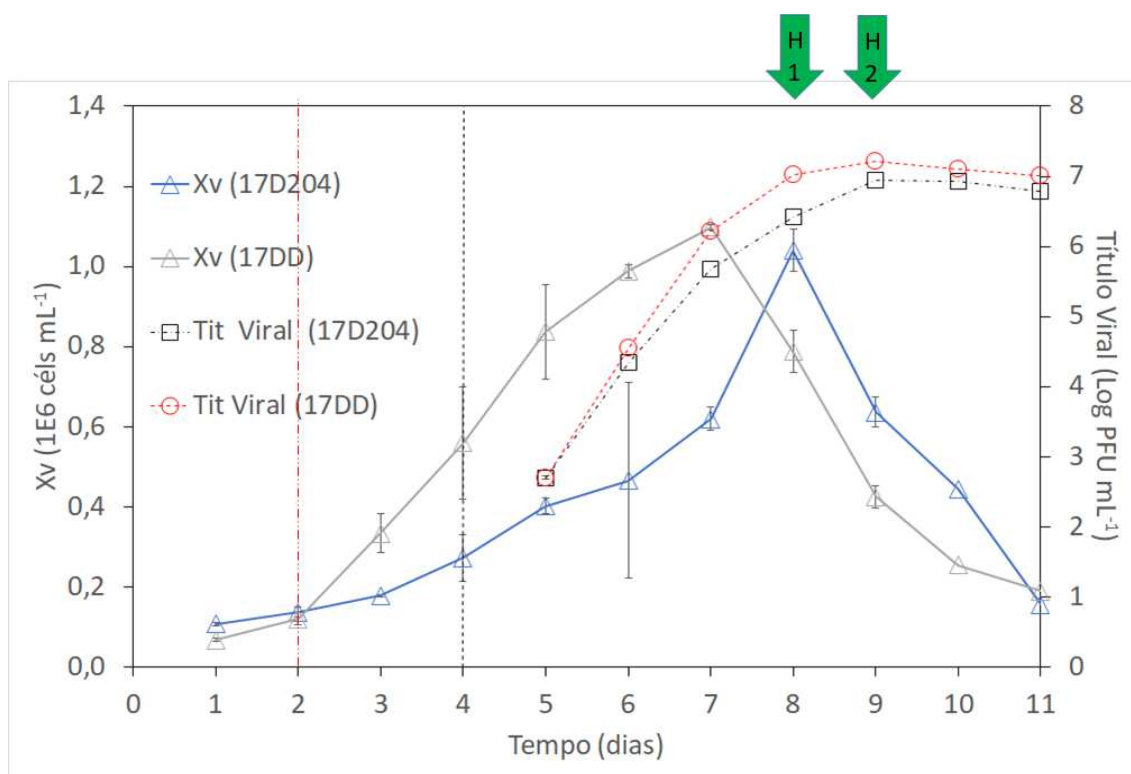


Figura 33: Perfil de concentração celular e produção de febre amarela em frascos agitados do tipo spinner com microcarregadores Cytodex 3 em modo colheita múltipla: duas colheitas (37/34 °C). A linha pontilhada vermelha indica a troca de 75 % do meio de cultivo, enquanto a linha pontilhada preta indica a infecção com o vírus da febre amarela e as setas verde indicam os dias das colheitas.

Os resultados de título viral para a cepa vacinal 17DD no quarto dia pós infecção, isto é, na primeira colheita (H1) foi 7,0 Log PFU mL^{-1} . No quinto dia pós-infecção, equivalente a segunda colheita (H2), o título viral foi de 7,2 Log PFU mL^{-1} . No caso da cepa 17D 204, o título viral na primeira colheita foi de 6,4 Log PFU mL^{-1} , enquanto o resultado no quinto dia pós infecção foi de 7,0 Log PFU mL^{-1} . Ao completar o meio de cultura para o volume de trabalho depois da primeira colheita, o título viral foi diluído cinco vezes, ou melhor, isto representaria em Log PFU mL^{-1} , um decréscimo de 0,7 Log PFU mL^{-1} no título viral. Contudo, após 24 horas os títulos virais se apresentavam em valores similares ou superiores ao dia anterior, indicando que ainda estava ocorrendo produção de vírus pelas células.

A concentração celular máxima encontrada nestes experimentos ficou na faixa de $1,0 - 1,1 \times 10^6$ células mL^{-1} . Esta concentração celular máxima coincide com resultados apresentados por Souza e colaboradores, onde em condições isentas de SFB onde foi descrita uma concentração máxima de $1,0 \times 10^6$ células mL^{-1} . No estudo, foi utilizada a

linhagem Vero cultivada em microcarregadores *Cytodex 1* (3 g L^{-1}) para a produção do vírus 17DD da febre amarela (SOUZA *et al.*, 2009). Em outro trabalho do mesmo grupo, a concentração celular máxima obtida, igualmente para as células aderidas a *Cytodex 1* ($1,5$ e 3 g L^{-1}), ficou na faixa de $0,8 - 0,9 \times 10^6 \text{ céls mL}^{-1}$ (MATTOS *et al.*, 2015).

Os resultados apresentados na Figura 32 demonstram a possibilidade de proceder duas colheitas da suspensão viral produzida. Além disto, as amostras retiradas do meio de cultivo nos dias 6 e 7 pós infecção, isto é, depois das duas colheitas feitas apresentaram títulos elevados (entre $6,8$ e $7,1 \text{ PFU mL}^{-1}$), indicando o potencial de se avaliar um número ainda maior de colheitas. Portanto, foi avaliado um processo com três colheitas (denominado $3 \times$), cujos resultados estão mostrados na Figura 34.

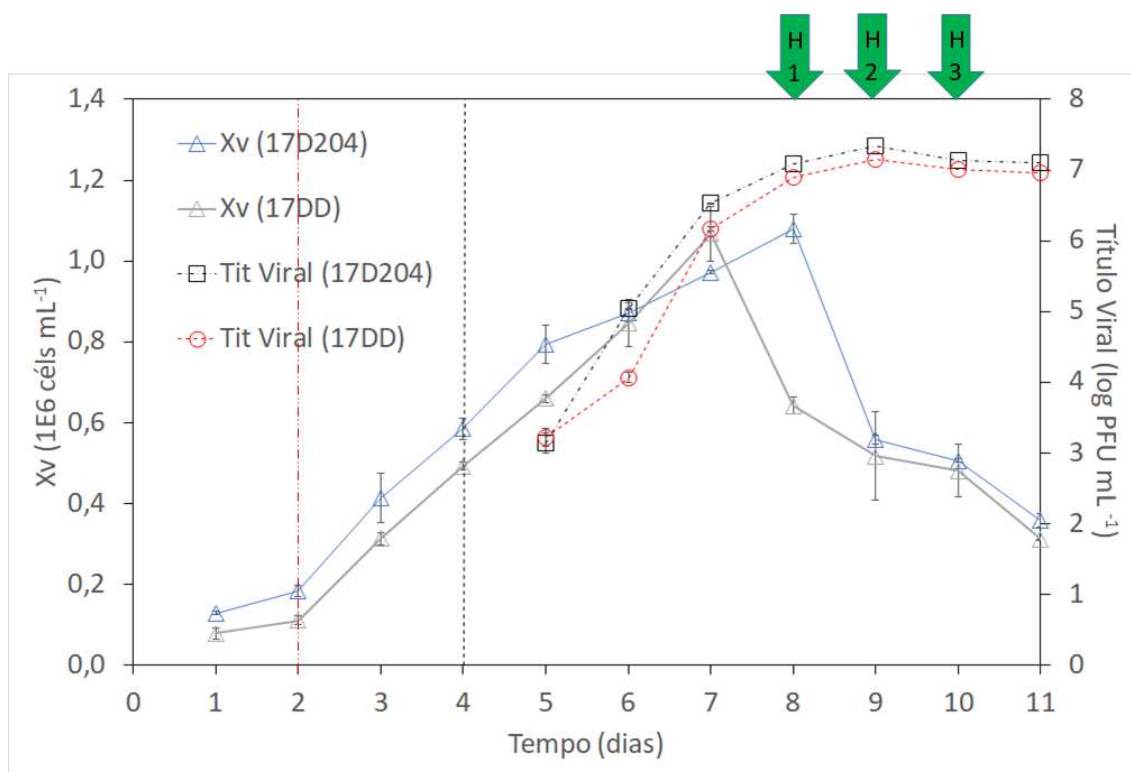


Figura 34: Perfil de concentração celular e produção do vírus de febre amarela em frascos agitados do tipo spinner em modo colheita múltipla: três colheitas ($37/34^\circ \text{ C}$). A linha pontilhada vermelha indica a troca de 75 % do meio de cultivo, enquanto a linha pontilhada preta indica a infecção com o vírus da febre amarela e as setas verde indicam os dias das colheitas.

O título viral para a cepa vacinal 17DD no quarto dia pós-infecção, isto é, na primeira colheita (H1), foi de $6,9 \text{ Log PFU mL}^{-1}$; na segunda colheita (H2) feita, o título viral foi de $7,2 \text{ Log PFU mL}^{-1}$ e na terceira colheita (H3) o título viral foi de $7,0 \text{ PFU mL}^{-1}$. Já para a cepa 17D 204 o título viral apresentado na primeira colheita foi de $7,1 \text{ Log}$

PFU mL⁻¹, na segunda colheita (H2) foi 7,3 Log PFU mL⁻¹ e na da terceira colheita (H3) foi de 7,1 Log PFU mL⁻¹. A concentração celular máxima encontrada nestes experimentos foi de aproximadamente $1,1 \times 10^6$ céls mL⁻¹.

Da mesma forma que anteriormente, no dia da última colheita (neste caso H#), optou-se por retirar apenas uma amostra (ao invés de efetivamente realizar a colheita do volume completo), para que fosse possível avaliar o potencial de realizar um processo com ainda mais colheitas. Como a amostra posterior a H3 apresentou títulos virais na faixa de 7,0 – 7,1 Log PFU mL⁻¹, decidiu-se investigar a possibilidade de realização de cinco colheitas. Neste experimento devido ao grande número de colheitas, decidiu-se antecipar o primeiro TOH para o dia 7 da cultura (3 dias pós-infecção) visto que a viabilidade celular nos experimentos anteriores já começava a decair entre os dias 7 e 8 da cultura. Neste experimento, excepcionalmente não foi feita replicata experimental como mostrado na Figura 35, os resultados obtidos estão coerentes, quando comparadas os dados com aqueles das Figuras 33 e 34.

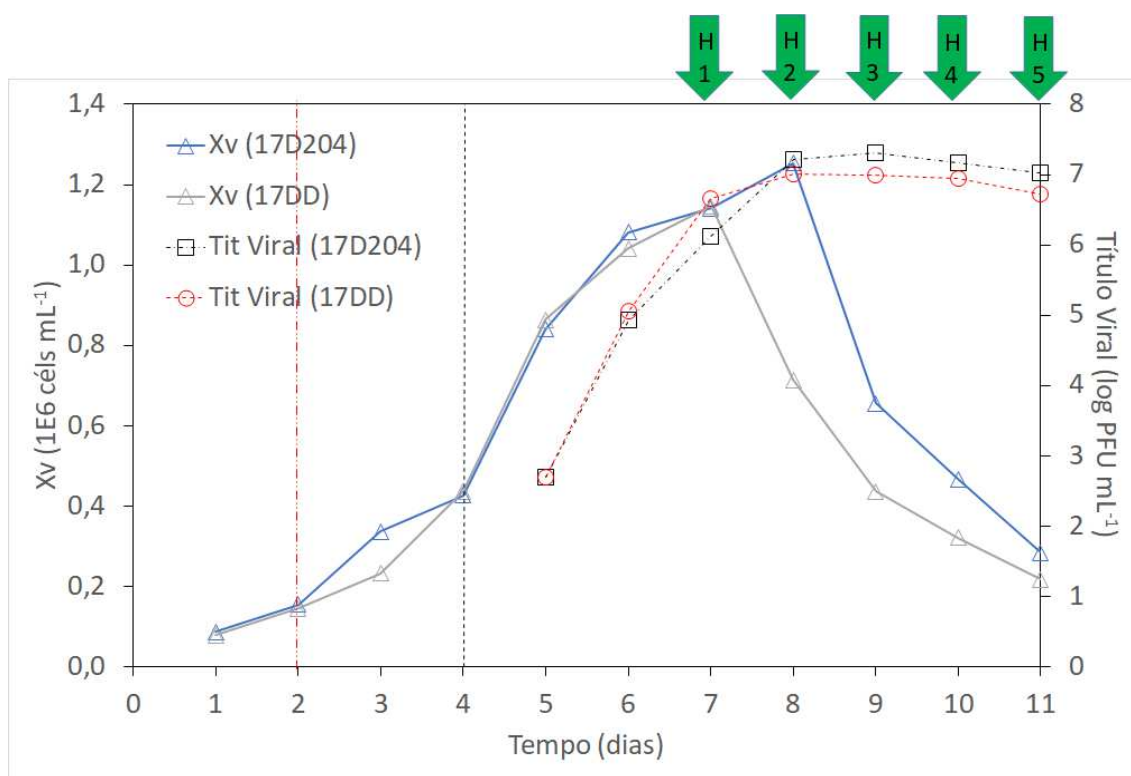


Figura 35: Perfil de concentração celular e produção do vírus de febre amarela em frascos agitados do tipo spinner usando microcarregadores Cytodex 3 em modo colheita múltipla: cinco colheitas (37/34 °C). A linha pontilhada vermelha indica a troca de 75 % do meio de cultivo, enquanto a linha pontilhada preta indica a infecção com o vírus da febre amarela e as setas verde indicam os dias das colheitas.

O título viral para a cepa vacinal 17DD no terceiro dia pós infecção, isto é, na primeira colheita (H1) foi 6,7 Log PFU mL⁻¹, na segunda colheita (H2) 7,0 Log PFU mL⁻¹, na terceira colheita (H3) 7,0 PFU mL⁻¹, na quarta colheita (H4) 6,9 PFU mL⁻¹ e na quinta e última colheita (H5) 6,7 PFU mL⁻¹.

No caso da cepa 17D 204, o título viral na primeira colheita foi de 6,1 Log PFU mL⁻¹, na segunda colheita (H2) 7,2 Log PFU mL⁻¹, na terceira colheita (H3) 7,3 Log PFU mL⁻¹ na quarta colheita (H4) 7,2 PFU mL⁻¹. E na quinta e última colheita (H5) 7,0 PFU mL⁻¹.

Portanto, estes dados demonstram a possibilidade de fazer múltiplas colheitas de suspensão vira, propagando-se a célula a 37 °C e reduzindo a temperatura para 34 °C no momento da infecção viral. O fato de que, após cada, colheita com subsequente diluição da suspensão celular em 5 vezes, o título viral se recuperava e alcançava níveis semelhantes aos obtidos na colheita anterior demonstra que, mesmo com a queda progressiva na concentração de células viáveis em geral a partir do dia 3-4 pós-infecção, a replicação viral ainda ocorria.

Na literatura, há um relato de uma estratégia baseada em colheitas múltiplas para a produção do vírus da raiva, no qual, depois de quatro dias de cultura de células Vero, o vírus foi infectado usando um MOI de 0,08 e, três dias depois da infecção, foi feita a primeira colheita, seguindo-se mais quatro colheitas com intervalo de 24 horas entre elas, 37 °C durante o crescimento celular e a 34 °C para a replicação viral. Segundo os autores este procedimento aumentou a densidade celular e a replicação viral. Foi demonstrado que este sistema é uma excelente alternativa para obtenção de suspensões virais para a formulação da vacina anti-rábica (FRAZZATI-GALLINA *et al.*, 2004).

A estratégia de colheita múltipla para a produção do vírus da febre amarela, como foi demonstrado no presente trabalho, apresenta algumas vantagens, em especial um melhor uso do banco de trabalho (WCB) e do lote de semente viral usados na produção, pois este método permite com apenas uma inoculação celular e uma infecção viral, obter um volume de suspensão viral aproximadamente 4 vezes maior que o volume de trabalho do frasco usado, com título viral semelhante ao que seria obtido no caso de apenas uma colheita (Figura 35).

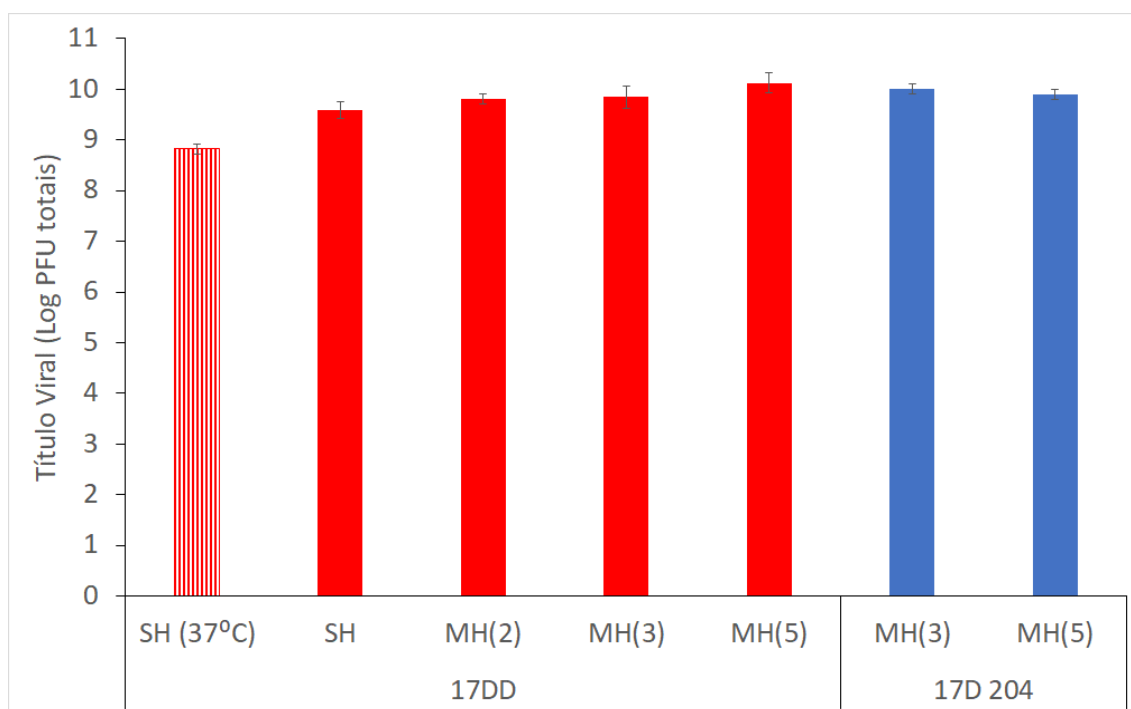


Figura 36: Comparativo das produções do vírus da febre amarela em batelada (SH) a 37 °C e múltipla colheita (MH2, MH3 e MH5) em frascos do tipo agitado (spinner) utilizando Vero WHO em microcarregadores Cytodex 3.

5.3 INVESTIGAÇÃO DA ESTABILIDADE DO VÍRUS AMARÍLICO

Como descrito anteriormente, durante a realização dos experimentos, foi observada uma perda significativa de título viral mesmo após estocagem a -70°C. Com o objetivo de investigar a estabilidade do vírus e estabelecer uma estratégia para evitar a perda de título, a cepa 17DD foi usada como modelo para avaliação de três concentrações de sacarose (0%, 4,25% e 8,5% m/v) e o impacto dos ciclos de congelamento e descongelamento das suspensões virais (2, 3 e 4 ciclos). A quantificação do título infeccioso das amostras após os ciclos de descongelamento e congelamento, na presença de diferentes concentrações de sacarose, foi realizada por titulação e este valor foi comparado com o título da SV que não sofreu ciclo de congelamento e descongelamento. Os resultados podem ser observados na Figura 37.

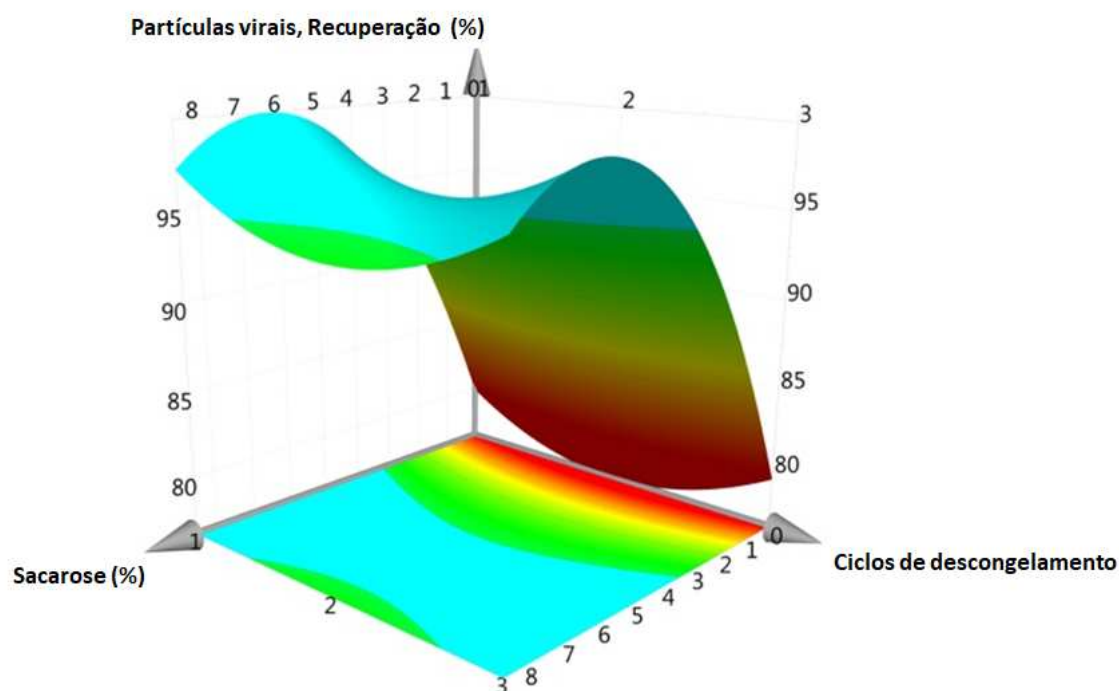


Figura 37: Gráfico de superfície de resposta da estabilidade infecciosa do vírus da febre amarela variando o número de ciclos de congelamento-descongelamento e concentração de sacarose. O título viral foi determinado pelo ensaio de placa e expresso como percentual de recuperação do produto em valores normalizados de unidades formadoras de placa (PFU mL⁻¹). A amostra foi a colheita de vírus clarificada por centrifugação não purificada (cepa 17DD).

Os resultados mostram que o número de ciclos de congelamento e descongelamento tem pouco impacto na infectividade viral, sendo a concentração de sacarose o fator determinante da estabilidade viral. Nas amostras virais que não foram estabilizadas com sacarose, houve uma redução de 20% na infectividade quando comparado à amostra controle, o que equivale a uma perda de até 1,5 Log PFU mL⁻¹. Este resultado está de acordo com perdas relatadas de 1,5 - 2,5 Log PFU por dose para vacinas liofilizadas na ausência de um estabilizador (MONATH 1996). Observou-se, ainda, que a perda de infectividade ocorre desde o primeiro ciclo de congelamento, permanecendo relativamente inalterada até o ciclo 4.

Uma concentração de sacarose de 4% m v⁻¹ parece ser o mínimo para evitar perda de infectividade, independentemente dos números de ciclos de congelamento e descongelamento. Os açúcares atuam como substitutos da água, estabilizando as proteínas e membranas via ligação de hidrogénio aos resíduos polares das biomoléculas. Um efeito protetor adicional sobre a cristalização também está envolvido: soluções concentradas de

açúcar previnem a formação de grandes cristais de gelo durante o congelamento dentro da partícula viral e da solução líquida, pela redução da temperatura de nucleação da água dentro da membrana do vírus (VIJAYASANKARAN et al., 2010).

Com base nos resultados obtidos, foi padronizada a estabilização das suspensões virais com 8% de sacarose (m v^{-1}), no caso que elas fossem congeladas. Por outro lado, suspensões virais não estabilizadas (sem sacarose) passaram a ser manipuladas por até 1 h à temperatura ambiente ou mantidas a 4°C por até 4 h.

Vale ressaltar que as amostras virais usadas neste experimento de estabilidade estavam em meio de cultura celular, sugerindo que os componentes do meio que poderiam atuar como estabilizadores (íons, aminoácidos, açúcares) não são suficientes para proteger o vírus contra danos (CHOI; GHO, 2015).

5.4 PURIFICAÇÃO DO VÍRUS DA FEBRE AMARELA

A cromatografia de exclusão estérica (SXC) se baseia no uso de uma fase estacionária hidrofílica para purificar solutos de grande tamanho, na presença de um co-solvente excluído, também denominado de substância promotora (em geral polietilenoglicol, PEG). Os solutos grandes e a fase estacionária repelem o PEG, de modo que a associação entre os mesmos é estabilizada na presença do polímero não iônico. A subsequente redução da concentração de PEG na fase móvel permite recuperar o produto purificado. O uso de SXC foi demonstrado para a purificação de diferentes vírus, tais como influenza (ARAKAWA; GAGNON, 2018; MARICHAL-GALLARDO et al., 2017), mostrando-se uma técnica simples, rápida e que promove alta pureza em uma só etapa cromatográfica, razões pelas quais foi escolhida para a purificação do vírus da febre amarela no presente trabalho.

5.4.1 Avaliação Inicial de Diferentes Concentrações de PEG-6000

Inicialmente, com base na literatura referente ao uso de SXC para o vírus influenza (MARICHAL-GALLARDO et al., 2017), escolheu-se o sistema PEG-6000 e membrana de celulose de 1 μm de tamanho de poro, e decidiu-se realizar uma avaliação inicial do impacto da concentração do polímero, na faixa de 6 a 10% m v^{-1} , sobre a recuperação do vírus da febre amarela infectivo. Como etapa de captura do vírus a partir do sobrenadante

de cultura celular clarificado, sem nenhum tratamento adicional do sobrenadante, o objetivo era maximizar o rendimento de vírus infectivo a vazões relativamente altas, que permitissem processar volumes relativamente grandes de sobrenadante.

Como mostrado na Figura 38, a recuperação do vírus infeccioso, das cepas 17DD e 17D204, nos pools de eluição situou-se na faixa de 40 a 100%. A diferença na recuperação entre as duas cepas não foi estatisticamente significativa ($p=0,17$, $0,23$ e $0,49$ para 6%, 8% e 10% $m v^{-1}$, respectivamente). Com a maior concentração de PEG-6000 testada (10% $m v^{-1}$), a recuperação foi total para ambas as cepas, tendo sido, portanto, a concentração de polímero escolhida para a continuação dos estudos.

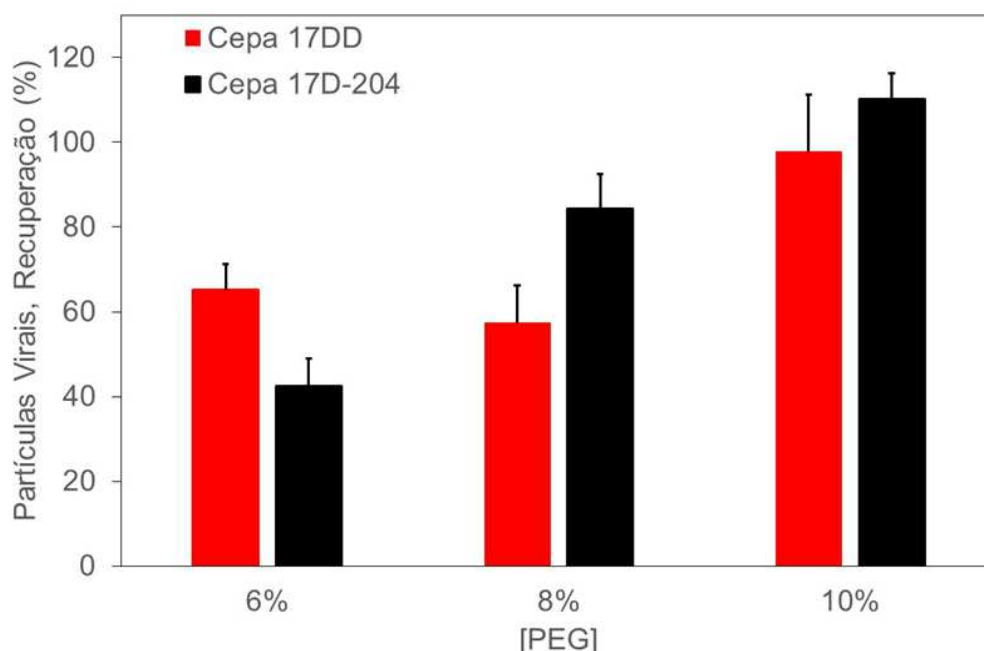


Figura 38: Comparação do uso de diferentes concentrações de PEG-6000 em cromatografia de exclusão estérica (SXC) para purificação de vírus da febre amarela (cepas 17DD e 17D204) produzidos em células Vero em meio isento de soro, usando um leito de 100 cm^2 de membranas de celulose regenerada com tamanho de poro de 1,0 μm . O título de vírus infeccioso foi determinado por ensaio de placa e expresso aqui como percentagem relativa à quantidade total de partículas alimentadas ao leito de membranas. O sobrenadante clarificado contendo os vírus foi misturado em diferentes proporções a uma solução estoque de 32% ($m v^{-1}$) de PEG-6000 para obter as concentrações de alimentação mostradas acima. As partículas de vírus purificadas foram recuperadas por um passo de eluição para uma solução aquosa de Tris-HCl 50 mM, cloreto de sódio 150 mM, pH 7,4. Os valores do gráfico são médias aritméticas $\pm$ erro padrão de réplicas analíticas ($n = 2$).

A retenção de um soluto em SXC é fortemente influenciada pelo seu tamanho: solutos maiores são retidos em concentrações menores de PEG (LEE et al., 2012). Nossos resultados estão, portanto, de acordo com a literatura, visto que para o vírus da influenza,

que é um pouco maior (80-120 nm), 8% m v⁻¹ de PEG-6000 foi suficiente para promover recuperação completa. PEG é conhecido por sua inércia em relação a biomoléculas, visto que mesmo concentrações elevadas de PEG não exercem efeito detectável sobre o espectro de dicroísmo circular e a temperatura de fusão de proteínas (ATHA; INGHAMG, 1981). Na verdade, PEGs já foram reportados como estabilizantes proteicos (BHAT e TIMASHEFF, 1992), o que coincide com nossa observação de que amostras do vírus da FA armazenados na presença de PEG, sem adição de sacarose, não apresentaram perda de título viral. Para amostras contendo sacarose, não foi observado nenhum efeito da mesma sobre a recuperação das partículas virais em SXC.

5.4.2 Estabelecimento do Processo de Purificação por SXC

Após o *screening* da concentração de PEG a ser usada na alimentação, foi testada a vazão de operação e o efeito do tratamento prévio com uma nuclease para digerir DNA, utilizando maiores volumes de alimentação por área de membrana do que nos experimentos anteriores.

Nestes testes, o sobrenadante clarificado foi digerido com Denarase por um hora à temperatura ambiente, enquanto, em relação aos experimentos anteriores, a carga alimentada foi aumentada em dez vezes (ficando na faixa de 300-350 mL por 100 cm² de membrana) e a vazão foi duplicada (10 mL min⁻¹ ou 122 cm h⁻¹). Os balanços de massa com as recuperações encontram-se na Tabela 14 e um cromatograma típico é mostrado na Fig. 37A.

As concentrações de dsDNA, que no sobrenadante clarificado se encontravam na faixa de 4400 a 4800 ng mL⁻¹ para as duas cepas virais, foram reduzidas em cerca de 98% por meio da digestão com a nuclease, ficando em torno de 80-100 ng mL⁻¹. A etapa de SXC promoveu uma redução adicional de 64 e 73% no nível de dsDNA para a cepa 17DD e 17D-204, respectivamente, enquanto a remoção de proteína total nesta etapa foi de cerca de 92%-95%.

A maior parte das partículas virais infecciosas foi recuperada nos primeiros 5 mL da eluição e uma recuperação aproximadamente completa foi alcançada em 10 ml de eluído, para ambas as cepas virais, conforme mostrado na Tabela 13. Comparativamente, Pato et al. (2014), utilizando uma membrana de troca aniônica forte (Q, 75 cm²) para a etapa de captura de vírus da febre amarela produzido em células Vero em meio de livre

de soro animal, alcançaram recuperações de aproximadamente 80%, quando o vírus foi quantificado em termos de partículas virais infecciosas, ou cerca de 93%, quando foi quantificado em termos de proteína do envelope viral por ensaio ELISA.

A distribuição de tamanho de partículas foi determinada por sedimentação diferencial centrífuga para o sobrenadante clarificado e a fração eluída de SXC (Fig. 37B) e apresentou um pico monodisperso na faixa de 25-55 nm, mostrando que SXC não induziu a formação de agregados. Análises de DLS do eluído mostraram um pico de 40-50 nm, com a presença adicional de espécies na faixa de 200-600 nm, que poderiam ser estruturas vesiculares não detectadas pela sedimentação diferencial centrífuga. A microscopia eletrônica de transmissão (Fig. 39C) revelou a presença de partículas virais de tamanho homogêneo e forma esperada, na faixa de 35-45 nm, assim como impurezas residuais (potencialmente vesículas) de tamanhos variados.

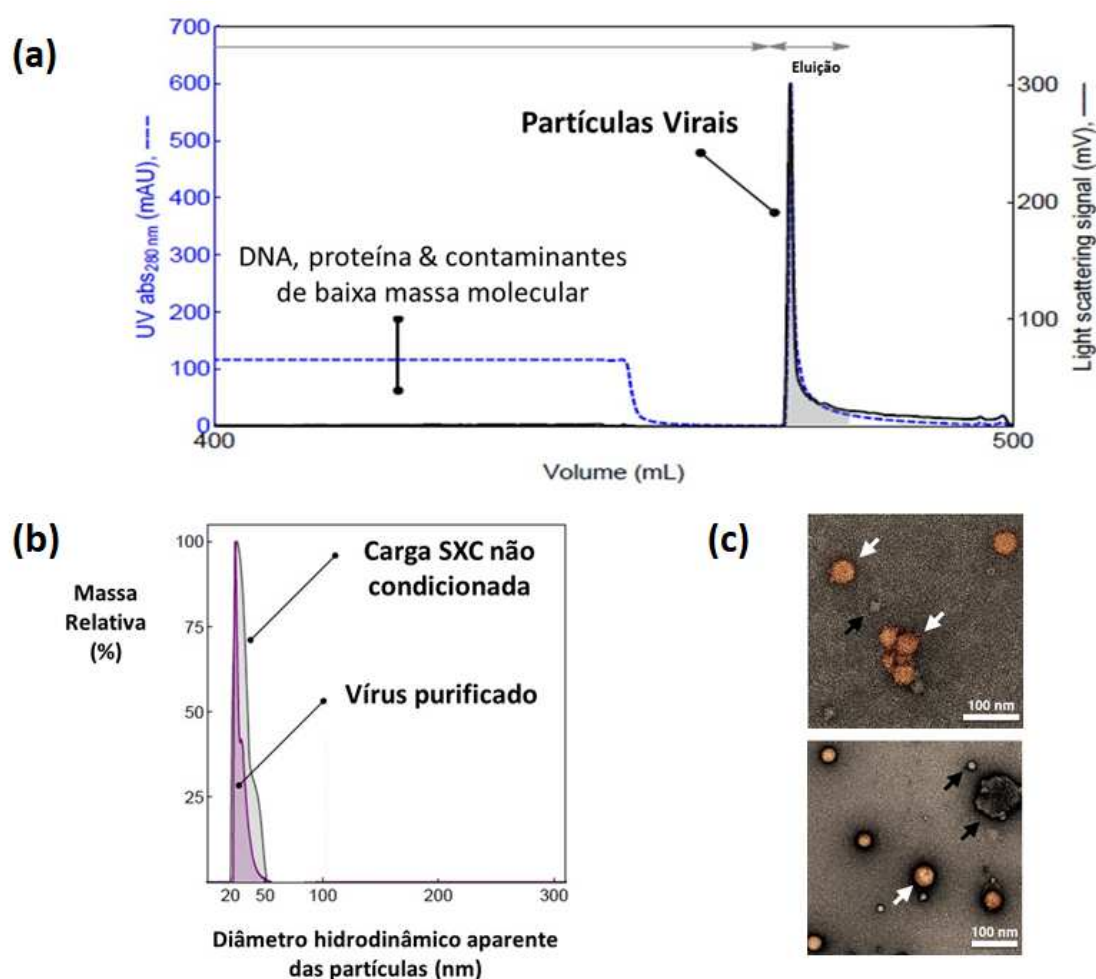


Figura 39: Cromatografia de exclusão estérica (SXC) de partículas do vírus da febre amarela (cepa 17DD) produzidas em células Vero em meio isento de soro, utilizando membranas de celulose regenerada com tamanho de poro de 1,0 μm . (a) cromatograma típico. A região sombreada indica as

partículas do vírus purificadas e recuperadas por eluição com um degrau de tampão de Tris-HCl 50 mM, cloreto de sódio 150 mM, pH 7,4. (b) Distribuição do tamanho das partículas por sedimentação centrífuga diferencial (DCS) antes (cinza) e depois (vermelho) da purificação por SXC. A amostra alimentada foi suspensão viral clarificada e inativada antes da adição de PEG. As curvas mostram um pico monodisperso de 25 - 55 nm, sem indicação da presença de agregados. (c) Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) de partículas de vírus da febre amarela purificadas por SXC. As partículas virais (setas brancas) são homogêneas em forma e tamanho, com um diâmetro aproximado de 35 nm. Impurezas residuais (setas pretas), como estruturas vesiculares, podem ser observadas.

Considerando a dose da vacina de FA atualmente comercializada, que deve conter no mínimo $4,74 \log_{10}$ PFU (STAPLES et al., 2018), as frações eluídas dos experimentos detalhados na Tabela 14 continham 0,65-1,85 ng de DNA por dose, dependendo da cepa viral. A tumorigenicidade e infectividade de DNA da célula hospedeira são considerados riscos potenciais para vacinas, de modo que o Comitê de Especialistas em Padrões Biológicos da Organização Mundial da Saúde em 1997 estabeleceu que níveis de até 10 ng DNA (menor que 200 pares de bases) por dose de produto injetável produzido em linhagens contínuas – tais como Vero – são aceitáveis. Este limite não se aplica a linhagens celulares diploides, culturas primárias ou vacinas orais, mesmo que produzidas por linhagens contínuas (FINN; EGAN, 2018). Sendo assim, os vírus purificados por SXC já se enquadravam no quesito que diz respeito ao DNA da célula hospedeira enquanto contaminante crítico derivado do processo.

Uma vantagem do processo com SXC, quando comparado a um processo utilizando cromatografia de troca iônica, é a questão do pH. A SXC permite trabalhar em uma ampla gama de pH, conferindo robustez ao processo e eliminando a necessidade de condicionar o sobrenadante a um determinado valor de pH antes da alimentação ao processo. Além disso, este fato permite que a operação se dê em pH neutro, que por sua vez foi determinado por Pato et al. (2014) como o pH de máxima estabilidade para o vírus 17DD.

Quando o volume de sobrenadante clarificado aplicado à membrana de 100 cm^2 foi aumentado para 600-700 mL, observou-se que a recuperação se manteve total, indicando uma alta capacidade dinâmica para a fase estacionária de SXC. Nestas condições, aplicando um sobrenadante com título viral na faixa de $1,75 \times 10^8$ PFU mL^{-1} para 17DD a $6,03 \times 10^8$ PFU mL^{-1} (17D-204), foi possível purificar vírus suficiente para preparar 33774 e 112316 doses, respectivamente, com níveis de DNA de 12,7 e 4,5 ng por dose e níveis de proteína total medida por ensaio de Bradford de 14,7 e 9,5 ng, respectivamente, confirmando o bom desempenho de SXC para a purificação do vírus da febre amarela produzido em células Vero em meio isento de componentes de origem animal. (Tabela 14).

Tabela 14: Quantidades calculadas de doses de vacina de febre amarela a partir de execuções por cromatografia de exclusão estérica (SXC) do vírus da febre amarela produzidas em culturas de células Vero. As colheitas de vírus clarificadas foram tratadas com nuclease para digestão de DNA antes da cromatografia. O SXC foi procedido em membranas com uso único, estas constituídas de coluna de celulose regenerada de 100 cm² com tamanho de poro de 1,0 µm e a alimentação ajustada para 10% de PEG-6000. As partículas de vírus purificadas foram recuperadas por um passo de eluição para uma solução tampão de Tris-HCl 50 mM, cloreto de sódio 150 mM, pH 7,4. Os valores indicados são médias aritméticas ± erro padrão das réplicas analíticas.

Cepa	Volume (mL)		FC ^c	Produto purificado (elução)				
	inicial ^a	final ^b		Título Viral (PFU mL ⁻¹)		Doses ^e (n)	Proteínas por dose ^f (ng)	DNA por dose ^g (pg)
				PFU mL ⁻¹	Recuperação (%)			
17DD	1009,4	10	100,9	$1,75 \times 10^8 \pm 1,77 \times 10^7$	97,7 ± 13,8	33774 ± 3203	12,7 ± 1,2	14,7 ± 1,4
17D 204	896,1	10	89,6	$6,03 \times 10^8 \pm 1,28 \times 10^7$	110,2 ± 6,1	112316 ± 2321	4,5 ± 0,1	9,5 ± 0,2

PFU, unidade formadora de placas de lise

^a colheita viral clarificada tratada com nuclease antes do condicionamento com PEG

^b pools da eluição SXC

^c fator de concentração volumétrica

^d por ensaio de placas

^e considerando um título de $\geq 4,74 \text{ Log PFU dose}^{-1}$ para a vacina comercial

^f Proteínas totais por ensaio de Bradford (máx 250×10^3 ng de proteína total por dose)

^g dsDNA por ensaio de PicoGreen (máx 10^3 pg DNA por dose)

Para fins de comparação, o processo de produção da vacina de febre amarela à base de ovos embrionados tem um rendimento de 100-300 doses por ovo (STAPLES *et al.*, 2018). As aproximadamente 100.000 doses, que foram purificadas a partir de aproximadamente 1 L de suspensão viral da cepa 17D-204, substituiriam de 333 a 1000 OVOS.

Os resultados obtidos são muito promissores para o desenvolvimento de um novo processo para purificação de vírus para vacinas, não somente para febre amarela, mas também para outros flavivírus, uma vez que a SXC separa em função do tamanho e, portanto, pode constituir uma plataforma universal para purificação de vírus. Apenas em uma etapa de captura, os vírus foram purificados com recuperação próxima a 100% e níveis de proteína total e dsDNA conforme preconizado pelas agências regulatórias.

Tabela 15: Balanços de massa e recuperações obtidas para a cromatografia de exclusão estérica (SXC) do vírus da febre amarela (FA) produzido em células Vero em meio isento de soro animal. A SXC foi realizada utilizando membrana de celulose regenerada (100 cm²) com tamanho com tamanho de poro de 1,0 µm e ajustando a alimentação para 10% de PEG-6000.

Cepa	Nuclease	Amostra	Volume (mL)	Produto		Impurezas			
				Título Viral (PFU mL ⁻¹)		Proteína		DNA	
				Log	%	(µg mL ⁻¹)	%	(ng mL ⁻¹)	%
17DD	sim	Alimentação	443,2	6,28 ± 0,06	100	49,4 ± 0,2	100	61,7 ± 5,2	100
		FT + lavagem	463,2	4,92 ± 0,02	4,5 ± 0,5	44,7 ± 0,1	94,6 ± 0,5	<LOD	<LOD
		Eluato 1	5,0	8,20 ± 0,03	93,5 ± 10,8	163,4 ± 1,6	7,5 ± 0,0	1093,4 ± 35,8	37,6 ± 2,0
		Eluato 2	5,0	7,10 ± 0,08	7,6 ± 1,3				
		Σ (FT + lavagem + eluatos)			105,6 ± 10,9		102,0 ± 0,5		37,6 ± 2,0
17D 204	sim	Alimentação	437,3	6,18 ± 0,03	100	53,6 ± 7,2	100	63,1 ± 3,7	100
		FT + lavagem	467,3	4,76 ± 0,08	4,0 ± 0,6	47,0 ± 5,2	91,7 ± 16,0	<LOD	<LOD
		Eluato 1	5,0	8,12 ± 0,16	101,4 ± 26,7	182,0 ± 1,5	7,8 ± 1,0	747,6 ± 33,0	27,1 ± 1,7
		Eluato 2	5,0	6,98 ± 0,19	7,5 ± 2,3				
		Σ (FT + lavagem + eluatos)			112,9 ± 26,8		99,5 ± 16,1		27,1 ± 1,7

5.5 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE N-GLICOSILAÇÃO DAS CEPAS VACINAIS DE FA

O *pool* do eluído da purificação por SXC se encontra em tampão Tris-HCl 50 mM, o que dificulta a posterior análise de perfil de glicosilação da partícula viral por meio da técnica utilizada, uma vez que a amostra deve estar em uma solução com concentração baixa de sais e em tampão fosfato pH 7,0. Por isso, primeiramente foi realizada a troca para tampão de fosfato 50 mM pH 7,0 utilizando o concentrador Vivaspin® Turbo 2 (*cut off* de 100,000 MWCO, Sartorius). As amostras de vírus 17DD e 17D 204 purificadas foram então tratadas com PNGase F para liberação dos glicanos ligados, para análise dos mesmos por meio de HILIC-HPLC. Os N-glicanos foram liberados com êxito e em tempo menor do que reportado por Tayi e colaboradores (TAYI; BUTLER, 2015).

5.5.1 Análise do Perfil Global de N-glicosilação de FA por HILIC-HPLC

A técnica de HILIC-HPLC permite a separação dos glicanos com base em sua hidrofilia, e é um método rápido, sensível e de alta resolução, desenvolvido para detectar quantidades em femtomoles (10^{-15}) de misturas de glicanos ácidos e neutros simultaneamente (GUILLE et al., 1996; REUSCH et al., 2015; ROYLE et al., 2008).

Os glicanos foram derivatizados com 2AB e adsorvidos à coluna TSKgel Amide 80. Foi utilizado um gradiente de formiato de amônio:acetonitrila para sua eluição. O método demonstrou bom desempenho em relação à separação dos glicanos, mostrando-se adequado para a análise da N-glicosilação do vírus da febre amarela. É descrita na literatura, que a detecção dos glicanos após a derivatização com 2AB é sensível (REUSCH *et al.*, 2015). Foi observada a presença de 12 picos para a cepa 17D 204 e 8 picos para a cepa 17DD. Ressalta-se que o número menor de picos identificados pelo software do equipamento para a cepa 17DD provavelmente está relacionado a menor concentração desta amostra, visto que os dois cromatogramas mostram perfis equivalentes na corrida cromatográfica. Os perfis obtidos em função do tempo de retenção na coluna são mostrados na Figura 40.

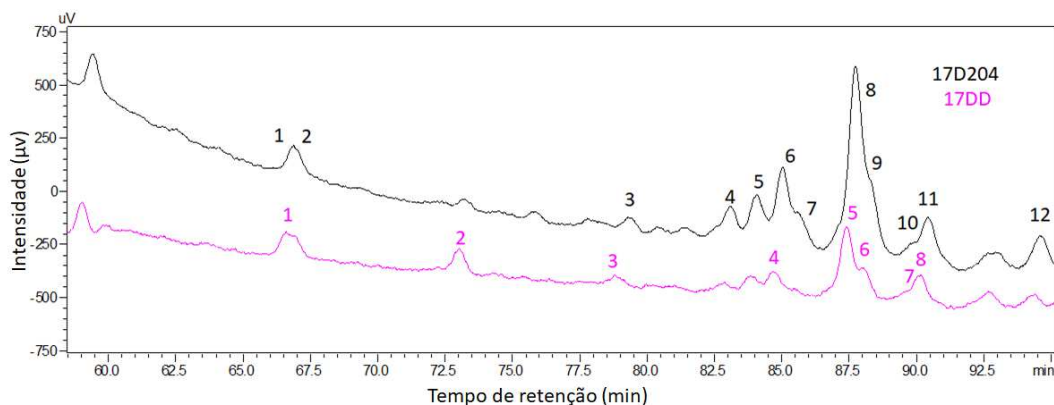
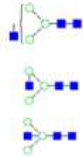
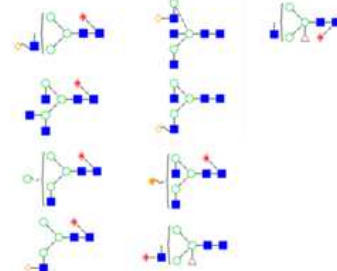
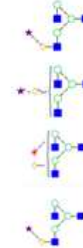


Figura 40: Cromatograma obtido por análise de HILIC-HPLC de amostra de glicanos liberados do vírus da febre amarela (Cepas 17DD e 17D 204). Os resultados mostram os perfis cromatográficos das duas cepas vacinais de FA: em preto a cepa 17D 204 e cepa 17DD em magenta são similares.

Com os tempos de retenção dos picos identificados nas corridas cromatográficas, foi feita a conversão de tempo de retenção para unidades de glicose (UG) e os dados foram comparados com a Glycobase 3.2.4 (<https://glycostore.org/displayCollection/Published%20Glycans>) obtendo-se 29 possíveis estruturas de oligossacarídeos para a cepa 17DD (Tabela 16) e 62 possíveis estruturas de oligossacarídeos para a cepa 17D 204 (Tabela 17).

Tabela 16: Possíveis N-glicanos principais da cepa 17DD representados por nomenclatura e estruturas preliminares. A amostra viral purificada foi desnaturada, foi clivada com PNGase F, separada por HILIC-HPLC e comparada com ladder de dextrana hidrolisada e feita busca na Glycobase 3.2.4 para possíveis estruturas.

Pico	Tempo de retenção experimental (min)	Conversão em unidade de glicose (UG)	Comparação com a Glycobase 3.2.4		
			Possíveis estruturas	UG	Denominação
1	66,60	4,90		4,96±0,05 4,92±0,04 4,96 ±0,2	A1 (Id:718) A1[6] (Id:725) M3B (Id:629)
2	73,02	5,64		5,66 ± 0,07	A1G1 (Id:776)
3	78,80	6,38		6,10 ± .29 6,28 ± .14 6,32 ± .12 6,35 ± .05 6,35 ± .07 6,38 ± .07 6,39 6,39 6,39	F(6)A1G1 (Id:796) F(6)A3 (Id:638) F(6)M4A1[3] (Id: 882) F(6)A1[3]G(4) (Id: 912) A2[6]BG(4)1 (Id: 633) A2[3]G1 (Id:690) F(6)A2GalNac1 (Id:951) XA1F(4)1 (Id:663) F(3)XA1 (Id: 662)
4	84,69	7,21		7,24 ± 0,36 7,07 ± 0,17 7,14 ± 0,09 7,24 ± 0,36	A2[3]G(4)1S(6)1 (Id:827) A2G1S1 (Id:890) A2F(3)1G(4)1 (Id:721) A2[3]G(4)1S(6)1 (Id:827)

■ N-acetilglicosamina ● manose ● galactose ● fucose ★ N-acetilsearminico

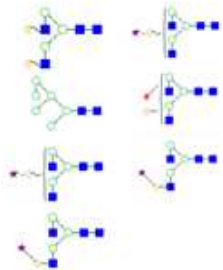
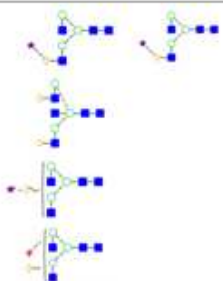
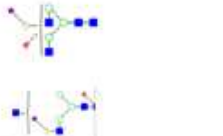
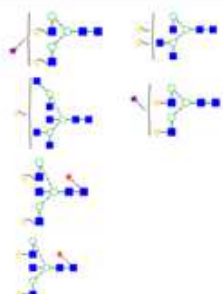
Pico	Tempo de retenção experimental (min)	Conversão em unidade de glicose (UG)	Comparação com a Glycobase 3.2.4		
			Possíveis estruturas	UG	Denominação
5	87,41	7,64	      	7,79 ± 0,19 7,64 7,66 ± 0,03 7,68 ± 0,04 7,70 ± 0,34 7,78 ± 0,26 7,79 ± 0,19	A2G2S[3]1 (Id:785) A4BG1 (Id:868) F(6)A2BG2 (Id:914) F(6)A2BG(4)2 (Id:943) A3G2 (Id:891) A2G(4)2S(6)1 (Id:941) A2G2S[3]1 (Id:785)
6	87,96	7,73	  	7,79 ± 0,19 7,68 ± 0,4 7,70 ± 0,34	A2G2S[3]1 (Id:785) F(6)A2BG(4)2 (Id:943) A3G2 (Id:891)
7	89,80	8,02		8,0 ± 0,1	A2G(4)2S1 (Id:859)
8	90,18	8,09		8,0 ± 0,1	A2G(4)2S1 (Id:859)

 N-acetylglucosamina
  manose
  galactose
  fucose
  N-acetilneuraminio

Figura 41: Continuação da Tabela 16.

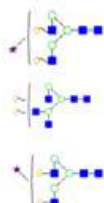
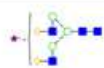
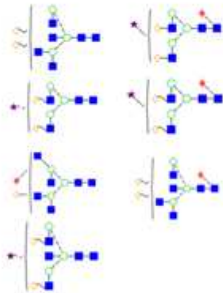
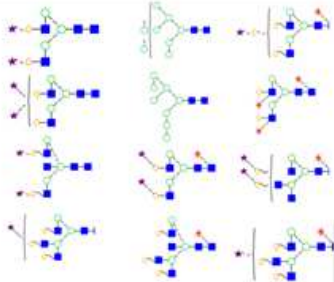
Tabela 17: Possíveis N-glicanos da cepa 17D 204 representados por nomenclatura e estruturas preliminares (Global). A amostra viral purificada foi desnaturada, foi clivada com PNGase F, separada por HILIC-HPLC e comparada com ladder de dextrana hidrolisada e feita busca na Glycobase 3.2.4 para possíveis estruturas.

Pico	Tempo de retenção experimental (min)	Conversão em unidade de glicose (UG)	Comparação com a Glycibase 3.2.4		
			Possíveis estruturas	UG	Denominação
1	66,88	4,93	  	4,96±0,05 4,92±0,04 4,96 ±0,2	A1 (Id:718) A1[6] (Id:725) M38 (Id:629)
2	67,05	4,95	  	4,96±0,05 4,92±0,04 4,96 ±0,2	A1 (Id:718) A1[6] (Id:725) M38 (Id:629)
3	79,31	6,45	      	6,32 ± .12 6,38 ± .07 6,42 ± .06 6,46 ± .03 6,47 ± .21 6,50 ± .07 6,60 ± .19	F[6]M4A1[3] (Id: 882) A2[3]G1 (Id:690) A2[6]BG1 (Id:655) A2[3]G(4)1 (Id:937) A2G(4)1 (Id:833) A2[3]BG(4)1 (Id:938) M4A1G(4)1 (Id:830)
4	83,08	6,96	     	6,96 6,86 ±0,16 6,96 ±0,0 6,96 6,98 ±0,19	A1[3]G(4)1S(3)1 (Id:650) A1[3]G(4)1S(6)1 (Id:651) M6 (Id:27384) M6 D2 (Id:625) A2[6]G(4)1S(6)1 (Id:950)

Pico	Tempo de retenção experimental (min)	Conversão em unidade de glicose (UG)	Comparação com a Glycibase 3.2.4		
			Possíveis estruturas	UG	Denominação
5	84,08	7,12		7,12 ± 0,04 7,06 ± 0,05 7,07 ± 0,17 7,24 ± 0,36 7,07 ± 0,17 7,14 ± 0,09 7,24 ± 0,36	A2G2 {id:927} M6 D1{id:687} A2G1S1 {id:890} A2[3]G(4)1S(6)1 {id:827} A2G1S1 {id:890} A2F[3]1G(4)1 {id:721} A2[3]G(4)1S(6)1 {id:827}
6	85,05	7,27		7,24 ± 0,36 7,28 ± 0,06 7,07 ± 0,17 7,14 ± 0,09 7,24 ± 0,36	A2[3]G(4)1S(6)1 {id:827} A2BG(4)2 {id:729} A2G1S1 {id:890} A2F[3]1G(4)1 {id:721} A2[3]G(4)1S(6)1 {id:827}
7	85,63	7,36		7,36 7,33 ± 0,02	A2F[3]1G(4)1S(6)1 {id:856} F(6)A1[3] G94[1]S(6)1 + GlcNac
8	87,74	7,69		7,79 ± 0,19 7,69 7,66 ± 0,03 7,68 ± 0,04 7,70 ± 0,34 7,78 ± 0,26	A2G2S(3)1 {id:785} A4BG1 {id:868} F(6)A2BG2 {id:914} F(6)A2BG(4)2 {id:943} A3G2 {id:891} A2G(4)2S(6)1 {id:941}

 N-acetilgli cosamina
  manose
  galactose
  fucose
  N-acetilneuraminico

Figura 42: Continuação da Tabela 17.

Pico	Tempo de retenção experimental (min)	Conversão em unidade de glicose (UG)	Comparação com a Glycobase 3.2.4		
			Possíveis estruturas	UG	Denominação
9	88,12	7,75		7,79 ± 0,19 7,70 ± 0,34 7,78 ± 0,26	A2G2S(3)1 (Id:785) A3G2 (Id:891) A2G(4)2S(6)1 (Id:941)
10	90,11	8,07		8,0 ± 0,1	A2G(4)2S1 (Id:859)
11	90,42	8,13		8,13 7,91 ± 0,21 7,98 ± 0,14 8,03 ± 0,25 8,13 ± 0,19 8,13 ± 0,13 8,15 ± 0,03	A3BG2 (Id:808) A2G2S1 (Id:875) A4F(3)1G(4)1 (Id:839) A2BG2S1 (Id:876) F(6)A2G(4)2S(6)1 (Id:683) F(6)A2G2S(6)1 (Id:840) F(6)A3BG2 (Id:893)
12	94,61	8,88		8,74 ± 0,24 8,59 ± 0,28 8,67 ± 0,65 8,77 ± 0,24 8,81 ± 0,1 8,86 ± 0,02 8,96 ± 0,25 8,97 ± 0,14 9,07 ± 0,29 9,08 ± 0,29 9,13 ± 0,48 9,19 ± 0,38 9,57 ± 0,76	A2G(4)2S2 (Id:860) A2G(4)2S(3.6)2 (Id:919) A2BG2S2 (Id:878) A3G3S(6)1 (Id:910) M8 (Id:616) M8 D1 .D3 (Id:295) F(6)A2G(4)2S(6.6)2 (Id:649) F(6)A3BG3 (Id:932) F(6)A2G2Ga1S1 (Id:708) F(6)A2F(3)2G(4)2 (Id:847) F(6)A3G2S(6.6)2 (Id:895) F(6)A3G3S1 (Id:841) A3G3S2 (Id:711)

 N-acetilglicosamina
  manose
  galactose
  fucose
  N-acetilneuramínico

Figura 43: Continuação da Tabela 17.

5.5.2 Digestão Sequencial com Exoglicosidases para Determinação dos Glicanos Presentes

O grupo de Guile e colaboradores sugeriram uma digestão enzimática com determinadas exoglicosidases para a confirmar as estruturas de glicanos propostas a partir da análise prévia do perfil global de N-glicosilação. Esta digestão é muito útil quando os valores

de UG determinados na análise global não são suficientes para identificar de forma definitiva a estrutura dos glicanos devido a diversas possíveis estruturas obtidas (GUILÉ et al., 1996).

Em decorrência da especificidade de clivagem de cada enzima e do perfil cromatográfico obtido após cada clivagem com cada enzima, torna-se possível elucidar de forma definitiva as estruturas glicídicas efetivamente presentes.

Para exemplificar a análise feita, foram escolhidas as corridas cromatográficas produzidas com a cepa 17DD. O primeiro cromatograma representa a amostra não digerida. As amostras foram sucessivamente digeridas com uma série de exoglicosidases: a primeira enzima utilizada foi sialidase de *Arthrobacter ureafaciens* (α 2-3,6,8 ácido siálico) (ABS), a qual removeu o ácido siálico (NANA) ligado em α 2-3 à galactose; na sequência, a β -galactosidase de testículos bovinos (β 1-3,4,6) (BTG) removeu a galactose ligada em β 1-4 à N-acetilglicosamina (GlcNAc), sequencialmente, a β -N-acetil-hexosaminidase de *Canavalia ensiformis* (β 1-2,3,4,6) (JBH) removeu GlcNAc ligada à manose, a α -fucosidase de rim bovino (α 1-2,3,4,6) (BKF) removeu a fucose ligada em α 1-6 à GlcNAc e a α -manosidase de *Canavalia ensiformis* (α 1-2,3,6) (JBM) removeu manose ligada (α 1-3- e α 1-6) à manose. No caso do pico 7, que se sugere ser um glicano sialilado, claramente houve uma perda deste pico ao se usar a sialidase ABS no cromatograma correspondente a esta enzima (Figura 41). Quando foram usadas as enzimas ABS e BTG (cromatograma ABS/BTG), comparando-se com o controle não digerido, observou-se a perda dos picos 3, 4, 5, 6 e 7, o que indica que poderiam se tratar de glicanos mono e digalactosilados. No caso da enzima manosidase (JBM), quando somente ela foi adicionada à amostra, observou-se uma perda do pico 3, com o qual sugeriu-se que este se tratava de um glicano de alta manose. Nota-se que, com ABS/BTG/JBH/BKF, apareceram picos nos tempos de retenção 58 a 68 minutos, que seriam o core do glicano (GlcNAc2Man3), visto que ambos mostraram tempos de retenção diferentes comparados ao controle não digerido (Figura 42).

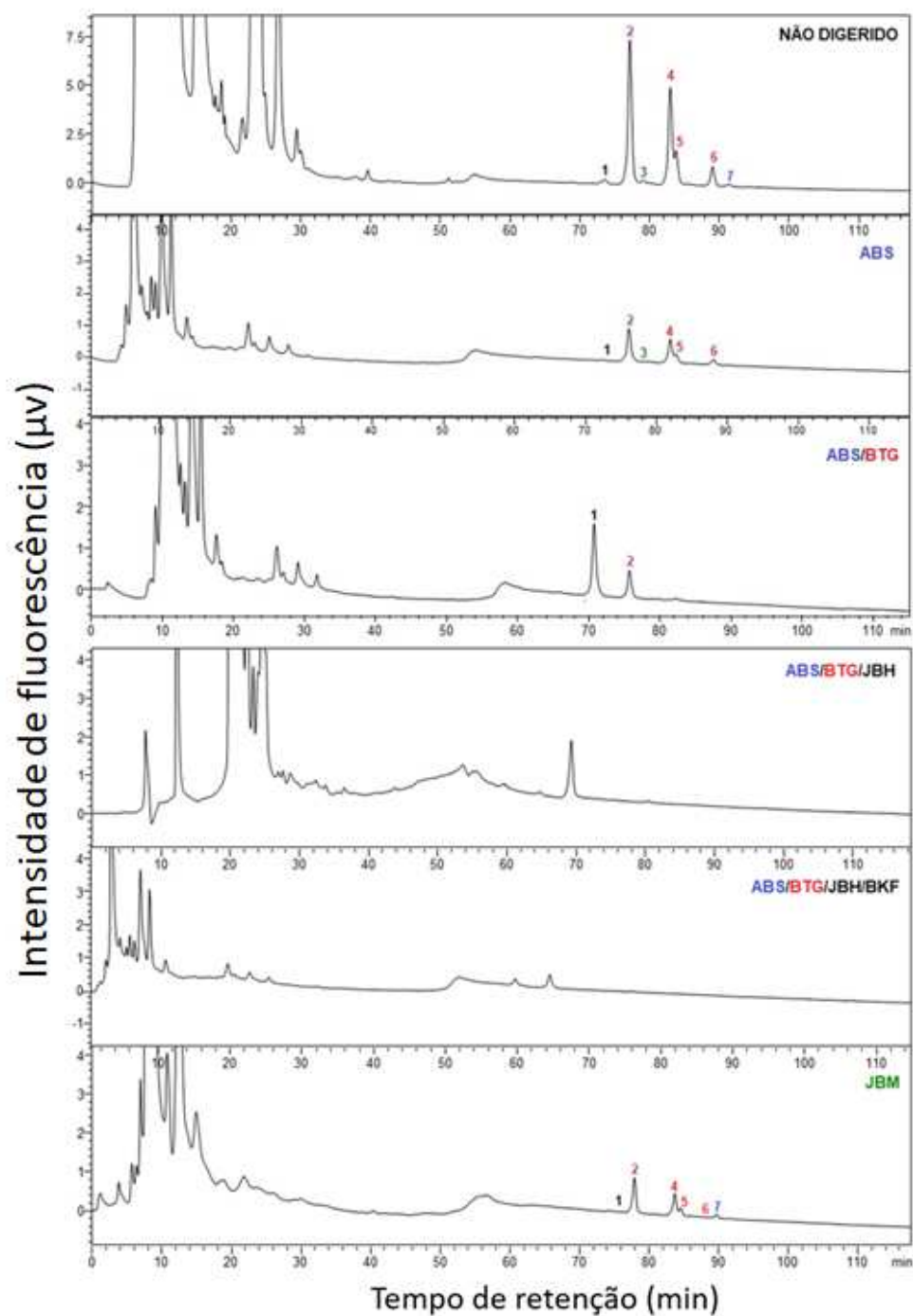
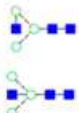
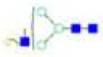
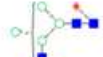
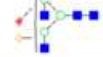
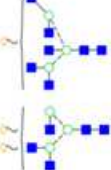
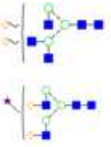
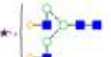


Figura 44: Análise com exoglicosidases (17DD). Os N-Glicanos foram liberados, marcados com o fluoróforo 2-aminobenzamida (2-AB) e analisados por HILIC-HPLC. Cromatograma: 1) Amostra não digerida, 2) ABS, sialidase, 3) ABS/ BTG, β -galactosidase, 4) ABS/BTG/ JBH, β -N-acetil-hexosaminidase, 5) ABS/BTG/JBH/ BKF, α -fucosidase e 6) JBM, α -manosidase.

Como resultado do tratamento com exoglicosidases dos glicanos liberados da amostra da cepa viral 17DD e da utilização de GlycoBase 3.2.4., foram descartadas várias estruturas da Tabela 16 e foram propostas as estruturas e as ligações entre os monossacarídeos mostradas na Tabela 18.

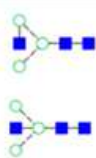
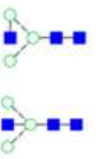
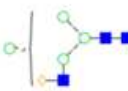
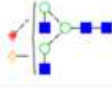
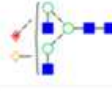
A mesma análise foi feita para a cepa 17D 204 e foram descartadas várias estruturas da Tabela 17 e propostas as estruturas e as ligações entre os monossacarídeos presentes na Tabela 19.

Tabela 18: **N-glicanos propostos para a cepa 17DD do vírus FA.** Após confirmação por digestão sequencial com diferentes exoglicosidases e análise das amostras digeridas por HILIC-HPLC, e comparados com a Glycobase 3.2.4.

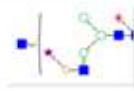
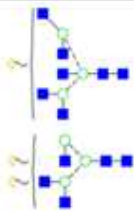
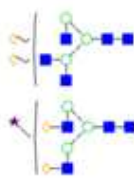
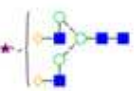
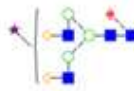
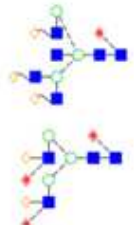
Pico	Tempo de retenção experimental (min)	Conversão em unidade de glicose (UG)	Comparação com a Glycobase 3.2.4		
			Estruturas possíveis	UG	Denominação
1	66,60	4,90		4,92±0,04 4,96 ±0,2	A1[6] (Id:725) M3B (Id:629)
2	73,02	5,64		5,66 ± 0,07	A1G1 (Id:776)
3	78,80	6,38		6,32 ± .12	F[6]M4A1[3] (Id: 882)
4	84,69	7,21		7,14 ± 0,09	A2F[3]1G(4)1 (Id:721)
5	87,41	7,64		7,64 7,70 ± 0,34	A4B61 (Id:868) A3G2 (Id:891)
6	87,96	7,73		7,70 ± 0,34 7,78 ± 0,26	A3G2 (Id:891) A2G(4)2S[6]1 (Id:941)
7	89,80	8,02		8,0 ± 0,1	A2G(4)2S1 (Id:859)
8	90,18	8,09		8,0 ± 0,1	A2G(4)2S1 (Id:859)

■ N-acetilglicosamina ● manose ● galactose ● fucose ★ N-acetilneuramínico

Tabela 19: N-glicanos propostos para a cepa 17D 204 do vírus FA. Após confirmação por digestão sequencial com diferentes exoglicosidases e análise das amostras digeridas por HILIC-HPLC, e comparados com a Glycobase 3.2.4.

Pico	Tempo de retenção experimental (min)	Conversão em unidade de glicose (UG)	Comparação com a Glycobase 3.2.4		
			Estruturas possíveis	UG	Denominação
1	66,88	4,93		4,92±0,04 4,96 ±0,2	A1[6] (Id:725) M3B (Id:629)
2	67,05	4,95		4,92±0,04 4,96 ±0,2	A1[6] (Id:725) M3B (Id:629)
3	79,31	6,45		6,60 ± .19	M4A1G(4)1 (Id:830)
4	83,08	6,96		6,96	M6 D2 (Id:625)
5	84,08	7,12		7,14 ± 0,09	A2F(3)1G(4)1 (Id:721)
6	85,05	7,27		7,14 ± 0,09	A2F(3)1G(4)1 (Id:721)

■ N-acetilglicosamina ● manose ◆ galactose ◆ fucose ★ N-acetilneuramínico

Pico	Tempo de retenção experimental (min)	Conversão em unidade de glicose (UG)	Comparação com a Glycobase 3.2.4		
			Estruturas possíveis	UG	Denominação
7	85,63	7,36		7,33 ± 0,02	F(6)A1[3]G94)1S(6)1 + GlcNac
8	87,74	7,69		7,64 7,70 ± 0,34	A4BG1 (Id:868) A3G2 (Id:891)
9	88,12	7,75		7,70 ± 0,34 7,78 ± 0,26	A3G2 (Id:891) A2G(4)2S(6)1 (Id:941)
10	90,11	8,07		8,0 ± 0,1	A2G(4)2S1 (Id:859)
11	90,42	8,13		8,13 ± 0,19	F(6)A2G(4)2S(6)1 (Id:683)
12	94,61	8,88		8,97 ± 0,14 9,08 ± 0,29	F(6)A3BG3 (Id:932) F(6)A2F(3)2G(4)2 (Id:847)

 N-acetilglicosamina
  manose
  galactose
  fucose
  N-acetilneuraminico

Figura 45: Continuação da Tabela 19.

Os dados apresentados na Figura 46 correspondem às abundâncias (obtidas segundo a área dos picos) relativas de cada glicano encontradas na cepa 17DD, apresentadas como média ± desvio padrão de duas corridas independentes por amostra, no perfil cromatográfico

desta cepa foram encontrados 8 picos, destes não foi possível propor apenas uma estrutura de glicanos para os picos 1 e 5.

As estruturas de glicanos proposta para a 17DD foram: pico 1 (A1 e M3B), pico 2 (A1G1), pico 3 (F(6)M4A1[3]), pico 4 (A2F(3)1G(4)1), pico 5 (A4BG1 e A3G2), pico 6 (A3G2 e A2G(4)2S(6)1), nos picos 7 e 8 é encontrada o mesma estrutura (A2G(4)2S1), por este motivo são representados por apenas uma coluna no gráfico abaixo (Figura 46).

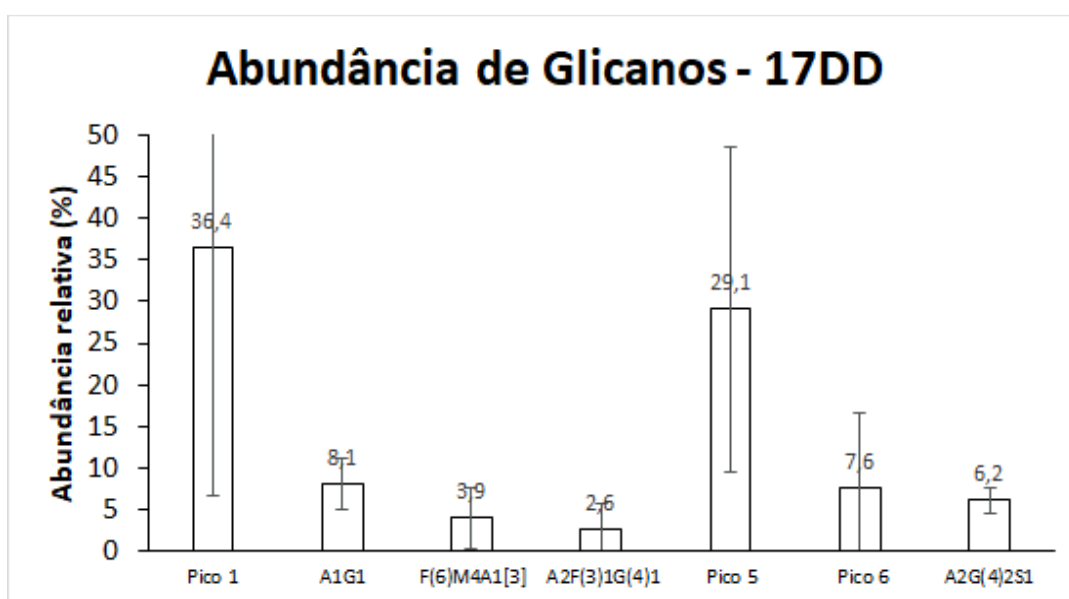


Figura 46: Abundância relativa das glicofórmulas encontradas na cepa 17DD. Estas glicofórmulas foram detectadas utilizando HILIC após liberação de PNGase F e marcação com 2-AB, conforme análise global (Tabela 17). Os dados estão representados como média e desvio padrão (duplicata analítica da mesma amostra).

Na Figura 43, são apresentados os dados que descrevem as abundâncias relativas de cada glicano encontradas na cepa 17D 204, apresentadas como média $\pm$ desvio padrão de duas corridas independentes por amostra. Para esta cepa foram encontrados 12 picos, dos quais não foi possível propor uma estrutura de glicanos para os picos 1, 2, 8, 9 e 12.

As estruturas de glicanos propostas para a 17D 204 foram: pico 1 e pico 2 (A1 e M3B), pico 3 (M4A1G(4)1), pico 4 (M6 D2), pico 5 e pico 6 (A2F(3)1G(4)1), pico 7 (F(6)A1[3] G94)1S(6)1 + GlcNac), pico 8 (A4BG1 e A3G2), pico 9 (A3G2 e A2G(4)2S(6)1), pico 10 (A2G(4)2S1), pico 11 (F(6)A2G(4)2S(6)1) e pico 12 (F(6)A3BG3 e F(6)A2F(3)2G(4)2) (Figura 46).

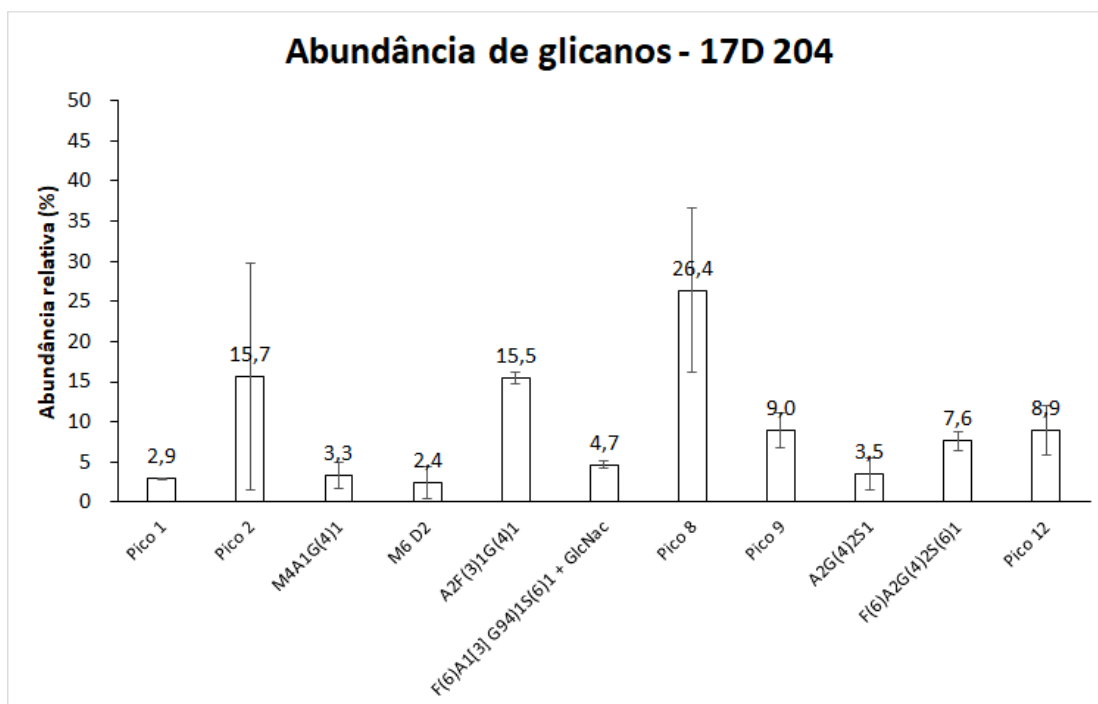


Figura 47: Abundância relativa das glicoformas encontradas na cepa 17D 204. Estas glicoformas foram detectadas utilizando HILIC após liberação de PNGase F e marcação com 2-AB, conforme análise global (Tabela 18). Os dados estão representados como média e desvio padrão (duplicata analítica da mesma amostra).

Com base nos resultados obtidos nas corridas cromatográficas para a proposição de possíveis estruturas para os glicanos encontrados para as duas cepas virais testadas, foram confeccionadas duas figuras, uma para cada cepa viral, onde as estruturas definidas após digestão sequencial com as exoglicosidases foram adicionados aos perfis encontrados na análise global dos glicanos (Figuras 48 e 49).

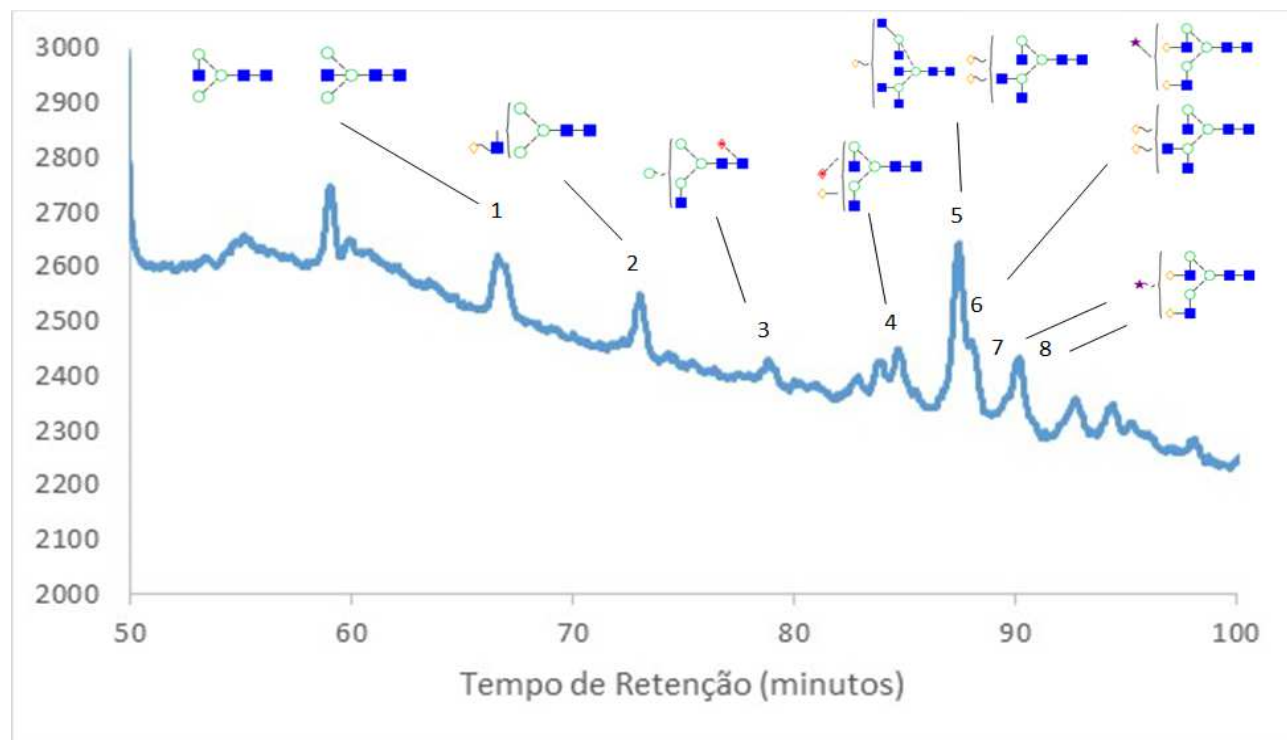


Figura 48: Cromatograma obtido e estruturas de glicanos propostas pela análise por HILIC-HPLC de amostra de glicanos liberados da cepa 17DD. O tempo de retenção dos picos de glicanos foram comparados com o ladder de dextrana, convertendo o tempo de retenção dos picos em unidades de glicose (UG). As estruturas de glicanos propostas após a digestão com as exoglicosidases foram indicadas para os diferentes picos obtidos na análise global.

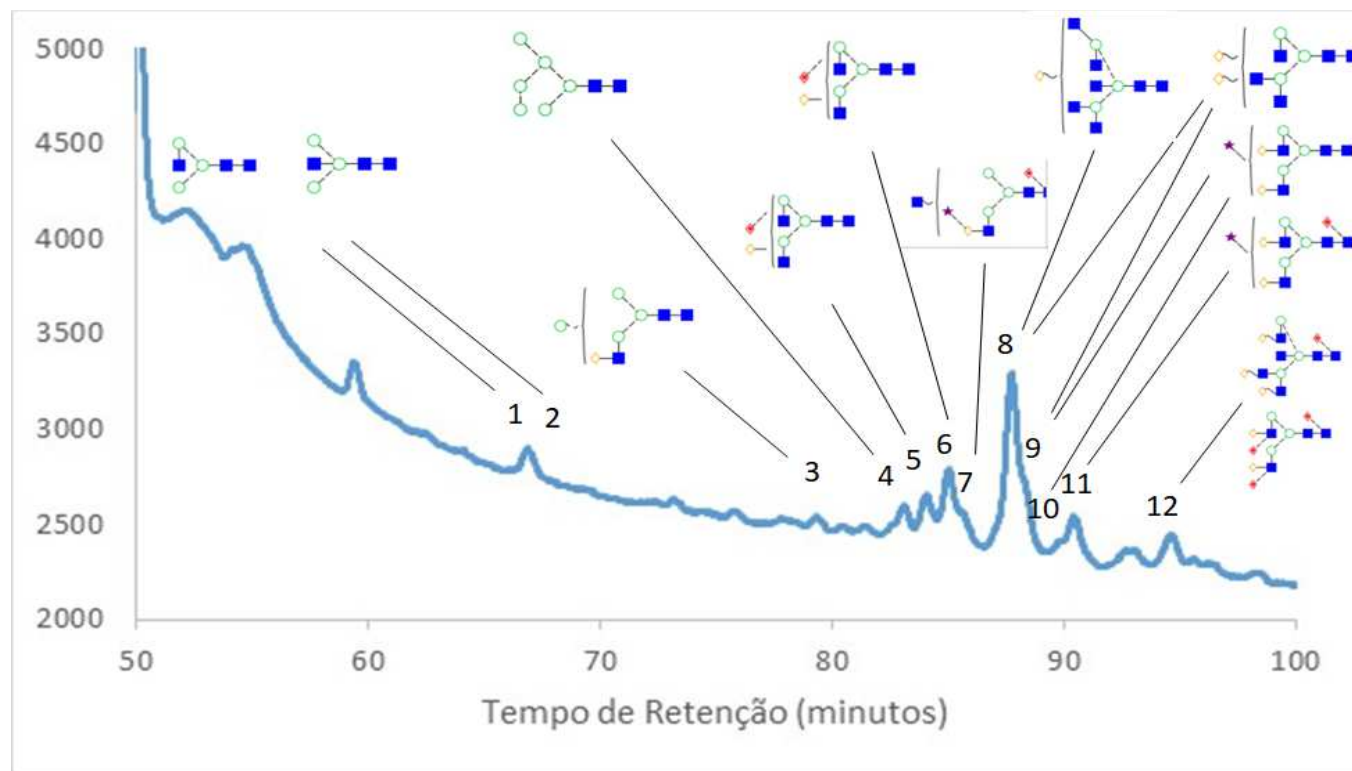


Figura 49: Cromatograma obtido e estruturas de glicanos propostas pela análise por HILIC-HPLC de amostra de glicanos liberados da cepa 17D 204. O tempo de retenção dos picos de glicanos foram comparados com o ladder de dextrana, convertendo o tempo de retenção dos picos em unidades de glicose (UG). As estruturas de glicanos propostas após a digestão com as exoglicosidases foram indicadas para os diferentes picos obtidos na análise global.

As glicoproteínas produzidas em cultura de células de mamíferos desempenham um papel importante na fabricação de muitos produtos biológicos. Para garantir uma qualidade consistente dos produtos produzidos, os perfis de glicosilação deveriam idealmente ser rigorosamente controlados, uma vez que esta afeta propriedades importantes das proteínas, incluindo a antigenicidade nas partículas virais. No nível proteico, glicosilação é responsável pelo correto enovelamento das estruturas das proteínas, tráfico e estabilidade das mesmas e, também desempenha funções de reconhecimento do receptor ao ligante (ROBY; FUNK; KHRROMYKH, 2012).

O significado da glicosilação de prM em flavivírus parece ser duplo, impactando tanto na montagem e quanto na liberação das partículas virais (ROBY et al., 2015). Por outro lado, a glicosilação da proteína E foi associada ao aumento da virulência em modelos de infecção de mamíferos e aviários e transmissão eficiente por mosquitos. Foi também sugerido que a glicosilação na proteína E potencializa fenótipos de virulência, facilitando a entrada de vírus mediada pelo receptor (STAPLES et al., 2018).

Apesar de sua grande importância, o perfil de glicosilação dos diferentes vírus utilizados na produção de vacinas é pouco estudado, talvez pela necessidade de amostras purificadas e concentradas para a realização da análise e pela complexidade da técnica.

Neste trabalho detectou-se uma mistura de glicanos e estes podem ser encontrados na proteína E e na prM, o pool dos glicanos estudados são destas duas proteínas virais

Dois dos mais caracterizados receptores para flavivírus dependem quase exclusivamente da glicosilação da proteína E para interação ou não com a prM em partículas virais imaturas/parcialmente maduras: as proteínas transmembranares tetraméricas de tipo II que contêm domínios de reconhecimento de carboidratos dependentes de Ca^{2+} + DCSIGN e DC-SIGNR ((KIM et al., 2017). Algumas reconstruções feitas a partir das imagens de microscopia eletrônica de transmissão criogênica da proteína E de DENV ligadas ao domínio de reconhecimento de carboidratos dependentes de DC-SIGN demonstraram que os glicanos ligados a N67 na proteína E, em vez dos encontrados no resíduo N153/4 conservado nos flavivírus, são necessários para a ligação do vírus (POKIDYSHEVA *et al.*, 2006).

Existe, portanto a necessidade de caracterização do perfil de glicosilação das partículas virais produzidas em cultura celular, e a técnica de HILIC-HPLC para a separação e detecção dos glicanos marcados com 2AB, mostrou ser uma excelente ferramenta para esta análise.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, podem ser traçadas as seguintes conclusões:

- ✓ As células Vero foram adaptadas ao cultivo em meios de cultura isentos de soro Opti Mem e ProVero 1 usando um protocolo de adaptação direta de meio contendo 10% v v⁻¹ SFB para os frascos de cultivo contendo meio sem soro.
- ✓ A produção do vírus da febre amarela (cepas 17DD e 17D 204) utilizando células Vero aderentes em microcarregadores demonstrou ser um processo viável e prático, quando comparado ao processo produtivo tradicional usando ovos embrionados.
- ✓ A utilização do microcarregador Cytodex 3 forneceu, dentro das faixas estudadas, as melhores condições de cultivo e as maiores concentrações celulares ($1,2 \times 10^6$ células mL⁻¹).
- ✓ As melhores condições de infecção definidas no planejamento experimental foram: MOI de 0,002, TOI de 5 dias e TOH de 4 dias. Nestas condições, o título viral máximo obtido foi de 7,3 Log PFU mL⁻¹.
- ✓ Demonstrou-se a possibilidade de conduzir o processo de produção viral com “*shift*” de temperatura de 37 °C para 34 °C no momento de infecção, e de fazer colheitas repetidas do vírus da febre amarela, diluindo-se a cultura celular infectada ao volume de trabalho inicial após cada colheita de 80% do volume de trabalho.
- ✓ A realização de um processo com 5 colheitas sucessivas a partir da mesma cultura celular infectada uma vez permitiu obter uma quantidade de suspensão viral cerca de 5 vezes maior com aproximadamente o mesmo título viral possibilitando a economia de banco de células e lote semente viral.

- ✓ A produção de altos títulos do vírus da febre amarela em microcarregadores, utilizando o meio isento de soro (Opti MEM) e colheitas repetidas contribui para o desenvolvimento de uma nova tecnologia, alternativa ao uso de ovos embrionados para a produção de uma nova vacina de febre amarela.
- ✓ A técnica de purificação investigada (cromatografia de exclusão estérica - SXC), bem como as condições de processo estabelecidas mostram-se adequados para a obtenção do vírus purificado e concentrado e parecem aplicáveis a processos em escala industrial.
- ✓ As condições estabelecidas para SXC, resultaram em uma recuperação total ($\approx 100\%$ por ensaio de placas) do vírus, utilizou-se $10\% \text{ v v}^{-1}$ de PEG-6000 para a purificação de ambas as cepas virais.
- ✓ O uso de sacarose como criopreservante, permitiu a manutenção da estabilidade do vírus armazenado a -70°C e submetido a ciclos de congelamento/descongelamento.
- ✓ A técnica de HILIC-HPLC demonstrou ser um método simples e robusto para a separação e detecção de glicanos, permitindo a elucidação do padrão de glicosilação presente nas prtoteínas do vírus de febre amarela (cepas 17DD e 17D 204).

6.2 SUGESTÕES

Como sugestões para trabalhos futuros, propõe-se:

- ✓ Investigar o escalonamento das condições do frasco spinner para biorreatores de tanque agitado, assim como estudar o emprego do modo de cultivo contínuo com retenção celular (perfusão).
- ✓ Realizar estudos de estabilidade da SV após a etapa de captura para determinação das melhores condições de estocagem.

- ✓ Investigar o uso de membranas adsorvente, de celulose sulfatada (SCMA) para uma etapa de purificação, visando ao polimento/aprimoramento do grau de pureza.
- ✓ Um aprofundamento da análise de glicanos das duas cepas vacinais de febre amarela por HILIC-HPLC, partindo de amostras mais concentradas, que permitam um menor desvio experimental.

7. REFERÊNCIAS

- AITKEN, T. H. G. et al. Transovarial transmission of yellow fever virus by mosquitoes (*Aedes aegypti*). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 28, n. 1, p. 119–121, 1979.
- ALLISON, S. L. et al. Mutational Evidence for an Internal Fusion Peptide in Flavivirus Envelope Protein E. **Journal of Virology**, v. 75, n. 9, p. 4268–4275, 1 maio 2001.
- ARAKAWA, T.; GAGNON, P. **Excluded Cosolvent in Chromatography** *Journal of Pharmaceutical Sciences* Elsevier B.V., , 1 set. 2018.
- ARIZA, J. M. A. **Avaliação do padrão de glicosilação de um anticorpo monoclonal produzido por células CHO**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2017.
- ATHA, D. H.; INGHAMG, K. C. Mechanism of Precipitation of Proteins by Polyethylene Glycols. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Printed in U.S. A**, v. 256, n. 23, p. 12108–12117, 1981.
- BARRETT, P. N. et al. **Vero cell platform in vaccine production: Moving towards cell culture-based viral vaccines** *Expert Review of Vaccines*, 1 maio 2009.
- BAUER, J. H.; HUDSON, N. P.; STOKES, A. Experimental Transmission of Yellow Fever to Laboratory Animals 1. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. s1-8, n. 2, p. 103–164, 1 mar. 1928.
- BEASLEY, D. W. C. et al. Envelope Protein Glycosylation Status Influences Mouse Neuroinvasion Phenotype of Genetic Lineage 1 West Nile Virus Strains. **Journal of Virology**, v. 79, n. 13, p. 8339–8347, 1 jul. 2005.
- BICA, A. N. Desenvolvimento da cepa 17-D e requisitos para produção da vacina contra Febre Amarela. In: HOMMA, A. (Ed.). **Simpósio Internacional sobre Febre Amarela e Dengue. Cinquentenário da introdução da cepa 17D no Brasil**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1988.
- BIRCH, J. R.; RACHER, A. J. **Antibody production** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 7 ago. 2006.
- BRASIL, M. DA S. **Febre amarela - Situação Epidemiológica no Brasil**. Brasília: [s.n.]. Disponível em: <<http://u.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-febre-amarela>>.
- BURDEN, C. S. A monolith purification process for virus-like particles from yeast homogenate. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 880, p. 82–89, 2012.
- BUTLER, M. et al. Application of a serum-free medium for the growth of Vero cells and the production of reovirus. **Biotechnology Progress**, v. 16, n. 5, p. 854–858, 2000.
- BUTLER, M. **Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for**

recombinant proteins produced by mammalian cell systems*Cytotechnology*, mar. 2006.

BUTLER, M. Modificações pós-tradução em proteínas recombinantes. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. (Eds.). . **Tecnologia do Cultivo de Células Animais - de Biofármacos a Terapia Gênica**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2008.

BYRNE, K. **High density CHO cell cultures: Improved productivity and product quality**. [s.l.] Dublin City University, 2014.

CALHEIROS, L. B. Febre Amarela no Brasil. In: HOMMA, A. (Ed.). . **Simpósio Internacional sobre Febre Amarela e Dengue. Cinquentenário da introdução da cepa 17D no Brasil**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1988.

CALVERT, A. E. et al. Mutations in the West Nile prM protein affect VLP and virion secretion in vitro. **Virology**, v. 433, n. 1, p. 35–44, 10 nov. 2012.

CASTRO, P. M. L. et al. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 84–90, out. 1992.

CAUFOUR, P. S. et al. Construction, characterization and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 viruses. **Virus research**, v. 79, n. 1–2, p. 1–14, 5 nov. 2001.

CHAMBERS, T. Flavivirus Genome Organization, Expression, And Replication. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 649–688, 1 jan. 1990.

CHARCOSSET, C. Review: Purification of proteins by membrane chromatography. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 71, n. 2, p. 95–110, fev. 1998.

CHEN, Z.; KE, Y.; CHEN, Y. A serum-free medium for hybridoma cell culture. **Cytotechnology**, v. 11, n. 3, p. 169–174, jan. 1993.

CHICO, E.; RODRÍGUEZ, G.; FIGUEIREDO, A. Biorreatores para Células Animais. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. (Eds.). . **Tecnologia do Cultivo de Células Animais - de Biofármacos a Terapia Gênica**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2008.

CHOI, D. S.; GHO, Y. S. Isolation of Extracellular Vesicles for Proteomic Profiling. In: POSCH, A. (Ed.). . **Proteomic Profiling**. New York, NY: Springer, 2015.

CHOI, Y. et al. Inactivated Hantaan virus vaccine derived from suspension culture of Vero cells. **Vaccine**, v. 21, n. 17–18, p. 1867–73, 16 maio 2003.

CHU, L.; ROBINSON, D. K. **Industrial choices for protein production by large-scale cell culture***Current Opinion in Biotechnology*Elsevier Ltd, , 1 abr. 2001.

CLEAVES, G. R.; RYAN, T. E.; WALTER SCHLESINGER, R. Identification and characterization of type 2 dengue virus replicative intermediate and replicative form RNAs. **Virology**, v. 111, n. 1, p. 73–83, 1981.

COLEMAN, W. **Yellow Fever in the North**. Madison: Univeristy of Wisconsin Press, 1987.

DAELLI, M. G. et al. **EP1942182B1 - Vero cell line which is adapted to grow in suspension, method of obtaining same and viral vaccines**, 2006. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/EP1942182B1>>. Acesso em: 16 nov. 2019

DELLEPIANE, N.; GRIFFITHS, E.; MILSTIEN, J. B. New challenges in assuring vaccine quality. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 78, n. 2, p. 155–62, 2000.

DESMYTER, J.; MELNICK, J. L.; RAWLS, W. E. Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). **Journal of virology**, v. 2, n. 10, p. 955–61, out. 1968.

DIALLO, M.; THONNON, J.; FONTENILLE, D. Vertical transmission of the yellow fever virus by *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae): Dynamics of infection in F1 adult progeny of orally infected females. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, n. 1, p. 151–156, 2000.

DOYLE, A.; GRIFFITHS, J. B. **Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology**. England: John Wiley & Sons, 1998.

DUFFY, J. **Sword of pestilence**. Baton Rouge, LA: LSU Press, 1966.

DUTARY, B. E.; LEDUC, J. W. **Transovarial transmission of yellow fever virus by a sylvatic vector, haemagogus equinus** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1981.

FA, R. et al. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. **Nature**, v. 375, n. 6529, p. 291–298, 1995.

FINLAY, C. J. El mosquito hipotéticamente considerado como agente de transmisión de la fiebre amarilla. **Rev Cubana Salud Pública**, v. 37, n. 5, 2011.

FINN, T. M.; EGAN, W. Vaccine Additives and Manufacturing Residuals. In: PLOTKIN, S. A.; ORENSTEIN, W. A.; EDWARDS, K. M. (Eds.). **Vaccines Licensed in The United States**. Philadelphia: Elsevier Inc., 2018. p. 75–83.

FONTENILLE, D. et al. First evidence of natural vertical transmission of yellow fever virus in *Aedes aegypti*, its epidemic vector. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 5, p. 533–535, 1997.

FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION. **Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/characterization-and-qualification-cell-substrates-and-other-biological-materials-used-production>>. Acesso em: 17 nov. 2019.

- FORCIC, D. et al. Concentration and purification of rubella virus using monolithic chromatographic support. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 13–14, p. 981–986, 15 abr. 2011.
- FOX, J. P.; PENNA, H. A. BEHAVIOR OF 17D YELLOW FEVER VIRUS IN RHESUS MONKEYS. **American Journal of Epidemiology**, v. 38, n. 2, p. 152–172, set. 1943.
- FRAHIA NETO, H. O recente reencontro do Aedes aegypti em Belém, Pará. **Revista Paulista Médica**, v. 71, n. 259, 1967.
- FRAZZATTI-GALLINA, N. M. et al. Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. **Vaccine**, v. 23, n. 4, p. 511–517, 9 dez. 2004.
- FRAZZATTI-GALLINA, N. M. et al. Higher production of rabies virus in serum-free medium cell cultures on microcarriers. **Journal of biotechnology**, v. 92, n. 1, p. 67–72, 14 dez. 2001.
- GASPAR, L. P. et al. Pressure-inactivated yellow fever 17DD virus: Implications for vaccine development. **Journal of Virological Methods**, v. 150, n. 1–2, p. 57–62, jun. 2008.
- GENZEL, Y.; FISCHER, M.; REICHL, U. Serum-free influenza virus production avoiding washing steps and medium exchange in large-scale microcarrier culture. **Vaccine**, v. 24, n. 16, p. 3261–3272, 12 abr. 2006.
- GERMAIN, M. et al. Isôlement du virus de la fièvre jaune à partir de la ponte et larves d'une tique, Amblyomma variegatum. **Comptes Rendus des Séances de L'Académie des Sciences Paris ser. D**, v. 289, n. 635, 1979.
- GLASSY, M. C.; THARAKAN, J. P.; CHAU, P. C. Serum-free media in hybridoma culture and monoclonal antibody production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 32, n. 8, p. 1015–1028, 1988.
- GOLLINS, S. W.; PORTERFIELD, J. S. Flavivirus infection enhancement in macrophages: An electron microscopic study of viral cellular entry. **Journal of General Virology**, v. 66, n. 9, p. 1969–1982, 1985.
- GOLLINS, S. W.; PORTERFIELD, J. S. The uncoating and infectivity of the Flavivirus West Nile on interaction with cells: Effects of pH and ammonium chloride. **Journal of General Virology**, v. 67, n. 9, p. 1941–1950, 1986a.
- GOLLINS, S. W.; PORTERFIELD, J. S. pH-dependent fusion between the flavivirus West Nile and liposomal model membranes. **Journal of General Virology**, v. 67, n. 1, p. 157–166, 1986b.
- GOTO, A. et al. Role of the N-linked glycans of the prM and E envelope proteins in tick-borne encephalitis virus particle secretion. **Vaccine**, v. 23, n. 23, p. 3043–3052, 27 abr. 2005.
- GUILE, G. R. et al. A rapid high-resolution high-performance liquid chromatographic

method for separating glycan mixtures and analyzing oligosaccharide profiles. **Analytical Biochemistry**, v. 240, n. 2, p. 210–226, 5 set. 1996.

HAN, K. K.; MARTINAGE, A. Post-translational chemical modification(s) of proteins. **The International journal of biochemistry**, v. 24, n. 1, p. 19–28, 1992a.

HAN, K. K.; MARTINAGE, A. Possible relationship between coding recognition amino acid sequence motif or residue(s) and post-translational chemical modification of proteins. **The International journal of biochemistry**, v. 24, n. 9, p. 1349–63, set. 1992b.

HANNA, S. L. et al. N-linked glycosylation of west nile virus envelope proteins influences particle assembly and infectivity. **Journal of virology**, v. 79, n. 21, p. 13262–74, nov. 2005.

HASE, T.; SUMMERS, P. L.; ECKELS, K. H. Flavivirus entry into cultured mosquito cells and human peripheral blood monocytes. **Archives of virology**, v. 104, n. 1–2, p. 129–43, 1989.

HEINZ, F. X.; ALLISON, S. L. The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. **Current opinion in microbiology**, v. 4, n. 4, p. 450–5, ago. 2001.

HEINZ, F. X.; MANDL, C. W. The molecular biology of tick-borne encephalitis virus. Review article. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 101, n. 10, p. 735–745, 1993.

HIMES, V. B.; HU, W. □S. Attachment and growth of mammalian cells on microcarriers with different ion exchange capacities. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 29, n. 9, p. 1155–1163, 1987.

HOMMA, A. Desenvolvimento e produção da vacina contra a febre amarela no Brasil. In: **Anais das perspectivas tecnológicas em Saúde: os desafios da leishmaniose e da febre amarela**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia de Imunobiológicos, 2002. p. 108–118.

JOSEFSBERG, J. O.; BUCKLAND, B. **Vaccine process technology** **Biotechnology and Bioengineering**, jun. 2012.

KALFBUSS-ZIMMERMANN, B.; REICHL, U. Viral Vaccines Purification. In: WEN, E. P.; ELLIS, R.; PUJAR, N. S. (Eds.). . **Vaccine Development and Manufacturing**. 1. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2005. p. 97–180.

KALFBUSS, B. Direct capture of influenza A virus from cell culture supernatant with Sartobind anion-exchange membrane adsorbers. **Journal of Membrane Science**, v. 299, p. 251–260, 2007.

KALLEL, H. et al. Evaluation of various serum and animal protein free media for the production of a veterinary rabies vaccine in BHK-21 cells. **Journal of biotechnology**, v. 95, n. 3, p. 195–204, 23 maio 2002.

KANAI, R. et al. Crystal structure of west nile virus envelope glycoprotein reveals viral

surface epitopes. **Journal of virology**, v. 80, n. 22, p. 11000–8, nov. 2006.

KANG, Y. K. Development of an Alternative Monoclonal Antibody Polishing Step. **Biopharm International**, v. 25, n. 5, p. 34–46, 2012.

KIM, E. J.; KIM, N. S.; LEE, G. M. Development of a serum-free medium for the production of humanized antibody from Chinese hamster ovary cells using a statistical design. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal**, v. 34, n. 10, p. 757–761, 1998.

KIM, J.-M. et al. A single N-linked glycosylation site in the Japanese encephalitis virus prM protein is critical for cell type-specific prM protein biogenesis, virus particle release, and pathogenicity in mice. **Journal of virology**, v. 82, n. 16, p. 7846–62, ago. 2008.

KISTNER, O. et al. Cell culture (Vero) derived whole virus (H5N1) vaccine based on wild-type virus strain induces cross-protective immune responses. **Vaccine**, v. 25, n. 32, p. 6028–6036, 10 ago. 2007.

KOLASKAR, A. S.; KULKARNI-KALE, U. Prediction of three-dimensional structure and mapping of conformational epitopes of envelope glycoprotein of Japanese encephalitis virus. **Virology**, v. 261, n. 1, p. 31–42, 15 ago. 1999.

LANGFIELD, K. K. et al. Manufacture of measles viruses. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 737, p. 345–366, 2011.

LEE, E. et al. Both E protein glycans adversely affect dengue virus infectivity but are beneficial for virion release. **Journal of virology**, v. 84, n. 10, p. 5171–80, maio 2010.

LEE, E.; WEIR, R. C.; DALGARN, L. Changes in the dengue virus major envelope protein on passaging and their localization on the three-dimensional structure of the protein. **Virology**, v. 232, n. 2, p. 281–290, 9 jun. 1997.

LEE, G. M. et al. Development of a serum-free medium for the production of erythropoietin by suspension culture of recombinant Chinese hamster ovary cells using a statistical design. **Journal of Biotechnology**, v. 69, n. 2–3, p. 85–93, 15 abr. 1999.

LEE, J. et al. Principles and applications of steric exclusion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1270, p. 162–170, 28 dez. 2012.

LEUTHOLD, M.; FABER, R.; FISCHER-FRÜHHOLZ, S. **96well Plate Membrane Adsorber Screening for Buffer and Salt Influence**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.sartorius-stedim.com/sartobind>. Acesso em: 17 nov. 2019.

LI, J. et al. The glycosylation site in the envelope protein of West Nile virus (Sarafend) plays an important role in replication and maturation processes. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 3, p. 613–622, mar. 2006.

LI, L. et al. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: Structure and maturation. **Science**, v. 319, n. 5871, p. 1830–1834, 28 mar. 2008.

LIU, C. C. et al. High immunogenic enterovirus 71 strain and its production using serum-

- free microcarrier Vero cell culture. **Vaccine**, v. 25, n. 1, p. 19–24, 2 jan. 2007.
- LIU, C. H.; CHU, I. M.; HWANG, S. M. Factorial designs combined with the steepest ascent method to optimize serum-free media for CHO cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 4–5, p. 314–321, 8 mar. 2001.
- LIU, L. **Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins** *Journal of Pharmaceutical Sciences* John Wiley and Sons Inc., , 1 jun. 2015.
- LOYD, W.; THEILER, M.; RICCI, N. I. Modification of virulence of yellow fever virus by cultivation in tissues in vitro. **Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 22, p. 529–781, 1936.
- LUBINIECKI, A. S. **Large-scale mammalian cell culture technology**. New York: Dekker, 1990.
- LUBINIECKI, A. S. Historical reflections on cell culture engineering. **Cytotechnology**, v. 28, n. 1/3, p. 139–145, 1998.
- LUCA, V. C. et al. Crystal structure of the Japanese encephalitis virus envelope protein. **Journal of virology**, v. 86, n. 4, p. 2337–46, fev. 2012.
- MANTEL, N. et al. Genetic stability of a dengue vaccine based on chimeric yellow fever/dengue viruses. **Vaccine**, v. 29, n. 38, p. 6629–6635, 2 set. 2011.
- MARANGA, L. et al. Scale-up of virus-like particles production: Effects of sparging, agitation and bioreactor scale on cell growth, infection kinetics and productivity. **Journal of Biotechnology**, v. 107, n. 1, p. 55–64, 8 jan. 2004.
- MARICHAL-GALLARDO, P. et al. Steric exclusion chromatography for purification of cell culture-derived influenza A virus using regenerated cellulose membranes and polyethylene glycol. **Journal of Chromatography A**, v. 1483, p. 110–119, 3 fev. 2017.
- MARIÑO, K. et al. **A systematic approach to protein glycosylation analysis: A path through the maze** *Nature Chemical Biology* Nature Publishing Group, , 22 out. 2010.
- MATHIS, C.; SELLARDS, A. W.; LAIGRET, J. Sensibilité du macacus rhesus au virus de la fièvre jaune. In: **Comptes Rendus des Séances de L'Académie des Sciences. Serie III, Sciences de la vie**. [s.l: s.n.].
- MATTOS, D. A. et al. Increasing Vero viable cell densities for yellow fever virus production in stirred-tank bioreactors using serum-free medium. **Vaccine**, v. 33, n. 35, p. 4288–4291, 20 ago. 2015.
- MELLADO, M. C. M.; CUNHA, T. P. P. Avanços nas técnicas de purificação de vacinas. **Pharmaceutical Technology**, v. 17, n. 4, p. 36–43, 2013.
- MENDONÇA, R. Z.; PEREIRA, C. A. High density VERO cell culture on microcarriers in a cell bioreactor. **Bioprocess Engineering**, v. 12, n. 6, p. 279–282, maio 1995.

MERTEN, O. W. et al. Evaluation of the new serum-free medium (MDSS2) for the production of different biologicals: use of various cell lines. **Cytotechnology**, v. 14, n. 1, p. 47–59, 1994.

MERTEN, O. W. et al. Evaluation of the serum-free medium MDSS2 for the production of poliovirus on Vero cells in bioreactors. **Cytotechnology**, v. 25, n. 1–3, p. 35–44, 1997.

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

MODIS, Y. et al. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 12, p. 6986–6991, 10 jun. 2003.

MONATH, T. P. Yellow Fever. In: PLOTKIN, S. A.; MORTIMER, E. A. (Eds.). . **Vaccines**. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, Harcourt Brace Javanovich Inc., 1999. p. 815–879.

MONATH, T. P. Yellow fever. In: PLOTKIN, S. A.; MORTIMER, E. A. (Eds.). . **Vaccines**. 4. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, Harcourt Brace Javanovich Inc., 2004. p. 1095–1176.

MONDOTTE, J. A. et al. Essential Role of Dengue Virus Envelope Protein N Glycosylation at Asparagine-67 during Viral Propagation. **Journal of Virology**, v. 81, n. 13, p. 7136–7148, 1 jul. 2007.

MONTAGNON, B. J. Polio and rabies vaccines produced in continuous cell lines: a reality for Vero cell line. **Developments in biological standardization**, v. 70, p. 27–47, 1989.

MORENWEISER, R. Downstream processing of viral vectors and vaccines. **Gene Therapy**, v. 12, p. S103–S110, 2005.

NICOLAU, A. R. Produção da vacina contra febre amarela no Brasil. In: **Cinquentenário da Introdução da Cepa 17D no Brasil**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1998. p. 168–169.

NYBAKKEN, G. E. et al. Crystal structure of the West Nile virus envelope glycoprotein. **Journal of virology**, v. 80, n. 23, p. 11467–74, dez. 2006.

OH, S. K. et al. Further studies of the culture of mouse hybridomas in an agitated bioreactor with and without continuous sparging. **Journal of biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 245–70, fev. 1992.

OPITZ, L. et al. Sulfated membrane adsorbers for economic pseudo-affinity capture of influenza virus particles. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, n. 6, p. 1144–1154, 15 ago. 2009.

OZTURK, S. S.; RILEY, M. R.; PALSSON, B. O. Effects of ammonia and lactate on

hybridoma growth, metabolism, and antibody production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39, n. 4, p. 418–431, 1992.

PAHO/WHO. **Epidemiological Alert: Yellow Fever**. Washington, DC.: [s.n.]. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&Itemid=270&gid=34758&lang=pt>.

PATO, T. P. et al. Development of a membrane adsorber based capture step for the purification of yellow fever virus. **Vaccine**, v. 32, n. 24, p. 2789–2793, 19 maio 2014.

PEIXOTO, C. et al. Towards purification of adenoviral vectors based on membrane technology. **Biotechnology Progress**, v. 24, n. 6, p. 1290–1296, nov. 2008.

PENNA, H. A.; BITTENCOURT, A. **Persistence of yellow fever virus in the brains of monkeys immunized by cerebral inoculation** *Science*, 1943.

PEREIRA, R. C. et al. An inactivated yellow fever 17DD vaccine cultivated in Vero cell cultures. **Vaccine**, v. 33, n. 35, p. 4261–4268, 20 ago. 2015.

PESSOA, J. R.; KILIKIAN, B. V. Introdução. In: PESSOA, J. R.; KILIKIAN, B. V. (Eds.). **Purificação de produtos biotecnológicos**. 1. ed. Barueri, SP: Editora Manole Ltda., 2005. p. 1–5.

PIELER, M. M. et al. Specific ion effects on the particle size distributions of cell culture-derived influenza A virus particles within the Hofmeister series. **Engineering in Life Sciences**, v. 17, n. 5, p. 470–478, maio 2017.

POST, P. R. et al. The Early Use of Yellow Fever Virus Strain 17D for Vaccine Production in Brazil - A Review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 849–857, 2001.

POWELL, J. H. **Bring out your dead**. Philadelphia: University of Pennsylvania Press, 1949.

QUESNEY, S. et al. Kinetics and metabolic specificities of Vero cells in bioreactor cultures with serum-free medium. **Cytotechnology**, v. 42, n. 1, p. 1–11, 2003.

REUSCH, D. et al. Comparison of methods for the analysis of therapeutic immunoglobulin G Fc-glycosylation profiles - Part 1: Separation-based methods. **mAbs**, v. 7, n. 1, p. 167–179, 1 jan. 2015.

RIBAS, E. Profilaxia da Febre Amarela. **O Brazil-Medico**, v. 35, p. 343–347, 1903a.

RIBAS, E. Profilaxia da Febre Amarela. **O Brazil-Medico**, v. 36, p. 353–357, 1903b.

RIBAS, E. Profilaxia da Febre Amarela. **O Brazil-Medico**, v. 37, p. 363–364, 1903c.

RICE, C. M. Flaviviridae: The Viruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEEEY, P. M. (Eds.). **Virology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p. 931–1033.

ROBY, A.; FUNK, A.; KHROMYKH, A. A. Flavivirus replication and assembly. In: SHI, P. Y. (Ed.). . **Molecular Virology and Control Flaviviruses**. Wymondham, UK: Caister Academic Press, 2012. p. 21–49.

ROBY, J. A. et al. **Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins***Journal of General Virology*Society for General Microbiology, , 1 jul. 2015.

RODRIGUES, T. et al. **Purification of retroviral vectors for clinical application: Biological implications and technological challenges***Journal of Biotechnology*, 10 jan. 2007.

ROMANOS, M. T. V. Introdução à Virologia Humana. In: SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. (Eds.). . **Introdução à Virologia Humana**. [s.l.] Guanabara Koogan, 2002. p. 177–181.

ROUROU, S. et al. A microcarrier cell culture process for propagating rabies virus in Vero cells grown in a stirred bioreactor under fully animal component free conditions. **Vaccine**, v. 25, n. 19, p. 3879–3889, 10 maio 2007.

ROYLE, L. et al. HPLC-based analysis of serum N-glycans on a 96-well plate platform with dedicated database software. **Analytical Biochemistry**, v. 376, n. 1, p. 1–12, 1 maio 2008.

RYMAN, K. D. et al. Yellow fever virus envelope protein has two discrete type-specific neutralizing epitopes. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 1353–1356, 1997.

SAKODA, Y. et al. Establishment of a serum-free culture cell line, CPK-NS, which is useful for assays of classical swine fever virus. **Journal of virological methods**, v. 75, n. 1, p. 59–68, nov. 1998.

SANFORD, K. K. et al. The measurement of proliferation in tissue cultures by enumeration of cell nuclei. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 11, n. 4, p. 773–95, fev. 1951.

SAWYER, W. A.; KITCHEN, S. F.; LLOYD, W. Vaccination against yellow fever with immune serum and virus fixed for mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 55, n. 6, p. 945–969, 1 jun. 1932.

SCHULLER, E. et al. Safety profile of the Vero cell-derived Japanese encephalitis virus (JEV) vaccine IXIARO ®. **Vaccine**, v. 29, n. 47, p. 8669–8676, 3 nov. 2011.

SCIENCES, G. H. L. **Protein Purification Methods**. Disponível em: <<https://www.gelifesciences.com/en/us/solutions/protein-research/knowledge-center/protein-purification-methods>>. Acesso em: 17 nov. 2019.

SIGMA-ALDRICH. **GlycoProfile™ Labeling Kits**. [s.l: s.n.].

SILVA, C. G. A. DA; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H. HYDROPHILIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY (HILIC): STATE OF THE ART AND

APPLICATIONS. **Química Nova**, 2016.

SIMIZU, B. et al. Development of inactivated poliovirus vaccine derived from Sabin strains. **Biologicals**, v. 34, n. 2, p. 151–154, jun. 2006.

SMITH, H. H.; PENNA, H. A.; PAOLIELLO, A. Yellow Fever Vaccination with Cultured Virus (17D) without Immune Serum 1. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. s1-18, n. 5, p. 437–468, 1 set. 1938.

SOUZA, M. C. O. **Produção do vírus da Febre Amarela em células Vero utilizando biorreatores agitados**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

SOUZA, M. C. O. et al. Production of yellow fever virus in microcarrier-based Vero cell cultures. **Vaccine**, v. 27, n. 46, p. 6420–6423, 30 out. 2009.

SRIVASTAVA, A. K. et al. A purified inactivated Japanese encephalitis virus vaccine made in Vero cells. **Vaccine**, v. 19, n. 31, p. 4557–65, 14 ago. 2001.

STADLER, K. et al. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. **Journal of virology**, v. 71, n. 11, p. 8475–81, nov. 1997.

STAPLES, J. E. Yellow Fever. In: PLOTKIN, S. A.; MORTIMER, E. A. (Eds.). . **Vaccines**. 7. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, Harcourt Brace Javanovich Inc., 2018. p. 1181–1265.

STIASNY, K. et al. Structural requirements for low-pH-induced rearrangements in the envelope glycoprotein of tick-borne encephalitis virus. **Journal of virology**, v. 70, n. 11, p. 8142–7, nov. 1996.

SUN, M. B. et al. A novel process for production of hepatitis A virus in Vero cells grown on microcarriers in bioreactor. **World Journal of Gastroenterology**, v. 10, n. 17, p. 2571–2573, 1 set. 2004.

TAYI, V. S.; BUTLER, M. Isolation and quantification of N-glycans from immunoglobulin G antibodies for quantitative glycosylation analysis. **Journal of Biological Methods**, v. 2, n. 2, p. 19, 21 jun. 2015.

THEILER, M. **Susceptibility of white mice to the virus of yellow fever** *Science*, 1930.

THEILER, M.; SMITH, H. H. The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization. **Journal of Experimental Medicine**, v. 65, n. 6, p. 787–800, 1 jun. 1937a.

THEILER, M.; SMITH, H. H. The effect of prolonged cultivation in vitro upon the pathogenicity of yellow fever virus. **Journal of Experimental Medicine**, v. 65, n. 6, p. 767, 1 jun. 1937b.

THOMASSEN, Y. E. et al. Improved poliovirus D-antigen yields by application of different Vero cell cultivation methods. **Vaccine**, v. 32, n. 24, p. 2782–2788, 19 maio 2014.

TOKASHIKI, M.; YOKOYAMA, S. Bioreactors designed for animal cells. In: GRUYTER, W. DE (Ed.). **Mammalian Cell Biotechnology in Protein production**. Berlin: [s.n.]. p. 279–317.

TORINIWA, H.; KOMIYA, T. Japanese encephalitis virus production in Vero cells with serum-free medium using a novel oscillating bioreactor. **Biologicals**, v. 35, n. 4, p. 221–226, out. 2007.

TOSOHBIOSCIENCE. **TSKgel Amide-80**. [s.l: s.n.].

TRABELSI, K.; ROUROU, S.; LOUKIL, H. Comparison of various culture modes for the production of rabies virus by Vero cells grown on microcarriers in a 2-L bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 514–519, 2005.

ULMER, J. B.; VALLEY, U.; RAPPUOLI, R. **Vaccine manufacturing: Challenges and solutions** **Nature Biotechnology**, nov. 2006.

VAN DER MOST, R. G.; COVER, J. E.; STRAUSS, J. H. Mutagenesis of the GR D motif in the Yellow Fever Virus. **Virology**, p. 83–95, 1999.

VAN REIS, R.; ZYDNEY, A. Bioprocess membrane technology. **Journal of Membrane Science**, v. 297, n. 1–2, p. 16–50, 5 jul. 2007.

VAN WEZEL, A. L. **Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers in homogeneous culture** [17] **Nature**, 1967.

VICENTE, T. et al. Anion-exchange membrane chromatography for purification of rotavirus-like particles. **Journal of Membrane Science**, v. 311, n. 1–2, p. 270–283, 20 mar. 2008.

VICENTE, T. et al. **Rational design and optimization of downstream processes of virus particles for biopharmaceutical applications: Current advances** **Biotechnology Advances**, nov. 2011.

VIJAYASANKARAN, N. et al. Animal Cell Culture Media. In: FLICKINGER, M. C. (Ed.). **Encyclopedia of Industrial Biotechnology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2010. p. 261–274.

VOISARD, D. et al. **Potential of cell retention techniques for large-scale high-density perfusion culture of suspended mammalian cells** **Biotechnology and Bioengineering**, 30 jun. 2003.

WALSH, G. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 17–18, p. 773–780, set. 2010.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2014. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 992–1000, 2014.

WALSH, G.; JEFFERIS, R. **Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins** **Nature Biotechnology**, out. 2006.

WANG, D. et al. The Bioreactor: A Powerful Tool for Large-Scale Culture of Animal Cells. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 6, n. 5, p. 397–403, 3 out. 2005.

WASSERMAN, A. Lyophilization in Vaccine Processes. In: WEN, E. P.; ELLIS, R.; PUJAR, N. S. (Eds.). . **Vaccine Development and Manufacturing**. 1. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2015. p. 263–286.

WATERS. **Dextran Calibration Ladder Standard**.

WATERS. **No Analysis of N-linked Glycans of GlycoProteins**.

WEIGEL, T. et al. A flow-through chromatography process for influenza A and B virus purification. **Journal of Virological Methods**, v. 207, p. 45–53, 2014.

WHO. **Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks**. [s.l.: s.n.].

WHO. **Situation Report: Yellow Fever**. Geneva: [s.n.]. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/246156/1/yellowfeversitrep30Jun16-eng.pdf?ua=1>>.

WU, S. C.; HUANG, G. Y. L. Stationary and microcarrier cell culture processes for propagating Japanese encephalitis virus. **Biotechnology Progress**, v. 18, n. 1, p. 124–128, 2002.

WU, S. C.; LIU, C. C.; LIAN, W. C. Optimization of microcarrier cell culture process for the inactivated enterovirus type 71 vaccine development. **Vaccine**, v. 22, n. 29–30, p. 3858–3864, 28 set. 2004.

YU, P. et al. Production and evaluation of a chromatographically purified Vero cell rabies vaccine (PVRV) in China using microcarrier technology. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 8, n. 9, p. 1230–1235, set. 2012.

YUEN, C.; CHAN, Y.; TAMBYAH, P. A. **Preflucel®: A Vero-cell culture-derived trivalent influenza vaccine**Expert Review of Vaccines, jul. 2012.

YUK, I. H. et al. A serum-free Vero production platform for a chimeric virus vaccine candidate. **Cytotechnology**, v. 51, n. 3, p. 183–192, jul. 2006.

ZANG, M. et al. Production of recombinant proteins in chinese hamster ovary cells using a protein-free cell culture medium. **Bio/Technology**, v. 13, n. 4, p. 389–392, 1995.

ZOU, H.; LUO, Q.; ZHOU, D. Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 49, n. 1–3, p. 199–240, 30 out. 2001.