

Ekspresi Transien Protein Rekombinan Spike S1 SARS-CoV-2 Pada Sel CHO (*Chinese Hamster Ovary*)

Transient Expression of SARS-CoV-2 S1 Spike Protein Recombinant in CHO cells (Chinese Hamster Ovary)

Devia Puspita Natalicka¹, Silvia Tri Widyaningtyas², Fera Ibrahim^{2,3*}

¹Program Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

²Pusat Riset Virologi dan Kanker Patobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

³Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

*E_mail: feraib@yahoo.fr

ABSTRAK

SARS-CoV-2 merupakan virus penyebab pandemi infeksi COVID-19 yang dilaporkan pertama kali di Wuhan, Cina. Berbagai upaya dilakukan untuk menekan kasus infeksi SARS-CoV-2 seperti pengembangan obat, vaksin, sistem deteksi hingga terapi plasma konvalesen. Protein Spike merupakan target utama antibodi netralisasi. Antibodi netralisasi pada orang yang telah sembuh dari infeksi COVID-19 merupakan salah satu syarat untuk menjadi pendonor plasma konvalesen, sehingga diperlukan sistem deteksi antibodi netralisasi seperti tes serologi berbasis kompetitif ELISA yang mudah, murah, cepat dan tidak membutuhkan BSL3 atau BSL2. Sistem deteksi ini membutuhkan protein rekombinan spike S1 SARS-CoV-2 sebagai antigen yang dapat diekspresikan pada berbagai sistem ekspresi. Penelitian ini bertujuan untuk mengekspresikan protein rekombinan spike S1 SARS-CoV-2 pada sistem ekspresi mamalia menggunakan sel kultur CHO. Penelitian ini menggunakan plasmid pD609 sebagai vektor ekspresi sel mamalia dan telah disisipkan gen spike S1 SARS-CoV-2. DNA plasmid ditransfeksi secara transien ke dalam sel CHO selanjutnya post transfeksi dilihat dengan melakukan immunostaining. Supernatan media sel kultur CHO post transfeksi dianalisis dengan teknik ELISA untuk melihat reaktivitas terhadap serum konvalesen COVID-19. Hasil immunostaining menunjukkan plasmid pD609 S1 Spike Foldon-His dapat mengekspresikan protein rekombinan spike S1 dan berdasarkan hasil Elisa menunjukkan supernatan media sel kultur CHO post transfeksi reaktif terhadap serum konvalesen COVID-19.

Kata kunci: SARS-CoV-2, Spike, Sel CHO

ABSTRACT

SARS-CoV-2 is the virus that causes the COVID-19 infection pandemic which was first reported in Wuhan, China. Various efforts were conducted to suppress cases of SARS-CoV-2 infection, such as the development of drugs, vaccines, and detection systems for convalescent plasma therapy. Spike protein is the main target of neutralizing antibodies. Neutralizing antibodies in people who have recovered from COVID-19 infection is one of the requirements to become convalescent plasma donors, so a neutralizing antibody detection system is needed such as a competitive ELISA-based serology test that is easy, inexpensive, fast, and does not require BSL3 or BSL2. This detection system requires recombinant protein SARS-CoV-2 spike S1 as an antigen that can be expressed in various expression systems. This study aimed to express the SARS-CoV-2 spike S1 recombinant protein in the mammalian expression system using CHO culture cells. This study used the plasmid pD609 as an expression vector for mammalian cells and the SARS-CoV-2 S1 Spike gene was inserted. Plasmid DNA was transiently transfected into CHO cells and post-transfection was seen by immunostaining. Post-transfection CHO cell culture media supernatants were analysed by ELISA to see the reactivity to COVID-19 convalescent serum. Immunostaining results showed that the plasmid pD609 S1 Spike Foldon-His could express the recombinant protein S1 Spike and based on Elisa's result, the post-transfection CHO cell culture supernatant was reactive against COVID-19 convalescent serum.

Keywords: SARS-CoV-2, Spike, CHO cells

Pendahuluan

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) yang disebabkan oleh *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)* dilaporkan pertama kali terjadi di Wuhan, China pada Desember 2019 dan saat ini telah menyebar dengan cepat di dunia. *World Health Organization (WHO)* menyatakan kasus infeksi SARS-CoV-2 sebagai pandemi COVID-19 pada Maret 2020. Pandemi COVID-19 menyebabkan kematian jutaan orang dan mempengaruhi kondisi perekonomian secara global.¹ Jumlah kasus COVID-19 tercatat pada Maret 2021 di Indonesia telah mencapai lebih dari 1 juta kasus dengan angka kematian mencapai lebih dari 30 ribu jiwa.²

SARS-CoV-2 adalah virus yang berukuran 80-120 nm dan merupakan virus dengan materi genetik RNA untai tunggal positif berukuran sekitar 30 kb. SARS-CoV-2 terdiri dari empat protein struktural yaitu *Spike (S)*, *Membran (M)*, *Envelope (E)* dan *Neucleocapsid (N)*. Materi genetik virus ini juga mengkode protein non-struktural dan protein aksesoris. *Spike* adalah protein struktural yang berperan dalam proses fusi membran saat virus masuk ke dalam sel dan sangat imunogenik.³

Protein Spike terdiri dari subunit S1 yang berperan dalam penempelan virus pada reseptor sel inang *Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2)* dan subunit S2 yang berperan dalam fusi membran. Protein Spike membutuhkan protease sel inang seperti *Furin* dan *Tripsin Transmembran Serin Protease 2 (TMPRSS2)* untuk memecah protein S dan memicu aktivitasnya. Domain N-terminal pada subunit S1 terdapat *Receptor Binding*

Domain (RBD) yang dapat menginduksi produksi antibodi netralisasi.^{3,4}

Antibodi netralisasi merupakan antibodi yang diproduksi oleh tubuh sebagai bagian dari respon imun terhadap infeksi patogen baik secara alami atau melalui vaksinasi. Antibodi netralisasi dalam plasma orang yang pernah terinfeksi dan sembuh dari infeksi COVID-19 menjadi syarat untuk menjadi donor plasma konvalesen sehingga dibutuhkan sistem deteksi untuk mengetahui keberadaan antibodi netralisasi seperti tes serologi berbasis Elisa kompetitif.⁵

Chee Wah Tan dkk dalam penelitiannya telah mengembangkan *surrogate VNT (sVNT)* yang dapat mendeteksi antibodi netralisasi dengan menggunakan rekombinan RBD protein S dan reseptor ACE2 sel inang. Tes tersebut dirancang menyerupai interaksi virus dan reseptor yang dilakukan dalam *well ELISA*.⁶

Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan sistem deteksi antibodi netralisasi SARS-CoV-2. Protein rekombinan spike subunit S1 diperlukan sebagai antigen yang dapat digunakan dalam deteksi antibodi netralisasi SARS-CoV-2 berbasis ELISA kompetitif. Protein rekombinan spike S1 SARS-CoV-2 diekspresikan pada sistem ekspresi sel mamalia karena terdapat modifikasi post translasi seperti glikosilasi serta memiliki aktivitas biologi dibandingkan dengan sistem ekspresi lainnya seperti pada *E.coli*.^{7,8} Protein rekombinan spike S1 SARS-CoV-2 diekspresikan pada sel kultur CHO karena sel tersebut dapat ditumbuhkan pada medium tumbuh yang minimal dan memiliki pertumbuhan yang cepat.⁹

Selain dapat digunakan sebagai antigen untuk mendeteksi antibodi

netralisasi dengan tes ELISA kompetitif, protein rekombinan Spike S1 SARS-CoV-2 dapat digunakan untuk mendeteksi antibodi anti-S SARS-CoV-2 dengan uji ELISA, Sehingga dapat dimanfaatkan untuk pengujian dalam mendeteksi keberadaan antibodi netralisasi atau antibodi terhadap protein spike SARS-CoV-2.

Metode

Plasmid pD609 S1 Spike Foldon-His

Plasmid rekombinan diperoleh dari laboratorium Pusat Riset Virologi dan Kanker Patobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (PRVKP FKUI). Plasmid diperbanyak pada sel *E.coli* TOP 10 yang dikultur dalam media Luria Bertani cair (Himedia) 250 ml mengandung ampicilin (1/1000) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C, shaker 150 rpm selama semalaman (16-18 jam). DNA plasmid diisolasi menggunakan Endotoxin Free Maxi kit (Qiagen) sesuai prosedur manufaktur. DNA plasmid hasil isolasi selanjutnya divisualisasi dengan elektroforesis jel agarose 0,8% dan didokumentasikan dengan gel Doc. Selanjutnya hasil isolasi DNA plasmid dianalisis dengan enzim restriksi.

Sel Kultur CHO

Sel CHO (*Chinese Hamster Ovary*) diperoleh dari laboratorium PRVKP FKUI digunakan sebagai sel mamalia pengeksresi protein Spike S1 SARS-CoV-2. Sel CHO ditumbuhkan dalam media DMEM yang mengandung 10% FBS, 1% L-Glutamin, 1% Penicilin streptomycin dan 0,5% Gentamicin. Kultur sel dilakukan dalam incubator dengan suhu 37°C dan 5% CO₂. Sel dipasasi saat

mencapai 100% konfluensi dengan penambahan 0,25% Trypsin-EDTA.

Transfeksi DNA plasmid pada sel CHO

Transfeksi sel CHO dilakukan pada *plate 12 well*. Sel kultur dengan konfluensi mencapai 70-80% ditransfeksi dengan plasmid pcDNA3.1-eGFP sebagai kontrol positif dan pcDNA3.1 WT serta plasmid pD609 S1 Spike Foldon-His, konsentrasi DNA plasmid yaitu 2 µg. Transfeksi DNA plasmid menggunakan reagen Lipofectamin™ 3000 (Thermo Fisher Scientific). Prosedur transfeksi sesuai dengan manufaktur yang telah dimodifikasi. Transfeksi Plasmid pD609 S1 Spike Foldon-His dilakukan pada wadah kultur *dish* 10cm untuk mendapatkan supernatan media sel kultur CHO post transfeksi dengan konsentrasi DNA plasmid yang digunakan adalah 15 µg.

Immunostaining

Empat puluh delapan jam paska transfeksi, sel CHO dicuci menggunakan Phosphate Buffer Saline (PBS) 1x, kemudian difiksasi menggunakan 3,7% Formaldehid selama 15 menit pada suhu ruang. Selanjutnya diberikan larutan Triton-100X 0,2% dalam PBS 1x, inkubasi 5 menit pada suhu ruang dan sel CHO di blocking dengan 2%BSA+PBS1x kemudian inkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. Setiap selesai inkubasi sel dicuci dengan PBS1x. Larutan antibodi primer berupa serum konvalesen COVID-19 (1/100) ditambahkan pada sel kultur kemudian diinkubasi selama semalaman pada suhu 4°C. Sel kemudian dicuci dengan PBS1x selanjutnya ditambahkan antibodi sekunder berupa goat anti human FITC (1/1000), diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. Sel dicuci kembali

dengan PBS1x kemudian ditambahkan DAPI 10 µg/ml sebanyak 50 µl, diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Selanjutnya sel diamati menggunakan mikroskop konfokal. Sel dengan ekspresi protein rekombinan akan memberi warna hijau.

Uji reaktifitas protein rekombinan spike S1 SARS-CoV-2 dengan menggunakan ELISA

Supernatan media sel kultur CHO post transfeksi hari ke-1 dan hari ke-2 direaksikan dengan serum konvalesen COVID-19. Supernatan media sel kultur dicoating pada well ELISA, diinkubasi pada suhu 4°C selama semalaman. Kemudian well dicuci dengan PBS-Tween 0,01%. Selanjutnya diblocking dengan 1%BSA + PBS-Tween 0,01% selama 1 jam pada suhu 37°C, pengenceran antibodi primer berupa serum konvalesen COVID-19 (1/25, 1/50, 1/100) ditambahkan pada well lalu diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Ditambahkan antibodi sekunder berupa ant human IgG biotin (1/5000), diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Kemudian ditambahkan streptavidin HRP (1/7000) kedalam well lalu diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Setiap kali selesai inkubasi well dicuci dengan PBS-Tween 0,01%. Penambahan substrat OPD dilakukan ditempat gelap dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang, selanjutnya reaksi dihentikan dengan larutan H₂SO₄ 2,5 N. Pembacaan optical density pada Elisa Reader pada panjang gelombang 490 nm.

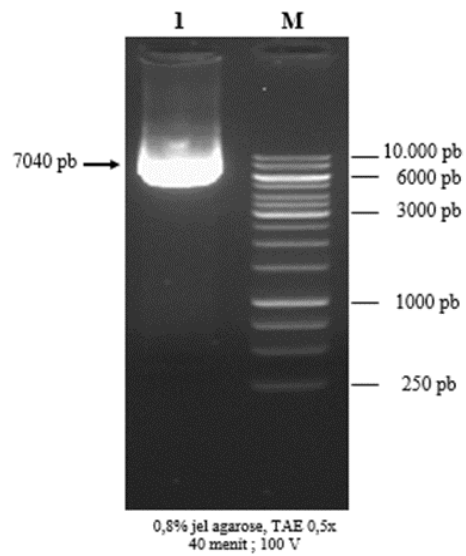
Hasil

Plasmid pD609 S1 Spike Foldon-His memiliki panjang 7040 pb (pasang basa), dikonfirmasi dengan enzim restriksi PstI

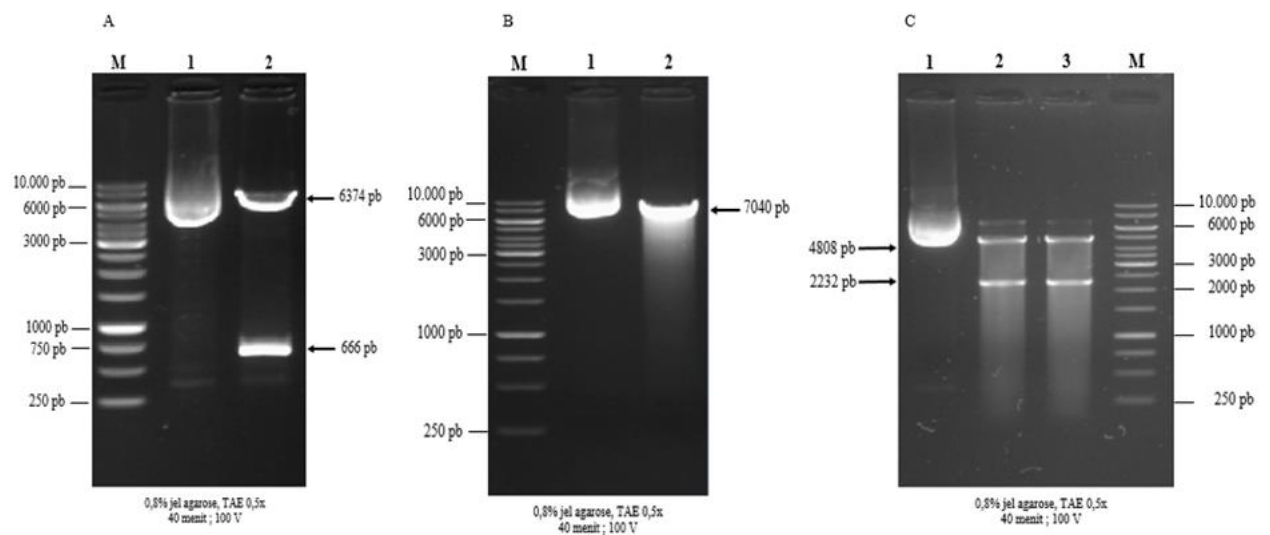
akan menghasilkan pita dengan panjang 6374 pb dan 666 pb, sementara plasmid dipotong dengan enzim restriksi EcoRI akan menjadi linier karena hanya ada satu situs restriksi enzim EcoRI pada DNA plasmid tersebut. Selanjutnya dipotong dengan enzim restriksi NheI dan HindIII akan membentuk dua pita berukuran 4808 pb dan 2232 pb yang merupakan vektor dan sisipan. Hasil isolasi DNA plasmid dan konfirmasi DNA plasmid dapat dilihat pada Gambar 1 dan Gambar 2 yang divisualisasi dengan menggunakan elektroforesis jel agarose 0,8%.

Hasil *immunostaining* sel kultur CHO setelah ditransfeksi DNA plasmid, dari hasil pengamatan mikroskop konfokal terlihat adanya pendaran berwarna hijau pada sel yang ditransfeksi dengan pcDNA3.1 eGFP sebagai kontrol positif dan plasmid pD609 S1 Spike Foldon-His sebagai pembawa gen S1 Spike SARS-CoV-2. Sementara sel yang ditransfeksi plasmid pcDNA3.1 wt (*wild type*) tidak menunjukkan warna (kontrol negatif). Hasil *immunostaining* post transfeksi DNA plasmid dapat dilihat pada Gambar 3. Tanda panah menunjukkan adanya ekspresi protein rekombinan spike S1 SARS-CoV-2 pada sel kultur CHO. Hal ini menunjukkan plasmid tersebut dapat mengekspresikan protein rekombinan spike S1 SARS-CoV-2 pada sel kultur CHO.

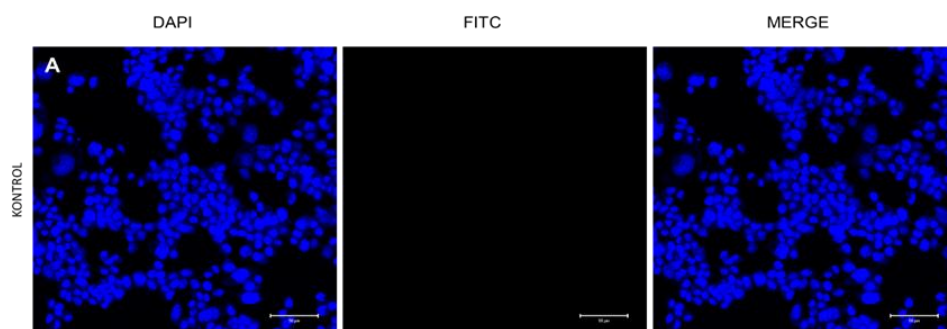
Hasil ELISA menunjukkan serum konvalesen COVID-19 memiliki reaktifitas terhadap antigen yang berasal dari supernatan media sel kultur CHO yang ditransfeksi dengan pD609 S1 Spike Foldon-His (H+1 dan H+2) dibandingkan supernatan kultur sel yang tidak ditransfeksi plasmid yang ditunjukkan melalui perbedaan absorbansi pada OD 490. Hal ini terlihat pada Gambar 4.

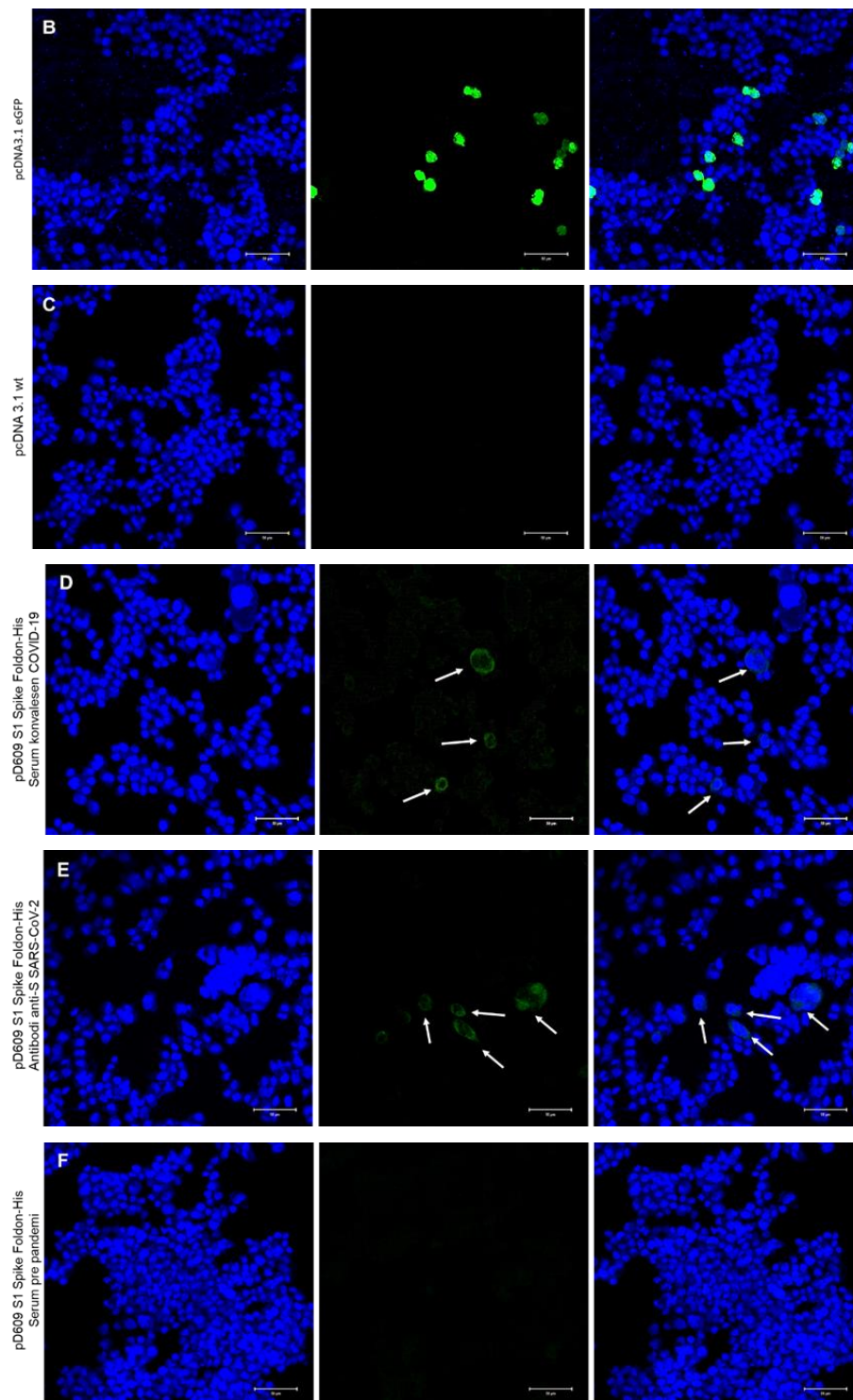


Gambar 1. Hasil Isolasi Plasmid pD609 S1 Spike Foldon-His



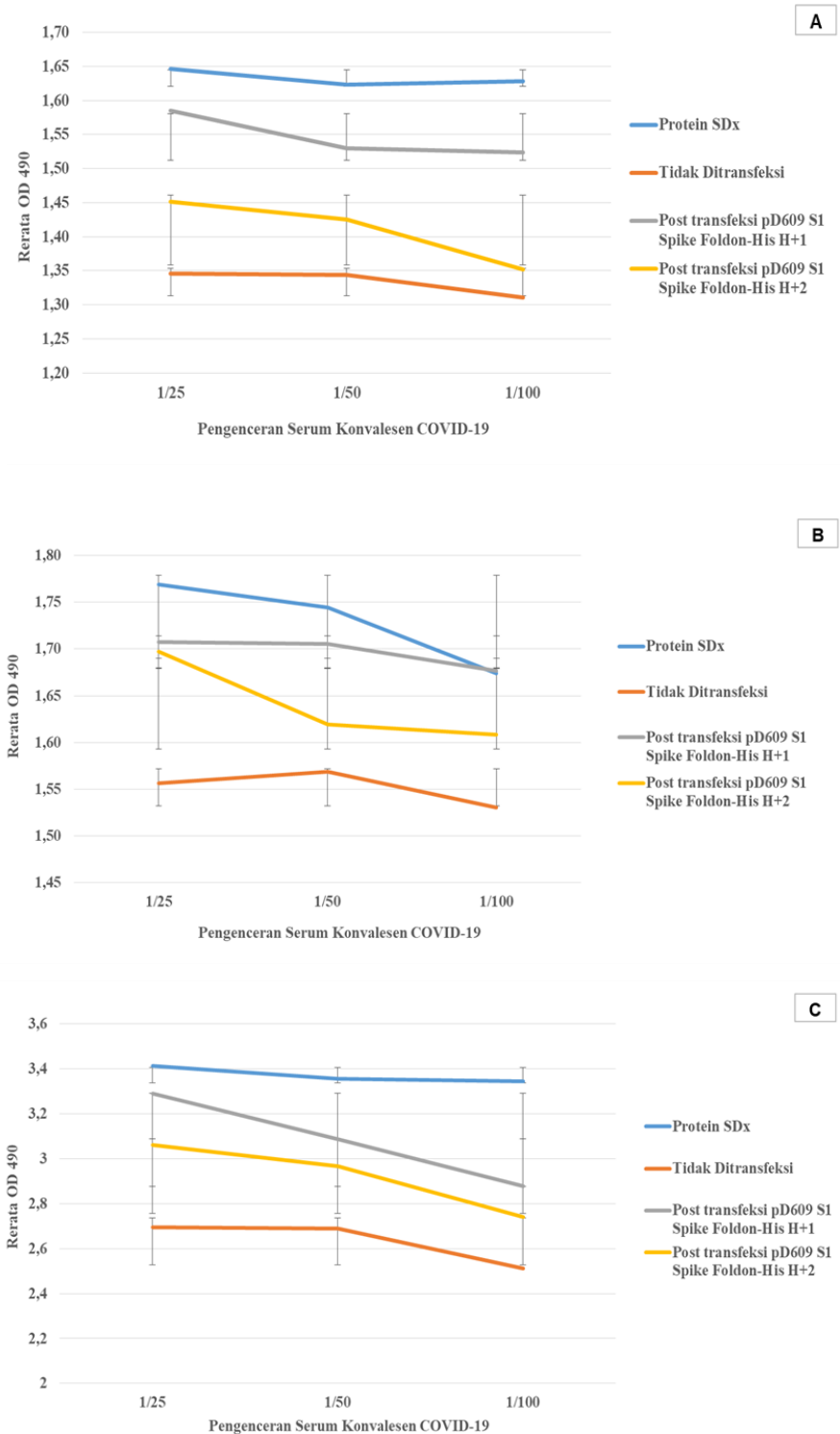
Gambar 2. Hasil restriksi enzim, plasmid pD609 S1 Spike Foldon-His





Gambar 3. Hasil Immunostaining *Immunostaining* sel kultur CHO post transfeksi DNA plasmid perbesaran 200x. A: Kontrol negatif (tidak ditransfeksi). B: kontrol positif (ditransfeksi dengan plasmid pcDNA3.1 eGFP). C: sel ditransfeksi dengan plasmid pcDNA3.1 wt. D: sel ditransfeksi dengan plasmid pD609 S1 Spike Foldon-His (antibodi primer; serum konvalesen COVID-19). E: sel ditransfeksi dengan plasmid pD609 S1 Spike Foldon-His (antibodi primer; antibodi anti-S SARS-CoV-2). F: sel ditransfeksi dengan plasmid pD609 S1 Spike Foldon-His (antibodi primer; serum pre pandemi)

Hasil Elisa Supernatan Media Sel Kultur CHO dengan Serum Konvalesen



Gambar 4. ELISA Supernatan Media Sel Kultur CHO Post Transfeksi pD609 S1 Spike Foldon-His. A: Supernatan kultur sebagai antigen (konsentrasi 1 µg/ml). B: Supernatan kultur sebagai antigen (konsentrasi 10 µg/ml). C: Supernatan kultur sebagai antigen (konsentrasi 20 µg/ml).

Pembahasan

Protein rekombinan yang digunakan dalam penelitian ini adalah protein spike subunit S1 SARS-CoV-2 yang terdiri dari *domain* NTD dan RBD yang berperan dalam pengikatan protein spike virus dengan reseptor ACE2 pada sel inang.⁴ Dari hasil penelitian sebelumnya terkait SARS-CoV menunjukkan bahwa antibodi terhadap *domain* yang terdapat pada daerah S1 atau S2 dapat berperan dalam netralisasi virus, namun RBD yang terdapat pada subunit S1 protein spike sangat imunogenik sebagai target antibodi netralisasi pada SARS dan infeksi COVID-19.⁷

Protein rekombinan S1 dapat dimanfaatkan sebagai antigen rekombinan pada uji Elisa kompetitif untuk mengetahui keberadaan antibodi netralisasi. Selain itu protein rekombinan tersebut banyak digunakan dalam pengembangan vaksin, sebagai target terapi dan pengembangan uji serologi metode Elisa.⁴ Protein rekombinan spike S1 SARS-CoV-2 diekspresikan pada sistem ekspresi sel mamalia yang diketahui adanya proses pasca translasi dan modifikasi seperti glikosilasi. Hal ini dapat meningkatkan stabilitas protein, aktivitas biologis dan imunogenisitas protein.¹⁰

Plasmid rekombinan dikonfirmasi dengan analisis enzim restriksi dan apakah gen yang mengekspresikan protein rekombinan sesuai dengan rancangan atau mengalami perubahan urutan nukleotida. Hasil analisis enzim restriksi DNA plasmid pD609 S1 Spike Foldon-His menunjukkan bahwa gen sisipan S1 Spike SARS-CoV-2 terdapat dalam plasmid.

Plasmid ditransfeksi ke dalam sel kultur CHO dengan menggunakan metode kimiawi berbasis lipid yaitu dengan reagen lipofectaminTM3000. Kationik dari senyawa

lipid berhubungan dengan fosfat yang bermuatan negatif pada asam nukleat sehingga DNA akan masuk ke dalam sel dengan cara fusi dari fosfolipid yang ada di membran sel dengan formulasi kationik liposom yang ada pada lipofectamin. Metode ini memberikan banyak keuntungan seperti efisiensi transfeksi yang relatif cukup tinggi karena dapat mentransfeksi beberapa tipe sel yang resisten terhadap kalsium fosfat maupun DEAE dekstran, dapat mengirimkan DNA berbagai ukuran dari oligonukleotida terhadap kromosom ragi artifisial, dapat mengirimkan RNA serta protein. Selain itu, metode ini pun dapat digunakan untuk mempelajari transfeksi secara transien maupun stabil.^{11,12}

Hasil *immunostaining* yaitu pada sel yang ditransfeksi dengan plasmid pD609 S1 Spike Foldon-His terlihat memberikan pendaran hijau meskipun hanya sedikit sel yang memberikan warna hijau, namun hal ini dapat menunjukkan bahwa plasmid tersebut dapat mengekspresikan protein rekombinan. Beberapa faktor yang menyebabkan sinyal lemah atau tidak ada pada hasil *immunostaining* diantaranya bisa dikarenakan protein disekresikan keluar sel dan terlarut dalam media transfeksi sel, sinyal yang dapat memudar jika terkena cahaya, sampel disimpan terlalu lama dan ekspresi protein yang rendah.¹³

Uji reaktifitas antara supernatan media sel kultur CHO post transfeksi dengan serum konvalesen COVID-19 dilakukan juga dengan teknik ELISA.¹⁵ ELISA merupakan uji yang memanfaatkan prinsip reaksi antigen dan antibodi. Berdasarkan perbedaan nilai absorban pada OD 490, hasil Elisa dengan menggunakan supernatan kultur sebagai antigen pada

konsentrasi 1 µg/ml, 10 µg/ml dan 20 µg/ml menunjukkan adanya reaktivitas antara antibodi serum konvalesen terhadap antigen yang berasal dari supernatan sel kultur CHO post transfeksi dibandingkan dengan supernatan sel kultur CHO tidak ditransfeksi.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini sebagian telah didanai oleh Hibah Publikasi Terindeks Internasional (PUTI) SAINTEKES FKUI.

Saran

Studi lebih lanjut perlu dilakukan terkait ekspresi secara transien dalam skala besar untuk memperoleh protein rekombinan agar dapat digunakan sebagai protein rekombinan untuk deteksi serologi.

Daftar Rujukan

1. Tani H, Kimura M, Tan L, et al. Evaluation of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies using a vesicular stomatitis virus possessing SARS-CoV-2 spike protein. *Virology journal*. 2021;18(1).
2. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Infeksi emerging. Media informasi resmi terkini penyakit infeksi emerging. <https://infeksiemerging.kemkes.go.id/situasi-infeksi-emerging/situasi-terkini-perkembangan-coronavirus-disease-covid-19-04-maret-2021>
3. Garcia-Cordero J, Mendoza-Ramirez J, Fernandez-Benavides D, Roa-Velazquez D, Filisola-Villasenor J, et al. Recombinant protein expression and purification of N, S1, and RBD of SARS-CoV-2 from mammalia cells and their potential applications. *Diagnostics*. 2021;11(10).
4. Huang Y, Yang C, Xu X, Xu W, Liu S. Structural and functional properties of SARS-

Kesimpulan

Protein rekombinan Spike S1 SARS-CoV-2 telah berhasil diekspresikan oleh plasmid pD609 S1 Spike Foldon-His pada sistem ekspresi sel CHO. Protein rekombinan yang diekspresikan memiliki reaktivitas dengan serum konvalesen COVID-19.

CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta pharmacologica sinica*. 2020;41(9): 1141-1149.

5. Rojas M, Rodriguez Y, Monsalve D, Acosta-Ampudia Y, Camacho B, Gallo J, et al. Convalescent plasma in COVID-19: possible mechanisms of action. *Autoimmunity reviews*. 2020;19(7).
6. Wah Tan C, Ni Chia W, Hu Z, Young B, Tan Y, Yi Y, et al. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test (sVNT) based on antibody-mediated blockage of ACE2-spike (RBD) protein-protein interaction. *Nature biotechnology*. 2020;38(9): 1073-1078.
7. Byrnes J, Zhou X, Lui I, Elledge S, Glasgow J, Lim S, et al. Competitive SARS-CoV-2 serology reveals most antibodies targeting the spike receptor-binding domain compete for ACE2 binding. *mSphere*. 2020;5(5).
8. Khan K. Gene expression in mammalian cells and its applications. *Advanced pharmaceutical bulletin*. 2013;3(2): 275-263.
9. Adi S. Perkembangan sel mamalia *chinese hamster ovary* (CHO) dalam produksi obat berbasis protein. Paper knowledge, toward a media history of documents. 2014;7(2): 107-115.
10. Kaufman RJ. Overview of vector design for mammalian gene expression. *Applied biochemistry and biotechnology-part B Molecular Biotechnology*. 2000;16(2): 151-160.
11. Hardiany NS. Metode transfer asam nukleat sebagai dasar terapi gen. *Departemen biokimia & biologi molekuler FK universitas indonesia*. 2016;4(3): 204-210.
12. Chong ZX, Yeap SK, Ho WY. Transfection types, methods and strategies: A technical review. *PeerJ*. 2021;9: 1-37.

13. Cell signaling technology. Immunofluorescence (IF) troubleshooting guide. <https://www.cellsignal.com/learn-and-support/troubleshooting/if-troubleshooting-guide>.
14. Schaub JM, Chou CW, Kuo HC, Javanmardi K, Hsieh CL, Goldsmith J, et al. Expression and characterization of SARS-CoV-2 spike proteins. *Nature protocols*. 2021;16(11): 5339-5356.
15. Longo PA, Kavran JM, Kim M, Leahy DJ. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *NIH Public Access*. 2014;529: 227-240.