

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Doutorado em Saúde Pública

Heike Erna Brand

**DESENVOLVIMENTO DE TESTE DIAGNÓSTICO PARA TRIAGEM SOROLÓGICA
DE DIVERSAS INFECÇÕES VIRAIS**

RECIFE

2014

Heike Erna Brand

**DESENVOLVIMENTO DE TESTE DIAGNÓSTICO PARA A TRIAGEM
SOROLÓGICA DE DIVERSAS INFECÇÕES VIRAIS**

Tese apresentada ao curso de Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação OswaldoCruz, para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador:

Dr. Ernesto Torres de Azevedo Marques Junior

Co-Orientador:

Dr. Rafael Dhália

RECIFE

2014

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

B821d Brand, Heike Erna.
Desenvolvimento de teste diagnóstico para a triagem sorológica de diversas infecções virais / Heike Erna Brand. - Recife: [s.n.], 2014.
187 p. : ilus., tab.

Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Departamento de Saúde Coletiva, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2014.

Orientador: Ernesto Torres de Azevedo Marques Junior; co-orientador: Rafael Dhalia.

1. Antígenos. 2. Microesferas. 3. Ensaio de Imunoadsorção Enzimática. 4. Hepacivirus. 5. HIV. 6. Vírus 1 Linfotrópico T Humano. 7. Vírus 2 Linfotrópico T Humano. I. Marques Júnior, Ernesto Torres de Azevedo. ths. II. Dhalia, Rafael. hs. III. Título..

CDU 616.98

Heike Erna Brand

DESENVOLVIMENTO DE TESTE DIAGNÓSTICO PARA A TRIAGEM
SOROLÓGICA DE DIVERSAS INFECÇÕES VIRAIS

Tese apresentada ao curso de Doutorado em
Saúde Pública do Centro de Pesquisas
Aggeu Magalhães, Fundação OswaldoCruz,
para obtenção do grau de Doutor em Ciências

Aprovada em: 23/05/2014

BANCA EXAMINADORA

Dr. Ernesto Torres de Azevedo Marques Junior (Orientador)
CPqAM – FIOCRUZ-PE

Dra. Yara de Miranda Gomes (Titular Interno I)
CPqAM - FIOCRUZ-PE

Dra. Nilma Cintra Leal (Titular Interno II)
CPqAM - FIOCRUZ-PE

Dra. Marli Tentório Cordeiro (Titular Externo I)
CPqAM - FIOCRUZ-PE

Dra. Clarice Neuenschwander Lins de Moraes (Titular Externo II)
CPqAM – FIOCRUZ-PE

Dedico este trabalho aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

À FACEPE pelo fornecimento da bolsa de doutorado, que me capacitou a participar neste projeto.

Ao CpqAM e à banca de seleção por ser aceita como aluna de doutorado e a oportunidade de estudar e desenvolver um projeto nesta instituição importante.

Quero muito agradecer aos organizadores da disciplina *Seminários Avançados em Pesquisa*, Dra. Lia Geraldo e Prof. Edgard Assis Carvalho, que por sua visão aberta sobre o universo de pesquisa me fortaleceram.

À equipe da Secretaria Acadêmica, pela gentileza, serviços e informações sempre dadas com maior desempenho.

Principalmente aos meus Orientadores Rafael Dhália e Ernesto Torres Azevedo Marques Jr. Pelo acompanhamento durante o projeto e sugestões dadas.

Ao Leonardo Foti (ICC/Curitiba) pela realização das análises finais de xMAPLuminex, ao Dr. Roberto Lins (Dept. Química Fundamental/UFPE) e ao Dr. Marco Morais (Dept. Genética/UFPE) pela ajuda teórica e esclarecimento de perguntas específicas.

A todos os pesquisadores e colegas do LaViTE pelo companheirismo e agradáveis momentos de convivências na esquina do café e laboratório.

Todavia, quero salientar Cheysa, Bruna e Isabelle não só pela sua Assistência técnica, mas também pela paciência em entender o meu português e a interação humana e carinhosa sempre dada.

Finalmente agradeço meus amores e familiares. Especialmente ao meu marido que com sua paciência, incontáveis vezes, me acompanhou nos domingos pelo campo abandonado da UFPE, para chegar segura no CpqAM.

“Nesta vida temos três professores importantes:
o Momento Feliz, o Momento Triste e o Momento Difícil.
O Momento Feliz mostra o que não precisamos mudar.
O Momento Triste mostra o que precisamos mudar.
O Momento Difícil mostra que somos capazes de superar. “

Roberto Shinyashiki.

BRAND, Heike. **Desenvolvimento de teste diagnóstico para a triagem sorológica de diversas infecções virais**. 2014. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

RESUMO

A condução de triagem sorológica de doadores de sangue é obrigatória e regulada na legislação brasileira. De acordo com o BNDES, o Brasil gasta em média 200 milhões de dólares ao ano com insumos de imunodiagnóstico. Com a finalidade de minimizar estes gastos e disponibilizar um kit de alto valor diagnóstico para o SUS, foi criado o *Instituto Nacional de Inovação em Diagnóstico para a Saúde Pública* (INDI-Saúde), com sede e coordenação no Instituto Carlos Chagas – ICC/FIOCRUZ. O projeto de doutorado constitui-se de um subprojeto do INDI-Saúde, cujo objetivo foi produzir e verificar antígenos sintéticos de HIV1-2, HCV e HTLV 1-2 que serão futuramente incorporados nos kits de diagnósticos multiplex (utilizando o sistema xMAPLuminex) a serem desenvolvidos no Brasil. Para este fim, foram criadas sequências consenso e cepa específicas como também modelos de antígenos diferentes. Entre eles antígenos completos, truncados, sem região trans-membrana, regiões hidrofílicas e construções híbridas. Foram utilizadas sequências de vírus circulantes no Brasil. Foram construídos 42 antígenos, entre eles 27 foram expressos e purificados usando o sistema de expressão procariota. Os protocolos usados para produção dos antígenos variam com cada antígeno e foram estabelecidos e modificados durante o desenvolvimento desta tese. A verificação da antigenicidade foi feita com Western Blot, ELISA e xMAPLuminex, usando soros de referência. Desta forma foram construídos 10 antígenos com alta especificidade e sensibilidade e mais 5 promissores que ainda precisam ser verificados pelo xMAPLuminex. A partir desses resultados foram iniciados os pré-testes para o desenvolvimento de um teste multiplex para HIV incluindo os antígenos p24HIV1, gp41ΔHIV1, gp120ΔHIV1, usando a tecnologia xMAPLuminex. Possibilitando ainda a inclusão de antígenos de outros vírus futuramente no mesmo teste. Sobretudo, foi submetido um artigo ao *Journal of Virological Methods* (Classificação Capes, Saúde Coletiva: A2).

Palavras-chave: antígenos, microesferas, ELISA, sorologia, HIV, HCV, HTLV

BRAND, Heike. **Development of diagnostics for serological screening of various viral infections**. 2014. Thesis (PhD in Public Health) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

ABSTRACT

The conduction of serological screening of blood donors is mandatory and regulated by Brazilian legislation. According to BNDES, Brazil spends an average of \$ 200 million per year for immunodiagnostic supplies. In order to minimize these expenses and to apply those diagnostic kits in laboratory facilities of the SUS, was created the National Institute of Diagnostics and Innovation for Public Health (INDI-Saúde), based and coordinated at the Institute Carlos Chagas - ICC/ FIOCRUZ. This PhD project constitutes a subproject of INDI-Saúde, whose goal was to produce and prevalidate synthetic antigens of HIV1-2, HCV and HTLV1-2 which will be incorporated in future multiplex diagnostic kits (using xMAPLuminex technology) to be developed in Brazil. To this end, consensus and strain specific sequences, from circulating virus in Brazil, as well as different models of antigens were created. Those include complete, truncated and hybrid forms as well as those without transmembrane region or the use of only hydrophilic regions. Like this, 42 antigens were built and 27 expressed and purified using the prokaryotic expression system. The protocols used for the production of antigens vary with each antigen and were established and modified during the development of this thesis. Verification of antigenicity was done by Western Blot, ELISA and xMAPLuminex using reference sera. Thus, 10 antigens with high specificity and sensitivity and five more to be promising, which still need to be checked by xMAPLuminex, were built. From those results pretests for developing a multiplex assay including HIV p24HIV1, gp41ΔHIV1 and gp120ΔHIV1 antigens using the xMAPLuminex technology were initiated. Still allowing the inclusion of more antigens and from other viruses in future, in the same test. Above all, it was an article submitted to the Journal of Virological Methods (Rating Capes , Public Health: A2) .

Keywords: antigens, microspheres, ELISA, serology, HIV, HCV, HTLV

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição global dos subtipos de HIV-1.....	24
Figura 2 - Representação da organização genômica e da partícula viral de HIV.....	26
Figura 3 - Ciclo viral de HIV.....	28
Figura 4 - <i>Fases de Fiebig</i> nos primeiros três meses da infecção por HIV.....	30
Figura 5 - Desenvolvimento da infecção por HIV e o padrão de anticorpos/antígenos encontrados no soro.....	31
Figura 6 - Distribuição de HTLV-1 no Brasil.....	34
Figura 7 - Organização genômica do HTLV1.....	36
Figura 8 - Ciclo viral na célula infectada por HTLV1.....	38
Figura 9 - Prevalência global da infecção por HCV.....	40
Figura 10 - Prevalência da infecção por HCV no Brasil.....	40
Figura 11 - Organização genômica e processamento de HCV.....	41
Figura 12 - Ciclo viral de HCV.....	43
Figura 13 - Aparecimento de RNA viral e anticorpos no soro durante a infecção.....	44
Figura 14 - Códigos genéticos de aminoácidos.....	45
Figura 15 - Estrutura básica de um aminoácido.....	46
Figura 16- Aminoácidos e seu <i>hydropathy score</i>	56
Figura 17 - Exemplo de um Kyte-Doolittle Hydrophathy Plot.....	57
Figura 18 - Apresentação de uma curva ROC.....	64
Figura 19 - Exemplo para discriminação da área de uma curva ROC.....	64
Figura 20 - Princípios do teste ELISA.....	65
Figura 21 - Microesferas coloridas e seus códigos.....	66
Figura 22 - Ilustração do aparelho Luminex.....	67
Figura 23 - Gerações de testes diagnósticos desenvolvidos para HIV.....	70
Figura 24 - Processo de secreção da proteína expressa em <i>K. lactis</i>	82
Figura 25 - Inserção do plasmídeo no genoma da levedura.....	83
Figura 26 - Localização dos iniciadores para verificação da Integração.....	86
Figura 27 - Esquematização dos resultados deste trabalho.....	104
Figura 28 - Modelos usados para construção dos antígenos.....	111
Figura 29 - Identificação das regiões transmembranas gpHTLV1.....	114
Figura 30 - Expressão do antígeno p24HIV1 completo em vetor pKLAC2.....	119
Figura 31 - Purificação das proteínas CBD expressas no sobrenadante.....	120
Figura 32 - Comparação dos antígenos p24HIV1 completo, expressos em	

bactéria e levedura, no ELISA.....	120
Figura 33 - Otimização da expressão da proteína 2.2 em BL21.....	122
Figura 34 - Expressão de HCV-CORE 1-117.....	123
Figura 35 - Expressão de gp41 Δ HIV1 em condições nativa e desnaturante.....	124
Figura 36 - Purificação dos antígenos cepa-específicos.....	125
Figura 37 - Purificação dos antígenos 5.9 e 5.11 com histidina C-terminal.....	126
Figura 38 - Purificação da proteína gp120 Δ HIV1_N utilizando o método <i>Matrix-assisted in vitro purification</i>	127
Figura 39 - Expressão e Immunoreatividade de antígenos consenso expressos em bactéria.....	128
Figura 40 - Western Blot das proteínas do envelope sem domínio trans- membrana.....	129
Figura 41 - Western Blot dos antígenos cepa-específicos.....	130
Figura 42 - ELISA de gp120 Δ HIV1 purificada através de diferentes métodos..	132
Figura 43 - Antigenicidade de antígenos consenso no ELISA.....	133
Figura 44 - Antigenicidade dos antígenos HIV sem região trans-membrana.....	135
Figura 45 - Antigenicidade dos antígenos HTLV sem região trans-membrana no ELISA.....	136
Figura 46 - Antigenicidade dos antígenos HIV cepa específicos no ELISA.....	138
Figura 47 - Antigenicidade dos antígenos HTLV cepa-específicos.....	139
Figura 48 - Análise de Luminex dos antígenos consenso.....	142
Figura 49 - Análise de Luminex dos antígenos do envelope sem a região trans-membrana.....	143
Figura 50 - Análise de Luminex dos antígenos cepa-específicos.....	144

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Métodos diagnósticos multiplex usado em virologia.....	60
Quadro 2 - Definição dos resultados para cálculo da sensibilidade, especificidade e valores preditivos.....	62
Quadro 3 - Principais características de ELISA comercial contra HIV.....	72
Quadro 4 - Principais características de ELISA comercial contra HCV.....	75
Quadro 5 - Lista de iniciadores construídos para subclonagem de antígenos em vetores pKLCF.....	81
Quadro 6 - Iniciadores construídos para subclonagem de antígenos em vetor pET28a.....	91
Quadro 7 - Iniciadores usados para o sequenciamento.....	92
Quadro 8 - Diluições dos anticorpos e soros usadas para WB.....	97
Quadro 9 - Painéis sorológicos nacionais e internacionais usados para o estudo.....	102
Quadro 10 - Resumo dos antígenos HIV.....	105
Quadro 11 - Resumo dos antígenos HTLV.....	107
Quadro 12 - Resumo dos antígenos HCV.....	109
Quadro 13 - Resumo da avaliação dos antígenos com maior antigenicidade.....	110
Quadro 14 - Regiões protéicas identificadas.....	116
Quadro 15 - <i>Índices de cut-off</i> dos resultados do ELISA.....	140

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	Aminoácidos
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrom</i> – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
Arg (R)	aminoácido Argenina
BNDS	Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> – Albumina Sérica Bovina
CBD	<i>Chitin Binding Beads</i>
CD	<i>Cluster of 29I29otóxico29tion</i>
CPqAM	Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães
CRF	<i>circulating recombinant forms</i> – formas recombinantes circulantes
CTL	<i>cytotoxic T Lymphocyte</i> – linfócito T 29I29otóxico
ddH ₂ O	água destilada
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
DO	Densidade Ótica
EDC	1-Etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescency</i> – Reação de Quimioluminescência
EIA	Ensaio imunoenzimático
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
Env	Envelope
ER	<i>Endoplasmatic Reticulum</i> – Retículo endoplasmático
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
Gag	Antígeno Grupo-Específico
gp	glicoproteína
HBZ	<i>HTLV-1 basic leucine-zipper factor</i> - Fator Básico Zíper de Leucina
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i> – Virus da hepatite C
HIS	Histidina tag
HIV	<i>Human Immunodeficiency Vírus</i> – Vírus da Imunodeficiência humana
HTLV	<i>Human T-Cell Lymphotropic Vírus</i> – Vírus Linfotrópico de Células T
IN	Integrase
IPTG	Isopropil β D-Tiogalactopiranosídeo

LAV	Controle lavagem
LB	Luria-Bertani
Leu (L)	aminoácido leucina
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i> – Longo Terminal Repetido
Lys (K)	aminoácido lysina
mAIE	<i>maltose binding protein</i> - proteína de ligação de maltose
mRNA	<i>Messenger RNA</i> – RNA Mensageiro
MES	Ácido 2-morfolinoetanosulfónico
MTOC	Centro de Organização de Microtúbulos
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Nef	<i>Negative regulating Factor</i> - Fator de Regulação Negativa
NK	<i>Natural Killer</i>
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
nt	Nucleotídeo
o.n.	<i>over night</i> - durante a noite (18h)
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	<i>Open Reading Frame</i> – Quadro Aberto de Leitura
PBS	Tampão Fosfato-salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em Cadeia da Polimerase
PE	Ficoeretrina
Phe (F)	aminoácido fenilalanina
pI	ponto isoelétrico
Pol	Polimerase
PR	Protease
Rev	<i>Regulator of Expression of Virion</i> - Regulador da Expressão do Virion
RNA	Ácido Ribonucléico
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
RPM	Rotação Por Minuto
RT	<i>Reverse Transcriptase</i> – Transcriptase Reversa
SIV	<i>Simian Immunodeficiency Virus</i> – V. da imunodeficiência de símios
Sulfo-NHS	Sulfo-N-hidroxisuccinimida
Tat	Transativador da Transcrição
tRNA	<i>Transfer RNA</i> – RNA Transportador
Tm	Melting temperature - temperatura de anelamento

Trp (W)	aminoácido triptofano
Tyr (Y)	aminoácido tirosina
UFRJ	Universidade Federal de Rio de Janeiro
UNAIDS	<i>Joint United Nations Programme on HIV/AIDS</i>
Vif	Fator de Infectividade do Vírus
Vpu	Proteína Viral U
Vpx	Proteína Viral X

SÚMARIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1	Agentes etiológicos	22
2.1.1	Vírus da imunodeficiência humana (HIV).....	22
2.1.1.1	<i>Histórico</i>	22
2.1.1.2	<i>Transmissão e Doença</i>	22
2.1.1.3	<i>Epidemiologia</i>	23
2.1.1.4	<i>Aspectos Moleculares</i>	25
2.1.1.5	<i>Replicação viral</i>	27
2.1.1.6	<i>Imunologia</i>	28
2.1.2	Vírus linfotrópico de células T humana (HTLV).....	33
2.1.2.1	<i>Histórico</i>	33
2.1.2.2	<i>Transmissão e Doença</i>	33
2.1.2.3	<i>Epidemiologia</i>	34
2.1.2.4	<i>Aspectos Moleculares</i>	35
2.1.2.5	<i>Replicação viral</i>	37
2.1.2.6	<i>Imunologia</i>	37
2.1.3	Vírus da hepatite C (HCV).....	39
2.1.3.1	<i>Histórico</i>	39
2.1.3.2	<i>Transmissão e Doença</i>	39
2.1.3.3	<i>Epidemiologia</i>	39
2.1.3.4	<i>Aspectos Moleculares</i>	41
2.1.3.5	<i>Replicação viral</i>	42
2.1.3.6	<i>Imunologia</i>	43
2.2	Produção de proteínas recombinantes	45
2.2.1	Proteínas.....	45
2.2.2	Sistemas de Expressão.....	47
2.2.2.1	<i>Sistema Procarioto</i>	48
2.2.2.2	<i>Sistema Eucariota</i>	51
2.2.3	Seleção de Antígenos.....	54
2.2.3.1	<i>Definição antígeno</i>	54
2.2.3.2	<i>Métodos e Ferramentas</i>	55

2.3	Testes Diagnósticos	59
2.3.1	Métodos e critérios gerais.....	59
2.3.2	Princípio teste ELISA.....	65
2.3.3	Princípio Microarranjos Líquidos/Sistema Luminex.....	66
2.3.4	Testes diagnósticos para HIV, HTLV, HCV.....	69
2.3.4.1	<i>HIV</i>	69
2.3.4.2	<i>HTLV</i>	73
2.3.4.3	<i>HCV</i>	74
3	JUSTIFICATIVA	76
4	OBJETIVOS	77
4.1	Objetivo Geral	77
4.2	Objetivos específicos	77
5	PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	78
5.1	Construção dos antígenos	78
5.2	Expressão em Sistema Eucarioto	80
5.2.1	Vetores de expressão e subclonagem.....	80
5.2.2	Transformação de leveduras <i>K. lactis</i>	81
5.2.2.1	<i>Transformação das células</i>	82
5.2.2.2	<i>Verificação da inserção do plasmídeo</i>	84
5.2.3	<i>Expressão e Purificação das proteínas</i>	87
5.2.3.1	<i>Expressão em Mini- e Midiescala</i>	87
5.2.3.2	<i>Crescimento com inibidores e albumina</i>	87
5.2.3.3	<i>Teste de concentração e tempo de incubação com Galactose</i> ...	87
5.2.3.4	<i>Teste de temperatura e uso de EDTA</i>	88
5.2.3.5	<i>Teste de pH em meio de cultura</i>	88
5.2.3.6	<i>Teste de meio de cultura</i>	88
5.2.3.7	<i>Concentração com PEG₃₃₅₀</i>	89
5.2.3.8	<i>Concentração com Chitin Beads</i>	89
5.3	Expressão em Sistema Procarioto	90
5.3.1	Vetores de expressão e subclonagem.....	90
5.3.1.1	<i>Sequenciamento das construções</i>	92
5.3.2	Transformação de <i>E. coli</i>	92
5.3.3	Expressão e Purificação das proteínas.....	92

5.3.3.1	<i>Expressão em Miniescala</i>	92
5.3.3.2	<i>Expressão em Midi- e Larga Escala</i>	93
5.3.3.3	<i>Purificação sem uréia e Resina de Níquel</i>	93
5.3.3.4	<i>Purificação com uréia e Resina de Níquel</i>	94
5.3.3.5	<i>Purificação pelo método Matrix-assisted in vitro purification</i>	94
5.3.3.6	<i>Diálise das proteínas</i>	95
5.3.3.6.1	<u>Utilização de detergente na diálise</u>	95
5.3.3.6.2	<u>Diminuição de uréia lenta na diálise</u>	95
5.3.3.7	<i>Concentração das proteínas</i>	95
5.4	Análise das Proteínas	96
5.4.1	Quantificação.....	96
5.4.2	SDS-PAGE e Western Blot.....	96
5.4.2.1	<i>SDS-PAGE</i>	96
5.4.2.2	<i>Western Blot</i>	97
5.4.2.3	<i>Coloração Azul de Coomassie</i>	98
5.4.3	ELISA.....	99
5.4.4	xMAPLuminex.....	100
5.4.4.1	<i>Acoplamento das proteínas às microesferas</i>	100
5.4.4.2	<i>Ensaio com microesferas acopladas</i>	100
5.5	Análises estatísticas	101
5.5.1	ELISA.....	101
5.5.2	xMAPLuminex.....	101
5.6	Soroteca	102
6	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	103
7	RESULTADOS	104
7.1	Construção dos antígenos	111
7.1.1	Antígenos consenso.....	112
7.1.2	Antígenos do envelope sem domínio trans-membrana.....	113
7.1.3	Antígenos cepa-específicos.....	117
7.2	Expressão em Sistema Eucarioto	118
7.3	Expressão em Sistema Procarioto	121
7.3.1	Teste de otimização para expressão.....	121
7.3.2	Purificação dos antígenos com Resina de Níquel.....	122

7.3.3	Remoção da uréia via <i>matrix-assisted purification</i>	126
7.4	Verificação da Antigenicidade	127
7.4.1	Western Blot.....	127
7.4.2	ELISA.....	131
7.4.2.1	<i>Padronização dos testes de ELISA</i>	131
7.4.2.2	<i>Antígenos consensos</i>	133
7.4.2.3	<i>Antígenos do envelope sem região trans-membrana</i>	134
7.4.2.4	<i>Antígenos cepa específicos</i>	137
7.4.3	xMAPLuminex.....	141
8	DISCUSSÃO	147
9	CONCLUSÕES	153
10	PERSPECTIVAS	154
	REFERÊNCIAS	155
	APÊNDICES	170
	Apêndice A - Identificação das regiões transmembranas com o programa THMM 2.0.....	171
	Apêndice B - Integração dos antígenos subclonados em plasmídeo pKLAC2 em levedura.....	173
	Apêndice C - Integração dos antígenos subclonados em plasmídeos pKLCF em levedura.....	174
	ANEXOS	175
	Anexo A - Parecer do Comitê Nacional de Ética.....	176
	Anexo B - Comprovante submissão do artigo.....	177
	Anexo C - Mapas de plasmídeos eucariota.....	178
	Anexo D - Mapas dos plasmídeos procariotas.....	181

1 INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas décadas a prática da medicina progrediu intensamente, salvando vidas de milhares de pessoas, devido ao desenvolvimento de métodos diagnósticos, tratamento e esclarecimento de fatores de riscos. Um desenvolvimento que se destaca é a transfusão de sangue. Esta é realizada em casos de perdas de sangue aguda (acidentes, cirurgias e anemias sintomáticas), queimaduras graves e doenças hereditárias (hemofilia) (OLIVEIRA et al., 2003). A primeira transfusão de sangue foi realizada no século 19, embora ainda pouco eficiente, devido aos seus efeitos adversos.

Com a descoberta dos grupos sanguíneos os A, B e O por Landsteiner no início do século 20, essa avançou para um tratamento mais seguro relacionado aos efeitos adversos de incompatibilidade entre doador e receptor do sangue. As reações adversas são classificadas em aguda (reação hemolítica aguda - ABO), tardia, imunológicas e não imunológicas. Entre as reações tardias não-imunológicas se encontram as doenças infecciosas causadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da hepatite B (HBV) e hepatite C (HCV), citomegalovírus (CMV), vírus linfotrópico da célula T humana (HTLV/II), Vírus do oeste do Nilo (WNV), Malária, Brucelose, Babesiose, Doença de Chagas, Parvovirose e Sífilis (OLIVEIRA et al., 2003).

Com o surgimento dos primeiros casos de HIV/AIDS, na década 1980, e a descoberta da transmissão desse vírus por transfusão sanguínea, o foco para melhorar a segurança e diminuir os riscos tardios mudou para a detecção de agentes etiológicos. Calcula-se que nos EUA, Japão, França e Canadá entre 1980 e 1990, milhares de pessoas foram infectadas por transfusões com sangue contaminado. A falta de regulamento legislativo, administração política falsa e a comercialização de produtos sanguíneos foram identificadas como causadores desses escândalos (ANDERSON et al., 2007). O histórico mostra a trajetória pessoal e o impacto social relacionado a transfusões, como também esclarece a responsabilidade política para definir uma Hemovigilância adequada. Assim, a partir dessa época, vários países estabeleceram normas para melhorar a segurança dos produtos sanguíneos. Parte dessas são a triagem sorológica do sangue, seleção de doadores e processamento adequado das bolsas sanguíneas e hemoderivados. A legislação brasileira, *Portaria nº 1.376/1993 e Resolução nº 343/2002 do Ministério*

da Saúde, determina que para cada doação seja obrigatório a triagem sorológica, com exames laboratoriais de alta sensibilidade dos seguintes agentes infectocontagiosos os: HIV1 e HIV2, HTLV I e HTLV II, HCV, HBV, *T. cruzi*, *Treponema pallidum*, *Plasmodium* em áreas endêmicas de malária e CMV para pacientes imunossuprimidos (CARRAZONE et al., 2004).

Nas últimas décadas, uma grande variedade de testes diagnósticos foram desenvolvidos, como por exemplo, técnicas de isolamento viral, PCR e ELISA, sendo os dois últimos os mais utilizados (KUHNS et al., 2006; STUERMER et al., 2009;).

Os testes diagnósticos em geral movimentam mundialmente cerca de 25 bilhões de dólares por ano, constituindo um setor de biotecnologia altamente dinâmico, embora a disseminação da produção ainda seja restrita. No Brasil, ainda não existe uma tradição neste campo industrial, criando-se uma dependência comercial em relação à importação desses produtos. De acordo com o BNDES, o Brasil gasta em média 200 milhões de dólares ao ano com insumos de imunodiagnóstico (GADELHA, 2008).

Com a finalidade de minimizar estes gastos foi criado (dentro da iniciativa dos projetos de Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia – INCT do CNPq) o *Instituto Nacional de Inovação em Diagnóstico para a Saúde Pública* (INDI-Saúde), com sede e coordenação no Instituto Carlos Chagas – ICC/FIOCRUZ. A meta deste INDI-Saúde é a nacionalização de insumos e sistemas de diagnósticos, reduzir os custos de importação no setor de imunodiagnóstico, reduzir a dependência tecnológica brasileira, fortalecer o Sistema Único de Saúde – SUS e qualificar recursos humanos, aumentando assim ainda a oferta de empregos nesta área emergente.

Este projeto de Doutorado é um subprojeto do INDI-Saúde, cujo objetivo principal foi produzir e verificar antígenos sintéticos de HIV1-2, HCV e HTLV 1-2 que serão futuramente incorporados nos kits de diagnósticos multiplex a serem desenvolvidos, usando novos métodos diagnósticos, como o sistema de xMAPLuminex. A meta foi a produção de antígenos protéicos, de alta qualidade, para aumentar a sensibilidade e a especificidade dos kits de diagnóstico em desenvolvimento por este instituto. É necessário salientar, que para este fim, foram usados especialmente antígenos de subtipos de virais circulando no Brasil.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Agentes etiológicos

Vírus são os menores dentre os organismos autoreplicantes e a sua estrutura é usada para sua taxonomia. Essa inclui a morfologia viral (tamanho, forma, simetria do capsídeo, presença ou ausência do envelope), propriedades físicas (estrutura do genoma, sensibilidade ao tratamento químico ou físico, carboidrato, proteínas estruturais e não estruturais), propriedades biológicas e antigenicidade (estratégia de replicação, hospedeiro, modo de transmissão, patogenicidade). Os vírus causam uma variedade de doenças no hospedeiro ou se manifestam como infecções latentes em indivíduos assintomáticos.

2.1.1 Vírus da imunodeficiência humana (HIV)

2.1.1.1 Histórico

HIV-1 e -2 foram identificados como *cross-especies* que evoluíram filogeneticamente do *simian immunodeficiency virus* (SIV) de macacos africanos e que foram transmitidos por primatas não-humanos (BUTLER et al., 2007). Um “ancester” vírus de HIV-1/2 provavelmente já existiu no início do século 20, todavia o HIV apareceu somente na década 80 quando foram relatados os primeiros casos inexplicáveis de linfadenopatia e imunodeficiência em humanos. Em 1983, o HIV-1 foi extraído de indivíduos assintomáticos por Luc Montagnier (Instituto Pasteur/França) e posteriormente em pacientes com AIDS por Robert Gallo (NIH/EUA). O vírus inicialmente foi nomeado HTLVIII e mais tarde renomeado em HIV-1. Em 1986 um vírus parecido, mas imunologicamente distinto, foi encontrado em indivíduos habitando em países da África oeste, chamado HIV-2 (FIELDS, 2007).

2.1.1.2 Transmissão e Doença

A transmissão dos HIV-1/2 ocorre por via sexual, vertical de mãe para filho ou pelo contato direto com sangue infectado, como por exemplo, transfusões de

sangue, acidentes, compartilhamento de agulhas e seringas entre usuários de drogas intravenosas (STUERMER, 2009). Os vírus infectam principalmente os linfócitos T (CD4+), como também macrófagos e provavelmente células dendríticas as quais são importantes para o sistema imune do hospedeiro. O tropismo celular é devido aos receptores de superfície celular, necessários para a entrada do vírus na célula. Normalmente, o receptor CD4 e um dos coreceptores da família de quimocinas são usados *in vivo* pelo vírus. A maior diferença entre HIV-1 e HIV-2 é a patogenicidade reduzida e um controle imune maior no caso de HIV-2 (REEVES et al., 2002). A infecção por HIV-1/2 pode ser latente por algum tempo, mas com o progresso da infecção (2-10 anos) geralmente se desenvolve para AIDS (síndrome de imunodeficiência adquirida) que pode levar à morte. Sendo o desenvolvimento para AIDS, em caso da infecção por HIV-2, mais lento. AIDS é caracterizado por linfadenopatia, infecções oportunistas especificamente pneumonia por *Pneumocystis carinii*, retinite associada ao citomegalovírus, cryptococcal meningite e uma variedade de câncer incomum, como o *linfoma não-Hodgkin* e *Kaposi Sarkoma* (SEDDON et al., 2011).

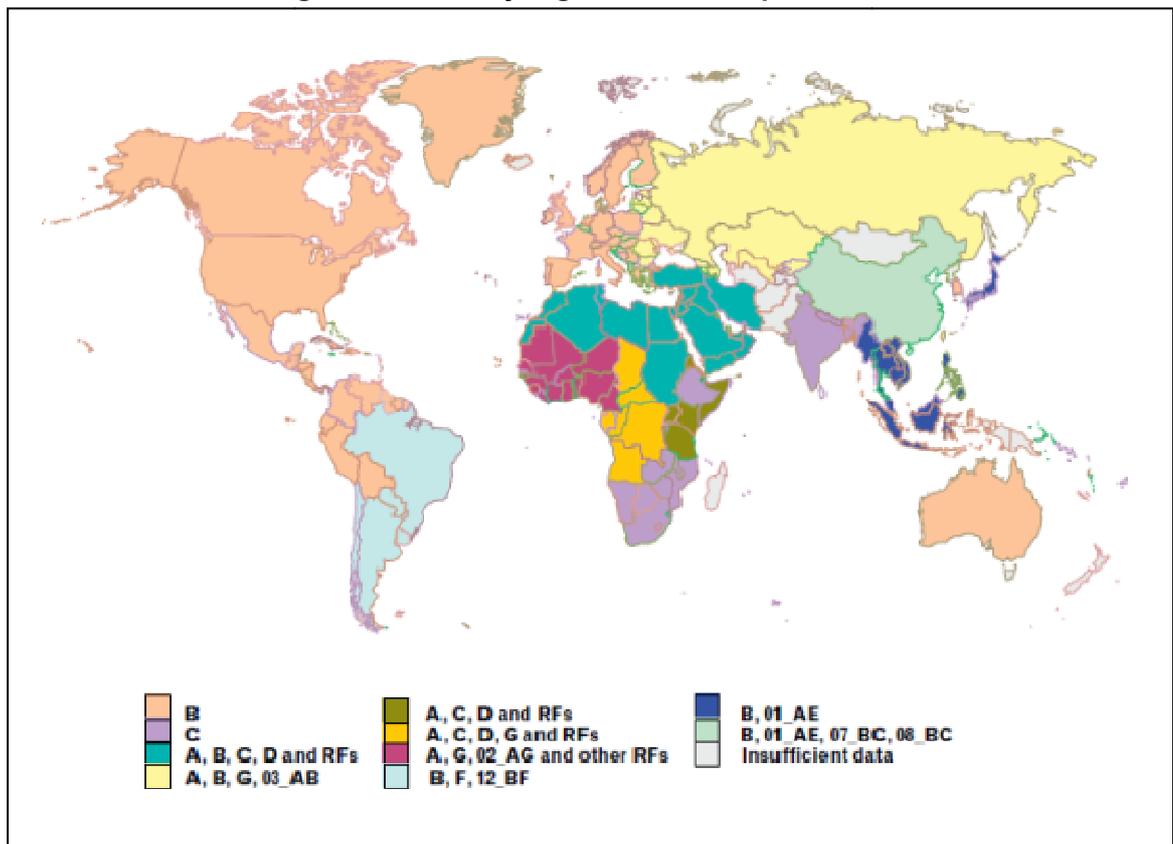
2.1.1.3 Epidemiologia

Atualmente estima-se que aproximadamente 34 milhões de pessoas em todo o mundo sejam HIV – positivos, com 2.5 milhões infecções novas cada ano (BRUN-VÉZINET; CHARPENTIER; 2013). A previsão para 2030 é que o número de óbitos aumente e gire em torno de até 6,5 milhões (MATHERS et al., 2002). No Brasil, estima-se que 1/3 da população com AIDS da América Latina esteja neste país (UNAIDS, 2010). Em 2006 foram 630.000 indivíduos infectados registrados, com uma incidência em 2008 de 18 por 100.000 habitantes (GRANGUEIRO et al., 2006). Um estudo feito no Instituto Oswaldo Cruz em parceria com a UFRJ identificou 15 amostras soropositivas por HIV-2 em diversos estados, mostrando esse vírus timidamente circulando no Brasil (GRANGUEIRO et al., 2006).

Os dois tipos de HIV circulando mostram alta diversidade genética, sendo necessário observar também a distribuição do vírus no nível molecular. Estudos filogenéticos distinguiram vários subtipos que em caso de HIV-1 foram classificados em três grupos: M (ingl. Main), O (ingl. Outlier), N (ingl. Non-M, non-O) e em caso de HIV-2 em A até H (BUTLER et al., 2007). Mais de 95% de todos os HIV-1 detectados

globalmente fazem parte do grupo M e são divididos ainda em subgrupos: A, B, C, D, F, G, H, J, K (grupos E e I não existem) e pelo menos 43 formas recombinantes (CRF), circulando em áreas geográficas distintas (Figura 1) (STUERMER et al., 2009). Sobretudo, foram definidos também sub-subtipos do vírus tipo A, C e F (BUTLER et al., 2007). A variação entre os diferentes subtipos pode ser de 25-30%, dependendo do subtipo e das regiões genômicas examinadas (HELEMAR et al., 2006; REEVES et al., 2002). O vírus do grupo O tem semelhança de aproximadamente 65% com os vírus do grupo M e foi achado em Camarão, Gabon e Guiné Equatorial. Enquanto cepas do vírus do grupo N foram identificados em seis indivíduos infectados do Camerões. Esses vírus falharam na detecção sorológica, em teste diagnóstico padrão, o ELISA. Entre os subtipos de HIV-2, o A e B são os mais comuns, circulando principalmente em Costa do Marfim. Os tipos C até H são raros e foram encontrados somente em pacientes únicos de Serra Leoa (BUTLER et al., 2007).

Figura 1- Distribuição global dos subtipos de HIV-1.



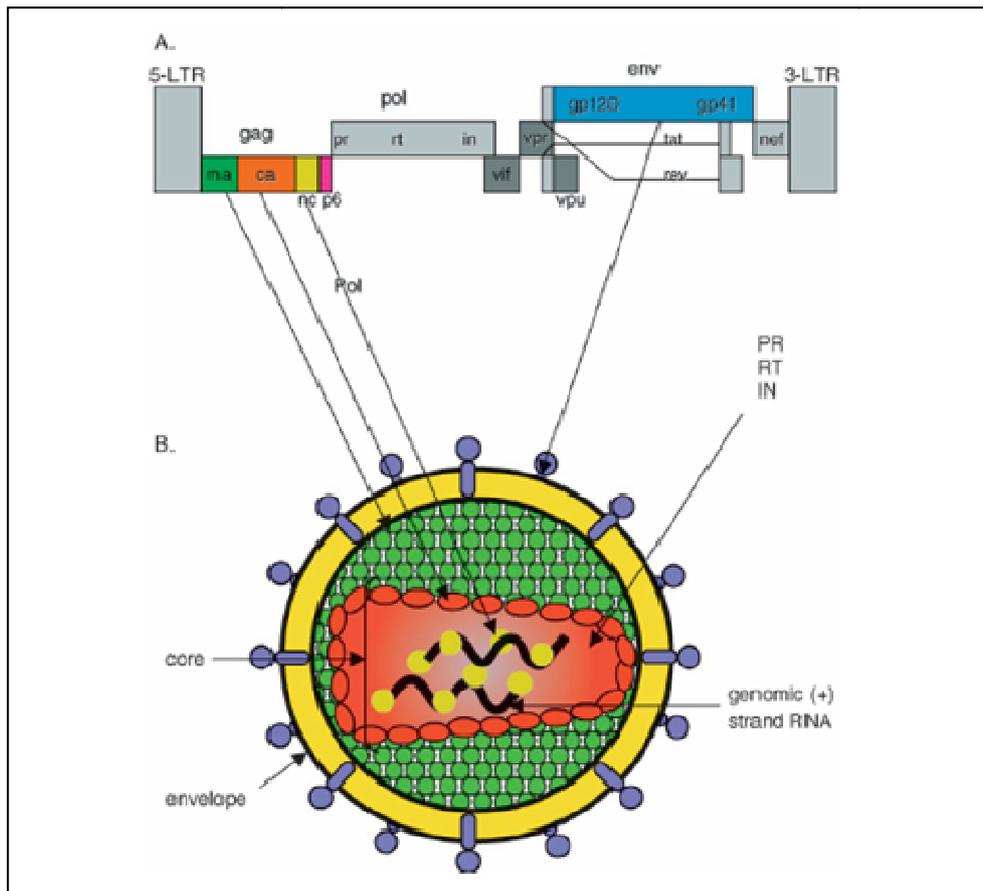
Fonte: Woodman et al. (2009)

No Brasil, predominantemente se encontra o HIV-1 do grupo M, subgrupo B e CRF (HELEMAR et al., 2006). Dependendo da região, também os subtipos F, C e pequenas proporções do subtipo D podem ser encontrados. Por exemplo, nos estados do sul e sudeste o subtipo B é presente em quase 50%, enquanto os subtipos C e F representam 28% e 7%, respectivamente. No Nordeste, o subtipo B prevalece com mais de 80%, seguido pelo subtipo F e CRF-BC recombinante em <3% (REQUEJO et al., 2006).

2.1.1.4 Aspectos moleculares

O HIV faz parte da família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus*. O genoma viral de HIV1 é constituído de duas fitas simples de RNA com tamanho de ~9kb que codificam nove *open reading frames* (ORF). Três desses codificam as poliproteínas gag, pol, env (comuns em todos os retrovírus) que após a sua tradução, são processados em proteínas individuais por proteases virais (em caso de gag, pol) ou protease celular (em caso de env). As quatro proteínas que resultam da poliproteína gag (Pr55^{Gag}), MA (matrix, p17), CA (capsídeo, p24), NC (nucleocapsídeo, p7), p6 e as duas glicoproteínas da precursora ENV (gp160), a gp120 (superfície) e a gp41 (transmembrana) são os componentes estruturais que fazem o core do virion e a membrana externa, o envelope, respectivamente (Figura 2). As três proteínas resultando da clivagem da proteína precursora pol (Pr160^{GagPol}), PR (protease, p11), RT (transcriptase reversa, p66/p51) e IN (integrase, p31) disponibilizam funções enzimáticas importantes e também se encontram encapsuladas na partícula viral. Os outros seis genes codificam proteínas únicas para o HIV, conhecidas como proteínas acessórias ou não estruturais. As proteínas *nef*, *vif*, *vpr* se encontram na partícula viral, *tat* e *rev* disponibilizam funções para o regulamento gênico e *vpu* participa do empacotamento do virion (FRANKL et al., 1998).

Figura 2- Organização genômica e representação da partícula viral de HIV.



Fonte: Scarlata et al. (2003)

Os *Long terminal repeats* (LTR), localizados em ambos os lados do provírus (genoma viral integrado), servem como elementos regulatórios e sítios para a iniciação da transcrição. Eles são compostos de regiões U3/R/U5 que contém elementos para a ligação da RNA polimerase II, fatores de transcrição e a TATA-box. Os RNA feitos podem ser distinguidos em três formas. Um é o RNA *unspliced* que serve como mRNA para a proteína precursora *gag* e *gagpol* e como RNA genômica para novos virions. A segunda forma se constitui em cerca de 5 kb, a qual é usada para tradução das proteínas *env*, *vpu*, *vpr* e *vif*. As outras formas são *spliced* em pequenas mRNAs (1.7 – 2kb) para a tradução em proteínas *ref*, *tat* e *nef*. A maioria das proteínas é traduzida no citoplasma. Com exceção do mRNA *ENV* o qual é traduzido no retículo endoplasmático (ER), onde também ocorre a glicosilação da proteína (FRANKL et al., 1998).

A estrutura genética do HIV-2 é parecida com a do HIV-1. A homologia de nucleotídeos é de 60% (REQUEJO et al., 2006). O tamanho do genoma é de ~9,7kb,

se diferenciando do HIV-1 devido ao tamanho dos LTR (GUYADER et al., 1987). O precursor poliproteína *Gag* é de 57kDa e processado em p16, p26 e p12 kDa proteínas. O ORF de *Pol* leva à p64 e p36 antígenos as quais correspondem à transcriptase reversa e endonuclease do HIV-1 (GUYADER et al., 1987). HIV-2 se distingue principalmente na glicoproteína *ENV* e outros epítomos antigênicos (BUTLER et al., 2007). O precursor de ENV tem tamanho de 140kDa e é clivado em gp125 (proteína da superfície) e gp36 (proteína trans-membrana) (REEVES et al., 2002). Sobretudo tem uma proteína *vpx*, em vez da *vpu* de HIV-1, que tem função no transporte nuclear (BUTLER et al., 2007).

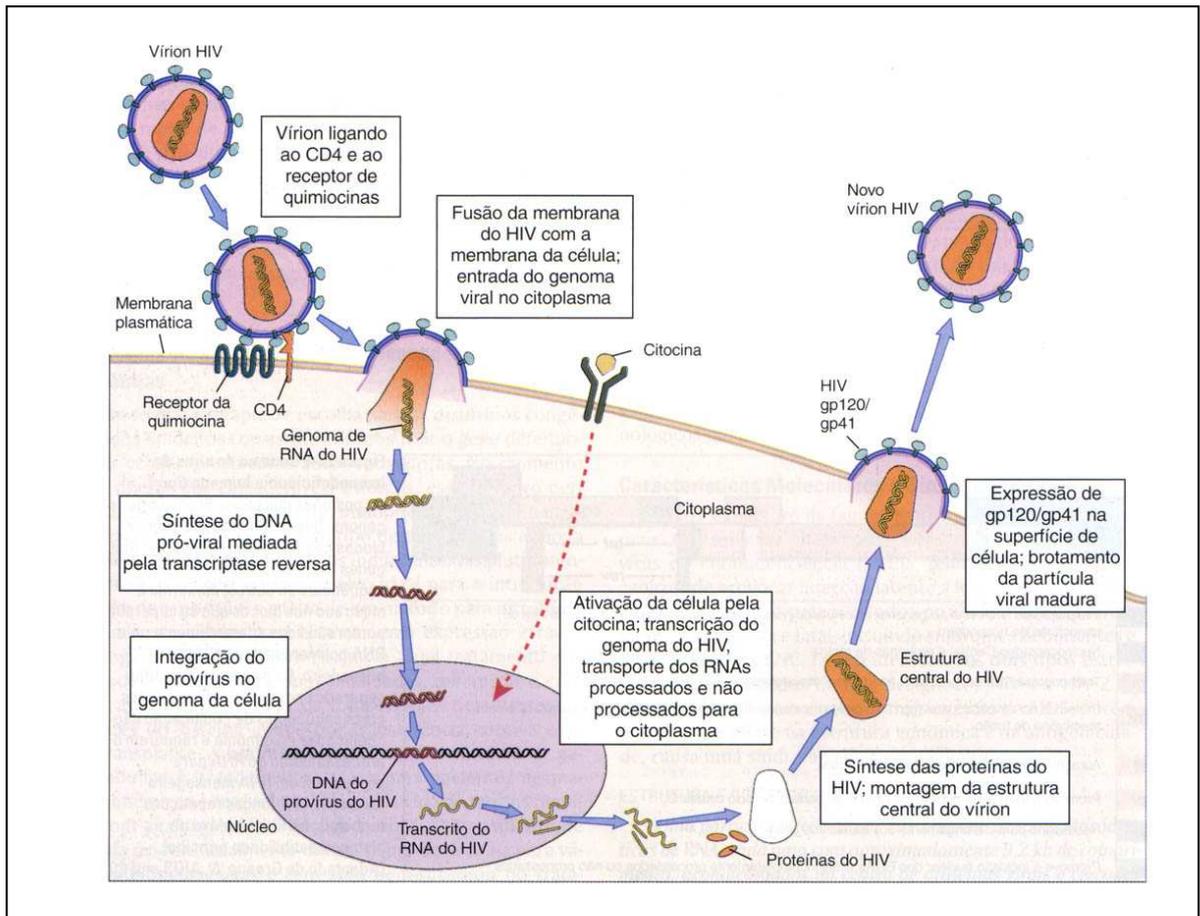
Os subtipos do grupo M mencionados acima são variantes, principalmente na sequência do gene *ENV*, que codifica a glicoproteína gp120, mas também de outras regiões genômicas do vírus (HELEMAR et al., 2006).

2.1.1.5 Replicação viral

A entrada do vírus começa pela interação de receptores e co-receptores específicos da célula alvo com o vírus. A ligação de alta afinidade entre a proteína viral gp120 e o receptor CD4 induzem a mudança conformacional de gp41 que permite a fusão da membrana viral com a membrana plasmática celular do linfócito T (Figura 3). Esse processo permite a liberação do core virion no citoplasma. Para não linfócitos, o uso de membros da *G protein-coupled receptor superfamília* serve como receptores. Além disso, os receptores α -chemokine (CXCR4) e β -chemokine (CCR5) são importantes como co-receptores para o HIV-1 (FREED et al., 2002), enquanto os CCR1, CCR2b, CCR3 e CCR5 são usados por HIV-2 (BUTLER et al., 2007). Após a entrada do virion, ocorre o processo de desnudamento que permite a liberação do genoma viral e a criação de um *reverse-transcription complex* (RTC) e *preintegration complex* (PIX).

Nesses complexos, o genoma viral de RNA é transcrito reverso em DNA pela *RT* viral. Logo após, o DNA é transportado para o núcleo onde se integra como provírus nos cromossomos da célula do hospedeiro. A inserção é catalisada pela enzima viral, *IN*. Em seguida, o provírus é usado como molde para a síntese dos RNAs virais que codificam todas as proteínas citadas acima, necessárias para a replicação do vírus e do RNA genômico (FRANKL et al., 1998).

Figura 3- Ciclo viral de HIV.



Fonte: Lookfordiagnosis

Logo depois da síntese de todas as proteínas virais, começa a montagem de novas partículas virais. A proteína mais importante envolvida nesse processo é a proteína precursora Pr55^{Gag}. Essa proteína se liga à membrana plasmática, encapsula o RNA genômico, se associa com as glicoproteínas *env* e estimula o *budding* para fora da célula. Em seguida ao brotamento, ocorre o amadurecimento da partícula viral. A protease viral *PR* corta as poliproteínas precursoras *gag* e *gagpol* gerando proteínas *gag* e *pol* maduras, que por sua vez levam ao reestruturamento do virion (FREED et al., 2002).

2.1.1.6 Imunologia

Logo após a infecção com HIV, uma resposta imune imediata pode ser observada que inclui linfócitos T/CD4+, linfócitos T citotóxicos (CTL) e células NK.

As células T CD4⁺ produzem citocinas que aumentam a resposta imune antiviral, enquanto a resposta dos CTL atinge diretamente as células infectadas. A ação dos CTL é específica ao antígeno e necessita o contato entre as células. A presença de células CTL e NK normalmente é encontrada em altas taxas durante a fase latente da infecção. Um declínio dessas células ao longo do tempo da infecção, pode, mas nem sempre é relacionado ao um desenvolvimento da AIDS. A resposta imune nos casos que não desenvolvem AIDS provavelmente é substituída pela produção de anticorpos neutralizantes contra as proteínas *env* gp120 e gp41 (13 dias pós-infecção em cepa B, 3-8 semanas em cepa C). Essas levam a uma menor carga viral no plasma e induz uma *citotoxicidade celular dependente do anticorpo* (ADCC) com as células NK envolvidas (KARPAS et al., 2004).

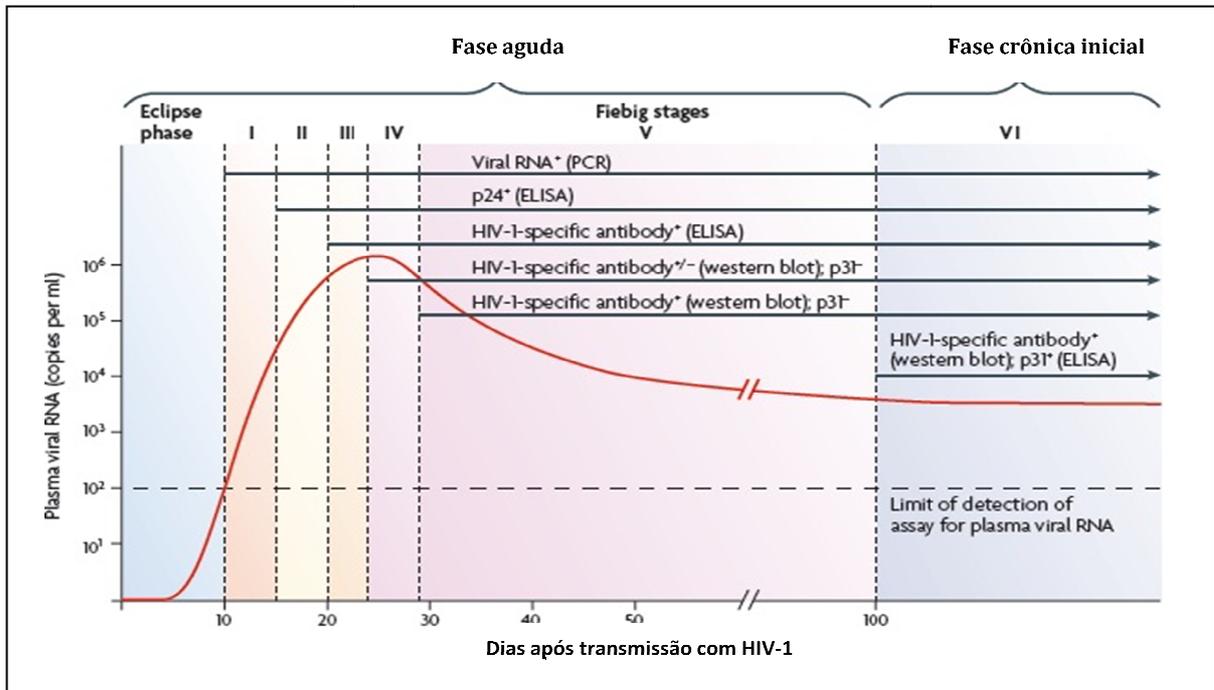
Estudos feitos sobre a presença de anticorpos ao longo da infecção, incluindo a fase mais precoce após transmissão, mostraram que o aparecimento de anticorpos contra determinadas proteínas marcam o progresso da infecção na fase aguda.

A infecção aguda por HIV pode ser definida pelo tempo entre a aquisição do vírus e a conversão sorológica (infecção primária). Passando meses, até uma infecção com uma carga viral estável e um aumento de concentrações de anticorpos com afinidade contra antígenos de HIV, foi desenvolvido. Durante a infecção aguda, um *pool* viral latente se desenvolve, o sistema imune sofre danos irreparáveis e o indivíduo fica altamente contagioso. Assim, a infecção por HIV pode ser caracterizada por padrões de antígenos virais e respostas por anticorpos diferentes (COHEN et al., 2010). Os anticorpos são feitos contra as proteínas *gag*, *pol*, *env* e podem incluir vários isotípos, como IgM, IgG, IgA, IgE e subtipos IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄ (TOMARAS et al., 2009). A porção FAB do anticorpo determina a especificidade para a ligação de um antígeno. A porção Fc é utilizada para a ligação de fatores de complemento e atividades antivirais (estimulando fagocitose, secreção de citocinas e quimocinas, recrutamento da atividade citolítica) após a sua interação com os *receptores de Fc*. Os *receptores Fc* são expressos na superfície das células da imunidade inata e células B. Os isotípos produzidos durante a infecção determinam a função efetiva dos anticorpos e constituem assim a imunidade humoral adaptativa (TOMARAS; ALTER; 2010).

Além disso, *Fiebig* descreveu seis fases da infecção por HIV-1 do grupo B que ocorre após a fase inicial (eclipse), (Figura 4) (ALTER et al., 2010):

Fase de eclipse: Após a transmissão, o vírus se estabelece no tecido onde foi exposto. A disseminação na circulação em níveis detectáveis ainda não ocorreu. Esta fase demora até cerca de seis dias.

Figura 4- Fases de Fiebig nos primeiros três meses da infecção por HIV.



Fonte: McMichael et al. (2010)

Fase I (ramp-up phase): Com a disseminação no tecido linfóide e no sangue, a replicação do vírus ocorre rápido. Esta fase é caracterizada como “período da janela” na qual o RNA viral no sangue pode ser detectado e anticorpos ainda não são detectáveis. Ao mesmo tempo podem ser evocados *mutantes de escapes da resposta imune mediada por células* do vírus.

Fase II: Sete dias depois é caracterizada pela detecção de antígeno p24. Não obstante, o p24 começa transientemente a aparecer na *ramp-up phase* quando os níveis de HIV-1 RNA se elevam à 10.000 cópias/ml sangue.

Fase III: Cerca de cinco dias depois do teste para o antígeno p24 é positivo, anticorpos da classe IgM podem ser detectados em ensaios imunes de enzimas (EIAs) sensíveis.

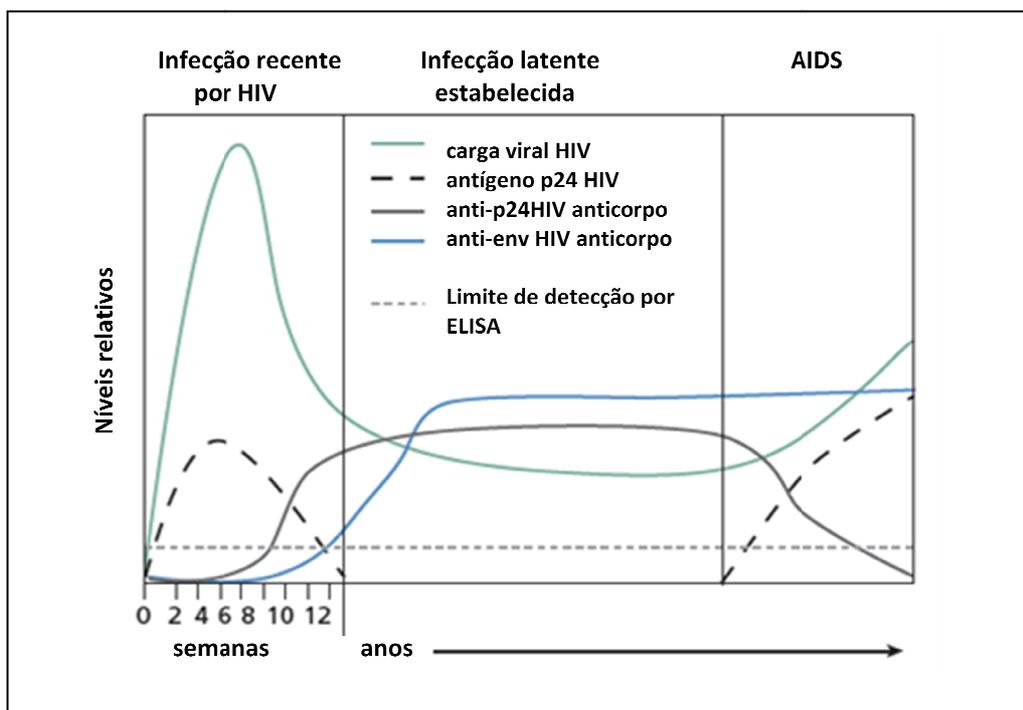
Fase IV: É representada por um Western Blot indeterminado

Fase V e VI: Estas fases são caracterizadas por um WB claramente positivo, que ocorre cerca de um mês após a infecção inicial.

Foi relatado, que os primeiros anticorpos HIV-1 são de anti-gp41 da classe IgM que seguem uma transferência (*class-switching*) para anticorpos da classe IgG, IgA e seus subtipos. As células B seguem uma mudança da classe de imunoglobulinas normalmente nos linfonodos. Esse pode ser influenciado pelas propriedades do agente etiológico, como por exemplo, tamanho, capacidade de ativar fatores de complemento, capacidade de se ligar aos receptores de células que representam antígenos ou formação de complexos imunes (TOMARAS et al., 2010). Aproximadamente dias e até semanas após da detecção do RNA viral no plasma, se encontram os seguintes anticorpos:

- a) 13° dia: *env* (gp41);
- b) 18° dia: *gag* (p24, p55);
- c) 28° dia: *env* (gp120);
- d) 33° dia: *gag* (p17);
- e) 40° dia: *env* (gp120, região V3);
- f) 53° dia: *pol* (p31).

Figura 5- Desenvolvimento da infecção por HIV e o padrão de anticorpos/antígenos encontrados no soro



Fonte: Daskalakis et al. (2011)

Outros estudos incluem também anticorpos contra outras estruturas virais e relatam o aparecimento do primeiro anticorpo contra p24 e do gp41 logo após (Figura 5) (DASKALAKIS et al., 2011).

Além disso, podem ser distinguidos anticorpos neutralizantes e não neutralizantes. Os anticorpos produzidos durante os primeiros 40 dias após a detecção dos RNA virais no soro são caracterizados como anticorpos não neutralizantes. Nestes, falta a capacidade de mediar a inibição do vírus (TOMARAS et al., 2010).

2.1.2 Vírus linfotrópico de células T humana (HTLV)

2.1.2.1 *Histórico*

Na década 1970 se concentraram casos de um novo tipo de leucemia na região geográfica do Japão. Em 1980, o agente etiológico, o HTLV-1, foi descoberto e identificado como o primeiro retrovírus associado ao câncer no ser humano (MATSUOKA et al., 2007). Depois, também outros tipos de HTLV foram identificados. O HTLV-2, apesar de não estar relacionado ao desenvolvimento de uma doença, foi isolado primeiro em um paciente com a leucemia de células pilosas (KALYANARAMAN et al., 1982). Em 2005 foram relatados, o isolamento de HTLV-3 e HTLV-4 de indivíduos na África (MAHIEUX et al., 2005).

2.1.2.2 *Transmissão e Doença*

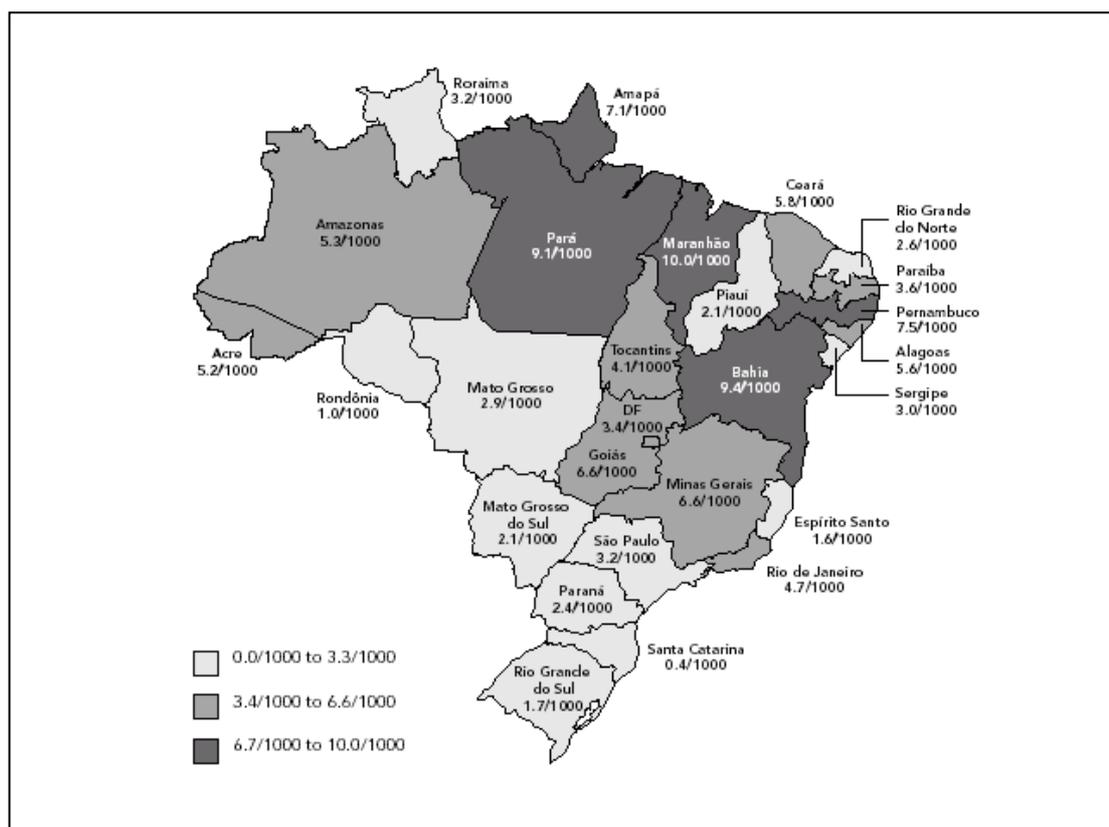
O vírus é transmitido sexualmente, através de sangue contaminado e verticalmente de mãe para filho, pela amamentação ou durante o parto. Durante muito tempo pensou-se que o vírus tinha um tropismo para células linfóide T (CD4+), aonde as proteínas virais produzidas iam induzir alterações intracelulares que levam a imortalização, transformação e proliferação da célula alterada (MATSUOKA et al., 2007). Entretanto, outras células também mostram suscetibilidade ao vírus, como os linfócitos T supressores, linfócitos T citotóxicos, os monócitos do sangue periférico, macrófagos, as células dendríticas, células NK, os linfócitos B, astrocitos presentes no sistema nervoso central, células gliais, fibroblastos, células endoteliais e epiteliais e células progenitoras CD34+ (RICHARDSON et al., 1990).

De acordo com a OMS, o HTLV-1 é reconhecido como agente etiológico da Leucemia de célula T no adulto (ATL). Além da ATL, o vírus também é responsável por varias outras doenças, como por exemplo, a mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP), uma doença neurodegenerativa; a uveíte, uma doença oftalmológica; a dermatite infecciosa (IDH) ou desordem psiquiátricas (GONÇALVEZ et al., 2010). Todavia, apenas 2-6% dos portadores do HTLV-1 desenvolvem uma das doenças relacionadas ao vírus e geralmente só 40 a 60 anos pós-infecção, sendo, portanto, a maioria dos indivíduos infectados portadores assintomáticos (MATSUOKA et al., 2007).

2.1.2.3 Epidemiologia

Mundialmente 10-20 milhões de pessoas são infectadas com HTLV-1. Áreas endêmicas com mais de 1% da população infectada são: Japão, África Subsaariana, América do Sul e as Ilhas do Caribe (MATSUOKA et al., 2007). De acordo com dados mais recentes obtidos em estudos com doadores de sangue, o Brasil tem o maior número absoluto de pessoas infectadas pelo HTLV-1 no mundo. Estimativas calculam 2,5 milhões de brasileiros infectados (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002). Um estudo feito nas capitais dos 27 estados no Brasil mostrou a maior prevalência na região Norte e Nordeste. Com 10/1000 em São Luis (Nordeste) comparados com 0,4/1000 em Florianópolis (Sul). Pernambuco mostrou uma prevalência de 7,5/1000 pessoas infectadas (Figura 6) (CATALAN-SOARES et al., 2005).

Figura 6- Distribuição de HTLV-1 no Brasil



Fonte: Catalan-Soares et al. (2005)

Mundialmente foram classificados sete subtipos de HTLV-1, nomeados A (Cosmopolitana), B (África Central), C (Ásia), D (África Central-Camarões), E (África-Congo), F (África Central-Gabão) (SLATTERY et al., 1999) e G (Camarões) (CHEN

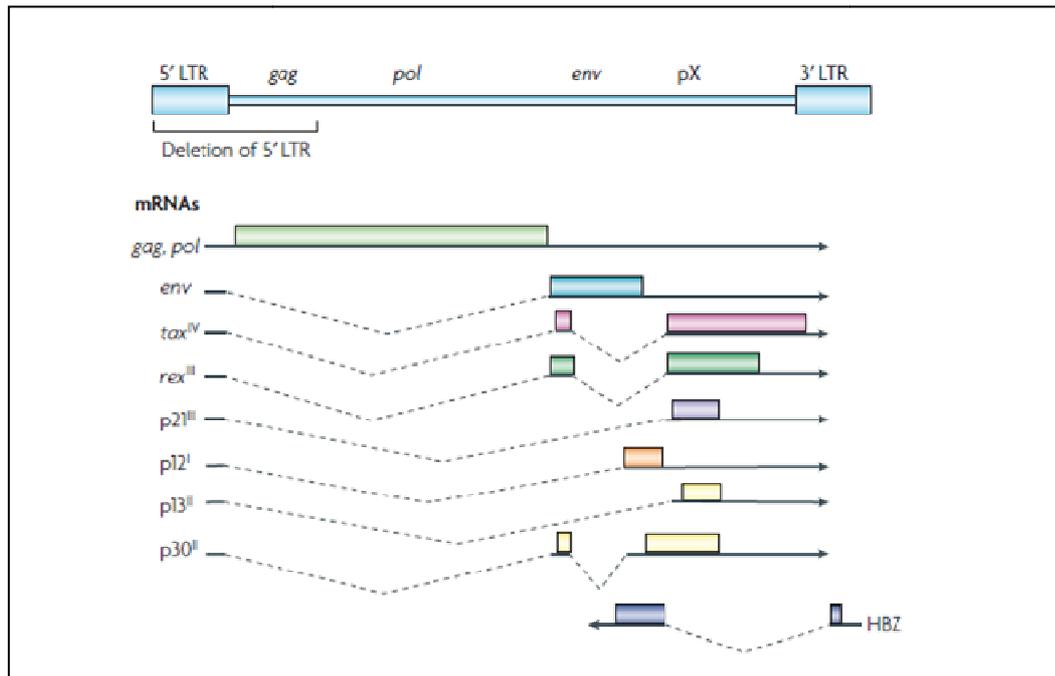
et al., 1995; DE ALMEIDA REGO et al., 2010). O subtipo *Cosmopolitana* ainda pode ser dividido em mais cinco subgrupos que são: *a* (Transcontinental), *b* (Japonês), *c* (África Oeste), *d* (África Norte), *e* (Afro Peruano). Enquanto HTLV-II mostra quatro subtipos, A (Europa, América do Norte e Central), B (Ásia, Europa, América do Norte e Sul, África), C (variante Ila no Brasil) e D (África Central) (SLATTERY et al., 1999).

Os subtipos de HTLV-1 encontrados no Brasil são Aa (Cosmopolitana-transcontinental) (DE ALMEIDA REGO et al., 2010). O HTLV-2 subtipo C se encontra principalmente em populações indígenas no Amazonas (ISHAK et al., 2003) enquanto subtipo B foi encontrado em populações urbanas no Sul do Brasil (RENNER et al., 2006).

2.1.2.4 Aspectos moleculares

O HTLV-1 é um retrovírus delta, que faz parte da família *Retroviridae* do gênero de *HTLV-BLV*. O vírus é envelopado e contém *spikes* de glicoproteínas. O gene *env* codifica a glicoproteína poliprecursora (gp61) cuja forma madura é composta de duas subunidades, a proteína trans-membrana (TM-gp21kDa) e a de superfície (SU-gp46kDa) (YAO et al., 2000; GHEZ et al., 2010). Enquanto o gene *env* do HTLV2 codifica 484 aminoácidos resultando em uma glicoproteína glicosilada de 67kDa que após sua clivagem gera uma gp52 e gp21 (SODROSKI et al., 1984). O centro é um nucleocapsídeo com um genoma constituído de duas fitas simples de RNA de nove mil bases (9kb) divididos nas regiões: LTR, *gag*, *pol*, *env* e pX. As sequências *gag*, *pol* e *env* representam genes que codificam as proteínas estruturais e enzimas virais comuns em todos os retrovírus. A proteína *gag* é clivada após tradução em proteínas matriz (MA-19kDa), capsídeo (CA-24kDa) e nucleocapsídeo (NC-15kDa). As enzimas são RT-transcriptase reversa, IN-integrase, PR-protease, tRNA^{pro}. Sobretudo, existe a região pX que codifica as proteínas reguladoras *tax* (40kDa), *rex* (27kDa), p21, p12, p13, p30. Uma característica do HTLV-1 é a proteína HTLV-1-binding bZIP factor (HBZ, 31kDa), codificada na fita complementar do provírus. Os longos terminais de repetição (LTR), que têm sequências idênticas, servem como promotores para o vírus e a regulação da transcrição dos RNA virais (MATSUOKA et al., 2007). A primeira fita de RNA transcrita representa uma fita completa da sequência e é chamado RNA primário ou *unspliced*.

Figura 7- Organização genômica do HTLV1



Fonte: Matsuoka et al. (2007)

Nota: O genoma do HTLV apresenta diversas ORFs sobrepostas, as quais codificam as proteínas *env*, *gag* e *pol*, além das proteínas regulatórias Tax, Rex, HBZ e proteínas acessórias menores. O DNA proviral com os LTRs e os transcritos (mRNA) não processados e processados pelo mecanismo de *splicing alternativo* são mostrados na figura. As linhas pontilhadas representam os íntrons, enquanto as linhas contínuas, os éxons.

Este é submetido a um processamento alternativo entre os três éxons e leva ao um RNA *single spliced* ou *double spliced*. Assim é criada uma variedade de mRNA. Adicionalmente é feito um mRNA codificado na fita negativa do provírus (DNA viral integrado) induzido pela ação do promotor 3'LTR (Figura 7) (MATSUOKA et al., 2007).

Geneticamente, a homologia entre HTLV-1 e HTLV2 é de 60% (SHIMOTOHNO et al., 1985). A região N-terminal do glicoproteína mostra cerca de 65% homologia enquanto a região C-terminal ~85% (SODROSKI et al., 1984). As divergências das sequências no gene *env* e LTR foram usadas para a classificação dos subtipos de HTLV-1 (SLATTERY et al., 1999). Na classificação de subtipos de HTLV-2 também a região do gene *tax* foi usada (LAL et al., 1997). O HTLV-1 e HTLV-2 mostram uma estabilidade da sequência marcante, não obstante variações de 3-8% (CADEONT et al., 2000) e 3-6% (ISHAK et al., 2003) entre os subtipos, respectivamente.

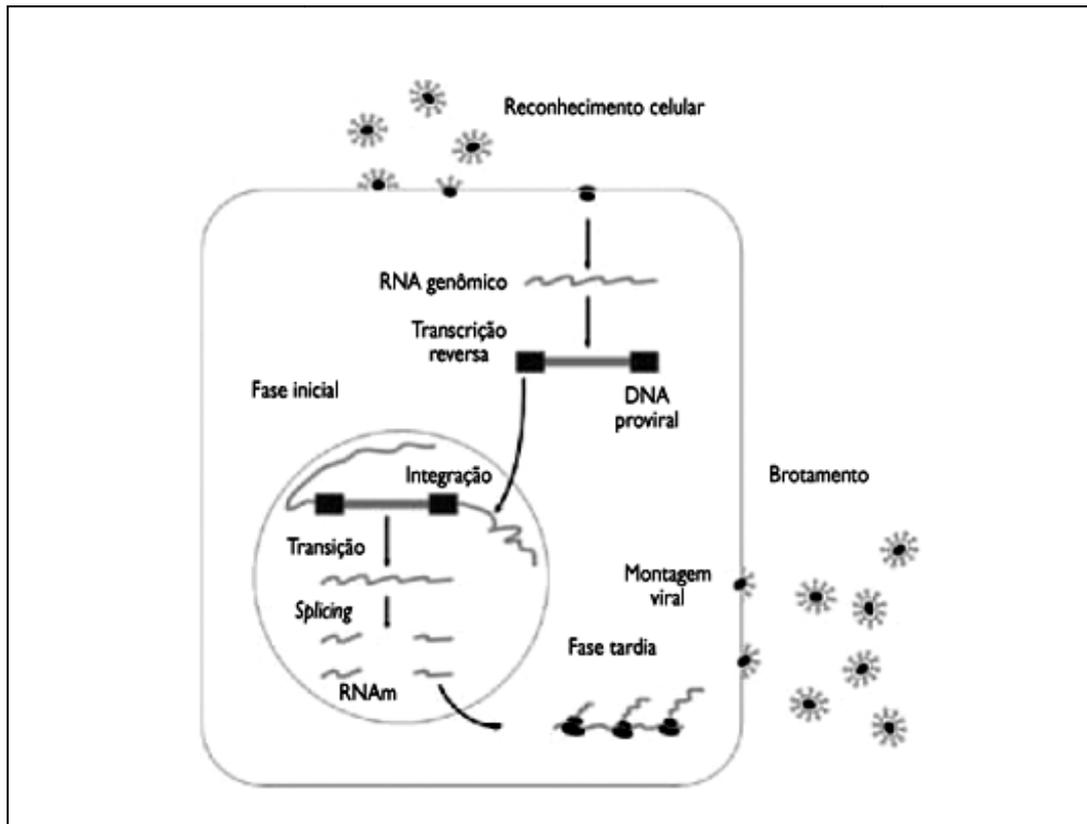
2.1.2.5 Replicação viral

O ciclo da vida de HTLV-1 pode ser dividido em duas fases (Figura 8). A primeira inclui a entrada do vírus, transcrição reversa de RNA viral em DNA, a localização nuclear do DNA proviral e a sua integração randomizada no genoma do hospedeiro. Todos esses processos são realizados pelas proteínas estruturais e enzimáticas localizadas dentro do virion e em ausência de uma expressão gênica viral *nova* e a montagem de novos virions. A segunda fase usa a maquinaria de transcrição gênica e proteica celular para expressão dos genes virais e sua montagem de novas partículas (YAO et al., 2000). Para a entrada do vírus numa nova célula, o contato direto da célula infectada com a célula não infectada é necessário. Assim, se forma um *centro organizador de microtubulos* (MTOC) na junção entre as células e uma sinapse pela qual o *complexo gag* e o RNA genômico viral passam para a célula ainda não-infectada (MATSUOKA et al., 2007).

2.1.2.6 Imunologia

Na infecção com HTLV, se observa uma resposta forte de células T citotóxicas (CD8+) contra células infectadas. A proporção de células CD8+ na circulação que reconhecem um único epítópio de HTLV-1 fica acima de 1% (BANGHAM et al., 2000). O período da janela imunológico varia entre 41 e 65 ou mais dias (GONÇALVEZ et al., 2010). Os primeiros anticorpos específicos que aparecem após a infecção com HTLV-1 são direcionados contra a proteína *gag* (BANGHAM et al., 2000) sendo primeiro detectável o anti-p24, seguida por anti-p19 (MANNS et al., 1991). Esses predominam nos primeiros dois meses. Em seguida podem ser detectados também os anti-*env* e ao final 50% de pessoas infectadas produzem concentrações detectáveis de anticorpos contra a proteína *tax* (BANGHAM et al., 2000). O título de anti-HTLV-1 é proporcional à carga proviral. Todavia, não fica claro se os anticorpos participam na proteção contra ou causam a doença HAM/TSP.

Figura 8- Ciclo viral na célula infectada por HTLV1.



Fonte: Santos et al. (2005)

Nota: O ciclo viral começa com a ligação das glicoproteínas na superfície da partícula viral com o receptor da célula. Após a fusão das membranas e entrada do vírus o RNA genômico é liberado e transcrito reverso em DNA proviral. O DNA é transportado para o núcleo onde ocorre a integração no genoma da célula. Ele serve como molde para transcrição de mRNAs e produção de novos genomas virais. Após a tradução são montadas novas partículas virais que se liberam da célula pelo brotamento.

2.1.3 Vírus da hepatite C (HCV)

2.1.3.1 Histórico

Na década de 1970 se observou que 90% da hepatite pós-transfusional não foi causado por HAV ou HBV, chamada essa *hepatite não-A, não-B* (NANBH). Em 1988, a clonagem do vírus causador das infecções non-A, non-B foi conseguida e nomeado HCV (ALBELDAWI et al., 2010).

2.1.3.2 Transmissão e Doença

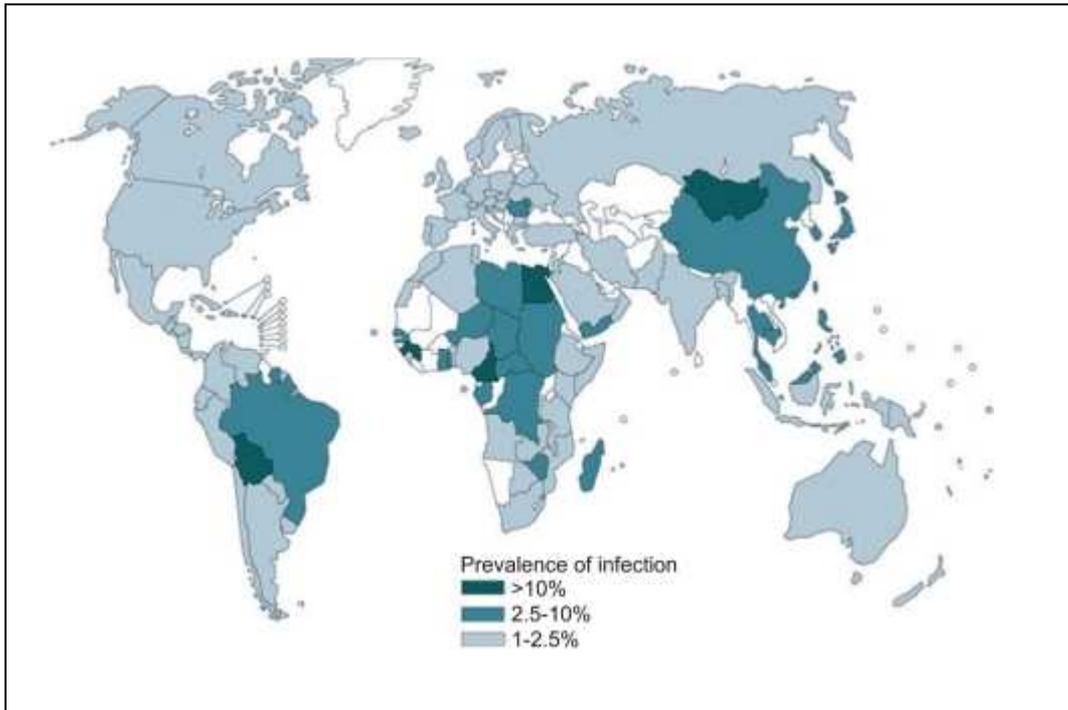
As formas mais importantes para adquirir uma infecção por HCV é compartilhar seringas no uso de drogas intravenosas (40%), hemodiálise crônica (10-33%) e transmissão por transfusões de sangue não testados. A transmissão sexual e vertical é mais rara em HCV do que em HBV (MARTINS et al., 2011; LAVANCHY et al., 2009) e infecções por HIV mostram um maior risco em adquirir o HCV (ALBELDAWI et al., 2010).

Após a infecção, o vírus caminha pelo sangue para o fígado onde se replica e em 25% causa uma hepatite aguda e em 70% uma hepatite crônica. Dos indivíduos infectados agudamente se recuperam 20% e mostram uma *clearance* viral espontânea. Enquanto 25% dos casos crônicos desenvolvem uma cirrose e uma parte desses desenvolvem uma carcinoma hepatocelular (LAVANCHY et al., 2009).

2.1.3.3 Epidemiologia

Existem 130-170 milhões pessoas (2.2% a 3%), cronicamente infectados por HCV mundialmente. Nos países em desenvolvimento são relatados a cada ano até 4.7 milhões de casos novos (Figura 9) (LAVANCHY et al., 2009).

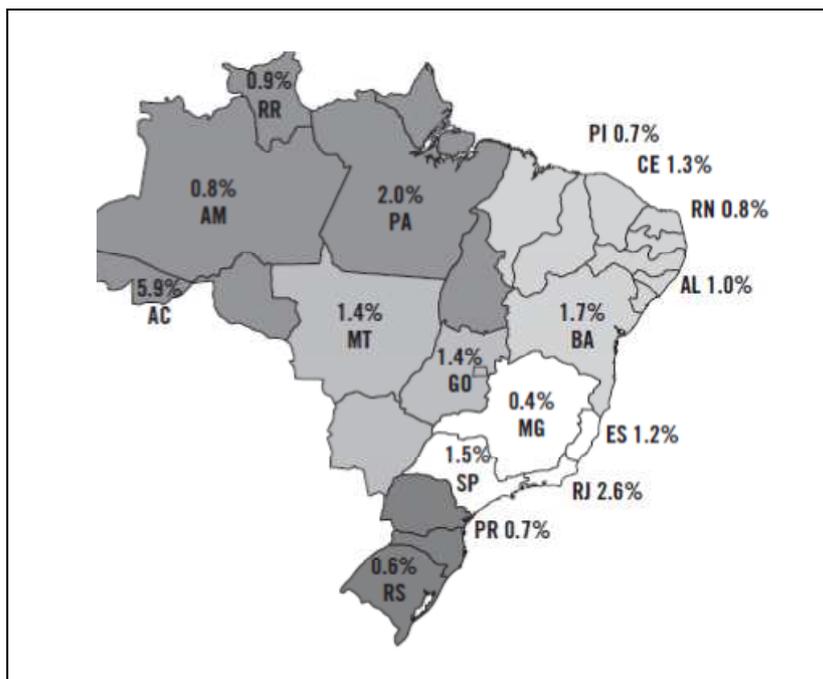
Figura 9- Prevalência global da infecção por HCV.



Fonte: Lavanchy et al. (2009)

Estima-se que no Brasil existe uma prevalência de infecções por HCV, dependendo da área, entre 1-2% (Figura 10) (MARTINS; KERSHENOBICH; 2011).

Figura 10- Prevalência da infecção por HCV no Brasil.



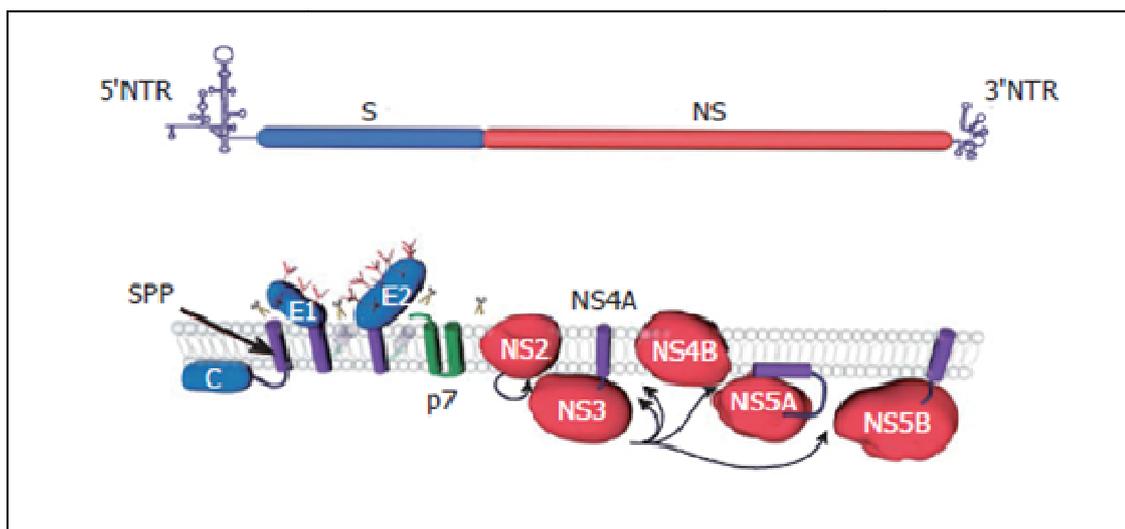
Fonte: Martins et al. (2011)

O HCV consiste de seis genótipos (1-6) e da existência de ainda mais de 100 subtipos (1a-c, 2a-c, 2k, 3a,b,k, 4a, 5a, 6a,b,d,g,h,k...) (SIMMONDS et al., 2005; TANG et al., 2009). O genótipo 1 a 3 é mais comum nos Estados Unidos e Europa, o genótipo 4 e 5 na África e o genótipo 6 na Ásia (SIMMONDS et al., 2005). No Brasil, foi relatada a seguinte distribuição genotípica (G): G1 (64.9%), G2 (4.6%), G3 (30.2%) e G4 (0.2%) (KERSENOBICH et al., 2011). A divergência da sequência entre os genótipos é de 31-33% e 20-25% entre os subtipos (SIMMONDS et al., 2005).

2.1.3.4 Aspectos moleculares

HCV é um vírus envelopado, com tamanho de 50nm, que pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivirus*. O genoma é de RNA fita simples (9.6kb), carga positiva, codificando uma única poliproteína com tamanho de cerca 3000 aminoácidos. O ORF é flanqueado pelas regiões 5' e 3' não traduzidas (UTR), essenciais para a replicação viral como também para a tradução da proteína (TANG, 2009). As proteínas estruturais se encontram na região 5' (N-terminal) e as proteínas não estruturais na região 3' (C-terminal). A poliproteína é processada por proteases celulares e virais para gerar 10 polipeptídios (Figura 11) (FABIANI et al., 2007).

Figura 11- Organização genômica e processamento da poliproteína de HCV.



Fonte: Fabiani et al. (2007)

As proteínas estruturais são a *Core* (21kDa), E1 (31-35kDa), E2 (70kDa) e p7 (7kDa). A proteína *Core* se liga ao RNA viral e forma o nucleocapsídeo do vírus, proteínas E1 e E2 são glicoproteínas que formam o envelope as quais são associadas à ligação ao receptor e entrada do vírus na célula.

Na proteína E2, os primeiros 27 aa formam uma região hipervariável (HVR) que leva a uma seleção maior de anticorpos e variantes de escape imunológicos. O p7 é uma pequena proteína politópica da membrana, encontrada principalmente em membranas de Retículo Endoplasmático e Mitocôndria, havendo atividade de Canal Iônico. As proteínas não estruturais são NS2 (21kDa), NS3 (69kDa), NS4A (6kDa), NS4B (27kDa), NS5A (5-58kDa) e NS5B (68kDa). NS2 é uma proteína integral de membrana a qual é essencial para a formação do complexo da replicação. NS3 é uma proteína multifuncional que interage com várias proteínas celulares e que tem atividade de protease. Esta é fortalecida pela presença do cofator NS4A que ao mesmo tempo protege o NS3 contra a degradação. A proteína NS4B induz alterações de membranas, necessários para a interação entre o lúmen de RE e o citosol, como também para a replicação viral. NS5A é uma fosfoproteína essencial para a replicação do genoma viral, enquanto o NS5B serve como *RNA-dependente RNA* polimerase (FABIANI et al., 2007). A diversidade entre os genótipos de HCV é dividida pela falta de atividade controle (ingl. *Proofreading*) da polimerase (RdRp) (TANG et al., 2009) e se encontra principalmente na região NS5B e Core/E1 (SIMMONDS et al., 2005).

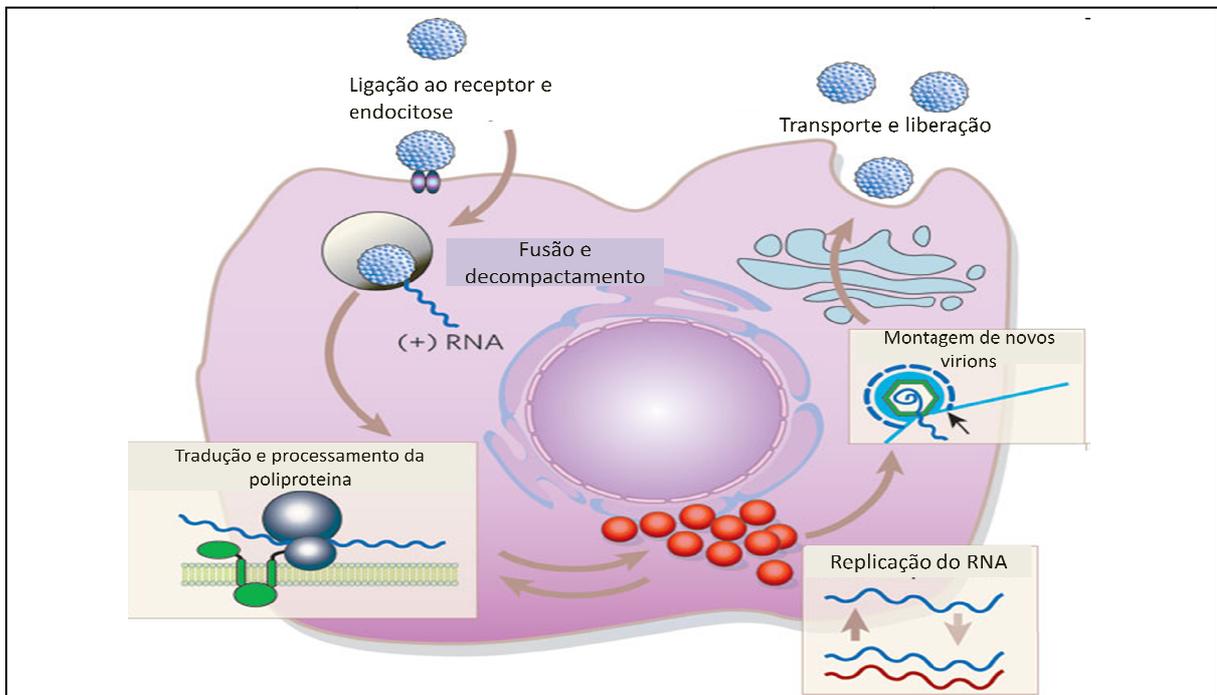
2.1.3.5 Replicação viral

HCV primeiro se liga à superfície da célula. As glicoproteínas do envelope interagem especificamente com receptores celulares que permitem a endocitose da partícula viral, pela membrana plasmática. Dentro da célula, o endossoma é acidificado e assim leva à libertação do nucleocapsídeo no citoplasma.

Em seguida o RNA genômico é liberado e traduzido numa poliproteína. Essa é modificada durante e após a tradução, produzindo proteínas virais maduras que levam à montagem de novos virions. Ao mesmo tempo, as proteínas não estruturais catalisam a transcrição de RNA intermediária (fita-negativa), de quais moléculas de RNA progenitores (fita positiva) são gerados e incluídos nos virions. Os virions progenitores entram no lúmen do RE e saem da célula do hospedeiro pela *vía*

segregatória (ingl. *secretory pathway*), completando assim um ciclo de vida viral (figura 12) (TANG et al., 2009).

Figura 12- Ciclo viral de HCV.



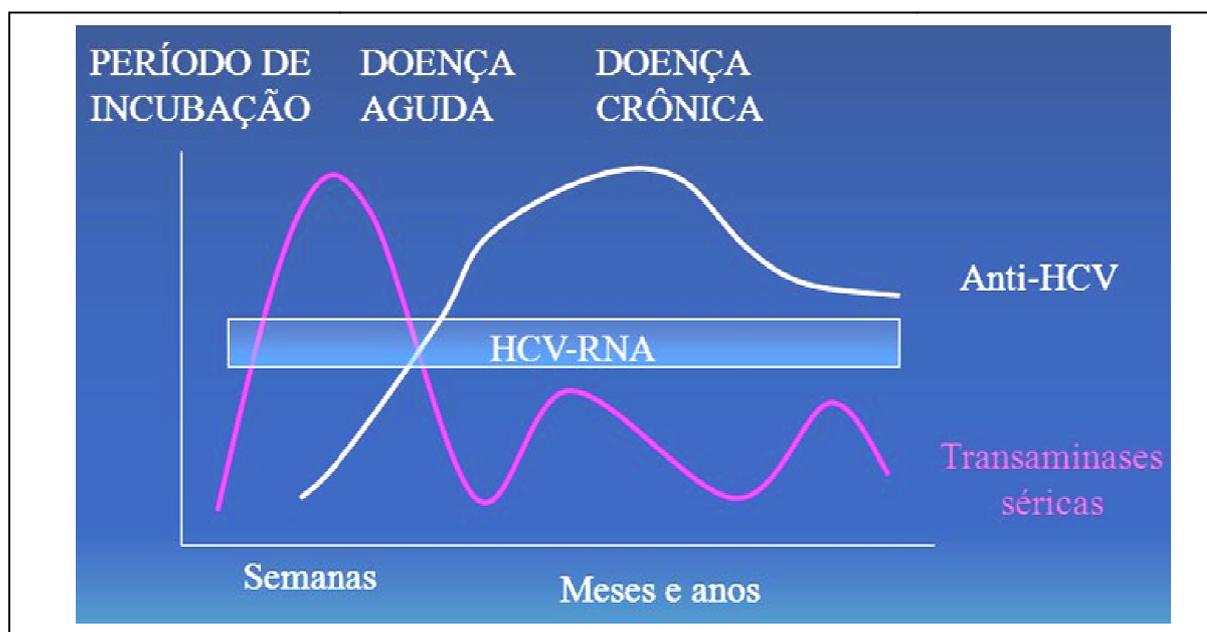
Fonte: Fabiani et al. (2007)

Nota: Após ligação do vírus ao receptor celular, o HCV entra na célula por endocitose. O genoma viral é liberado por acidificação do endossomo e traduzido numa poliproteína no citoplasma. E é usado para replicação do RNA genômico. A poliproteína é clivada em proteínas estruturais e não estruturais. Novas partículas são montadas e em seguida segregadas pela *via secretória* para o exterior da célula.

2.1.3.6 Imunologia

HCV RNA pode ser detectado em títulos altos no soro uma semana após a infecção e declina aproximadamente 8-12 semana depois (REHERMANN et al., 2005). Enquanto a resposta humoral ocorre somente cerca de dois meses depois. Na fase aguda da infecção por HCV, que é marcada por níveis mais altos de transaminase sérica (ALT), o HCV RNA declina, anticorpos específicos podem ou não aparecer e o início de uma resposta de célula T HCV-específico no fígado é observado. Após desaparecimento de HCV, também os títulos de anticorpos declinam até níveis indetectáveis (TANG et al., 2009).

Figura 13- Aparecimento de RNA viral e anticorpos no soro durante a infecção com HCV.



Fonte: Rehemann et al. (2005)

A fase crônica é caracterizada por níveis estáveis de HCV RNA, em 2-3 log mais baixos do que na fase aguda. Títulos de anticorpos HCV-específicos (inclusive anticorpos neutralizantes contra múltiplas cepas) aumentam e mostram os seus níveis mais altos (Figura 13).

A presença de anticorpos, como no caso de HIV, não pode indicar certamente o progresso da doença. Sobretudo, títulos de anticorpos específicos ao HCV geralmente declinam e podem desaparecer completamente 10-20 anos após a recuperação (REHERMANN et al., 2005). O perfil de soroconversão inclui anticorpos contra oito proteínas virais, a Core, E1, E2, NS3, NS4, NS5 (LAVILETTE et al., 2005). Sendo os anticorpos contra Core (97%), NS4B (86%), NS3 (68%) e NS5A (53%) os mais abundantes encontrados em soro de pacientes infectados por HCV genótipo 1-4 e positivo por HCV RNA (SILLANPAAE et al., 2009). Sendo as imunoglobulinas principalmente restritas ao isotipo IgG1 (CHEN et al., 1999). Anticorpos específicos contra as glicoproteínas E1 e E2 tem efeito neutralizante (REHERMANN et al., 2005).

2.2 Produção de proteínas recombinantes

2.2.1 Proteínas

Proteínas são sintetizadas por todas as formas vivas como parte do seu metabolismo natural. A produção de proteínas recombinantes tem aplicação em áreas diferentes, como fins terapêuticos, desenvolvimento de vacinas, estudos básicos ou desenvolvimento de teste diagnóstico. Na década 1970, enzimas produzidas foram ainda derivadas de plantas ou animais, mostrando desvantagens como a limitação na produção, custos altos e reações adversas para os pacientes. Com o aparecimento da tecnologia recombinante de DNA e engenharia protéica, enzimas e outras proteínas podem ser obtidas com mais facilidade e superior qualidade (ARNOLD et al., 2009).

Proteínas são moléculas com grande variedade em tamanho e função. Os aminoácidos são os componentes que, conectados um ao outro, determinam uma proteína ou polipeptídeo. Existem 20 aminoácidos, cada uma codificada e representada pela composição de três bases numa sequência de DNA. Todavia, uma combinação de bases diferentes pode ser usada para codificar um mesmo aminoácido (Figura 14) (LEWIS et al., 2006).

Figura 14- Códigos genéticos para aminoácidos

		2.ª BASE				
		U	C	A	G	
1.ª BASE	U	UUU } Fenilalanina (Fen) UUC } UUA } Leucina (Leu) UUG }	UCU } Serina (Ser) UCC } UCA } UCG }	UAU } Tirosina (Tir) UAC } UAA } Codão de finalização UAG } Codão de finalização	UGU } Cisteína (Cis) UGC } UGA } Codão de finalização UGG } Triptofano (Trp)	3.ª BASE U C A G
	C	CUU } Leucina (Leu) CUC } CUA } CUG }	CCU } Prolina (Pro) CCC } CCA } CCG }	CAU } Histidina (His) CAC } CAA } Glutamina (Glu) CAG }	CGU } Arginina (Arg) CGC } CGA } CGG }	
	A	AUU } Isoleucina (Ile) AUC } AUA } AUG } Metionina (Met) codão de iniciação	ACU } Treonina (Tre) ACC } ACA } ACG }	AAU } Asparagina (Asn) AAC } AAA } Lisina (Lis) AAG }	AGU } Serina (Ser) AGC } AGA } Arginina (Arg) AGG }	
	G	GUU } Valina (Val) GUC } GUA } GUG }	GCU } Alanina (Ala) GCC } GCA } GCG }	GAU } Ácido aspártico (Asp) GAC } GAA } Ácido glutâmico (Glu) GAG }	GGU } Glicina (Gli) GGC } GGA } GGG }	

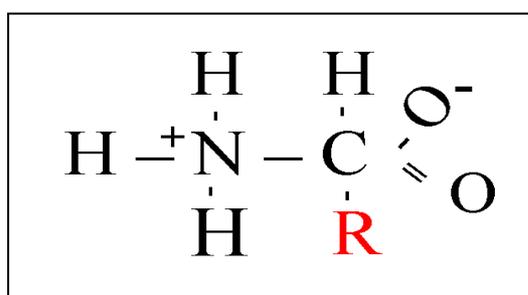
Fonte: Branden et al. (1991)

Nota: O quadro mostra as possíveis combinações de bases (U = Uracila, C= Citosina, A= Adenina, G= Guanina) e sua localização num códon (primeira, segunda ou terceira base) os quais são usados como código genético para cada aminoácido.

Cada aminoácido tem uma estrutura básica, composto de um carbono no centro e uma cadeia variável, cadeia lateral (R), (Figura 15) que determina a propriedade (por exemplo, tamanho e polaridade). Essa propriedade influencia a interação entre os mesmos e a formação da estrutura tridimensional da proteína. Aminoácidos podem ser classificados também devido a sua cadeia variável em:

- a) *carga positiva* (aminoácidos hidrofílicos);
- b) *carga negativa* (aminoácidos hidrofílicos);
- c) *sem carga* (hidrofóbicos).

Figura 15- Estrutura básica de um Aminoácido



Fonte: Branden et al. (1991)

Após transcrição do DNA em mRNA, ele é utilizado nos ribossomos como matriz para leitura e montagem da cadeia peptídica. O ribossomo desliza ao longo da fita de mRNA e os diferentes tRNA isoceptores que fornecem os aa, reconhecem especificamente três bases, aliais um códon, entregando assim o aa apropriado. Conectando vários aminoácidos, é criado um polipeptídeo que recebe suas modificações (p.e. a formação de pontes dissulfeto ou a glicolisação) no retículo endoplasmático e aparelho de Golgi. As proteínas diferentes se distinguem na sua divergência da sequência de aa (LEWIS et al., 2006). Proteínas de membrana, por exemplo, se encontram integradas numa bicamada lipídica e por isto tem mais aminoácidos com resíduos hidrofóbicos (SCHLICK et al., 2010).

Existem quatro níveis para descrever a estrutura de proteínas. A estrutura primária a que é a sequência de aminoácidos, a estrutura secundária a qual define o padrão da estrutura de α -hélices, β -sheets ou combinação de motivos, a estrutura terciária a qual mostra a ordem tridimensional de todos os átomos na cadeia de um polipeptídeo e a estrutura quaternária, usado para proteínas grandes com subunidades diferentes, para determinar a interação tridimensional dos mesmos

(SCHLICK et al., 2010). A função biológica da proteína depende muitas vezes da sua conformação estrutural. Cada proteína existe numa única forma nativa, a qual se encontra sob condições in vivo, incluindo meio aquático com pH neutro e temperatura de 20-40°C. Desta forma, proteínas podem ser denaturadas, perdendo o seu dobramento nativo sob condições de temperatura alta, pH ácido ou básico ou solventes não aquosos. Todavia, o redobramento das proteínas no laboratório é possível (LEACH et al., 2001).

2.2.2 Sistemas de Expressão

O primeiro passo para gerar uma proteína recombinante é a obtenção da sequência gênica (DNA) de uma determinada proteína. Após a subclonagem do DNA em vetores de expressão e a introdução do mesmo num sistema de expressão, a proteína desejada é traduzida. Qualidade, funcionalidade, rapidez e eficiência na produção, são consideradas os fatores mais importantes em escolher um sistema de expressão apropriado. Como sistemas de expressão são usados sistemas procarióticos (bactérias) e eucarióticos (levedura, fungi, células de insetos, células mamíferos, animais transgênicas, plantas transgênicas). Todavia, a expressão nesses sistemas pode ser ainda uma tarefa muito árdua (ARNOLD et al., 2009).

A primeira causa de desregulamento na produção de proteínas heterólogas é o padrão de utilização dos códons (ingl. *biased codon usage*). Neste existe uma discordância alta no uso do tipo do códon para reconhecimento dos aa entre a espécie do gene e do hospedeiro usado como sistema de expressão. Os códons sinônimos em geral são utilizados não-randômicos. Aliás, existe uma preferência no uso de códons o qual corresponde diretamente às concentrações intracelulares de moléculas de tRNA isoacceptores específicas (EVANS et al., 2011). Varias estratégias são usadas para minimizar especialmente o *codon usage bias*. Uma, extensivamente usada, é a estratégia da otimização dos códons. Através do uso de algoritmos genéticos (ferramenta de computação) é possível conceber sequências de DNA sintéticas otimizadas. Essas são compostas apenas pelos códons preferenciais, utilizados para expressão das proteínas endógenas no organismo da expressão (por exemplo, bactéria ou levedura). Existem programas computacionais como o *Leto Entelechon* que são usados para fazer estas modificações na sequência de DNA. Outra estratégia é ajustar as concentrações das moléculas

específicas de tRNA isoacceptor intracelular. Para isto, se usa plasmídeos que codificam especificamente os tRNAs raros no organismo de expressão. As outras causas que podem interferir na produção de proteínas recombinantes são: a toxicidade de produtos gênicos, a solubilidade das proteínas, a estrutura secundária e a estabilidade de RNA. Os algoritmos genéticos também são capazes de detectar e evitar a expressão dos elementos regulatórios negativos como, estruturas secundárias do mRNA, regiões ricas em GC e elementos repetitivos (EVANS et al., 2011).

2.2.2.1 Sistema procarioto (*E. coli*)

A bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) é o sistema mais comum utilizado na produção de proteínas recombinantes. Um plasmídeo que contém a sequência da proteína desejada é transformado na bactéria e a expressão induzida.

Os plasmídeos contém o elemento *origem de replicação* (*ori*), um marcador antibiótico de resistência, um promotor, uma *região de iniciação de tradução* (TIR) e terminadores para a transcrição e tradução. A replicação dos plasmídeos na bactéria é estável devido à pressão de seleção com um antibiótico como, por exemplo, Ampicillina, Kanamicina ou Tetraciclina.

Extremamente importante para a expressão de proteínas na bactéria é a atividade basal baixa do promotor, para evitar uma produção constante das proteínas heterólogas. Esta pode induzir um estresse celular e assim levar à perda do plasmídeo. A indução do promotor pode ocorrer de modo térmico ou pelo uso de químicos. O mais usado indutor é a molécula isopropyl-beta-d-thiogalactopyranoside (IPTG). Para a iniciação da tradução na TIR, o mRNA necessita um *ribosomal binding site* (RBS) e um *códon da iniciação da tradução* qual é o AUG. O STOP códon (preferencialmente UAA usado em *E. coli*) localizado 3' terminal do gene, media o término da tradução. A eficiência do término também pode ser aumentada pela inserção de um STOP códon consecutivo ou de um STOP códon prolongado (UAAU) (SOERENSEN et al., 2005).

Para a produção de proteínas recombinantes em bactérias, também a escolha da cepa é importante. Ela deve ser deficiente de proteases agressivas, naturalmente presentes em procariotas. A cepa *E. coli* BL21 é a cepa mais usada no sistema de expressão procariota, porque cresce em *meio mínimo* e é não-patogênica

(SOERENSEN et al., 2005). Recentemente também apareceram no mercado *E. coli* geneticamente modificada, entre eles os chamados *E. coli Origami* e *Rosetta*. As modificações feitas nas células *Origami* são mutações dos genes de *thioredoxin reductase* e *glutathione reductase* que permitem a formação de pontos de dissulfídeos no citoplasma (MAKINO; SKRETAS; GEORGIU, 2011). Uma função normalmente restrita a células eucariotas. As células *Rosetta* contém sete tRNAs de códon, em geral encontrados raramente em bactéria (NOVAGEN, 2004). Assim, uma otimização dos códon, na sequência de DNA, por algoritmo genético não é necessário. Sobretudo, foram reportados *E. coli* que permitem a produção de proteínas com N-glicosilação e acetilização (MAKINO; SKRETAS; GEORGIU, 2011).

Para facilitar a detecção e purificação das proteínas recombinantes, uma variedade de parceiros (*tags*) foi concebida para gerar proteínas de fusão. Em alguns casos, o uso de *tags* também aumenta a solubilidade e até apoia o dobramento próprio da proteína. A curta sequência de DNA do *tag* faz parte do plasmídeo e se localiza N- ou C-terminal das sequências subclonadas para expressão. Ele é usado, por exemplo, para estratégias de purificação por afinidade, como o *polihistidina* (HIS-tag), *glutathione-S-transferase* (GST-tag) ou para a visualização por microscopia de fluorescência, como o *green fluorescent protein* (GFP-tag). A separação do *tag* da proteína de fusão recombinante pode ser necessária devido à possibilidade em interferir com a estrutura ou a atividade biológica da proteína parceira. Esta pode ser alcançada em alguns casos, dependendo da sequência, por clivagem com endoproteases (Factor Xa, proteases virais) ou Exoproteases (carboxipeptidase, aminopeptidase) (SOERENSEN et al., 2005; WAUGH et al., 2011).

As vantagens gerais no uso das procariontes são um crescimento e expressão rápida, facilidade no cultivo, rendimento alto e baixos custos. Todavia, o uso de *E. coli* também mostra algumas dificuldades. Por exemplo, o crescimento da célula em densidade alta pode levar à toxicidade devido à formação de acetato. Essa formação pode ser regulada pelo controle de níveis de oxigênio durante o crescimento (ARNOLD et al., 2009). Também a atividade biológica de proteínas terapêuticas pode ser influenciada especialmente em bactéria, pela formação incorreta de pontes de dissulfídeo (ZHANG et al., 2011). Além disso, foi descoberto recentemente, que em cDNA de Flavivírus, usados para a expressão em bactérias, existem motivos

ECP (ingl. *E. coli cryptical promoters*) que a própria *E. coli* reconhece como promotor. Em caso ativo, essas sequências levam a uma toxicidade intrínseca e expressão baixa das proteínas virais (PU et al., 2011).

Um dos maiores problemas que pode ocorrer durante a expressão em *E. coli* é a agregação da proteína recombinante em corpos de inclusão (ingl. *inclusion bodies*), deixando a proteína insolúvel e inativa. Necessitando primeiro a extração dos corpos de inclusão para posterior purificação da proteína e um protocolo adequado para o redobramento da proteína na sua forma nativa (ARNOLD et al., 2009). Todavia, em alguns casos, a insolubilidade da proteína também é considerada vantajosa, mostrando pureza da proteína desejada na fração e um nível de proteção maior contra proteases bacterianas (VALLEJO; RINAS, 2004). Para a extração dos corpos de inclusão, a quebra mecânica da célula bacteriana, por exemplo, pela sonicação é usado. Esta ocorre em conjunto com uso de detergentes, para tirar contaminações por proteínas das membranas celulares. Após, para a solubilização e purificação da proteína recombinante, é necessário o uso de altas concentrações de reagentes caotrópicos (ingl. *chaotropic agents*), como por exemplo, a úrea ou o guanidinium hidrocloreto. Também o uso de soluções com pH extremo foi reportado. Nesse processo, também o uso de *reagentes thiol*, como por exemplo, DTT ou β -mercaptoetanol, são necessários para reduzir a formação de pontes dissulfídicas anormais, ocorrendo por oxidação durante o processo da ruptura celular (VALLEJO; RINAS, 2004).

Em seguida, o redobramento (interações intramoleculares) correto tem que ser alcançado, usando métodos que diminuem o dobramento incorreto (ingl. *missfolding*) ou a agregação (interações intermoleculares) da proteína. O melhor método depende de cada proteína e tem que ser avaliado empiricamente. Para este fim foram reportadas técnicas como a diluição direta, diálise, métodos cromatográficos e métodos por assistência de um matriz. Propriedades físicas e químicas, como por exemplo, alteração de temperatura e uso de *chaperonas*, podem ajudar neste processo (VALLEJO; RINAS, 2004). Em 2006 foi lançado um banco de dados chamado REFOLD DATABANK onde são listadas 200 proteínas com parâmetros de interesse para purificação e redobramento das mesmas (CHOW et al., 2006).

Para melhorar o sistema de expressão *E. coli* foram feitas várias modificações ao longo do tempo, como o uso de promotores diferentes nos plasmídeos para

regular a quantidade da síntese de proteínas, o uso de cepas de *E. coli* diferentes como já mencionado acima (MAKINO et al., 2011), a co-expressão de *chaperonas* e *foldases*, baixar a temperatura durante o crescimento, a secreção de proteínas no meio de cultura, a troca do meio de cultura durante o tempo de crescimento, a expressão de proteínas truncadas, a fusão da proteína com peptídeo *leader*, a denaturação *in vitro*, o redobramento da proteína (ARNOLD et al., 2009) e a inserção de mutações silenciosas (PU et al., 2011).

Não obstante, a maior diferença entre proteínas obtidas por um sistema procariótico e eucariótico é a ausência de modificações pós-tradução, como a glicosilação. A glicosilação influencia a solubilidade, o dobramento, a susceptibilidade à proteólise, a estabilidade térmica, a ligação aos receptores e as atividades *in vivo* da proteína (CELIK et al., 2011). Para fins imunodiagnósticos a produção de proteínas glicosiladas pode ser necessária, devido ao aumento da imunogenicidade de um antígeno e assim a interação com seu próprio anticorpo. A literatura científica mostra, que várias proteínas virais já foram expressas em sistema procarioto, como por exemplo, gp21HTLV1 (RUSSO-CARBOLANTE et al., 2007), gp125HIV2, gp36HIV2 (MARCELINO et al., 2006) e Core_HCV (BOULANT et al., 2005).

2.2.2.2 Sistema eucarioto (*Levedura K. lactis*)

As leveduras representam organismos eucarióticos de uma única célula. Dessas, existem muitas cepas com características diferentes, usadas para a expressão de proteínas recombinantes. Entre elas se encontram a *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis* e *Hanselua polimorpha* (CELIK et al., 2011).

As vantagens do uso das leveduras como sistema de expressão são a permissão de modificações pós-tradução semelhante à de eucariotas mais altas, como por exemplo, o dobramento correto, a formação de pontes de disulfídeo, a *N*- e *O*-linked glicosilação e o processamento proteolítico de sequências de sinais. As proteínas recombinantes glicosiladas em levedura podem ainda possuir um padrão de glicosilação não-humana o qual pode afetar a meia vida ou a imunogenicidade (VAN OUYEN et al., 2006). Todavia, com o aumento das informações genéticas dessas eucariotas, também foram geradas cepas as quais produzem uma N-

glicolização humana (CELIK et al., 2011). Sobretudo, parte das vantagens faz uma produção estável de clones recombinantes, rendimento de proteínas relativamente alto e custos mais baixo do que o uso de sistemas eucariotas multicelulares (CELIK et al., 2011; DEMAIN et al., 2009;).

A *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*) é um *non-saccharomyces budding Yeast* aeróbico que pertence a espécie *phylum ascomycota*. Desde 1950, *K. lactis* é usado como fonte de lactase, uma enzima que degrada o açúcar de leite para a produção de produtos ausente de lactose. *K. lactis* também tornou-se importante na indústria de alimentos devido ao seu estado GRAS (ingl. Generally Recognized As Safe) obtido pela *Food and Drug Administration* (FDA), considerando-a um organismo seguro. Em 1993, a *K. lactis* foi reportada, pela primeira vez, como hospedeiro na expressão de oito proteínas heterólogas. Em 2006 este número aumentou para mais de quarenta. Entre eles se encontram proteínas de origem viral, bacteriana, fungo, plantas e mamíferos, como por exemplo à expressão da glicoproteína E2 de HCV e o antígeno S da Hepatite B (HBsAg) (VAN OUYEN et al., 2006; CELIK et al., 2011). Todavia, existem mais de 50 cepas de *K. lactis* as quais foram utilizadas para avaliar a capacidade de secreção da albumina sérica humana recombinante, mostrando grande variabilidade no rendimento da proteína. A cepa selvagem GG799 mostrou uma síntese excelente e capacidade de secreção (VAN OUYEN et al., 2006). Como na bactéria, um plasmídeo é usado para introduzir a sequência desejada na célula. Os vetores usados em *K. lactis* podem se replicar extracromosomal (*vetor episomal*) ou se integram no genoma (*vetor integrativo*). Os vetores episomais mostram um número de cópias maior no hospedeiro após a transfecção, mas podem ficar instáveis na célula no caso da ausência de pressão de seleção. Ao contrário, os vetores integrativos possuem sequências homólogas com regiões do cromossomo da levedura que direcionam a inserção do vetor no genoma por recombinação homóloga (ingl. homologous site directed recombination mechanism). Um método comum para o uso de vetores integrativos é a inserção no genoma no locus LAC4 e o uso desse forte promotor para a expressão (VAN OUYEN et al., 2006). A maior desvantagem de vetores integrativos é o número de cópias menores. Todavia, uma integração múltipla ou *tandem* do vetor integrativo pode ocorrer no mesmo sítio da integração na levedura (READ et al., 2007). Além do promotor LAC4, também os promotores da *S. cerevisiae*, o phosphoglycerate kinase (*PGK*) e o acid phosphatase

(*PHO5*) são usados em *K. lactis*. O promotor LAC4 é ativado pela presença de galactose ou lactose e os outros dois por fosfato no meio de cultura.

Para a seleção de *K. lactis* é usado o antibiótico Geneticina (G418) ou outros químicos como acetamida, bleomicina (BLE) e aureobasidin A (AUR1). O acetamida, degradado pela enzima *amdS*, leva à produção de amônio e assim fornece uma fonte de nitrogênio, necessário para seu crescimento às leveduras (VAN OUYEN et al., 2006). Todavia se mostrou que, usando o promotor LAC4 em conjunto com o G418 somente 2-5% das colônias tem inseridas em tandem 2-10 vetores no genoma. Usando o acetamida, como método de seleção, aumentou a integração em >90% das colônias, mostrando 2-6 cópias em tandem (READ et al., 2007). O aumento de colônias com integrações múltiplas usando o acetamida é provavelmente devido à vantagem de crescimento dessas células (VAN OUYEN et al., 2006).

As técnicas usadas para a transformação de *K. lactis* incluem o transfer de DNA mediado por polyethylene Glycol (PEG), por acetato de lítio e a eletroporação. As vantagens no uso de *K. lactis* são a sua manipulação genética fácil, o uso de vetores de expressão integrativos e episomais, o crescimento em meio standard de leveduras e a secreção de proteínas com peso molecular alto. Além disso, não necessita o uso de equipamento de fermentação segura contra explosão, para a produção em larga escala (CELIK et al., 2011).

A literatura científica mostra poucas publicações de proteínas virais expressas em *K. lactis*. Todavia, como já mencionado acima, a expressão da glicoproteína E2 de HCV e o antígeno S da Hepatite B (HBsAg) foram reportadas (VAN OUYEN, 2006; CELIK et al., 2011). Outras leveduras como a *S. cerevisiae* é mais usada para estudos de mecanismos virais (WICKNER et al., 2013), foram reportados, por exemplo, a expressão da proteína precursora HTLV1 (KUGA et al., 1986) e domínios do envelope de HIV (BARR et al., 1987) em artigos mais antigos. Entre outros, se encontram publicações reportando a expressão de proteínas virais em *Pichia pastoris*, como por exemplo, a glicoproteína do envelope do HIV (ZHAO et al., 2007) ou formas truncadas das proteínas de envelope E1 e E2 de HCV (CAI et al., 2010).

2.2.3 Seleção de antígenos

2.2.3.1 Definição antígeno

A resposta imune humoral é baseada na habilidade de anticorpos reconhecerem e se ligarem aos antígenos, apresentados por organismos invasivos como bactéria ou vírus. Este antígeno é chamado *antígeno de célula B* e é definido como uma substância que pode interagir com um anticorpo específico secretado no espaço extracelular ou com o receptor na superfície da célula B (REIMER et al., 2009). Também existem *antígenos de célula T* que são fragmentos de um antígeno que foi degradado dentro da célula infectada e apresentados através do *complexo major de histocompatibilidade* (MHC) na superfície de uma célula corporal. O receptor da célula T reconhece tal antígeno e destrói a célula infectada (JANEWAY; TRAVERS; 2005).

Antígenos mais freqüentemente usados na imunologia experimental são proteínas. Todavia, para induzir a produção de anticorpos, não é necessário apresentar a proteína completa, mas somente a fração imunogênica (REIMER, 2009). Outros antígenos potenciais, por exemplo, são carboidratos, ácidos nucléicos, *haptenos* que muitas vezes só induzem uma resposta imune se forem ligados à uma proteína carregadora, um imunógeno (JANEWAY; TRAVERS; 2005)

O *determinante antigênico* de uma molécula antigênica ao qual se liga um certo anticorpo é conhecido como *epítopo*. Diferentes anticorpos podem se ligar aos distintos epítomos no mesmo antígeno (JANEWAY; TRAVERS; 2005)

Sobretudo, se distingue entre epítomos lineares/contínuos (9-12 mers) e epítomos conformacionais/descontínuos (15-22 mers). Os epítomos lineares são segmentos de uma corrente de polipeptídios que podem ser reconhecidos pelo anticorpo. Ao contrário, a formação de epítomos conformacionais depende da estrutura tridimensional da proteína. Segmentos diferentes precisam se juntar através do dobramento correto da proteína, gerando assim este tipo de epítopo. Em geral, mais do que 90% de epítomos de célula B são descontínuos (JANEWAY; TRAVERS; 2005).

..

2.2.3.2 Métodos e Ferramentas

Para criar antígenos imunogênicos que podem ser usados em teste diagnóstico é necessário identificar as regiões protéicas ou sequências gênicas que em seguida vão ser usadas para expressão no sistema de expressão escolhido. Não existe um procedimento padrão para gerar antígenos, mas existem métodos diferentes e ferramentas que podem ajudar na escolha da sequência apropriada.

Um método, especialmente encontrado em artigos científicos antigos, faz uso de sítios de enzimas de restrição presente ao longo de sequências de DNA. São usadas enzimas de restrição que cortam mais próximo a um fragmento de DNA viral que contém o gene desejado. Esse fragmento em seguida é usado para subclonagem em vetores de expressão (VLASUK et al., 1989).

Uma outra estratégia é a identificação de regiões hidrofílicas. Existem proteínas que apesar de serem expostas no exterior da célula, também são encaixadas na membrana celular ou viral, como por exemplo, a proteína viral gp41 do envelope de HIV. Essas proteínas de membrana são compostas de regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, a última também chamada *região trans-membrana*. Assim se define que os domínios hidrofílicos são potencialmente mais antigênicos do que os hidrofóbicos, devido à possibilidade de causar uma resposta imune e o reconhecimento pelos anticorpos (VALERIE et al., 1991).

As diferentes regiões na proteína são feitas, devido à estrutura das membranas celulares que são compostas por moléculas lipídicas. Estas têm uma cabeça hidrofílica e uma cauda hidrofóbica. As moléculas lipídicas se localizam opostas uma a outra, formando dessa forma a bicamada lipídica. Assim, duas superfícies hidrofílicas (uma para o exterior e outra para o interior da célula) e uma superfície hidrofóbica (localizada no meio) são formadas (BRANDEN; TOOZE; 1991).

Tirar regiões hidrofóbicas da sequência usada para expressão pode mostrar outra vantagem, como foi reportado para a expressão de glicoproteínas do envelope de HIV e HTLV. Mostrou-se, a redução da toxicidade das proteínas expressas em sistema procariota e o aumento da expressão, de níveis não detectáveis até o acúmulo da proteína recombinante de 10-15% da proteína celular total (SISK et al., 1992).

Um método para identificar regiões hidrofílicas e trans-membranas é o *Hydroplicity plot*. Esse foi designado para mostrar a distribuição de resíduos polares e apolares de AA ao longo duma sequência protéica (Figura 16).

Figura 16- Aminoácidos e seu *hydropathy score*.

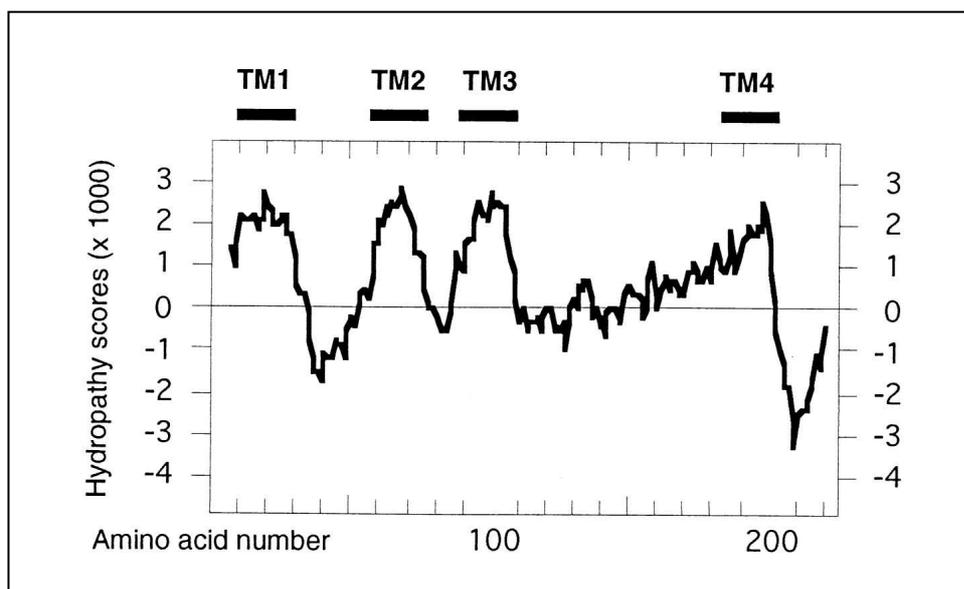
Aminoácido	R	K	N	D	E	Q	H	P	Y	W	S	T	G	A	M	C	F	L	V	I
Escala de hidrofobicidade Kyte Doolittle	5.5	3.9	3.5	3.5	3.5	3.5	2.2	1.6	1.3	0.9	0.8	0.7	0.4	1.8	1.9	2.5	2.8	2.8	4.2	4.5
categoria valor	1	2	3	3	3	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
significado físico-químico																				

Fonte: Branden et al. (1991)

Nota: Apresentados são o *score de hidrofobicidade* de um aminoácido utilizando o método Kyte/Doolittle. Valores negativos indicam aminoácidos hidrofílicos, quando maior o número negativo, maior é a hidrofiliçidade. Valores positivos mostram aminoácidos hidrofóbicos, quando maior o número positivo, maior é a hidrofobicidade; os aminoácidos são apresentados na primeira linha, utilizando o seu código de uma única letra;

Todos os aa recebem um *hidropathy score*, representando um score de 4.6 (mais alta hidrofobicidade) até -4.6 (mais alta hidrofiliçidade). Uma ferramenta computacional comum, entre outros, é o *Kyte Doolittle Hydrophathy Plot*. Para identificar as regiões é necessário definir um *window size* (*ws*) que define o número de aa examinados em conjunto. Um *ws* de 5-7 ou 9 é bom para identificação de regiões hidrofílicas, enquanto um *ws* de 19-21 identifica domínios da membrana (hidrofóbicos) se apresenta um *score* >1.6. O número do *score* de hidrofobicidade, calculado pelo programa, é apresentado em forma de curvas em relação aos números dos resíduos de uma proteína, num diagrama (Figura 17) (CLERGEOT et al., 2001).

Figura 17- Exemplo de um Kyte-Doolittle Hydrophathy Plot



Fonte: Clergeot et al. (2001)

Nota: A análise mostra ao longo da sequência protéica, regiões de aminoácidos com alto e baixo (números negativos) score. Neste exemplo, foram identificadas quatro regiões -transmembranas (TM1-4), havendo um score de >1.6 .

Na seleção de antígenos deverá ser considerado que a sensibilidade analítica de um teste diagnóstico também depende do genótipo ou subtipo viral. Muitos vírus mostram uma variabilidade alta nas suas sequências e por isto foram classificados em subtipos os quais muitas vezes circulam em regiões geográficas diferentes. Esta variabilidade ocorre por criação de altas razões de mutações, principalmente devido à falta de atividade *proofreading* da Transcriptase reversa (RT) viral (FREED et al., 2002). Dessa forma foram observadas diferenças de até 10 vezes na sensibilidade entre testes diagnósticos, usando subtipos de HBV diferentes (WEBER et al., 2005). Também teste diagnóstico contra antígenos de *Influenza vírus* mostrou menor sensibilidade, devido a mudanças genéticas e antigênicas do vírus (LANDRY et al., 2011). O uso de teste diagnóstico onde o subtipo circulando na população varia do vírus usado para produção do teste, isto pode influenciar significativamente no resultado do teste, aumentando resultados falso-negativos (WEBER et al., 2005). O uso de banco de dados possibilita o acesso à sequências genômicas de diferentes subtipos e assim a seleção adequada das sequências usadas para produção de proteínas recombinantes. Um banco muito usado para obter sequências registradas na América Latina, é o *Los Alamos Sequence Database*. Esse tem registrado especialmente sequências de HIV e HCV, fornecendo além disso informações sobre

o genótipo, subtipo, sítio de start e stop, país de coleta, cidade, data e tecido (KUIKEN et al., 2003; KUIKEN et al., 2008). Outros bancos de dados são o *National Center of Biotechnology Information (NcBI) Reference Sequence (RefSeq) database* com dados genômicas, protéicas e transcritos de mais de 3700 organismos incluindo procariotas, eucariotas e vírus (PRUITT et al., 2007) ou o NIH (*ingl.* National Institute of Health) genetic sequence database *GenBank*, com mais de 27.000 genomas virais completos registrados (BRISTER et al., 2010).

Métodos mais modernos para seleção de antígenos apropriados vêm da área da Biologia estrutural, envolvendo análises computacionais. A identificação de regiões onde epítomos se encontram localizados na proteína é importante para garantir a funcionalidade do antígeno em teste diagnóstico. Cerca de 30 anos atrás começou a tentativa para identificar epítomos. Nesta época foram avaliadas as propriedades diferentes de aminoácidos ao longo de uma seqüência protéica. Todavia se mostrou que um perfil de aminoácidos únicos não pode ser usado confiantemente para determinar a localização de um epítomo. A grande mudança veio através da biologia estrutural que reconhece epítomos conformacionais de células B pela estrutura 3-dimensional da proteína (REIMER et al., 2009). Devido aos custos altos e um procedimento demorado para identificar novos epítomos, foram desenvolvidas também ferramentas bioinformáticas ou *epitope prediction software* para prever a presença de epítomos. Esses algoritmos de previsão são baseados na seqüência de aminoácidos, estrutura 3D ou outras características de proteínas como hidrofobicidade, acessibilidade e flexibilidade (CHEN; RAYNER; HU; 2011). Não obstante, já foi identificada a presença de epítomos em muitas proteínas virais, normalmente usadas em teste diagnóstico, e assim podem ser achadas também em publicações científicas.

Outro método que faz uso da Biologia estrutural é o uso de proteínas *scaffold*, como a proteína Top7, para inserção de epítomos conformacionais ou regiões com alta probabilidade de serem imunogênicas. A simulação da dinâmica molecular é usada para análise da estabilidade e estrutura protéica. Assim, a seleção das proteínas quimeras mais promissoras podem ser obtidas usando ferramentas computacionais e em seguida usadas para expressão em bactéria (VIANA et al., 2013).

2.3 Testes diagnósticos

2.3.1 Métodos e critérios gerais

Um teste diagnóstico serve para identificar a presença de uma doença ou patógeno em indivíduos assintomáticos. Métodos diagnósticos clássicos para vírus incluem a manutenção do vírus em células de cultura (MAHONY et al., 2008), imunoenaios como o ensaio de imunofluorescência (SCHINDERA et al., 2010), testes sorológicos (MAHONY et al., 2008) como o *imunoensaio ligado a enzima* (EIA) e o teste de *inibição da hemaglutinação*. Esses testes são intensivos no desempenho de trabalho, consomem muito tempo até chegar ao resultado e muitas vezes mostram reatividade cruzada alta, sensibilidade baixa e a necessidade de testes confirmatórios com métodos moleculares (KEHL et al., 2009). Sobretudo, são capazes de detectar somente um único alvo. Para aumentar o nível de sensibilidade, minimizar a janela de diagnóstico, incluir novos patógenos, facilitar o uso em laboratório de rotina, garantir um diagnóstico acurado também em países de renda baixa, o desenvolvimento de novos testes continua.

Devido aos avanços metodológicos foram desenvolvidos também testes multiplex que permitem a detecção e identificação simultânea de múltiplos tipos de vírus ou proteínas numa única reação. Ao lado dos benefícios em diminuir custos e tempo, a quantidade do material biológico (sangue), usado no teste, pode ser reduzida. Todavia, os métodos seguem princípios diferentes, usando, por exemplo, microesferas, placas de múltiplos poços ou suporte de vidro para acoplamento do antígeno, mostrando critérios específicos para sua aplicação e vantagens e desvantagens específicas (Tabela 1). Para triagem sorológica já existem testes diagnósticos multiplex na base de ácidos nucléicos e PCR, como por exemplo, o *COBAS TaqScreen MPX Test* para HCV, HIV-1, HIV-2, o *Procleix Ultrio Assay* e *Procleix Ultrio Plus Assay* para HBV, HCV e HIV-1 (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2013).

Quadro 1- Métodos diagnósticos multiplex usados em virologia.

MÉTODO	DETECÇÃO		VANTAGEM	DESVANTAGEM
	DNA	PROTEINA		
ELISA	NÃO	SIM	Baixo problema de contaminação por <i>carry-over</i> ; Equipamento comum; <u>Uso</u> : detecção de infecções primárias (IgM) e secundárias (IgG); (OLIVEIRA, 2004)	Número de patógenos por teste limitado; Quantidade grande de material biológico usado; (ELLINGTON, 2010)
MICROESFERAS LIQUIDOS	SIM	SIM	≤200 patógenos diferentes/teste <i>High throughput</i> <u>Uso</u> : laboratório de rotina Quantidade baixa de material biológico necessário; (ELLINGTON, 2010)	Perda substancial de microesferas em caso o soro não for diluído; Variabilidade na mensuração devido às diferenças em diâmetro de microesferas; Vazamento, acúmulo de microesferas; (ELLINGTON, 2010)
MICROARRAY	SIM	SIM	<i>High throughput</i> e <i>screen</i> ; Bem desenvolvido para DNA; <u>Uso</u> : pesquisa, detecção de biomoléculas; Teste automatizado; Inclusão de replica tas múltiplas para melhor precisão possível; (FOURNIER-WIRTH, 2010)	Equipamento especial; Método complexo; Interação entre proteínas; Amplificação do target pelo PCR necessário; (FOURNIER-WIRTH, 2010)
PCR/RT-PCR	SIM	NÃO	Alta sensibilidade e especificidade; (KEHL, 2009) Equipamento comum em laboratório de rotina e pesquisa; <u>Uso</u> : laboratório de rotina (TANAKA, 2009)	Alto risco de contaminação por <i>carry-over</i> de amplicons; (MAHONY, 2008) Métodos adicionais para detecção necessários; (TANAKA, 2009; SZEWCZUK, 2010) Perda de material durante a extração de DNA e RNA; Possível interferência de primers; (SZEWCZUK, 2010)
REAL-TIME PCR	SIM	NÃO	Alta sensibilidade e especificidade; Baixo risco de contaminação por <i>carry-over</i> ; Teste automatizado; <u>Uso</u> : laboratório de rotina e pesquisa (RAYMOND, 2009; Huang, 2008)	Números de patógenos limitados (Max. 5)/ teste devido à falta de marcadores fluorescentes; (MOLENKAMP, 2007); Equipamento caro; Possível interferência de primers e sondas (HUANG, 2008)

Fonte: a autora

As características que influenciam a escolha de um teste apropriado incluem: a infraestrutura do laboratório, a simplicidade do procedimento, o equipamento necessário para performance do teste, a *vida útil* dos reagentes e as condições para guardar o teste, a habilidade do técnico, a rapidez, o preço, o alvo desejado seja a detecção de antígeno ou anticorpos, a sensibilidade e especificidade altas e a variante do vírus dependendo da região geográfica (p.e. HIV-1, grupo O) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2005).

Importante para a avaliação da qualidade de um novo teste diagnóstico é:

- a) a reprodutibilidade;
- b) a acurácia;
- c) a sensibilidade e especificidade;
- d) o valor preditivos positivos ou negativos.

A reprodutibilidade se mostra pela repetição do teste, esperando igualdade nos resultados e ao mesmo tempo se encontrando entre discordância (-1) e concordância total (+1). Essa depende também do fator técnico, como por exemplo, como foi conduzido o teste e por quem (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2005). A acurácia pode ser definida comparando o novo teste diagnóstico com um *padrão ouro*. O *padrão ouro* são testes diagnósticos de referência, disponíveis com o melhor critério diagnóstico e geralmente são os mais invasivos, caros e/ou complexos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2005).

A sensibilidade é definida como a habilidade de detectar corretamente soros com anticorpos (ensaio de referência positivo). Assim, a sensibilidade é o número dos soros identificados verdadeiramente positivos (a), divididos pelo número dos soros identificados no ensaio de referência como sendo positivos (a+c), expresso em percentagem, (sensibilidade = $a/(a+c)$) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2005).

A especificidade do teste é definida como a habilidade de detectar corretamente soros que não tem anticorpos (ensaio de referência negativo). Assim, a especificidade é o número de soros verdadeiramente negativos (d), dividido pelo número de soros identificados no ensaio de referência como sendo negativos (b+d), expresso em percentagem, (especificidade = $d/(b+d)$) (Tabela 2) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2005).

O critério mínimo de performance de um teste diagnóstico estabelecido pela OMS é uma sensibilidade de >99% para testes rápidos e 100% para ELISA e uma especificidade de pelo menos 98% (OMS, 2005).

Quadro 2- Definição dos resultados para cálculo da sensibilidade, especificidade e valores preditivos.

	Estado verdadeiro do soro		
	positivo	negativo	
Resultado do ensaio	a verdadeiro positivo	b falso positivo	a+b
+	c falso negativo	d verdadeiro negativo	c+d
-	a+c	b+d	

Fonte: Organização Mundial de Saúde (2005)

O valor preditivo positivo (VPP) ou negativo (NPV) mostra a probabilidade de um teste com ou sem anticorpos, caso o teste seja positivo ou negativo, respectivamente. Para este cálculo pode ser usado uma fórmula simples que determina um valor aproximado: $VPP = a/a+b$, $NPV = d/c+d$ ou incluir a prevalência de HIV na população para valores mais precisos.

$$VPP = \frac{(prevalência) (sensibilidade)}{(prevalência) (sensibilidade) + (1 - prevalência) (1 - especificidade)}$$

$$NPV = \frac{(1 - prevalência) (especificidade)}{(1 - prevalência) (especificidade) + (prevalência) (1 - sensibilidade)}$$

Define-se, que quanto maior a prevalência da infecção por HIV na população maior a probabilidade do resultado positivo mostram uma infecção do indivíduo por HIV. Dessa forma em regiões com maior prevalência, a proporção de soros testados falso-positivos diminui (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2005).

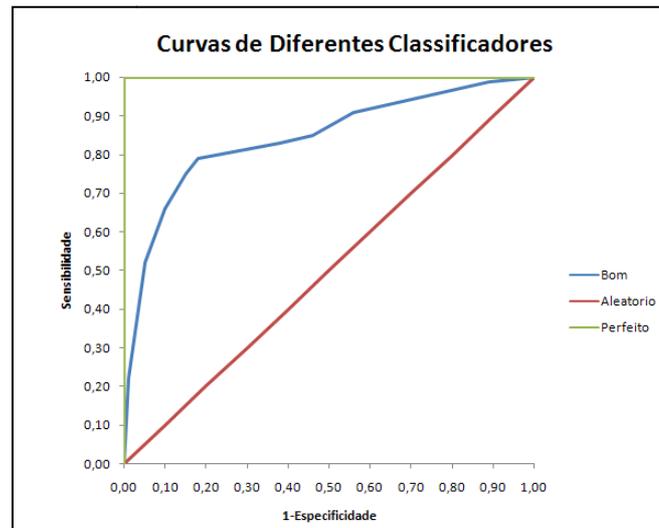
O *intervalo de confiança de 95%* (IC95) pode ser usado para determinar se as diferenças de sensibilidade e especificidade observadas entre ensaios são significantes ou não. Também o *valor p* determina a significância de um teste e é complementar ao IC95, sendo significativo se for abaixo de 0.05 ($p < 0.05$).

Para definição de resultados positivos é também necessário determinar o *ponto de corte* (*ingl.* cut-off). Assim, se define que indivíduos que mostram uma mensuração no teste igual ou abaixo do ponto de corte, são classificados como sendo negativos ou não infectados. De uma maneira geral se calcula, quanto menor o ponto de corte, maior a habilidade do teste de classificar os infectados como sendo positivos (MARTINEZ et al., 2003). Todavia, quanto menor for o ponto de corte também menor será a especificidade. Os testes diagnósticos já estabelecidos no mercado usam cálculos de ponto de corte diferentes, como por exemplo, (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2005):

- a) média DO controle positivo no ELISA x 0.23 (Enzgnost HIV Integral II);
- b) média DO controle negativo no ELISA + 0.20 (Genedia HIV Ag-Ab ELISA);
- c) média DO controle negativo no ELISA + 0.15 (Murex HIV Ag/Ab Combination);
- d) média DO controle negativo no ELISA + 0.10 (Vironostika HIV Uni-Form II Ag/Ab).

Para determinar a sensibilidade e especificidade de um teste diagnóstico se usa também a curva ROC (*ingl.* *Receiver Operating Characteristic; Característica de Operação do Receptor*) que tem capacidade discriminativa para um número de valores (pontos de cortes). Nesta se trata de uma apresentação gráfica que ilustra a performance de um teste onde a fração verdadeira positiva de positivos totais (sensibilidade) na ordenada Y é representado em % contra os falsos positivos entre negativos totais (1-especificidade) na abscissa X . A escolha do ponto de corte pode influenciar um teste. Na curva ROC, os valores individuais (por exemplo cada soro usado) são apresentados como pontos de corte individuais, criando assim uma curva, permitindo a discriminação e valores com maior otimização da sensibilidade em função da especificidade. O melhor ponto, onde isto acontece, é aquele que se encontra mais próximo do canto superior esquerdo no diagrama (Figura 18).

Figura 18- Apresentação de uma curva ROC.

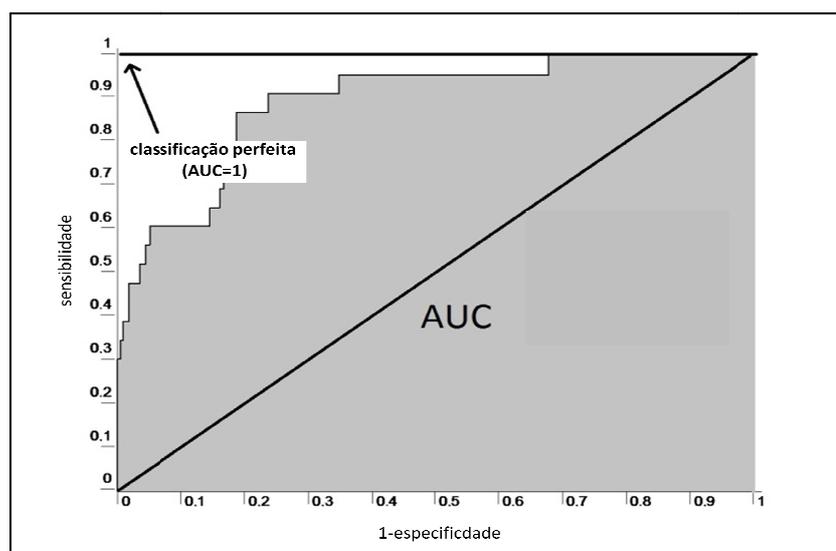


Fonte: Souza (2014)

Nota: Na ordenada Y se mostra a sensibilidade e abcissa X a especificidade. Cada valor é colocado criando assim uma curva. Quanto ao valor mais próximo no canto esquerdo superior, melhor representa um bom desempenho, mostrando assim, maior sensibilidade e menor falso positividade. Valores que se encontram em cima ou abaixo da linha no meio representam um teste diagnóstico com mal desempenho.

Sobretudo, a curva ROC também é usada para quantificar a exatidão do teste que é proporcional à *área sob a curva* (AUC). O teste diagnóstico com maior desempenho é aquele que mostra maior AUC. Isto ocorre quando a curva se aproxima mais possível à área superior esquerda (Figura 19).

Figura 19- Discriminação da área de uma curva ROC.



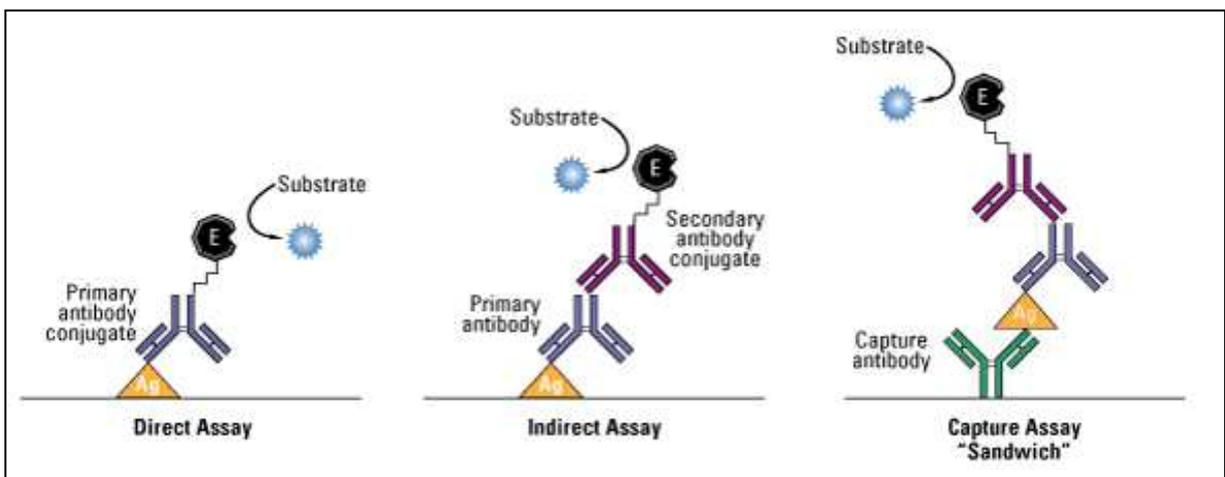
Fonte: Souza (2014)

Nota: Mais perto a curva se aproxima ao lado esquerdo superior, maior seja a área calculada (área cinza escura) e assim maior a exatidão do teste.

2.3.2 Princípio: Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA)

O ELISA é um teste imunológico que faz parte dos métodos de diagnóstico convencionais. Existem três tipos diferentes, o ensaio direto, indireto e de captura (Figura 20). O princípio é a formação de um “modelo *sandwich*” entre o antígeno sintético, ligado à superfície de plástico da placa com 96 poços, o anticorpo ou antígeno presente no soro e o segundo anticorpo anti-humano usado para detecção. Outra forma é o uso de um anticorpo ligado à superfície da placa, para capturar o antígeno viral circulando no sangue. Os epítopes utilizados para o ELISA têm que ser linear, imunodominante e conservados entre cada tipo de vírus (ELLINGTON et al., 2010).

Figura 20- Princípios do teste ELISA



Fonte: Piercenet (2013)

Nota: A figura ilustra os principais tipos de ELISA, o ensaio direto, indireto e de captura. Sendo o ensaio indireto usado para o desenvolvimento deste trabalho. Neste caso, o antígeno (Ag) representa a proteína recombinante expressa e purificada e o anticorpo primário, o anticorpo presente no soro dos indivíduos infectados.

A visualização é feita por métodos de coloração e mensuração num espectrofotômetro. O ELISA comum é o monoplex que permite a detecção de anticorpos virais específicos para um epítopo. Foi relatado que a sensibilidade de um teste 11-plex diminuiu por fator 1.7-5.0 devido à reatividade cruzada de anticorpos, em comparação com um ELISA monoplex (ELLINGTON et al., 2010).

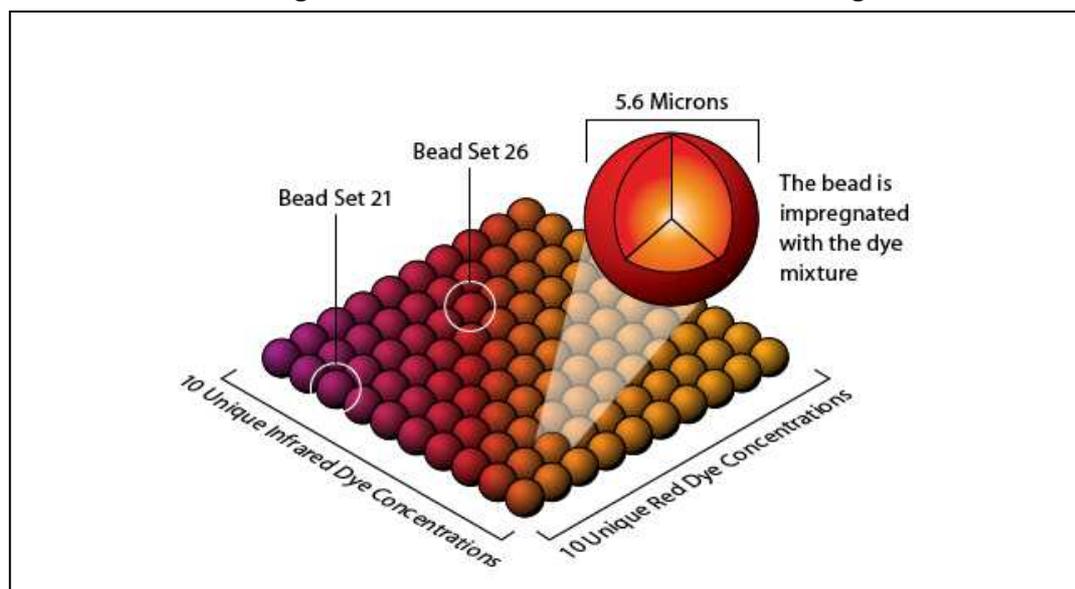
Todavia, um ELISA multiplex, usando um multiepítopo recombinante (antígeno tandem) chamado MEP foi desenvolvido. O MEP consiste de uma junção de até seis epítomos diferentes interligados por *linkers* flexíveis ou rígidos. Esse foi

desenvolvido para a detecção de cepas de regiões geográficas diferentes dos HIV-1 e HIV-2 (TALHA et al., 2010) ou HCV (DIPTI et al., 2006).

2.3.3 Princípio: Microarranjos líquidos (xMAPLuminex)

A metodologia dos microarranjos líquidos usa microesferas de poliestireno de $\sim 5\mu\text{M}$ em diâmetro que atuam como suporte sólido para a captura de diferentes *moléculas-alvo*, sejam elas anticorpos, antígenos, peptídeos ou ácidos nucleicos. A junção das *moléculas de captura*, às microesferas, ocorre por *carboxylate functional groups* na superfície das moléculas. O uso de microesferas de vidro ou polímeros para imobilização do substrato é conhecido desde os anos 80, todavia este sistema hoje é principalmente conhecido como sistema MAPX Luminex (THIGE et al., 2013). Cada microesfera é corada internamente com proporções distintas de corantes fluorescentes laranja e vermelho (Figura 21), permitindo a criação de até 200 (sistema Luminex 100/200TM) ou 500 códigos de cores (sistema FLEXMAP3D[®]) (WWW.LUMINEXCORP.COM) únicos e específicos para cada grupo de microesferas. Dessa forma, cada grupo acopla à *molécula de captura* desejada, e após incubação com o material biológico captura as *moléculas-alvo*.

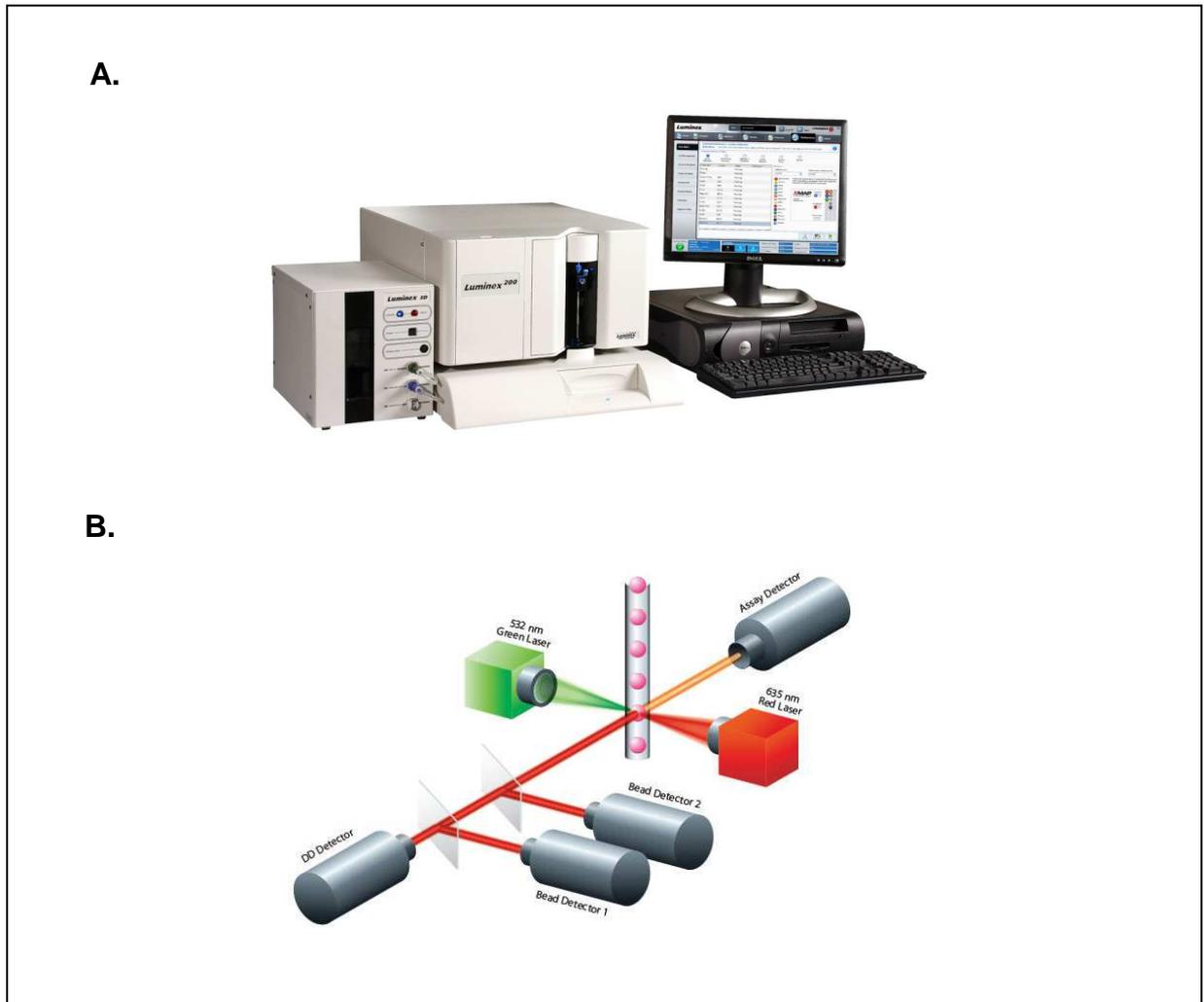
Figura 21- Microesferas coloridas e seus códigos



Fonte: Viracoribt (2013)

Em seguida, num segundo passo de incubação, uma *molécula repórter* é adicionada, sendo um anticorpo marcado com *phytoeritrin green* interagindo com o *target* e formando um modelo “*sandwich*”. Este é usado para a quantificação das microesferas as quais capturaram a *molécula-alvo*. A reação é analisada pelo sistema xMAPLuminex (Figura 22).

Figura 22- Ilustração do aparelho Luminex



Fonte: Viracoribt (2013)

Nota: (A) *Hardware* Luminex; (B) As microesferas entram pela *sonda de amostra* na máquina, onde passam por dois lasers. Um laser vermelho que detecta e identifica as microesferas e um laser verde que quantifica os números de cada microesfera.

Teoricamente, todas as *moléculas-alvo* podem ser detectadas, identificadas e quantificadas em um único ensaio multiplex. Assim, microarranjos líquidos podem ser usados como ensaios imunológicos qualitativos e quantitativos e como ensaio de hibridização de DNA (VIGNALI et al., 2000).

Os parâmetros de ensaio do sistema Luminex deveriam ser avaliados. Assim por exemplo, a seleção de *moléculas de captura* é crucial para não ocorrer reatividade cruzada com moléculas inespecíficas. Para este fim, as sequências de epítomos escolhidos para produção de *moléculas de captura* são pré-avalidadas à sua reatividade, após expressão em sistema eucariota ou procariota. Sobretudo, é necessário testar e determinar o tampão de ensaio e o tempo de incubação (ELLINGTON et al., 2010).

Para identificação de patógenos virais já foram publicados vários testes usando o método Luminex. Para citar algum, em pacientes com meningite, foi desenvolvido uma combinação de PCR multiplex com subsequente detecção de produtos de PCR, usando microesferas acopladas com *gene-specific probes*, (BOVING et al., 2009). Num outro ensaio de Luminex, incluindo um *primer extension step* específico após a amplificação por PCR foi possível identificar 20 vírus respiratórios humanos diferentes (MAHONY et al., 2007). Microesferas líquidas também foram usadas como ensaio de mapeamento de anticorpos para caracterização de resposta imunológica em indivíduos infectados com HIV-1 (OPALKA et al., 2004). Também um teste diagnóstico contra diferentes proteínas de HCV foi desenvolvido (FONSECA et al., 2011). Todavia, a comercialização dos ensaios usando microesferas líquidas para a identificação de vírus e outros patógenos somente se encontra para vírus respiratórios (xTAG Respiratory Panel)(LUMINEX CORP., 2013; RAYMOND, 2009) e patógenos gastrointestinais (xTAG Gastrointestinal Pathogen Panel) (LUMINEX CORP., 2013).

Limitações desse método se encontram na perda substancial de microesferas, no caso do soro não ser diluído (FU et al., 2010) e uma variabilidade na mensuração, de 10% a 32%, provavelmente devido a variações no diâmetro das microesferas. Outra observação feita é o vazamento, o acúmulo (*clogging*) e a adsorção não específico para a superfície de filtro nas placas com fundo de filtro, usado para lavagem das microesferas (ELLINGTON et al., 2010).

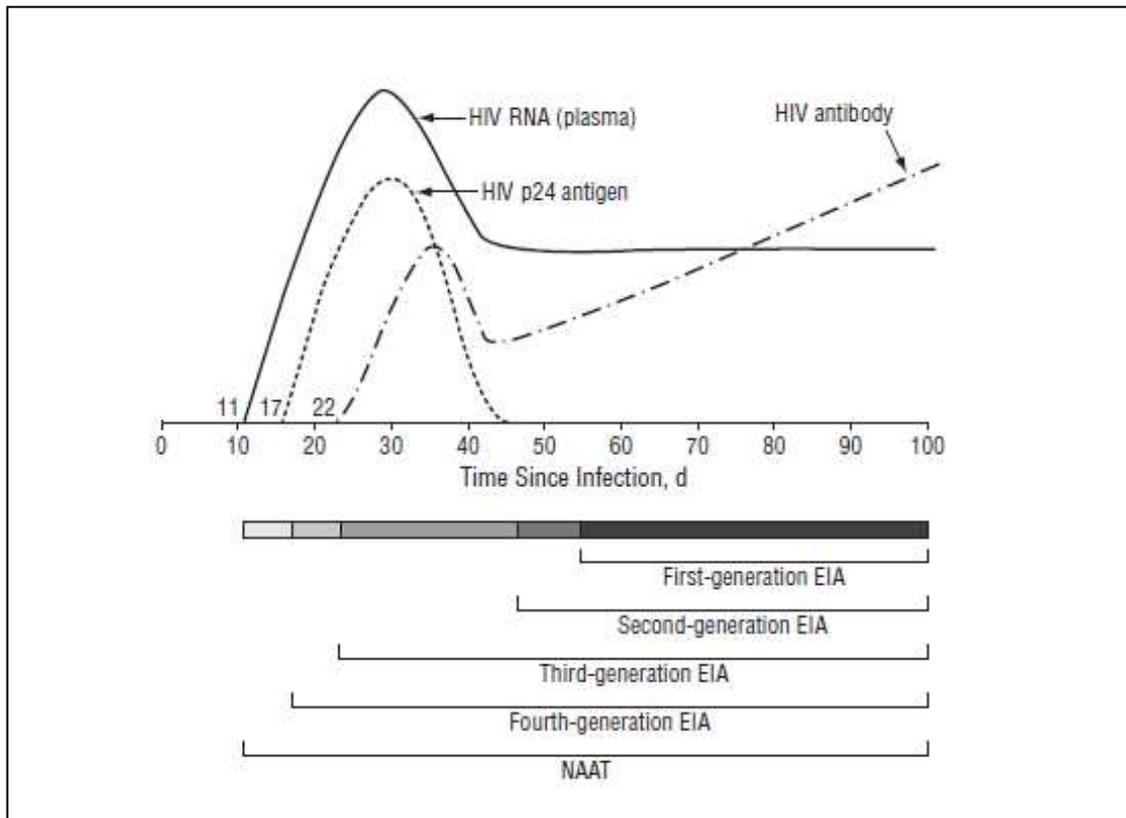
2.3.4 Testes diagnósticos para HIV, HTLV, HCV

2.3.4.1 HIV

Estima-se que nos anos 80, o risco de ser infectado por transfusões sanguíneas, era de 1:100 enquanto o atual risco de adquirir HIV por transfusões, que foram testados previamente, se reduziu de 1 em 1.5-4.3 milhões (HIGHTOWER et al., 2003). Isto, entre outro, é devido ao desenvolvimento de testes diagnósticos que permitem uma detecção do vírus no indivíduo cada vez mais precoce no percorrer da infecção e que assim garante a segurança de uso de bolsas sanguíneas.

O primeiro teste diagnóstico desenvolvido em 1985 foi um ensaio imunoenzimático (EIA) indireto, chamado teste de *primeira geração*. Para a detecção de anticorpos IgG na amostra, os poços das placas de ELISA contém lisados de vírus, assim fornecendo os antígenos virais. A visualização é feita com um anticorpo secundário, o IgG anti-humano, ligado a uma enzima. Após o uso de um substrato, a coloração do poço indica a presença de anticorpos na amostra. O teste da *segunda geração* segue o mesmo princípio, embora sendo usados peptídeos sintéticos ou antígenos recombinantes. Os imunoenaios da terceira geração (princípio sandwich) também usam proteínas recombinantes, mas são capazes de detectar anticorpos da classe IgG e IgM e assim, permitem o diagnóstico de uma infecção mais precoce. Para a visualização, uma enzima ligada ao antígeno é adicionada no poço que se liga diretamente ao anticorpo se for presente na amostra. O teste diagnóstico de quarta geração é o atual usado e combina a detecção de antígenos virais e anticorpos contra p24, como também combina a detecção de HIV1 e HIV2 no mesmo ensaio. A detecção é feita com ambos, a enzima ligada ao antígeno e ao anticorpo. Uma coloração no poço indica a presença de antígeno p24 e anticorpos anti-HIV. Nesse método, também dois marcadores diferentes podem ser usados. Esse tipo de teste reduziu o tempo da detecção da infecção ainda mais, pois antígenos presentes no plasma antes da soroconversão podem ser detectados (Figura 23), (ALTER et al., 2010; DASKALAKIS et al., 2011).

Figura 23- Gerações de testes diagnósticos desenvolvidos para HIV



Fonte: Patel et al. (2010)

Nota: O gráfico relaciona os primeiros três meses da infecção (mostrando a aparência de partículas virais, antígenos e anticorpos no sangue) com a capacidade de um diagnóstico usando gerações de testes diferentes. Mostrando que a janela de diagnóstico pode ser aumentada com o uso das mais novas gerações de testes, sendo o teste EIA de quarta geração (ingl. *fourth-generation*, EIA) e técnicas de detecção de ácidos nucleicos (NAAT) os melhores.

Apesar de não ser usado para a triagem sorológica de bolsas sanguíneas, existe um método para um diagnóstico rápido de infecções, chamado teste rápido (ingl. *lateral flow device*). Este teste é capaz de detectar anticorpos da classe IgG e IgM contra gp41 e/ou gp120 em fluidos orais, sangue, (plasma ou soro), por *colloidal gold conjugated antigens* de HIV. As vantagens desse teste são a rapidez para obter um resultado (menos de 30 minutos) e que pode ser executado em locais não laboratoriais (DASKALAKIS; DELANEY; 2011). Recentemente também foi desenvolvido um *lateral flow device* que combina a detecção de anticorpos com um teste confirmatório para detecção de RNA viral (CHEN et al., 2013). Geralmente o Western Blot é usado como teste confirmatório que permite a detecção de antígenos virais (gp160, gp 120, p65, p55, gp41, p40, p31 e p24) cinco semanas após a infecção (CDC, 1993). Todavia, este teste é muito caro e mostra muitas vezes resultados intermediários. Por este motivo o *Line immuno-assay* (LIA) baseado em proteínas recombinantes ou sintéticas capazes de detectar anticorpos específicos foi

desenvolvido e é atualmente vendido sob nome comercial INNOLIA, Pepti-Lav e RIBA-Assay (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2005). Também a detecção dos RNA virais no plasma pela técnica da amplificação de ácidos nucleicos, chamada NAAT, é usada. Os vRNA começam a ser detectáveis a partir de 1.5 semanas após a infecção. Esse tipo de teste é normalmente feito com amostras de plasma de vários indivíduos misturados (*pooled screening*) e é confirmado, em caso positivo, com as amostras individuais. Como alguns estudos nos EUA mostram 0.02%-1.1% de infecções novas podem ser detectados por NAAT quais em teste EIA, mostraram resultados falso-negativos (DASKALAKIS et al., 2011).

Em 1991 foi licenciado o primeiro teste ELISA, combinatório para HIV-1 e HIV-2. Testes atuais incorporam antígenos de ambos os vírus (DWYRE et al., 2011). A OMS reconhece a infecção de HIV-2 na amostra, se pelo menos dois antígenos do *env* foram detectados no WB. Outras organizações exigem a reatividade positiva de uma combinação de antígenos HIV-2 *gag* (p26, gp34) e *env* (gp105) (DWYRE, 2011). A OMS recomenda nos seus *guidelines* várias estratégias para o diagnóstico de infecções por HIV, dependendo se o objetivo é a transfusão/transplante de sangue, o diagnóstico ou a supervisão de indivíduos tratados (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2005). Para fins de transfusão (estratégia I), um teste ELISA positiva deveria ser confirmado por 1-2 testes específicos contra HIV-1 e HIV-2 (DWYRE et al., 2011; WHO, 2005). A OMS criou uma lista de teste diagnóstico para infecções virais, onde cinco ELISA comerciais foram incluídos. A tabela abaixo mostra as principais características desses testes (Tabela 3).

Quadro 3 . Principais características de ELISA comercial contra HIV.

	Enzignost HIV Integral II	Genedia HIV Ag-Ab ELISA	Genscreen Plus HIV Ag/Ab	Murex HIV Ag/Ab Combination	Vironostika HIV Uni-form II Ag/Ab
Empresa	Behring/ Alemanha	Green Cross Life Science Corp/ Korea	Bio-Rad/ França	Abbott/ Alemanha	bioMérieux/ França
Tipo antígeno	peptídeos recombinantes e sintéticos: gp41HIV1 gp41HIV1 (O) gp36HIV2	proteínas recombinantes: gp41HIV1 gp41HIV1 (O) gp36HIV2	peptídeos recombinantes e sintéticos: gp160HIV1 envHIV2	proteína recombinante: envHIV1 polHIV1 envHIV2 peptídeo: HIV1 (O)	gp160HIV1 ANT70HIV1 envHIV2
sensibilidade (95% CI) n= 157	100 (97,7-100)	100 (97,7-100)	100 (97,7-100)	100 (97,7-100)	100 (97,7-100)
especificidade (95% CI) n= 296	100 (98,8-100)	99,7 (98,1-100)	98,3 (96,1-99,4)	99,3 (97,6-100)	99 (97,1-99,8)

Fonte: Organização Mundial de Saúde (2005)

Resultados falsos positivos mais comuns em testes sorológicos para HIV são causados por vacinação contra *influenza* (ERICKSON et al., 2006), como também, doenças autoimunes, colapso renal, fibrose cística, gravidez múltipla, doenças alcoólicas do fígado e vacinação contra *hepatite B* e *raiva* (CELUM et al., 1994). Também infecções tropicais causadas por *Trypanosoma brucei gambiense* mostram resultados falsos positivos (LEJON et al., 2010). Resultados falsos negativos foram relatados durante a fase de pré-soroconversão, com uma carga viral abaixo ou igual a 150 cópias RNA viral/ml (DELWART et al., 2004; LING et al., 2000;).

2.3.4.2 HTLV

Um estudo feito em Santa Catarina/Brasil calculou que o risco residual de adquirir HTLV-1 por transfusões sanguíneas, atualmente é de 1 em 116.300 doações de sangue testadas (MARESCH et al., 2008).

O diagnóstico de infecção pelo HTLV-1/2 é feito através do ELISA, que detecta anticorpos no soro que foram produzidos contra proteínas do vírus I e II (gp21 e gp46) ou através do ensaio do *particle agglutination* (GONÇALVEZ et al., 2010; MALM et al., 2010). Os números de testes são limitados. Testes usados são o Murex HTLV/II kit, Abbott HTLV-I EIA ou Abbott ARCHITECT rHTLV-I/II Assay. O último e mais recente desenvolvido mostra 100% de sensibilidade e 99.8% de especificidade (MALM et al., 2010). Por enquanto não existe nenhum teste confirmatório, licenciado pela FDA, para confirmação de resultados positivos. Ao contrário da possibilidade de detectar a proteína p24 do HIV, a detecção de proteínas virais do HTLV em sangue periférico, é mais difícil. Em infecções não malignas, a expressão de proteínas virais ocorre somente em níveis baixos e células individuais. Por este motivo, a detecção de proteínas virais não faz parte do diagnóstico (BANGHAM et al., 2003). Todavia, o Western Blot ou o ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA) pode ser usado para detectar proteínas virais (LOBATO MARTINS et al., 2010). A OMS define um teste positivo quando uma proteína gag (p15, p19, p24) e uma env (gp21, gp46, gp61/68) aparecem (CDC, 1997). A PCR é outro teste usado para identificação do DNA proviral nas células mononucleares do sangue periférico. A PCR como o WB podem distinguir entre HTLV-1 e 2 (WALTERS et al., 2011).

Resultados falsos-positivos relatados entre 1989 e 1990 em mil pessoas foram devidos à vacinação contra influenza que induz anticorpos da classe IgM que se ligam inespecificamente nos ensaios de HTLV-1 (CDC, 1993). Também anticorpos de pacientes com *síndrome respiratória aguda grave* mostram reatividade cruzada em testes para HTLV-1 (TSAO et al., 2005). Adicionalmente, foram relatados até 50% de resultados indeterminados em WB, dependendo se o teste for feito em áreas endêmicas (MANGANO et al., 2004; YAO et al., 2006). Em muitos casos, os mesmos se revelaram positivo no PCR para HTLV-2 (OLAH et al., 2010). Resultados falso-negativos podem ocorrer no caso de executar os testes com *pool*

de soros em vez de usar amostras individuais, levando à uma sensibilidade mais baixa (CHANG et al., 2002).

2.3.4.3 HCV

Estima-se que entre 1960 e 1991 a possibilidade de se infectar com HCV por transfusões sanguíneas era de 5-15%, enquanto hoje devido ao melhor diagnóstico e estratificação de doadores, o risco de adquirir uma infecção diminuiu até 0.001%. Todavia, o risco de infecção no Brasil foi estimado de ser cerca 10x maior do que em países desenvolvidos (MARTINS et al., 2011).

Geralmente, duas classes de testes são usadas para detectar e classificar infecções por HCV. Entre eles se encontram ensaios sorológicos (EIA) para detecção de anticorpos específicos contra HCV e métodos moleculares para detecção do genoma viral (ABELDAWI et al., 2010). Ao longo do tempo os ensaios EIA continuam a se desenvolver. O ensaio de segunda geração desenvolvido em 1991 inclui antígenos recombinantes contra proteínas não estruturais NS3, NS4 e um antígeno da região *Core*, aumentando significativamente a sensibilidade e especificidade em comparação com teste de primeira geração. A incorporação de epítomos de NS5 no EIA de terceira geração, aumentou a fidelidade, mostrando alta sensibilidade e especificidade (COLIN et al., 2001). Até hoje 14 testes para detecção de anticorpos contra HCV foram avaliados, incluindo cinco ELISA e nove testes rápidos (http://www.who.int/diagnostics_laboratory/evaluations/hepc/en/) (Tabela 4). Os testes moleculares para detectar HCV RNA podem ser qualitativos ou quantitativos. Testes qualitativos são mais sensíveis, enquanto testes quantitativos podem determinar a carga viral. Os quantitativos seguem o princípio da PCR, *real-time PCR* e *transcription-mediated amplification* (TMA) e podem detectar ≤ 50 HCV RNA IU/ml, com sensibilidade igual para todos os genótipos. Para a quantificação a OMS estabeleceu um *standard internacional de unidades de HCV RNA* (IU), usado em todos os testes comercialmente existentes (CHEVALIEZ et al., 2007).

Todavia, considerando o uso de testes diferentes, um resultado positivo, não consegue distinguir entre uma infecção aguda ou crônica, nem indica imunidade ou proteção contra as doenças causadas por HCV (ABELDAWI et al., 2010).

Quadro 4. Principais características de ELISA comercial contra HCV.

	3rd Generation HCV Microlisa	Innotest HCV AbIII	Innotest HCV Ab IV	Ortho HCV 3.0 Enhanced SAve	Monolisa anti-HCV PLUS
Empresa	J.Mitra & Co. Índia	Innogenetics Bélgica	Innogenetics Bélgica	Ortho-Clinical Diagnostics EUA	Bio-Rad França
Tipo antígeno	NE	NE	NE	antígeno recombinante NE	antígeno recombinante NE
sensibilidade (95% CI) n= 68	100 (94,7-100)	100 (94,7-100)	100 (94,7-100)	100 (94,7-100)	100 (94,7-100)
especificidade (95% CI) n= 189	97,4 (93,9-100)	100 (98,1-100)	100 (98,1-100)	98,9 (96,2-99,9)	99,5% (97,1-100)

Fonte: Organização Mundial de Saúde (2001)

Nota: Tabela modificada pelo autor; **(NE)** não especificado

Os testes EIA de terceira geração mostram uma sensibilidade e especificidade de 99%. Não obstante, em doadores sadios, até 50% dos resultados positivos, são identificados falsos. Sobretudo, falsa positividade pode ocorrer devido às doenças autoimunes de fígado ou hipergamaglobulinaemia. Assim, testes positivos necessitam da confirmação com métodos qualitativos ou quantitativos (dependendo do perfil de risco) para a detecção de RNA viral (ABELDAWI et al., 2010).

Testes falsos negativos geralmente ocorrem no caso de imunossupressão dos doadores ou pacientes em hemodiálise prolongada (ABELDAWI et al., 2010).

3 JUSTIFICATIVA

O setor de Pesquisa e Desenvolvimento em Biotecnologia desponta como um dos mais promissores no que diz respeito aos avanços científicos e tecnológicos. Em especial, o setor de kits diagnósticos, movimenta mundialmente cerca de 25 bilhões de dólares a cada ano, configurando um setor extremamente dinâmico.

Com 4.5 milhões de doações de sangue por ano registrados no Brasil, os gastos para imunodiagnósticos dessas doações chegam aos 330 milhões de reais. Entretanto, o Brasil apresenta uma forte dependência tecnológica dos insumos e produtos deste setor, devido à baixa densidade do campo tecnológico nacional.

O desenvolvimento de kits comerciais no país, incorporando novas tecnologias como a produção de antígenos quiméricos e plataformas de microarranjos líquidos, deverá impulsionar o setor nacional de desenvolvimento de kits diagnósticos. Além da diminuição da dependência tecnológica, os processos de inovação aqui propostos podem colocar o Brasil em condições de disputa no mercado de imunodiagnóstico.

Mais especificamente, o desenvolvimento de um kit de diagnóstico capaz de detectar precisamente os vírus HIV 1-2, HCV e HTLV 1-2, cuja triagem sorológica é compulsória, permitirá aos órgãos de saúde um melhor controle transfusional reduzindo os gastos e riscos de contaminação passiva.

Finalmente, o desenvolvimento de kits diagnósticos, no território nacional, além de contribuir para o Sistema Único de Saúde (SUS), deverá também contribuir na formação de recursos humanos e geração de novos empregos qualificados neste setor.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Produzir e avaliar a eficiência de antígenos sintéticos, dos agentes virais HIV 1-2, HTLV 1-2, HCV para o desenvolvimento de um teste multiplex de diagnóstico.

4.2 Objetivos específicos

- a) Selecionar em bancos de dados públicos regiões de aminoácidos potencialmente antigênicas dos vírus HIV 1-2, HTLV 1-2, HCV e construir antígenos sintéticos *in silico*;
- b) Expressar, purificar e caracterizar os antígenos obtidos em sistema de expressão procariota e eucariota, para posteriores ensaios de validação através da técnica de ELISA;
- c) Determinar a especificidade, sensibilidade e antigenicidade dos antígenos obtidos através de ensaios de microarranjos líquidos (xMAPLuminex), utilizando painéis de soro de referência;
- d) Desenvolver um teste diagnóstico multiplex usando microarranjos líquidos (xMAPLuminex);

5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

5.1 Construção dos antígenos

Sequências codificantes de aminoácidos de várias proteínas dos HIV1, HIV2, HTLV1, HTLV2 e HCV que foram isolados exclusivamente no continente sul-americano, foram obtidos em bancos de dados como *Los Alamos* ou *National Center for Biotechnology Information-NCBI*. Primeiro, as sequências foram alinhadas utilizando o algoritmo MultAlin (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin.html>) o qual permite a geração de uma sequência consenso. Segundo, a sequência consenso resultante foi usada para a busca por homologia mais alta entre sequências virais circulando, usando o algoritmo Blast-p (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Para gerar antígenos recombinantes completos, foram escolhidas sequências que após o alinhamento em Blast-p apresentaram uma identidade maior do que 90%. Para gerar antígenos recombinantes truncados, sequências com homologia de 90% foram analisadas quanto aos seus perfis de hidrofobicidade *Kyte-Doolittle* (<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>). As regiões hidrofílicas foram utilizadas (as hidrofóbicas excluídas) e intercaladas por uma sequência espaçadora de DNA (GPGPG) (LIVINGSTON et al., 2002). Estes espaçadores evitam a formação de neoepítomos imunogênicos inespecíficos, devido à fusão de regiões selecionadas. Os antígenos sem região trans-membrana (Δ) foram construídos a partir das sequências de DNA consenso descritas acima. As regiões transmembranas foram identificadas com o programa TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) (KROGH et al., 2001) e uma análise do perfil de hidrofobicidade com *Kyte-Doolittle* com *window size* 19 feito para confirmar a tirada de sequências com alta hidrofobicidade, correspondendo às regiões trans-membranas.

Os antígenos cepa específicos de HIV e HTLV foram construídos a partir de sequências de DNA encontradas em banco de dados ou publicações científicas (TALHA, 2011).

Sobretudo, as sequências de DNA foram flanqueadas por sequências contendo sítios de restrição, sequência Kozak, sítios de clivagem Kex e STOP códon, necessários para a subclonagem em plasmídeos e expressão.

As sequências antigênicas obtidas foram otimizadas para a expressão em *Escherichia coli* e em caso de antígenos consenso também para levedura, através

do algoritmo genético do programa LETO 1.0 (Entelechon®) ou foi realizado pela empresa que os sintetizou. O intuito foi aumentar a eficiência de tradução, a estabilidade de RNA e assim melhorar a expressão da proteína nos sistemas de expressão. Na otimização foram incluídos parâmetros para modificação da sequência nativa, como *códon usage*, estrutura secundária do mRNA, distribuição do conteúdo de GC e sítios internos de restrição. Estas modificações são realizadas por mutações pontuais silenciosas. Os sítios flanqueados nas sequências de DNA dos antígenos foram bloqueados para não ocorrer a otimização.

Em seguida as sequências de DNA foram enviadas para síntese comercial (Geneart®/Alemanha ou Genescript®/EUA).

5.2 Expressão em Sistema Eucarioto

5.2.1 Vetores de Expressão e subclonagem

Para obter plasmídeos que permitem a expressão e secreção dos antígenos em levedura foi usado o vetor pKLAC2 que não contém um tag e pKLCF-C e –N que contém um CBD-tag no C- ou N-terminal, respectivamente (ANEXO C).

Para subclonagem em vetor pKLAC2, os antígenos sintetizados e o vetor foram cortados com as enzimas de restrição XhoI (NEB®) e NcoI (NEB®) por 6h à 37°C. O vetor, adicionalmente, foi tratado por 30min com fosfatase alcalina (NEB®) para defosforilação dos terminais. Os fragmentos e o vetor linearizado foram separados pelo 1-1.5% gel de agarose e purificados através do kit NucleoSpin Extract II (Machery-Nagel®). Em seguida uma reação de ligação usando insert (antígeno) e vetor (pKLAC2) no ratio 1:1 e 3:1, com T4 DNA Ligase (Invitrogen®) por 16h a 16°C foi feito e no dia seguinte uma transformação das reações em *E. coli* DH10B foi realizada. DNA plasmídeo dos clones foi extraído no Miniprep com o QiaprepSpin Kit (Qiagen®) e a obtenção dos plasmídeos certos verificados cortados com enzimas de restrição.

Para subclonagem em vetores pKLCF-C- ou –N foram construídos iniciadores os quais contém alguns nucleotídeos específicos do antígeno, como também sítios de restrição e outros sítios necessários para a subclonagem e expressão (Tabela 5). Em seguida, foram feitas as PCR, usando antígenos consenso em vetor comercial como molde e incluindo em concentrações finais: 25pmol de iniciador 5´ e 3´, 1.5mM MgCl₂, 200µM dNTP´s, 1U proofreading Platinum Taq HIFI (Invitrogen®). As reações foram realizadas em máquina de PCR Mastercycler Gradient (Eppendorf®) a 95°C 3min, 95°C 30seg – 60°C 30seg – 72°C 1 até 2.5min. (dependendo do tamanho do produto) por 30 ciclos e um passo final à 72°C por 5min. O produto de PCR foi separado por 1-1.5% gel de agarose e purificado seguindo o protocolo do kit NucleoSpin Extract II (Machery-Nagel®). Após o produto de PCR foi ligado em vetor pDRIVE/Qiagen PCR cloning Kit (Qiagen®) usufruindo os *A-sobrepostos* gerados durante a PCR. As ligações foram transformadas em *E. coli* DH10B e estriada em placas LB com Ampicilina de 50µg/ml com presença de X-gal/IPTG para seleção de colônias beta-galactosidase negativas. Após a verificação de clones por restrição com enzimas de restrição e o sequenciamento com iniciadores (M13forward, reverso

ou T7 promotor), os antígenos e vetores foram cortados com NotI e StuI para subclonagem em pKLCF-N e XhoI e SbfI para pKLCF-C e a ligação realizada como descrito acima.

Quadro 5- Lista de iniciadores construídos para subclonagem de antígenos em vetores pKLCF

	Antígeno	Seqüência (5' - 3')
Forw	p24HIV1_N terminal	ACCG GCGGCCGCGATGACGATGACAAG CCTAGGACCCTGA ATGCCTGGGTGAAGGTG
Rev	p24HIV1_N terminal	ACCG AGGCCTT <u>CA</u> ACCACCAACACCTTGACAAGCTGTCATCA TTTC
Forw	p24HIV1_C terminal	ACCG CTCGAGAAAAGA CCTAGGACCCTGAATGCCTGGGTGA AGGTTGT
Rev	p24HIV1_C terminal	ACCG CTGCAGGCTTGT CATCGTCATC ACCACCAACACCTTG ACAAGCTGTCATCATTTTC
Forw	ENVHTLV1_N terminal	ACCG GCGGCCGCGATGACGATGACAAG ATGGGAAAATTCTT GGCTACTTTGATAC
Rev	ENVHTLV1_N terminal	ACCG AGGCCTT <u>CA</u> TAAACTACTCTCCGGATTGATCAAAGAGT AGTGTGGG
Forw	ENVHTLV1_C Terminal	ACCG CTCGAGAAAAGA ATGGGAAAATTCTTGGCTACTTTG
Rev	ENVHTLV1_C Terminal	ACCG CTGCAGGCTTGT CATCGTCATC ACTACTCTCCGGATT GATCAAAGAGTAGTG
Forw	gp120ΔHIV1_N terminal	ACCG GCGGCCGCGATGACGATGACAAG GTTTACTACGGAGT CCCAGTTTGAAAGAGGC
Rev	gp120ΔHIV1_N terminal	ACCG AGGCCTT <u>CA</u> GACCACTTGTCTTTAGCTTTGTTGGTG CCTACTCC
Forw	gp41ΔHIV1_N terminal	ACCG GCGGCCGCGATGACGATGACAAG TTGTTCTTGGGATT TCTTGAGCAGCAGGTAGC
Rev	gp41ΔHIV1_N terminal	ACCG AGGCCTT <u>CA</u> TTTGGAAATATCAAACCAGTTCCACAAAG AAGCCC

Fonte: a autora

Nota: (**Forw**) iniciador 5', (**Rev**) iniciador reverso 3', (**Azul**) sítio para NotI, (**Vermelha**) sítio para *Enterokinase clivage side* (**DDDDK**), (**Verde**) sítio para StuI, (**Lilais**) sítio par XhoI, (**Laranja**) sítio KEX, (**rosa**) sítio para SbfI, (**Preto underline**) STOP códon;

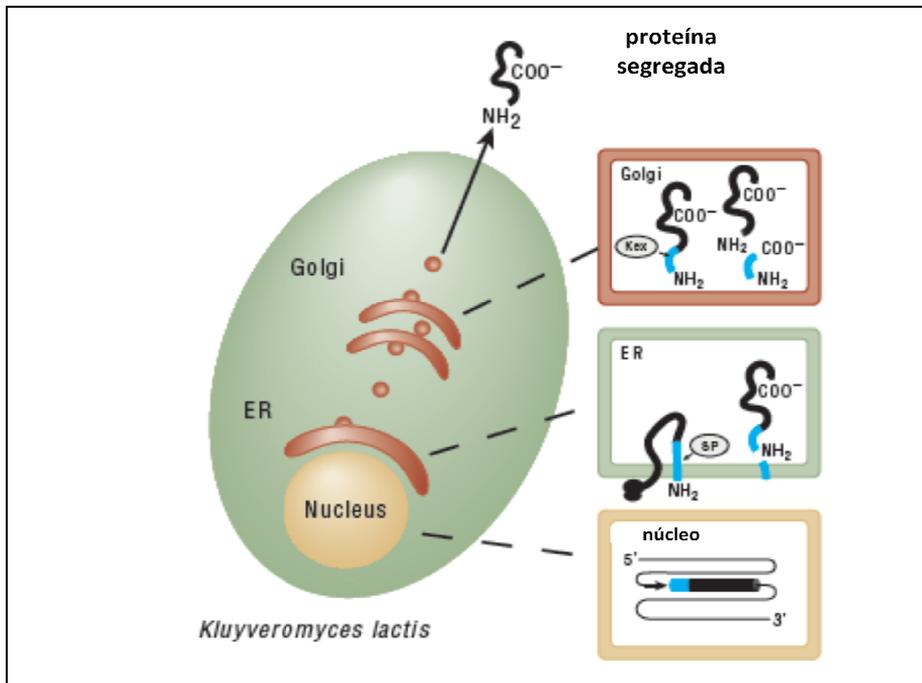
5.2.2 Transformação das células de levedura *K. lactis*

Para a transformação dos antígenos em sistema de levedura foi seguido o protocolo do kit comercial *K. lactis Protein Expression Kit* (NEB®). Os antígenos foram inseridos no plasmídeo de tal forma que a proteína expressa pode ser secretada no meio da cultura.

Para conseguir a secreção, o antígeno tem que ser subclonado no vetor após do *α-mating fator domínio* (ingl. *α-MF domain*). Após inserção do plasmídeo no genoma da levedura por recombinação homóloga uma proteína de fusão (antígeno e

domínio α -MF) é expressa. Este domínio guia a proteína de fusão pela via de secreção da levedura (ingl. *yeast secretion pathway*) (Figura 24).

Figura 24- Processo de secreção da proteína recombinante expressa em *K. lactis*



Fonte: New England Biolabs (2011)

Nota: A proteína recombinante (linha preta) contém após expressão um domínio α -MF (linha azul) no seu N-terminal usada para entrada na membrana do retículo endoplasmático, onde a peptidase de sinal (SP) corta e libera a proteína para ser guiada ao aparelho de Golgi, onde a protease Kex corta e libera a proteína para secreção.

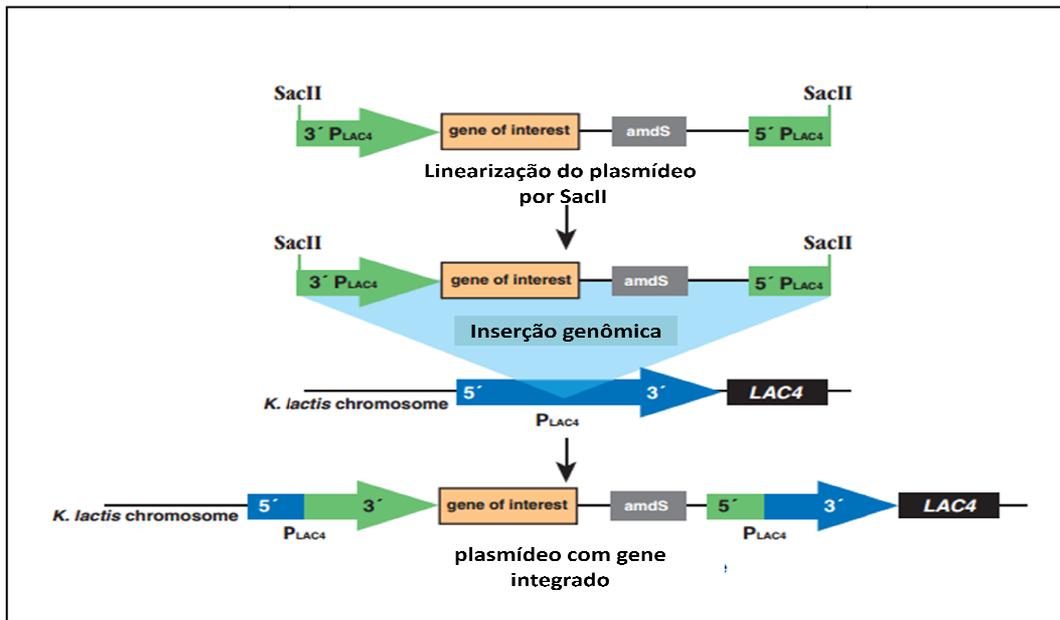
Um peptídeo de sinalização presente no domínio direciona a translocação para o lúmen do *retículo endoplasmático* (RE) e em seguida é removida por *peptidase de sinal* (ingl. *signal peptidase*). Vesículas de secreção transportam depois a proteína de fusão para o aparelho de Golgi onde a endoprotease *Kex* corta o domínio α -MF. Isto leva a libertação da proteína antigênica que é transportada novamente em vesículas para a membrana plasmática e secretada para o exterior da célula.

5.2.2.1 Transformação das células

Dois μ g do plasmídeo pKLAC2 ou pKLCF-C/N com antígeno subclonado foram linearizados com 20U SacII (NEB®) em volume de 50 μ l total por 2h à 37°C. Após controle de restrição de uma alíquota em gel de agarose, o plasmídeo foi

purificado pelo Núcleo Spin Extract II Kit (Machery-Nagel®). O vetor linearizado forma após transformação e inserção no genoma da levedura um cassete de expressão. A expressão é conduzida sob controle do *K. lactis* *LAC4* promotor (Figura 25).

Figura 25- Inserção do plasmídeo no genoma da levedura



Fonte: New England Biolabs (2011)

Nota: A enzima de restrição *SacII* é usada para linearizar o plasmídeo antes da transformação, para conseguir a inserção pela recombinação homóloga no genoma da levedura. Juntando as partes do promotor no plasmídeo com os no genoma, vai formar novamente um *LAC4* promotor completo (5' e 3'), usado para expressão da proteína desejada (nosso caso, o antígeno).

A inserção do vetor ocorre na região do promotor do *LAC4* locus, dessa forma destruindo o promotor presente no genoma da levedura. Todavia, o vetor contendo partes modificadas do mesmo vetor que após sua inserção se juntam com esses do genoma, formando assim novamente um promotor funcional.

Para a transformação das leveduras, um tubo com 200µl *K. lactis* GG799 (NEB®) foi descongelado em gelo sob condição estéril no fluxo e misturado com 620µl tampão NEB do kit. Com esta mistura de células/tampão podem ser feitas até 8 transformações de antígenos diferentes. Assim 100µl das células/antígeno foram transferidas para um novo tubo de Eppendorf e 120ng plasmídeo linearizado adicionado às células. Tudo foi incubado por 30 minutos na estufa à 30°C. Após, um choque térmico foi aplicado e as células incubadas por 1h à 37°C no banho Maria. Em seguida, as células foram centrifugadas à 7000rpm por 2 minutos e resuspendidas para lavagem em 0.5ml meio YPGLU (10g Yeast extrato, 20g Bacto

Peptone, 950ml ddH₂O, autoclavagem por 20 min. 121°C, adicionado 50ml 40% glucose estéril). Após mais uma etapa de centrifugação, o pellet foi resuspenso em 1ml YPGLU, transferido para um tubo de vidro e incubado por 3-4h à 30°C sob agitação a 200rpm num shaker. As células transformadas foram transferidas para um tubo de Eppendorf, centrifugadas por 2 minutos à 7000 rpm, resuspenso em 100µl 1xPBS estéril e plaqueadas em placa YCB contendo 5mM Acetamide (15ml 1M Tris-HCL, 5.85g YCB MEDIUM powder (Kit), 10g Bacto Agar, 495ml ddH₂O, autoclavado por 20min 121°C, baixar temperatura até 60°C, adicionado 5ml 100x Acetamide Stock Solution (kit). Em seguida, as placas foram incubadas por 4 dias a 30°C.

A acetamida na placa é usada para seleção positiva dos clones transformados, fornecendo uma fonte de nitrogênio no *meio mínimo livre de nitrogênio* (ingl. *nitrogen free-minimum medium*), necessário para o crescimento das células. O gene acetamidase (*amdS*), presente no vetor, codifica a acetamidase a qual, após a sua inserção no genoma da levedura, é expressa. Essa é capaz de quebrar a acetamida presente no agar para o amônio, usado como fonte de nitrogênio. A vantagem deste método de seleção é a possibilidade de enriquecer populações de células que têm integradas múltiplas cópias do vetor e assim produzem mais proteína recombinante.

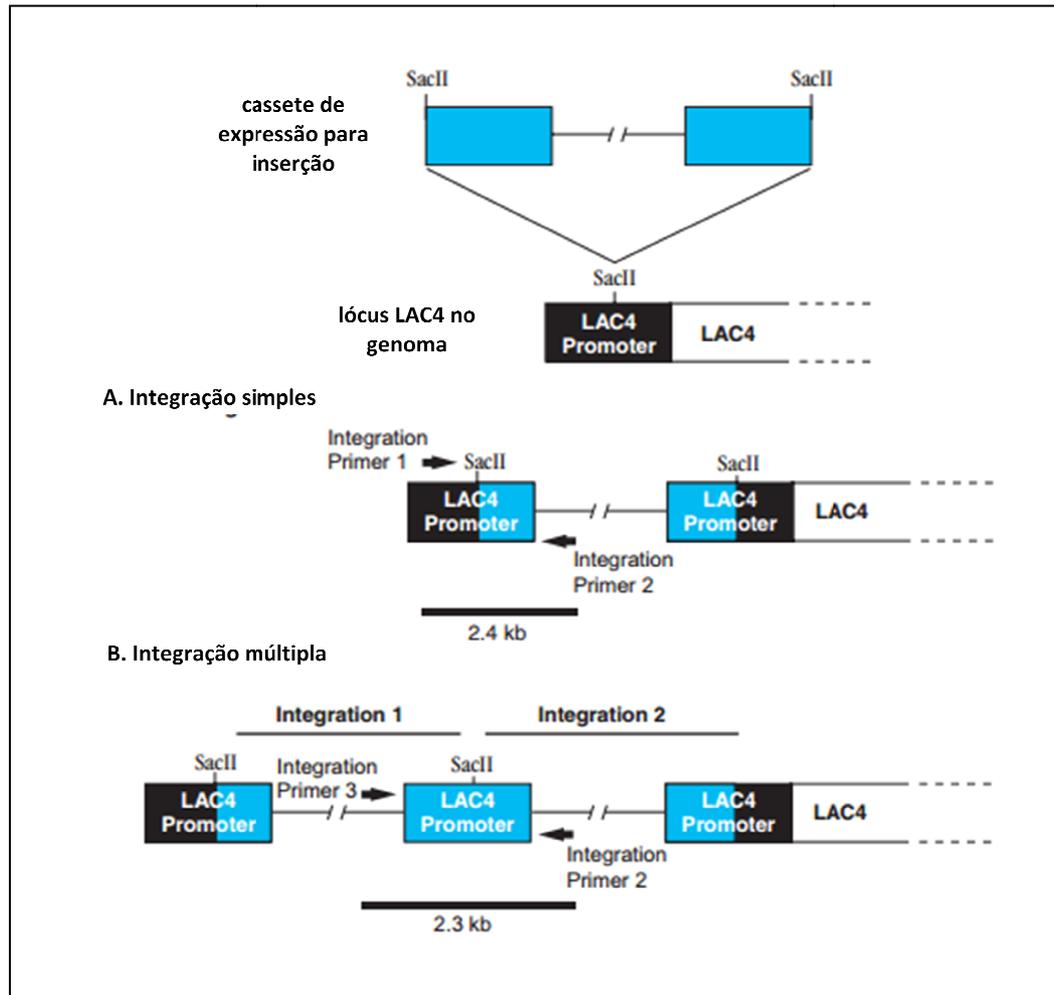
5.2.2.2 Verificação da inserção do plasmídeo

Para verificar a recombinação homóloga dos plasmídeos na levedura, cada colônia selecionada foi inoculada em 20ml YPGLU com 2% Glucose e incubado pela noite à 30°C num *shaker* à 200rpm. No dia seguinte, o DNA foi isolado (Miniprep) da seguinte maneira: a cultura foi concentrada por 2min a 3000rpm e o pellet transferido em 1ml ddH₂O para um tubo de 1.5ml Eppendorf. A centrifugação foi repetido e o pellet resuspenso em 400µl tampão SCE (1M Sorbitol, 0.1M NaAc, 60mM EDTA, pH7) + 2µl Zymolase (200mg/ml 1M Sorbitol) + 1.5µl β-mercaptoetanol e incubado por 1h à 37°C. Os tubos foram centrifugados a 13.000rpm por 10 minutos e o pellet usado para seguir o protocolo do Kit QIAprep Miniprep Spin (Qiagen®). Assim o pellet foi resuspenso em 300µl tampão P1 + 300 µl tampão P2 incubado por 3-5min. O mix foi neutralizado com 420 µl tampão N3 e centrifugado à 10.000 rpm por 10min. O sobrenadante foi aplicado numa coluna do kit, centrifugado por 1min a

10.000 rpm e lavado 1x com 0.5ml tampão PB e 1x com 0.75ml tampão PE. Em seguida, a coluna foi transferido para um tubo fresco de Eppendorf e o DNA da levedura eluido com 30 µl ddH₂O. Para verificar a presença e pureza do DNA 3 µl foram usados para correr um gel de agarose a 1% e 1 µl para quantificação no espectrofotômetro NanoDrop (Implen®).

Para verificação da integração e da integração múltipla foram feitas reações de PCR. Em volume de 20µl foram juntados 80ng de DNA extraído, 1µl de cada iniciador (10x *Integration Primer 1 + 2* ou 10x *Integration primer 2 + 3*) com concentrações finais de 1.5mM MgCl₂, 200µM dNTP's, 1x tampão de polimerase e 1U Taq DNA polimerase (Invitrogen®). A reação foi realizada em Mastercycler Gradient (Eppendorf®) à 95°C 3min, 95°C 1min – 58°C 1min – 72°C 2min por 28x, 72°C 5min. Em seguida, 10µl da reação foi corrida num 1% gel de agarose, corado com brometo de etídeo. Os iniciadores fazem parte do kit e são construídos da seguinte forma (Figura 26): durante a integração simples do vetor no genoma da levedura, o promotor LAC4 é formado por uma parte 5' do genoma da levedura e uma parte 3' do vetor. O *Integration Primer 1* se encontra na parte 5' e o *Integration primer 2* no parte 3' do promotor, gerando assim um produto de PCR com tamanho de 2.4kb. Durante a integração múltipla, vários vetores são inseridos um atrás do outro no mesmo local, assim formando também um promotor interno, consistente por partes 5' e 3' do vetor. A parte 5' vem do primeiro vetor integrado e a parte 3' do vetor inserido em seguida. O *Integration primer 3* é localizada no parte 5' do promotor vetorial, gerando um produto de PCR com *Integration primer 2* no tamanho de 2.3kb.

Figura 26. Localização dos iniciadores para verificação da Integração pela PCR



Fonte: New England Biolabs (2011)

Nota: A figura mostra o *cassete de expressão* (azul) usado para a integração no LAC4 promotor do genoma da levedura (preto). Sinalizado é o posicionamento dos iniciadores (primers) para verificar a integração simples ou múltipla do *cassete de expressão*, utilizando primer 1 e 2 ou 3 e 2, respectivamente.

5.2.3 Expressão e Purificação de proteínas

5.2.3.1 Expressão em Mini- e Midiescala

Para melhor identificação, colônias individuais foram selecionadas e transferidas, de modo ordenado, para uma nova placa e incubadas por mais 1-2 dias a 30°C na estufa. Usando uma ponteira, as colônias foram inoculadas em 2ml YPGLU, incubadas o.n. a 30°C num *shaker* e no dia seguinte um estoque de glicerol feito usando uma solução de 20% glicerol estéril. De acordo com o protocolo do kit para a expressão, também estas colônias individuais foram inoculadas em 2ml YPGAL (10g Yeast extract, 20g Bacto Peptone, 950ml ddH₂O, autoclavagem por 20 min 121°C, adicionado 50ml 40% galactose estéril) e incubados por 2 dias a 30°C num *shaker* com 200rpm velocidade, até uma densidade ótica OD₆₀₀ >30. Um ml da cultura foi transferido num tubo de Eppendorf, centrifugado por 30seg e o sobrenadante avaliado em 15-20% SDS-PAGE.

5.2.3.2 Crescimento com inibidores e albumina

Na expressão de proteínas recombinantes em outras cepas de levedura como *Pichia pastoris*, foram descritos problemas com a proteólise. Uma das estratégias para modificar este problema foi o uso de inibidores de protease no meio de cultura (JAHIC et al., 2003; ZHANG et al., 2007), como também o uso de albumina, conhecida em reduzir as atividades das proteases (WWW.PIERCENET.COM). Para testar a influência de inibidores de protease e a albumina na expressão das proteínas em *K. lactis* foi crescido um clone com pKLAC2-p24HIV1 em 5ml meio líquido YPGAL 2% (1) por 2 dias a 30°C num *shaker*, adicionando 200µl 25x Inibidores de Protease (Roche®), 0.1% ou 0.5% albumina bovina (Sigma®).

5.2.3.3 Teste de concentração e tempo de incubação com Galactose

Mostrou-se que a expressão de algumas proteínas em levedura *K. marxianus* depende da concentração da Galactose. Foi observada uma redução da expressão quando concentrações altas de Galactose foram utilizadas (GONDIM MARTINS et al., 2002). Assim foram testados a concentração e o tempo de indução com

Galactose na expressão das proteínas com *K. lactis*. Foi feito um *time course* de 15min, 30min, 1h, 2h, 4h, 8h, 24h e 48h com concentrações de Galactose à 2%, 0.2%, 0.02% e 0.002% em meio YP.

5.2.3.4 Teste de temperatura e uso de EDTA

Temperaturas altas de cultivo de levedura são conhecidas por induzir morte celular e aumento de atividades proteolíticas. Assim ao contrário, baixando a temperatura há uma estabilidade maior de proteínas recombinantes, liberação de menos proteases e diminuição de dobramento incorreta de proteínas (ZHANG, 2007). Assim foram avaliados a temperatura de crescimento a 30°C e a 23°C com concentração de Galactose de 2% por 2 dias e 0.2% por 2h. Sobretudo, a acumulação de proteínas pode ser evitada e aumentando a indução de 3-5x, usando 5mM EDTA no meio de cultura (ZHANG, 2007). Assim, o efeito de EDTA no meio da cultura YP no sistema *K. lactis* foi testado.

5.2.3.5 Teste de pH em meio de cultura (YP)

A observação de uma atividade mais baixa de proteases em meio de cultura com pH baixo e a capacidade da levedura *P. pastoris* crescer sob pH 3-7 (ZHANG et al., 2007), levou a testar o pH no meio de cultura para crescimento de *K. lactis*. Assim foi feito um *time course* (15min, 30min, 1h, 2h, 4h, 8h, 24h e 48h) a 30°C, a200rpm, num *shaker*, usando 2% e 0.2% de Galactose em meio YP de pH 7, 5, 4 e 3. Para ajustar o pH do meio foi usado a 85% solução de H₃PO₄ antes da incubação (JAHIC et al., 2003).

5.2.3.6 Teste do tipo de meio de cultura (YNB, YLU)

A combinação do conteúdo do meio de cultura de levedura pode influenciar o crescimento celular e a viabilidade ou a secreção de proteases extracelulares. O uso de peptona ou casamino ácido no meio de cultura pode agir como substrato da competição para proteases e assim reprimir a proteólise (ZHANG et al., 2007). Sobretudo, a falta de nitrogênio no meio da cultura, pode levar ao aumento de atividade de proteases (comunicação pessoal com Dr. Marco Morais/Genética,

UFPE). Também em *K. lactis*, foi reportado o uso de meios diferentes para aumentar a expressão de proteínas recombinantes de até duas vezes (YIN et al., 2010). Assim foram cultivados a 30°C, a 200rpm, num *shaker* o clone pKLAC2-p24HIV1 em YNB (0.67% Yeast Nitrogen base powder, 2% Peptona) ou YLU (1.2% Yeast extrato, 0.5% Úrea) usando 2%, 0.2%, 0.02% ou 0.002% de Galactose por 15min, 30min, 1h, 2h, 4h, 8h, 24h e 48h.

5.2.3.7 Concentração com PEG₃₃₅₀

Seiscentos mililitros de meio de cultura YPGAL a 2% foram inoculados com *K. lactis* transformado por p24HIV1 e incubado a 200rpm num *shaker* por 2 dias a 30°C, chegando a uma densidade ótica de (OD₆₀₀) de 55. O protocolo a seguir foi realizado de SIMARD et al., (2001). A cultura foi centrifugada por 5 minutos à 5000rpm, 200ml sobrenadante misturado com 15%, 30% ou 60% PEG₃₃₅₀ em 0.4M NACL para obter concentrações finais de PEG₃₃₅₀ de 5%, 10% e 20% respectivamente e incubado por 6h sob agitação à 4°C. Em seguida o PEG foi concentrado pela centrifugação à 2000 rpm por 20 minutos, o tubo invertido num papel toalha para secagem por 5-10 minutos e em seguida dissolvido em 2ml PBS/0.15M NACL + inibidores de protease (Roche®). Tubos de diálise (MW 12.000-14.000, Sigma-Aldrich®) foram preparados por aquecimento a 60°C em 0.1M Sódio bicarbonato/0.01M EDTA pH7 e a mistura PEG transferido para diálise em 2L água Milli-Q (Millipore®) *overnight* a 4°C. No dia seguinte a água foi trocada cada 2h por mais 2x e substituído por 1xPBS por 5h. O tubo de diálise em seguida foi colocado por 15 minutos numa camada de PEG₃₃₅₀ para reduzir o volume do líquido e o líquido transferido para um tubo fresco de Falcon (LI et al., 2011; SHARMA et al., 2004).

5.2.3.8 Concentração por Chitin Beads

Para a concentração dos antígenos no vetor pKLCF-C ou pKLCF-N, as leveduras foram incubadas em 10ml meio YPGAL 2% em Erlenmeyer de 100ml por 2 dias à 30°C. Ao longo do procedimento foram tirados diferentes controles para detectar uma eventual perda da amostra (*pellet*, *flow through*, lavagem, resina). As células foram separadas do sobrenadante por centrifugação à 3000rpm por 5min e o

pellet guardado como *controle pellet*. Ao mesmo tempo, 500µl de *Chitin Beads* foram lavados 3x com 1ml 10mM Tris pH7.4, adicionado ao 5ml sobrenadante da cultura e incubado sob agitação lenta em temperatura ambiental por 1h. A mistura foi aplicada em uma coluna Poly-prep (BioRad®), coletando uma alíquota do líquido que passou pela coluna, como *controle FT* (íngl. *Flow through*). A coluna foi lavada 3x com 1ml 10mM Tris pH7.4, a terceira lavagem foi coletada como *controle primeira LAV* (lavagem) e após mais duas lavagem com 1ml H₂O como *controle segunda LAV*. Para a eluição, três tubos de Eppendorf foram preparados com 100µl de tampão Neutralizante (1M Tris pH7.4) e as amostras eluidas 3x diretamente nos tubos pré-preparos com 500µl 20mM NaOH, sendo *eluato I, II e III*.

5.3 Expressão em Sistema Procarioto

5.3.1 Vetores de Expressão e subclonagem

Para obter plasmídeos que permitem a expressão de antígenos em bactéria com uma cauda de histidina (HIS-tag) no N-terminal foi usado o vetor pRSETA para cauda de histidina no C-terminal o pET21d e o pET28a para N- e C-terminal dependendo da estratégia de restrição escolhida (ANEXO D).

Os antígenos sintetizados comercialmente e os vetores foram cortados com as enzimas de restrição necessários para subclonagem:

pRSETA: SpeI/NcoI (NEB®) e NheI/NcoI (NEB®), respectivamente

pET21d: XhoI/NotI (NEB®) e Sall/NotI (NEB®), respectivamente

pET28a: BAmHI e HindIII (N-terminal HIS) NcoI e EcoRI (C-terminal HIS)

por 6h à 37°C, os fragmentos e o vetor linearizados separados pelo 1-1.5% gel de agarose e purificados através do kit NucleoSpin Extract II (Machery-Nagel®). Em seguida foi realizada uma reação de ligação usando o insert (antígeno) e o vetor (pRSETA) no ratio 1:1 e 3:1, com T4 DNA Ligase (Invitrogen®) por 16h à 16°C. No dia seguinte foi realizada uma transformação das reações em *E. coli* DH10B. Alguns clones obtidos foram usados para extrair Miniprep-DNA com QiaprepSpin Kit (Qiagen®) e verificar os clones certos pela restrição com enzimas.

Para gerar os antígenos consenso sem região trans-membrana com HIS-tag no N-terminal, foram construídos iniciadores (Tabela 6) contendo os sítios de restrição necessários para subclonagem e um STOP códon. A PCR foi realizada

usando os antígenos consenso em vetor comercial como template, e incluindo em concentrações finais 25pmol de iniciador *forward* e *reverse*, 1.5mM MgCl₂, 200µM dNTP's, 1U proofreading Platinum Taq HIFI (Invitrogen®). As reações foram realizadas em máquina de PCR Mastercycler Gradient (Eppendorf®) a 95°C 3min, 95°C 30seg – 58°C 30seg – 72°C 1 até 2.5min (dependendo do tamanho do produto) por 30 ciclos e um passo final à 72°C por 5min.

Os produtos foram purificados em 1.5% gel de agarose e subclonados em vetor pDRIVE (Quiagen®). Após extração de DNA plasmídial, os clones obtidos foram verificados com enzimas de restrição e sequenciamento. Os insertos e o vetor pET28a foram cortados com BamHI e HindIII e a ligação feita do mesmo modo como descrito acima no uso de outros vetores.

Quadro 6- Iniciadores construídos para subclonagem de antígenos em vetor pET28/21 ou pET21a.

Antígeno	sequência 5' - 3'
gp120ΔHIV1	Forw: ACCGGGATCCGTTTACTACGGAGTCCCAGTTTGGAAAGAGGC Rev: ACCGAAGCTTTCAGACCACCTGTCTTTAGCTTTCGTTGGTGCC
gp41ΔHIV1	Forw: ACCGGGATCC TTGTTCTTGGGATTTCTTGGAGCAGCAGGTAGC Rev: ACCGAAGCTTTCAGTTGGAAATATCAAACCAGTTCACAAAGAAGCCC
gp125ΔHIV2	Forw: ACCGGGATCCCAACTTGGAAGAATGCAACAATTCCATTG Rev: ACCGAAGCTTTCAGTCTGGTATGTCTTCCATGTGCAGAAGAG
gp36ΔHIV2	Forw: ACCGGGATCCAGATTGAGGAAAGGTTACAGACCTGTTTTC Rev: ACCGAAGCTTTCAGCAATTTAGCACCCTGTCTGATTCTTC
gp36ΔinternoHIV2	Forw: ACCGGGATCCACAGTCTCAGCACAGTCTCGTACTCTTTTG Rev: ACCGAAGCTTTCAGTGAATGTATTTACCCAACCTGGTCAAATC
gp46ΔHTLV1	Forw: ACCGGGATCC TCTCCTTCTGTTGCACTTTGACTGTTGG Rev: ACCGAAGCTTTCAGTGAACCCAACGTCGGCACTGGTGACAAGGA
gp21ΔHTLV1	Forw: ACCGGGATCCAGGATTACTGGTTCCATGAGCTTGGCTTCT Rev: ACCGAAGCTTTCAGTGAATGCTTCCCTAGCCCACTGGCTCAGACCC
gp21ΔHTLV1_2	Forw: ACCGCCATGGCTATCGCTCAGTATGCTGCACAGA Rev: ACCGCTCGAGGAAAACCTCTGTTTTCCAATGGAGG
gp52ΔHTLV2	Forw: ACCGGGATCC TGTACTCTTACAATCGGTATCTCATCCTAT Rev: ACCGAAGCTTTCAGTTGCTGGTGGTGAACCGGAGCTAATGA
HCV_CORE 1-117	Forw: ACCGCCATGGATGAGCACGAATCCTAAACCTCAA Rev: ACCGCTCGAGACGCGACCTACGCCGGGGTCCGT

Fonte: a autora

Nota: (Forw) iniciador 5', (Rev) iniciador reverso 3', (vermelho no Forw) sítio para BamHI, (vermelho no Rev) sítio para HindIII, (verde) STOP códon; (azul no Forw) sítio para NcoI, (azul no Rev) sítio para XhoI

5.3.1.1 Sequenciamento das construções

O sequenciamento de construções de antígenos em vetor de subclonagem (pDRIVE) foi feito no Serviço de Plataforma Tecnológica do CPqAM. DNA (10-40ng) dos plasmídeos foi usado com 3.2 pmol do primer M13Rev ou M13For (Tabela 7), 0.5µl Big Dye, 1µl *Save Money Tampão* e H₂O adicionada para volume de 10µl. A reação foi incubada por 2 minutos a 92°C e em seguida 40 ciclos de: 92°C 15seg – 55°C 10seg – 60°C 4min e analisada no seqüenciador *ABI PRISM 3100* (Applied Biosystems®).

Quadro 7. Iniciadores usados para o sequenciamento

M13 Rev	5' AACAGCTATGACCATG 3'
M13 Forw	5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'

Fonte: a autora

Nota: (Rev) iniciador reverso 3', (Forw) iniciador 5'

5.3.2 Transformação das células bacterianas *E. coli*

Os plasmídeos com os antígenos recombinantes foram transformados em *E. coli*, cepa *BL21 Star* (Invitrogen®) usando o método do choque térmico e plaqueados em agar seletivo LB com 50µg/ml Ampicilina (vetor: pRSETA, pET21) ou 30µg/ml Kanamicina (vetor: pET28a).

5.3.3 Expressão e Purificação das proteínas

5.3.3.1 Expressão em Miniescala

Para pré-teste (pequena escala), colônias foram inoculadas o.n. à 37°C e no dia seguinte 100µl da cultura transferida em 4ml meio LB com Ampicilina ou Kanamicina, crescendo até OD₆₀₀ de 0.5. Após, 1ml foi transferido para um novo tubo e incubado com e sem 1mM IsoPropil-beta-D-TioGalactopiranosídeo(IPTG) por 4h a 30°C. Em seguida a cultura foi transferida para um tubo de Eppendorf, centrifugada e o pellet ressuspendido em 100µl 1x PBS + 4µl 25x Inibidores de

Protease (Roche®). Para verificar a expressão, 20µl foram misturados com 20µl 2xLaemli, aquecido a 95°C por 10 min. e 10-20µl separado no 15% SDS-PAGE. Após corrida, o gel foi corado em *Azul de Coomassie* (veja receita pg. 101)

5.3.3.2 Expressão em Midi- e Larga escala

Para expressão em midi ou larga escala 20 ou 40 ml de meio LB, contendo Ampicilina ou Kanamicina, foram inoculadas com BL21 transformadas com plasmídeos e crescidas o.n. a 37°C. No dia seguinte, foram misturados com 200ml ou 400ml, respectivamente e deixado crescer dependendo do experimento até OD₆₀₀ de 0.5 ou 0.8. A indução foi feita com IPTG em concentrações de 0.5mM por 4h ou 0.3mM por 2h a 30°C ou 25°C.

5.3.3.3 Purificação sem uréia e Resina de Níquel

Para a purificação de antígenos com cauda de histidina, uma cultura de bactéria em midi ou larga escala foi usada. Após indução a cultura foi precipitada através da centrifugação à 5000rpm por 10 minutos à 4°C. A purificação foi feita para alguns antígenos com tampão a base de NaH_2PO_4 , ou com base em *Tris*. O pellet foi resuspendido em 10ml (midi escala) ou 20ml (larga escala) tampão A (50mM NaH_2PO_4 ou 50mM *Tris*, 300mM *NACL*, 20mM *Imidazol*, pH8). O conteúdo foi transferido para um *béquer* de vidro em gelo e sonificado por 6 pulsos à 30seg com intervalo de 59seg. Logo após, foi transferido num tubo de GSA e 100-200µl de *Triton-X* foi adicionado. O tubo foi centrifugado a 10.000 rpm, 4°C por 10 minutos. O pellet foi usado como *controle pellet* e resuspendido em 300µl *Laemli*. O sobrenadante foi resuspendido com 200µl resina *NI-NTA* (*Qiagen*®) anteriormente equilibrada e lavada 3x com 10ml tampão A. Tudo foi deixado sob agitação por 1h a 4°C. Em seguida, a mistura foi centrifugada e 100µl do sobrenadante usado como *controle Flowthrough (FT)*. O pellet, contendo a resina, foi transferido para um tubo de *Eppendorf* e submetido a cinco lavagens com tampão B gelado (50mM NaH_2PO_4 ou 50mM *Tris*, 300mM *NACL*, 40mM *Imidazol*, pH8). A última lavagem foi deixada por 5 min. sob agitação a 4°C e 100µl do sobrenadante usado como *controle LAV*. Para eluir a proteína da resina foram usados 2x 300µl tampão C (50mM NaH_2PO_4 ou 50mM *Tris*, 300mM *NACL*, 0.5M *Imidazol* pH8) e deixado por 30 minutos sob

agitação a 4°C. Após centrifugação à 5000rpm 4°C 2min, o eluato foi armazenado em alíquotas, contendo inibidores de protease, a -20 e -80°C.

5.3.3.4 Purificação com uréia e Resina de Níquel

A proteína pode ficar insolúvel, presa na fração sólida da bactéria e assim necessita uma purificação usando uréia (VALLEJO et al., 2004). O pellet bacteriano usado para sonicar é resuspendido em PBS em vez de tampão A. Após centrifugação das bactérias sonicadas, o sobrenadante foi descartado e o pellet resuspendido em tampão A com 8M ou 6M uréia e deixado o.n. sob agitação na câmara fria. No dia seguinte, a suspensão foi centrifugada a 10.000rpm por 10min, 4°C e o sobrenadante misturado com a resina. A purificação continuou da mesma forma como descrito acima. Todavia, todos os tampões (lavagem e eluição) também contém 8M ou 6M úreia. Devido à uréia ter efeito desnaturante e precisar ser tirada para renaturação da proteína, uma diálise é necessária após a purificação (VALLEJO et al., 2004)

5.3.3.5 Purificação pelo método: Matrix-assisted in vitro purification

O protocolo para esta técnica foi baseado em REHM et al., 2001, com modificações de tal forma, que para a purificação dos corpos de inclusão foi usado o nosso protocolo de standard, com 8M uréia, descrito acima. A vantagem desse método de purificação é que não necessita a diálise no final do procedimento.

Dez ml do sobrenadante contendo as nossas proteínas foram incubados por 1h com 500µl resina de Níquel. Após, a resina foi aplicado num *Poly-Prep Chromatography Column* (Bio-Rad®) e lavado, com 1ml de cada tampão contendo concentrações de uréia diferente 6M (50mM Tris, 300mM NaCL, 40mM Imidazol, pH8), 4M, 2M, 1M, 0.5M (20mM Tris, 500mM NaCL, pH 7.5) e sem uréia (50mM Tris, 300mM NaCL, 40mM Imidazol, pH 8). Em seguida a coluna foi tampada, 200µl tampão de eluição (50mM Tris, 300mM NaCL, 0.5M Imidazol, pH8) aplicada e incubada a 4°C por 30minutos. O conteúdo foi coletado e mais 2x 200µl tampão de eluição aplicada. A coleta foi feita instantânea, sem tempo de incubação.

5.3.3.6 Diálise das proteínas

Após purificação com uréia, foram usados dois sistemas diferentes para diálise.

5.3.3.6.1 Método utilização de detergente

Cem µl do primeiro eluato é diluído 1:20 com tampão ASB (PBS e 0.1% detergente ASB-14 (Sigma®)) e transferido nos tubos de diálise antecipado incubados em PBS por 5min. As proteínas são dialisadas usando 0.5 litro/saquinho em 1xPBS não-esteril, sob agitação, na câmara fria. O PBS é trocado 4 vezes a cada 2 horas e inclui uma incubação pela noite (ALLONSO et al., 2011)

5.3.3.6.2 Método acrescentar tampão para diluir a concentração de uréia

Para esta diálise foi usado 200ml do primeiro tampão (6M uréia, 20mM HEPES pH7.9, 300mM KCL, 0.1%NP-40, 5mM MgCl₂, 10% glicerol, 1mM DTT) por tubo de diálise, 2h 4°C sob agitador magnético. A cada 2h é acrescentado um segundo tampão (igual à *buffer I* mas sem uréia) resultando na diluição do primeiro tampão, levando à concentrações cada vez mais baixas de uréia. Foi adicionado o segundo tampão da seguinte forma: +35ml (=5M uréia) por 2h, + 50ml (= 4M uréia) por 2h, +75ml (=3M uréia) por 2h, + 120ml (= 2M uréia) por 2h. Depois foi tirado 250ml tampão e adicionado 250ml segundo tampão novo (= 1M uréia), deixado o.n a 4°C. No próximo dia, foi subtraído novamente 250ml do tampão e adicionado 250ml novo segundo tampão (= 0.5M uréia) por 2h. Em seguida foi descartado todo o tampão e adicionado 500ml do segundo tampão (= 0M uréia) por 1h. O último passo foi repetido. No final todo tampão foi descartado e adicionado 500ml do terceiro tampão (20mM HEPES pH 7.9, 100mM NaCL, 0.1% NP-40, 5mM MgCl₂, 10% glicerol, 1mM DTT) por 2h (<http://www.embl.de/~zinzen/levinelab/protocols/Dialysis%20Protocol>).

5.3.3.7 Concentração das proteínas

Após diálise, o conteúdo dos tubos precisava ser concentrado.

Para isto os tubos de diálise foram cobertos com açúcar mascavo por cerca 1 hora, sob refrigeração. Com este método é possível reduzir o volume de 2ml para cerca 500-750µl. Outra técnica usada para os antígenos com baixa concentração

(gp46 Δ HTLV1 e gp21 Δ HTLV1) foi o uso de concentradores Vivaspin 6/10.000MW (Santorius Stedim Biotech®), centrifugando o conteúdo do tubo de diálise por ~20 minutos a 4000g.

5.4 Análise das proteínas

5.4.1 Quantificação

A quantificação foi feita através do *método de densitometria* no SDS-PAGE utilizando o programa Labworks. Num 15% SDS-PAGE foi aplicada 10 μ l das amostras de proteínas recombinantes em tampão de Laemli, ao lado de um padrão de Albumina Sérica Bovina (BSA). A concentração do padrão estoque era de 1 μ g/10 μ l Laemli a qual foi diluída serialmente para concentrações finais de 0.5 μ g, 0.25 μ g e 0.125 μ g. Após a corrida, o gel foi corado em solução Azul de Coomassie (pg. 101), colocado em cima de um transluminador de luz branca e a intensidade das bandas determinada usando o *Área Density Tool* da *software Labworks* (UVP Bioimaging Systems®). A quantidade da amostra foi obtida pelo cálculo de todas as concentrações de BSA para 1 μ g. Sendo assim multiplicados o padrão 0.5 μ g por 2, 0.25 μ g por 4 e 0.125 μ g por 8. No final, tudo foi sumado e dividido por 4, correspondendo à $Y(= 1\mu\text{g}/\mu\text{l})$. Os valores das amostras obtidas, correspondendo ao valor X, foram usados para calcular a concentração por regra de três em $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

5.4.2 SDS-PAGE e WB

5.4.2.1 SDS-PAGE

O SDS-PAGE foi preparado em concentração de 12.5%, 15% ou 20% da seguinte forma: 2 ml, 2.5 ml ou 3.3 ml de 30% Acrilamide/Bis (BIO-RAD®), respectivamente foi misturado com 1.25 ml 1.5M Tris pH 8.8, 1.7 ml ddH₂O, 50 μ l 10%SDS, 50 μ l 10% APS e 5 μ l Temed *Ultrapure* (Invitrogen®). O *stacking gel* foi feito usando 1.25ml da mistura (3.32 ml 30% Acrilamide/Bis, 2.52 ml 1M Tris pH 6.8, 14.16 ml H₂O) com 12.5 μ l 10% SDS, 12.5 μ l 10% APS e 1.25 μ l Temed. Para a aplicação das amostras, 10-20 μ l da amostra foi misturada com tampão Laemli (1ml Tris pH 6.8, 0.3g DTT, 0.4g SDS, 2.5ml 87% Glicerol, 0.003g Bromophenol Blue

(Sigma®) ad 5ml volume total). Como peso molecular foi usado 5µl de *10-250kDa Protein Ladder* (NEB®), *Benchmark* (Invitrogen®) ou *Color Plus Prestained Protein Ladder* (NEB®). O gel correu em 1x tampão de corrida (58g Glicina, 12g Tris Base, 2g SDS ad 2L) à 30mAmp por cerca de 1h à temperatura ambiente.

5.4.2.2 Western Blot

Após SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose 0.45µm (Hybond ECL/Amersham®) ou PVDF 0.45µm (Immobilon/Millipore®) com um *Semidry Blotter* (BioRad®). O gel, membrana e filtros foram umedecidos anteriormente em tampão de transferência (5.82g Tris Base, 2.93g Glicina, 3.75ml 10%SDS ad 800ml ddH₂O) com 20% metanol e depois juntados formando um *sandwich* entre o papel filtro – membrana – gel – papel filtro. A transferência ocorreu à 25V por 30 minutos.

Em seguida, a membrana foi bloqueada com 5% leite/PBS por 1h à temperatura ambiente. O leite foi desprezado e a membrana incubada por 1h em 1%leite/PBS com 0.05% Tween20 junto com o primeiro anticorpo ou soro de referência (Tabela 8).

Quadro 8- Diluições dos anticorpos e soros usadas para WB.

Anticorpo/Soro	Diluição de uso
coelho anti-p24HIVcompleto	1:500
soros humanos de referência HIV/HTLV	1:200 ou 1:500
mouse anti-histidina	1:2000
HRP mouse anti-humana IgG (Zymed®) Sheep anti-mouse IgG Peroxidase (Sigma®)	1:10.000

Fonte: a autora

Nota: O anticorpo de coelho anti-p24HIV foi obtido “*inhouse*” em outros estudos; os soros de referência foram usados na diluição 1:500 para HIV e 1:200 para HTLV, a partir de um pool de 10 soros individuais;

Após três lavagens à 10 minutos com 1x PBS/Tween20 0.05%, o segundo anticorpo HRP-goat anti rabbit (Amersham®), HRP-sheep anti-mouse (Sigma®) ou HRP-mouse anti-human IgG (Zymed®) foi colocado 1:10.000 em 1% leite/PBS/Tween-20 por 1h a temperatura ambiental. A membrana foi lavada mais três vezes por 10 minutos com 1xPBS/Tween20 e incubada por 1 minuto com a mistura das soluções 1 e 2 do *Immobilon Western-Chemiluminescent HRP substrate* (Millipore®). Para visualização das bandas um filme Kodak foi colocado sobre a membrana na câmara escura e revelado através da incubação por 3 minutos em solução Dektol, Interruptor (3% Acido Acético) e Fixador.

5.4.2.3 Coloração com Azul de Coomasie

Para visualização das proteínas, o gel foi colocado por 15 minutos em solução de Coomasie (5g Coomasie Blue R 250, 450ml Metanol p.A, 100ml Acido Acético, 450ml ddH₂O) e em seguida o excesso do corante tirado com solução *Destain* (250ml Etanol, 70ml Acetic Ácido, 680ml ddH₂O) por cerca 1h, com várias trocas.

5.4.3 ELISA

Numa placa de poliestereno *EIA/RIA de 96 poços half area* (Costar®) concentrações de antígenos diferentes foram colocados em duplicata ou triplicata (100µl/poço), para sensibilizar a placa durante a noite a 4°C em câmara húmida. As quantidades de proteínas usadas primariamente para estabelecer as condições do teste foram 1µg, 0.5µg, 0.25µg, 0.125µg e 0.06µg/poço. Essas foram feitas por diluições serialmente em 0.1M Carbonato-Bicarbonato de sódio pH9.6. Como controle do *background* (blank) foi usado poços sem antígeno (somente tampão de diluição) e poços com antígenos, mas sem uso de soros. No dia seguinte, a placa foi lavada 5 vezes com PBS e em seguida bloqueada com 150µl/poço 4% BSA/PBS a 37°C por 1h. Após cinco lavagens com PBS/Tween20 0.05%, 50µl de um pool de 10 soros (aleatoriamente escolhidos entre os soros de LACEN, para HIV e entre os soros comerciais, para HTLV) diluído em 1% BSA/PBS para 1:500 (HIV) ou 1:200 (HTLV) foram colocados por poço e incubado por 1h a 37°C. As diluições testadas inicialmente foram 1:100, 1:200 ou 1:500. Os soros usados eram de referência, comprovadamente positivos ou negativos para os vírus. Dessa forma, foram avaliados a antigenicidade dos antígenos. Os pools de soros utilizados para outras doenças (por exemplo, antígenos de HIV foram testados com soros de HTLV) foram incluídos para visualizar uma possível reatividade cruzada com anticorpos contra vírus da mesma família. Logo após, novamente cinco lavagens foram feitas com PBS/Tween20 0.05% e 25µl de anticorpo camundongo HRP-IgG anti-humano diluído em 1%BSA/PBS foi adicionado por poço. As diluições testadas inicialmente foram 1:2000, 1:5000 ou 1:10.000. Após uma hora de incubação à 37°C, mais uma lavagem completa de 5x foi realizada e 75µl da mistura do substrato A e B de BD OptEIA™ Reagent Set (BD Biosciences Pharmingen®) adicionado. Isto leva a uma reação colorimétrica visível. Após cerca 5 minutos de incubação (dependendo da intensidade da coloração), a reação foi interrompida com 75µl solução STOP (12.5% Ácido Fosfórico). Em seguida, a intensidade ótica foi determinada num Microplate Reader (Bio-Rad®) à 450nm. Para interpretar os resultados foram subtraídos os valores do *blank* dos valores obtidos nos poços sensibilizados com antígeno e o desvio padrão calculado usando o programa Excel.

5.4.4 xMAPLuminex

5.4.4.1 Acoplamento de proteínas às microesferas

Independente do seu pI, foram testados para o acoplamento de cada proteína tampões de acoplamento com pH diferentes: 1xPBS (pH 7.2), 100mM MES (pH 6.5), 100mM NaHCO₃ (pH 8.0). 25µg/ml proteína foram usados em volume final de 100µl tampão de acoplamento.

As microesferas magnéticas foram homogeneizadas com o auxílio de um agitador vortex e banho-sonicador 3x 30seg cada. Oitenta microlitro da solução estoque (12.500.000 microesferas/ml) correspondendo à um milhão de microesferas foram colocadas na placa de 96 poços a ser utilizado no acoplamento. Em seguida, foram lavadas 2x com 200µl de tampão de ativação. Em seguida foram adicionados 80µl do tampão de ativação e 10µl da solução sulfo-NHS (50mg/ml) e 10µl da solução EDC (50mg/ml), ambas preparadas frescas e homogeneizando com as microesferas. A placa foi incubada por 20 minutos no escuro em temperatura ambiente sob agitação de 250rpm. Em seguida a placa foi lavada 3x com o tampão de acoplamento. Depois a proteína, em volume de 100µl tampão de acoplamento, foi adicionada e incubada por 2h no escuro em 37°C sob agitação a 250rpm. Depois, os poços da placa foram lavados 3x com tampão de bloqueio, as microesferas homogeneizadas em 200µl de tampão de bloqueio (1% BSA/PBS) e transferidas em microtubo *low-binding* (USA_Scientific®).

5.4.4.2 Ensaio com soros e microesferas acopladas

As microesferas acopladas foram homogeneizadas com o auxílio de um agitador vórtex e banho-sonicador, 3x por 30 segundos.

Em seguida foram misturadas para volume total de 50µl/poço:

- a) 2.500 beads;
- b) 2% extrato de *E. coli* (estoque 10mg/ml; concentração final 0.2mg/ml);
- c) tampão de ensaio PBS/TBN (1x PBS, 1%BSA, 250mM Tris-HCL pH 7.4, 0.02% Tween-20).

A mistura foi homogeneizada novamente e 50µl transferida num poço de *placa de 96-poços*, junto com 50µl da pré-diluição dos soros (1:100). Dessa forma, a diluição final do soro era de 1:200.

A placa foi incubada a 37°C por 15 minutos sob agitação (300rpm) e abrigada da luz, lavada 3x com 100µl tampão de ensaio PBS/TBN e 100µl de uma diluição 1:1000 do segundo anticorpo PE anti-humana (conjugado com Ficoeritrina) por poço foi adicionado.

Após incubação de 15 minutos à 37°C, sob agitação (300rpm) e abrigada da luz, foi lavado 3x com *sheath fluid* (Luminex®) e ao final um volume de 100µl *sheath fluid* deixado no poço para análise no IE Labscan 100/Luminex200. Para análise foram lidas 100 microesferas de cada poço.

5.5 Análises estatísticas

5.5.1 ELISA

Os gráficos e os testes de estatística aplicados (ANOVA ou t teste e o *valor p*) foram feitos usando o programa PRISM. O *cut-off* foi calculado como média de triplicatas do controle negativo (soro comprovadamente negativo) mais 3 vezes o desvio padrão. O *índice de cut-off* foi calculado dividindo a média de triplicatas do sinal utilizando soros comprovadamente positivo pelo *cut-off*.

5.5.2 xMAPLuminex

Para calcular o *cut-off*, a sensibilidade, a especificidade, a exatidão do teste e o IC95, foi feito uma análise ROC utilizando a intensidade dos sinais de fluorescência (MFI) de 100 microesferas analisadas para cada soro e o programa PRISM. Após seleção do *cut-off* apropriado (mostrando valores mais altos e equilibrados entre sensibilidade e especificidade), as amostras foram apresentados em forma de *curva ROC* e *Scatter Plot* para cada antígeno.

5.6 Sorotecas

Painéis sorológicos nacionais e internacionais, contendo amostras comprovadamente positivas e negativas, para os vários vírus. Foram obtidos comercialmente (Tabela 9) ou a partir de laboratórios de referência (LACEN/PE).

Quadro 9- Painéis sorológicos nacionais e internacionais usados para o estudo.

A.

Painel positivo	Laboratório/Empresa	Amostras HIV-1	Amostras HIV-2
Anti-HIV-1 Seroconversion Panel Y	Boston Biomedica, Inc.	4	-
Anti-HIV-1/2 Qualification Panel	Boston Biomedica, Inc.	3	1
Anti-HIV-1/2 Qualification Panel	SeraCare Life Sciences	4	2
Anti-HIV-1/2 Combo Performance Panel	SeraCare Life Sciences	7	6
Anti-HIV-1 Recife	Lacen - PE	78	-
Total de amostras		96	9

B.

Painel positivo	Laboratório/Empresa	Amostras HTLV-1	Amostras HTLV-2
Anti-HTLV-1/2 Mixed Titer Performance Panel	SeraCare Life Sciences	6	7
Anti-HTLV-1/2 Qualification Panel	SeraCare Life Sciences	3	2
Anti-HTLV-1 Recife	Lacen - PE	36	-
Total de amostras		45	9

C.

Painel positivo	Laboratório/Empresa	Número de amostras
Anti-HCV Recife	Lacen – PE	20
Total de amostras		20

D.

Painel negativo	Laboratório/Empresa	Número de amostras
HIV-1/2, HTLV-1/2, HCV Negativo Recife	Lacen - PE	118
HIV-1/2, HTLV-1/2, HCV Negativo AEQ	Ministério de Saúde	230
Total de amostras		348

Fonte: a autora

6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo utilizou principalmente antígenos sintéticos e ferramentas de Bioinformática e Biologia Molecular.

Para avaliação das proteínas recombinantes foram usados soros de referências comerciais como também os cedidos do Laboratório Central de Pernambuco (LACEN-PE). Não houve coleta nova de amostra de sangue. As amostras do LACEN provem da demanda espontânea que foram estocadas após os testes diagnósticos realizados.

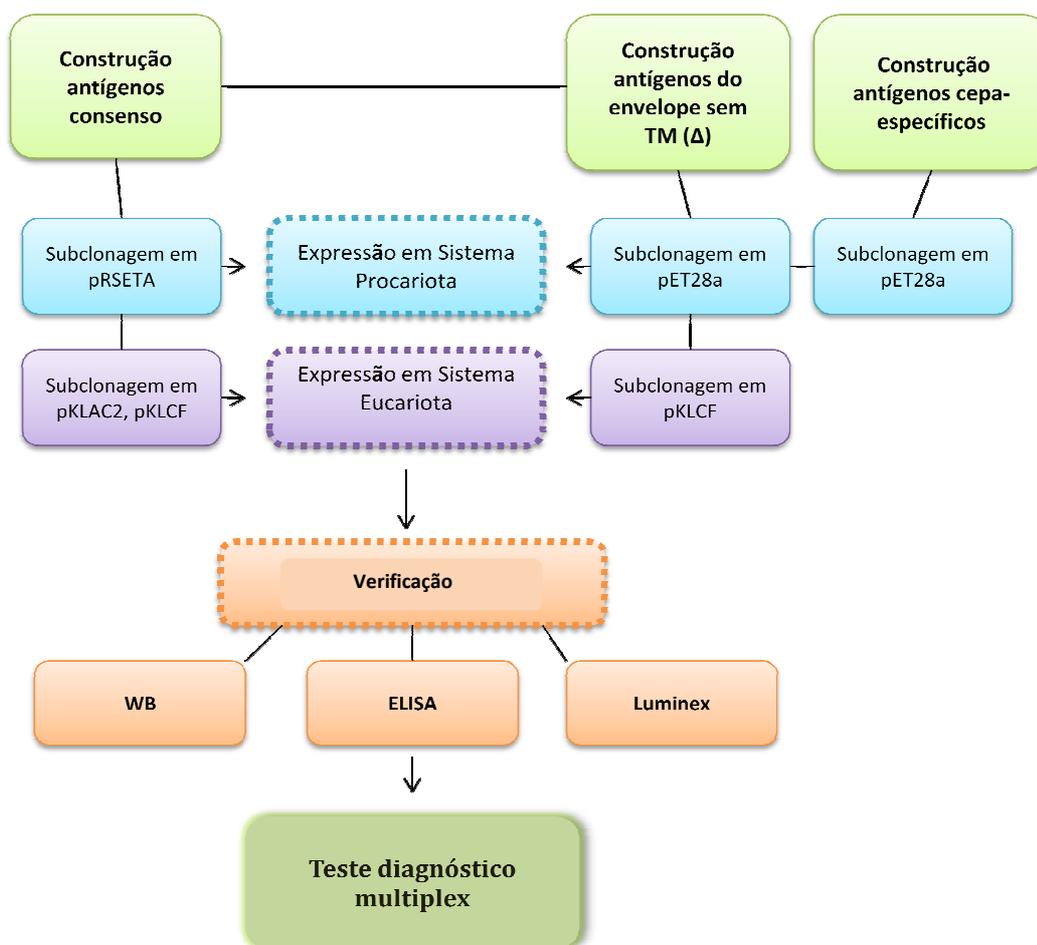
O presente trabalho teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM (ANEXO A).

7 RESULTADOS

Ao longo da execução desta tese de doutorado foram obtidos 42 antígenos recombinantes, 23 sendo de HIV, 14 de HTLV e 5 de HCV.

Para facilitar a interpretação dos resultados apresentados nas páginas seguintes, as etapas para o desenvolvimento do trabalho se encontram esquematizadas na figura 27. A tabela 10 lista numa forma resumida, todos os antígenos construídos e a tabela 10 mostra os antígenos com maior antigenicidade avaliado pelo WB, ELISA e xMAPLuminex.

Figura 27- Esquematização das etapas do trabalho.



Fonte: Dados da autora

Quadro 10- Resumo dos antígenos de HIV.

(continua)

Sequências selecionadas			Construção		Vetores de expressão						Avaliação		
Antígeno	Tipo	Tamanho (kDa)	Modelo	Sequência	pRSETA (HIS-N)	pET21 (HIS-C)	pET28a (HIS-N)	pET28a (HIS-C)	pKLAC2 (sem)	pKLCF (CBD)	Expressão (BL21)	WB	Sens Espec
p24HIV1	capsídeo	25	completa	consenso	•				•	•	+++	•	97.4% 98.8%
p26HIV2	capsídeo	25.4	completa	consenso	•				•		+++	•	100% 93.4%
p24HIV hidr/hibri	capsídeo	12.5	híbrida	consenso	•				•		+++	•	35% 75%
ENVHIV1	precursora envelope	97	completo	consenso	•						X	ND	ND
ENVHIV1hidr	envelope	14.9	hidrofílica	consenso	•				•		+++	ND	62% 62%
ENVHIV2hidr	envelope	18.3	hidrofílica	consenso	•				•		+++	ND	67% 86%
gp120ΔHIV1	envelope	54	sem TM	consenso			•	•		▪	++	•	80.8% 97.7%
gp41ΔHIV1	envelope	20	sem TM	consenso			•			▪	++	•	95% 99.7%
gp125ΔHIV2	envelope	59.1	sem TM	consenso			•				X	ND	ND
gp36ΔHIV2	envelope	21.6	sem TM	consenso			•				X	ND	ND
gp36Δinterno HIV2	envelope	20.6	sem TM	consenso			•				+	X	AEA
gp41 HIV1 (5.2)	envelope	22	truncada	cepa B			•	•			X	ND	ND
gp41 HIV1 (5.3)	envelope	22	truncada	cepa BC			•				+	X	100% 100%
gp41 HIV1 (5.4)	envelope	22	truncada	cepa BF			•				+	X	100% 95.5%

Quadro 10- Resumo dos antígenos de HIV.

(continuação)

Antígeno	Tipo	Tamanho	Modelo	Sequência	pRSETA (HIS-N)	pET21 (HIS-C)	pET28a (HIS-N)	pET28a (HIS-C)	pKLAC2 (sem)	pKLCF (CBD)	Expressão (BL21)	WB	Sens Espec
gp41 HIV1 (5.5)	envelope	22	truncada	cepa BF1			•				+	•	100% 96.3%
gp41 HIV1 (5.6)	envelope	22	truncada	cepa F1			•	•			X	ND	ND
gp41 HIV1 (5.7)	envelope	22	truncada	cepa C			•				+	X	97.4% 98.8%
gp41 HIV1 (5.8)	envelope	22	truncada	cepa D			•				+	•	100% 98.8%
gp41 HIV1(5.9)	envelope	22	truncada	cepa O			•	•			+		AEA
gp41HIV1(5.10)	envelope	22	truncada	cepa O2AG			•	•			X	ND	ND
gp41HIV1(5.11)	envelope	22	truncada	cepa U			•	•			++		AEA
gp120gp41 HIV1(5.12)	envelope	42.9	truncada	cepa B			•				+	X	100% 97.8%
gp36HIV2 (6.1)	envelope	21.8	completa	cepa			•	•			X	ND	ND

Fonte: a autora

Nota: As informações sobre todos os antígenos obtidos são representados em forma resumida; (**Antígeno**) nome dado; (**Tipo**) região do genoma na qual o antígeno foi baseado; (**Tamanho**) tamanho da proteína codificada em kDa; (**Modelo**) Tipo de construção, ver figura 31; (**Sequência**) tipo de sequência usada para construção; (**Vetores de expressão, pontos pretos**) vetores onde os insertos foram clonados e (**pontos vermelhos**) onde a expressão foi alcançada; (**Expressão-BL21**) em caso positivo: (+) nível de expressão < 0.1mg/L; (++) nível de expressão 1.5mg/L-80mg/L; (+++) nível de expressão 0.4-10g/L; (X) em caso negativo; (**WB**) ponto indica a reatividade no Western Blot, (**ND**) não determinado; (**Sens/Espec**) sensibilidade e especificidade determinada pelo ensaio Luminex e calculada através de curvas ROC; (**AEA**) análise em andamento;

Observação: Subclonagem, expressão e avaliação c/ Luminex dos antígenos consenso HIV e HTLV em vetor pRSETA foram resultados apresentados na Tese de Mestrado da aluna *I. Vianna*; todavia fizeram parte do projeto e foram incluídos na tabela e contagem dos antígenos construídos, para melhor comparação com outros antígenos construídos nesta tese).

Quadro 11- Resumo dos antígenos de HTLV.

Sequências selecionadas			Construção		Vetores de expressão						Avaliação		
Antígeno	Tipo	Tamanho (kDa)	Modelo	Sequência	pRSETA (HIS-N)	pET21 (HIS-C)	pET28a (HIS-N)	pET28a (HIS-C)	pKLAC2	pKLCF (CBD)	Expressão (BL21)	WB	Sens/ Espec
p24HTLV1	capsídeo	22.9	completa	consenso	•					.	+++	•	97% 93%
p24HTLV2	capsídeo	22.9	completa	consenso	•						+++	•	90% 80%
p24HTLV hidr/hibri	capsídeo	11.2	híbrida	consenso	•						+++	•	79% 37%
ENVHTLV1	precursora envelope	56.1	completa	consenso	•	•				.	X	ND	ND
ENVHTLV2	precursora envelope	56.4	completa	consenso	•	•				.	X	ND	ND
ENVHTLV1 hidr	envelope	14.7	hidrofílica	consenso	•					.	+++	ND	73% 93%
ENVHTLV2 hidr	envelope	14.7	hidrofílica	consenso	•					.	+++	ND	100% 87%
gp46ΔHTLV1	envelope	35	completa	consenso			•				+		AEA
gp21ΔHTLV1	envelope	15.9	truncada	consenso			•	•			+	X	EA
gp21ΔHTLV1 -2	envelope	7.5	truncada	consenso				•			X	ND	ND
gp52ΔHTLV2	envelope	35	completa	consenso			•				+	•	88.9% 69%
p19HTLV1 (2.1)	envelope	18	completa	cepa			•	•			X	ND	ND
gp21gp46 HTLV1 (2.2)	envelope	34.1	truncada	cepa			•				+	•	97% 72.9%
gp21gp46 HTLV2 (3.1)	envelope	34.4	truncada	cepa			•				+	•	66% 87%

Fonte: a autora

Nota: As informações sobre todos os antígenos obtidos são representados em forma resumida; (**Antígeno**) nome dado; (**Tipo**) região do genoma na qual o antígeno foi baseado; (**Tamanho**) tamanho da proteína codificada em kDa; (**Modelo**) Tipo de construção, ver figura 31; (**Sequência**) tipo de sequência usada

para construção; (**Vetores de expressão, pontos pretos**) vetores onde os insertos foram clonados e (**pontos vermelhos**) onde a expressão foi alcançada; (**Expressão-BL21**) em caso positivo: (+) nível de expressão < 0.1mg/L; (++) nível de expressão 1.5mg/L-80mg/L; (+++) nível de expressão 0.4-10g/L; (**X**) em caso negativo; (**WB**) ponto indica a reatividade no Western Blot, (**ND**) não determinado ; (**Sens/Espec**) sensibilidade e especificidade determinada pelo ensaio Luminex e calculada através de curvas ROC; (**AEA**) análise em andamento;

Quadro 12- Resumo dos antígenos de HCV.

Sequências selecionadas			Construção		Vetores de expressão						Avaliação		
Antígeno	Tipo	Tamanho	Modelo	Sequência	pRSETA	pET21	pET28a	pET28a	pKLAC2	pKLCF	Expressão (BL21)	WB	Sens/ Espec
		(kDa)			(HIS-N)	(HIS-C)	(HIS-N)	(HIS-C)	(CBD)				
E1-HCV	envelope	22.9	completo	consenso	•	•			•		X	ND	ND
E2-HCV	envelope	40	completo	consenso	•	•			•		X	ND	ND
E1/E2-HCV	envelope	19.4	hidrofílica/ híbrida	consenso	•	•			•		X	ND	ND
Core aa1-169- HCV	capsídeo	19.8	truncada	consenso	•	•					X	ND	ND
Core aa1-117- HCV	capsídeo	14.4	truncada	consenso	•	•					++	•	AEA

Fonte: a autora

Nota: As informações sobre todos os antígenos obtidos são representados em forma resumida; (**Antígeno**) nome dado; (**Tipo**) região do genoma na qual o antígeno foi baseado; (**Tamanho**) tamanho da proteína codificada em kDa; (**Modelo**) Tipo de construção, ver figura 31; (**Sequência**) tipo de sequência usada para construção; (**Vetores de expressão, pontos pretos**) vetores onde os insertos foram clonados e (**pontos vermelhos**) onde a expressão foi alcançada; (**Expressão-BL21**) em caso positivo: (+) nível de expressão < 0.1mg/L; (++) nível de expressão 1.5mg/L-80mg/L; (+++) nível de expressão 0.4-10g/L; (X) em caso negativo; (**WB**) ponto indica a reatividade no Western Blot, (**ND**) não determinado ; (**Sens/Espec**) sensibilidade e especificidade determinada pelo ensaio Luminex e calculada através de curvas ROC; (**AEA**) análise em andamento;

Quadro 13- Resumo da avaliação dos antígenos com maior antigenicidade

Antígeno	WB	Índice cut-off ELISA	Sensibilidade xMAPLuminex	Especificidade xMAPLuminex	AUC xMAPLuminex	IC95% xMAPLuminex
p24HIV1	R	19.2	97.4%	98.8%	97.2%	0.75-0.96
gp41ΔHIV1	R	54	95%	99.7%	97.3%	0.92- 1.02
gp120ΔHIV1	R	2.4	81%	97.7%	93.9%	0.86- 1.01
gp41HIV1 (5.3)	NR	24.1	100%	100%	100%	1.0-1.0
gp41HIV1 (5.4)	NR	3.1	100%	95.5%	99.5%	0.988-1.0
gp41HIV1 (5.5)	R	18.7	100%	96.3%	99.9%	0.993-1.0
gp41HIV1 (5.7)	NR	13.4	97.4%	98.8%	99.8%	0.997-1.0
gp41HIV1 (5.8)	R	20.3	100%	98.8%	99.9%	0.996-1.0
gp41HIV1 (5.9_C)	NR	13.6	AEA	AEA	AEA	AEA
gp41HIV1 (5.11_C)	R	14.5	AEA	AEA	AEA	AEA
gp120gp41HIV1 (5.12)	NR	33.3	100%	97.8%	99.7%	0.991-1.0
gp36Δinterno HIV2	NR	2.7	AEA	AEA	AEA	AEA
p24HTLV1	R	ND	97%	93%	97%	-
gp21ΔHTLV1	NR	1.4	AEA	AEA	AEA	AEA
HCV_Core 1-117	R	7.8	AEA	AEA	AEA	AEA

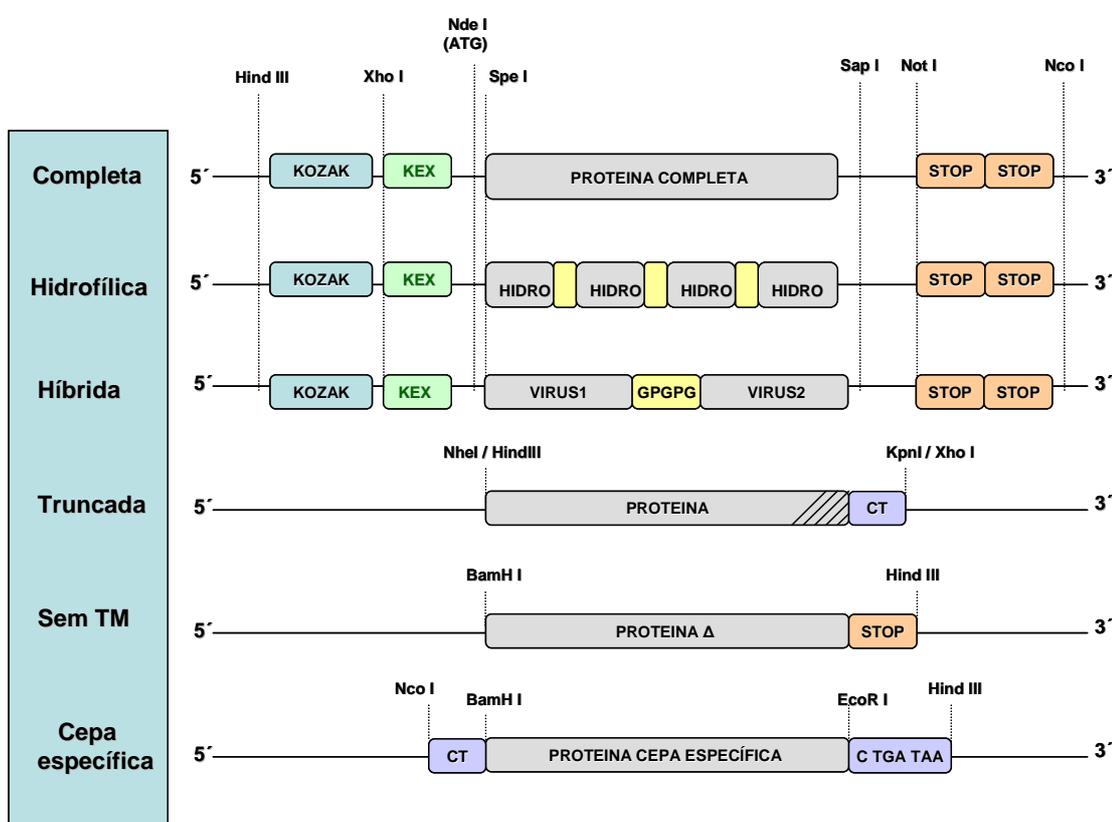
Fonte: a autora

Nota: Na tabela se encontram listados os antígenos construídos e com melhor desempenho de antigenicidade avaliado pelo WB, ELISA e xMAPLuminex; (NR) não reativo, (R) reativo, (ND) não determinado, (AEA) análise em andamento, (-) sem informação;

7.1 Construções dos antígenos

Foram seguidas várias estratégias para a construção dos antígenos supracitados, usando tanto sequências consenso como cepa específica. Entre os modelos de construção criados se encontram antígenos completos, truncados, híbridos, hidrofílicos e glicoproteínas do envelope sem suas regiões transmembranas (Figura 28).

Figura 28- Modelos usados para construção dos antígenos



Fonte: a autora

Nota: (**Completa**) uso da ORF completa; (**Hidrofílica**) quatro regiões hidrofílicas do mesmo vírus intercaladas com espaçador *GPGPG não-imunogênico*; (**Híbrida**) construções híbridas utilizando uma região hidrofílica de cada cepa viral distinta; (**Truncada**) proteínas expressas removendo possíveis domínios negativos para a expressão; (**Sem TM**) glicoproteínas do envelope expressos sem suas respectivas regiões transmembranas; (**Cepa específica**) proteínas específicas de cepas virais distintas; (**Kozak**) sítio de iniciação de tradução; (**Kex**) sítio de reconhecimento da protease Kex presente em levedura; (**Stop**) Stop códon. (**CT e CTGATAA**) nucleotídeos incluídos na sequência para manter as sequências de aminoácidos das proteínas em fase com o Taq-HIS de purificação.

7.1.1 Antígenos consenso

Para a construção dos antígenos consenso foram geradas sequências consenso alinhando múltiplas sequências de todos os vírus descritos, principalmente de isoladas do Brasil e/ou América Latina. Utilizando as sequências consensos geradas, foram realizadas buscas por homologia no intuito de identificar sequências circulantes com mais de 90% de homologia com o consenso. Estas sequências de alta homologia foram utilizadas para as construções dos antígenos consenso completas, truncadas, hidrofílicas e híbridas apresentadas na figura 27. Os *antígenos completos* se constituem da *ORF* completa da proteína enquanto na *forma truncado* foram deixados a parte alguns aminoácidos.

Os *antígenos hidrofílicos* foram constituídos de quatro regiões consideradas hidrofílicas, determinadas utilizando o perfil de Kyte-Doolittle com tamanho de janela 5-7 aminoácidos, sendo intercaladas pela sequência de aminoácidos GPGPG para evitar a formação de neo-epítomos, não específicos, pela fusão direta das regiões hidrofílicas.

Os *antígenos hidrofílicos/híbridos* se constituem de uma mistura de sequências de dois vírus distintos. No nosso caso, foram geradas construções codificando simultaneamente para HIV-1 e HIV-2 e para HTLV-1 e HTLV-2. Assim como para os antígenos hidrofílicos, as construções híbridas foram igualmente intercaladas pela sequência de aminoácidos GPGPG.

As sequências definidas foram em seguida flanqueadas por sítios múltiplos de clonagem (5'- Hind III, Xho I, Nde I, Spe I e 3' – Sap I, Not I, Nco I) ou simplesmente (5'-NcoI e 3'-XhoI) permitindo a subclonagem em diferentes vetores de expressão. As sequências obtidas foram submetidas à otimização para expressão, utilizando parâmetros como *códon usage*, estrutura secundária de mRNA, distribuição e conteúdo de GC, presença de sítios internos de restrição. Após síntese comercial, as sequências artificiais foram subclonadas em vetores capazes de gerar antígenos fusionados a uma cauda de histidina.

7.1.2 Antígenos do envelope sem domínio trans-membrana (TM)

Para evitar uma possível influência negativa de regiões trans-membranas durante a expressão das proteínas e para gerar glicoproteínas individuais do envelope, como estão naturalmente presentes na partícula viral após processamento das proteínas precursoras foram construídos antígenos do envelope sem suas respectivas regiões trans-membranas. Como modelo para as construções foram utilizados os antígenos consenso precursores completos: ENVHIV1, ENVHIV2, ENVHTLV1 e ENVHTLV2.

Para determinar as regiões internas, de superfície e transmembranas dessas proteínas, foi realizada inicialmente uma análise usando o programa TMHMM 2.0 (Apêndice 3). Em seguida, foi realizada uma análise com o programa *Kyte Doolittle*, utilizando uma janela 19-21 aminoácidos, visando confirmar as localizações das regiões trans-membranas previstas.

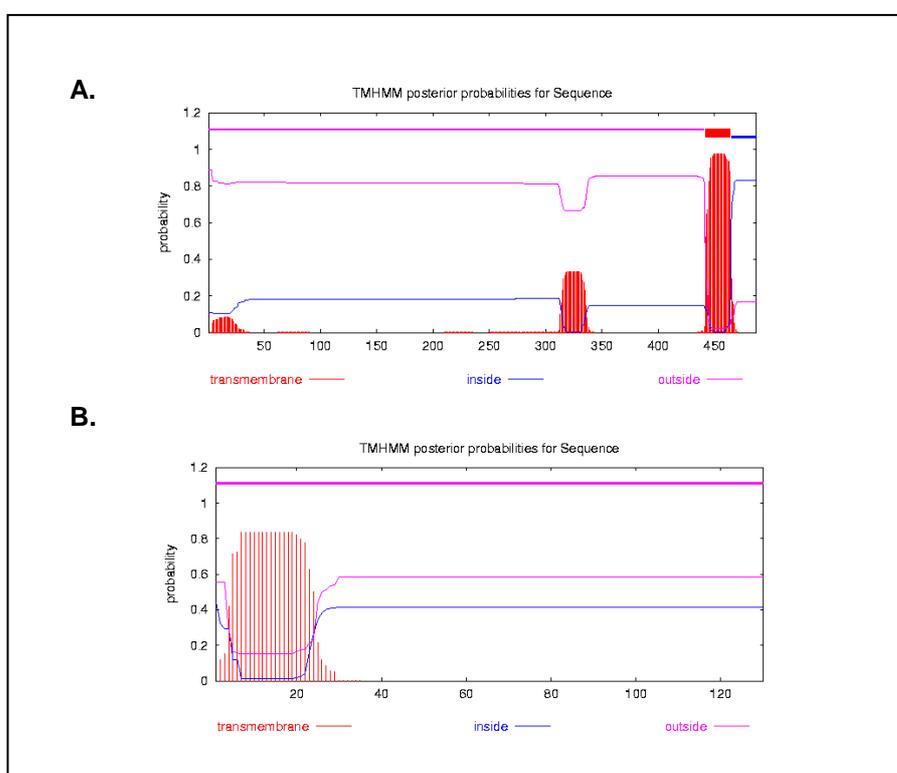
Em uma outra etapa, foi realizada uma análise na literatura e no *Protein Blast Search* de NCBI visando identificar as sequências protéicas individuais. Nesta etapa também foram identificados as regiões correspondentes aos epítomos imunologicamente mais relevantes, visando a sua manutenção nas sequências alvos no intuito de preservar a imunoreatividade dos antígenos em questão. Alguns antígenos, como o gp36 Δ internoHIV2 por exemplo, demonstraram (de forma inesperada) que sua região mais imunogênica se encontrava em sua porção interna considerada hidrofílica.

Adicionalmente foram realizadas duas análises estruturais com a colaboração do Dr. Roberto Lins, do *Laboratório de Química teórica e computacional* do Departamento de Química Fundamental/UFPE. As estruturas dos antígenos gp120 Δ HIV1 e gp21 Δ HTLV1 foram analisadas utilizando como referência suas estruturas cristalográficas, depositadas no *protein data bank* (www.rcsb.org). Foram utilizados os programas VMD 1.91 e os *pdb-files* *3JWO.pdb* para a gp120HIV1 e o *MG1.pdb* para a gp21HTLV1. A análise de gp120HIV1 indicou, que a sequência escolhida para gerar a proteína Δ , não ia interferir na formação correta da sua estrutura e conseqüente domínios protéicos.

A análise estrutural da sequência escolhida para gerar o antígeno gp21 Δ HTLV1 (aa 309-441) era necessário, devido ao resultado obtido no programa TMHMM 2.0, em relação a identificação de suas regiões trans-membranas.

Utilizando a sequência completa de ENVHTLV1, foi identificada uma região trans-membrana próxima ao aa 450 e uma região com alta hidrofobicidade, mas com menor chance em ser uma região trans-membrana, entre os aa 300 e 350 (Figura 29A). Uma segunda análise, usando somente aa 309-441, aumentou a probabilidade para 0.8 de ser uma região trans-membrana (Figura 29B). Dessa forma, esta região podia interferir na expressão e assim foi removida para a construção do antígeno gp21 Δ HTLV1. Todavia, era necessário esclarecer, se a estrutura protéica iria ou não ser influenciada após esta remoção.

Figura 29. Identificação dos domínios trans-membranas de ENVHTLV1.



Fonte: a autora

Nota: A.) ENVHTLV1consensus (gp61): (colunas vermelhas) probabilidade em ser uma região trans-membrana, <1: com menos probabilidade, \geq 1: com maior probabilidade, aa 442-464; (traços lilás) região externa da proteína, sendo aa 1-441; (traço azul) região interna da proteína, 465-487;

B.) aa 309-441 de gp21HTLV1 (traço lilás) toda a sequência representa uma região externa da proteína; Uma região trans-membrana com alta probabilidade, não prevista anteriormente se mostrou presente com probabilidade de 0.8 após o refinamento da análise (coluna vermelha).

A análise estrutural realizada pelo Dr. Roberto Lins, utilizando os aa 338-425 do pdb-file, demonstrou que os primeiros 33 aa desta sequência constituíam sua região hidrofóbica, com um alto potencial hidrostático. Através destas análises, especulamos que esta região provavelmente poderia dificultar a estabilidade/expressão da referida proteína, sendo, portanto excluída (neste caso

utilizamos apenas os aa 371-423 para subclonagem/expressão). Desta forma, a proteína composta de um lado hidrofóbico e outro lado hidrofílico não tenderiam a se oligomerizar, mas se fechar em si mesmo, permanecendo portanto em seu estado solúvel.

A tabela 12 lista os resultados obtidos de acordo com as análises supracitadas, e mostram as regiões de aminoácidos selecionadas nas construções dos antígenos do envelope sem TM.

Para a obtenção destas construções, foram desenhados iniciadores (primers), com a ajuda do programa *APE Plasmid Editor*, para amplificação das respectivas regiões por PCR. Nestes iniciadores foram incluídos sítios específicos de restrição e STOP códons, visando a expressão correta destas proteínas. Após o sequenciamento dos respectivos produtos de PCR, os antígenos foram utilizados nas etapas posteriores de subclonagem e expressão.

Quadro 14. Regiões proteicas identificadas.

Antígeno precursor	Seleção das regiões de glicoproteínas individuais		Regiões trans-membranas	Regiões dos epítomos
ENVHIV1 (gp160)	gp120Δ (aa 44-487)	gp41Δ (aa 511-671)	aa 21-43 aa 672-694	aa 303-338 (V3loop) (GORNY, 1993) aa 553-565
ENVHIV2 (gp140)	gp125Δ (aa 21-511)	gp36Δ (aa 512-858) gp36Δinterno (aa 535-678)	aa 7-29 aa 512-534 aa 679-701	aa 234-248, 296-337, 472-507 (MANNERVIK, 1992; MARCELINO, 2006) aa 480-501 (ALCARO, 2003) aa 581-605 (TIWARI, 2013)
ENVHTLV1 (gp61)	gp46Δ (aa 23-308)	gp21Δ (aa 333-441) gp21Δ_2 (aa 371-423)	aa 442-464	aa 187-199 (BABA, 1995) aa 190-209 (PALKER, 1989) aa 244-249 e aa 244- 257 (HORAL, 1991) aa 296-312 (PALKER, 1989) aa 361-404, aa 397- 430, aa 374-392 (LYNCH, 2006)
ENVHTLV2 (gp61)	gp52Δ (aa 23-304)	gp21Δ devido à alta similaridade (85%) com HTLV1 não foi construído	aa 438-460	aa 172-195, aa 185-208 (HORAL,1991)

Fonte: a autora

Nota: A seleção das regiões foi obtida a partir de análises com o programa TMHMM 2.0 (detecção das regiões trans-membranas), NCBI Protein Blast Search e literatura científica. O gp21Δ_2 foi construído a partir das análises estruturais supracitadas.

7.1.3 Antígenos cepa-específicos

As construções cepa específicas foram definidas em colaboração com o Dr. Nilson Zanchin do Instituto Carlos Chagas (FIOCRUZ-PR), utilizando sequências cepa-específica, publicadas em banco de dados ou descritas em artigos científicos. Para facilitar a análise e comparação dos resultados, foram dado códigos numéricos a cada antígeno.

Os antígenos de HIV-1 consistem de proteínas gp41 dos 10 subtipos circulantes no mundo (5.2) aa 533-689, (5.3) aa 524-679, (5.4) aa 507-662, (5.5) aa 531-686, (5.6) aa 517-672, (5.7) aa 519-674, (5.8) aa 523-678, (5.9) aa 543-691, (5.10) aa 536-691, (5.11) aa 265-421), (5.12) proteína de fusão contendo 171 aa de gp120 e 172 aa de gp41 (TALHA et al., 2011). Os de HIV-2 consistem da proteína completa gp36 (6.1). Os antígenos de HTLV-1 consistem em uma proteína completa p19 aa 1-130 (2.1) e uma proteína de fusão contendo fragmentos de gp21 e gp46 aa 165-440 (2.2). Os de HTLV-2 consistem de uma proteína de fusão com os fragmentos de gp21 e gp46 aa 161-436 (3.1).

Assim como descrito anteriormente, foram também incluídos sítios de restrição 5´ e 3´ flanqueando estas sequências, visando a expressão das mesmas em fusão com caudas de histidinas N e/ou C terminais.

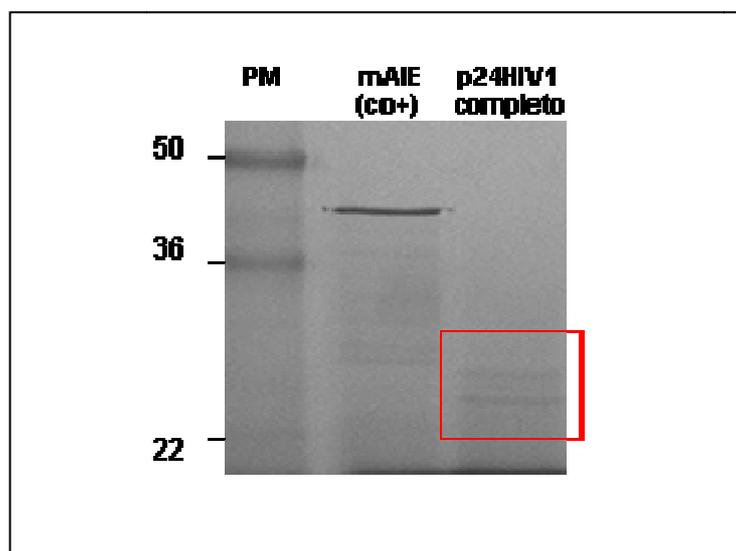
7.2 Expressão em sistema eucariótico de levedura (*K. lactis*)

Nos dois primeiros anos desta tese de doutorado foram realizadas extensivas tentativas para a expressão dos antígenos supracitados, em sistema de levedura utilizando a levedura *K. lactis*. Este sistema foi escolhido devido as suas vantagens em relação à capacidade de glicolisação e dobramento correto (pontes de disulfídeos realizadas em sistemas eucarióticos). Apesar de termos seguido todas as recomendações do fabricante, e de inúmeras adaptações/modificações de protocolos entre elas:

- a) Testar a intensidade do crescimento das culturas (OD_{600} 50, 60, 70 e 90) e sua influência na expressão;
- b) Concentrar as proteínas expressas no sobrenadante com PEG₃₃₅₀; (LI et al., 2011, SHARMA et al., 2004);
- c) Aumentar o nível da expressão testando diferentes concentrações do indutor *Galactose* (2%, 0.2%, 0.02%, 0.002%); (MARTINS et al., 2001, 2002);
- d) Aumentar o nível da expressão testando diferentes tempos da indução (15 minutos, 30 minutos, 1h, 2h, 4h, 8h, 24h, 48h); (MARTINS et al., 2001, 2002);
- e) Diminuir a atividade de proteases utilizando albumina, EDTA ou inibidores de protease no meio da cultura; (JAHIC et al., 2003; ZHANG et al., 2007);
- f) Diminuir a atividade de proteases diminuindo a temperatura durante a indução (23°C); (ZHANG et al., 2007);
- g) Diminuir a atividade de proteases modificando o pH no meio da cultura (pH 7, 5, 4, 3); (JAHIC et al., 2003; ZHANG et al., 2007);
- h) Usar outra fonte de nitrogênio, como *úrea* ou *nitrogen base powder* no meio da cultura; (YIN et al., 2010; JAHIC et al., 2003);
- i) Usar vetores de expressão diferentes, desenvolvidos nesta época e cedidos pela empresa *New England Biolabs* (pKLAC2: sem tag, pKLCF-N ou -C: com CBD-tag).

Não obtivemos resultados satisfatórios em relação aos níveis finais de expressão obtidos utilizando vetores diferentes no sistema de levedura. Apenas foi possível detectar em gel SDS-PAGE, corado com Azul de Coomassie e após purificação com Chitin Beads (Figura 30, 31), o antígeno p24 de HIV-1 (previamente obtido, em sistema procariótico, pela colaboradora e mestranda Isabelle Freire Tabosa Viana). Comparando a eficiência dos antígenos p24 expressos em bactérias e levedura quanto ao reconhecimento por soro comprovadamente positivo por HIV-1, não conseguimos identificar nenhum ganho em termos de sensibilidade/especificidade do antígeno expresso em levedura (Figura 32). Considerando, tanto a dificuldade encontrada em expressar no sistema eucariótico, como a capacidade diagnóstica não ter sido considerada melhor que o do mesmo antígeno expresso em bactéria decidimos utilizar apenas o sistema procariótico, por ser mais simples e mais rápido (considerando que consumimos 2 anos, desta tese, tentando padronizar o sistema de levedura).

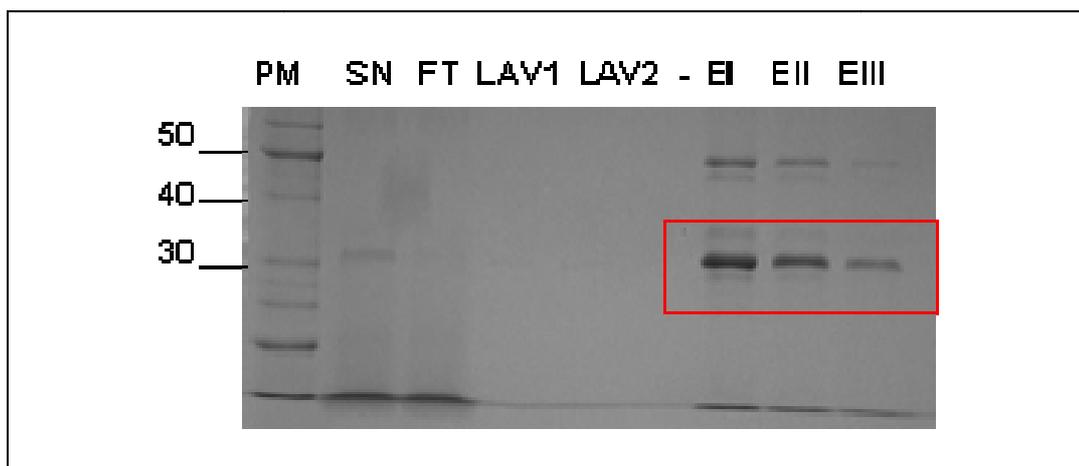
Figura 30- Expressão do antígeno p24HIV1 completo em vetor pKLAC2.



Fonte: a autora

Nota: SDS-PAGE corado com Azul de Coomassie, (PM) Peso Molecular, (mAIE) controle positivo da expressão, (retângulo) indica expressão da proteína, Tamanho esperado: p24HIV1: 25kDa;

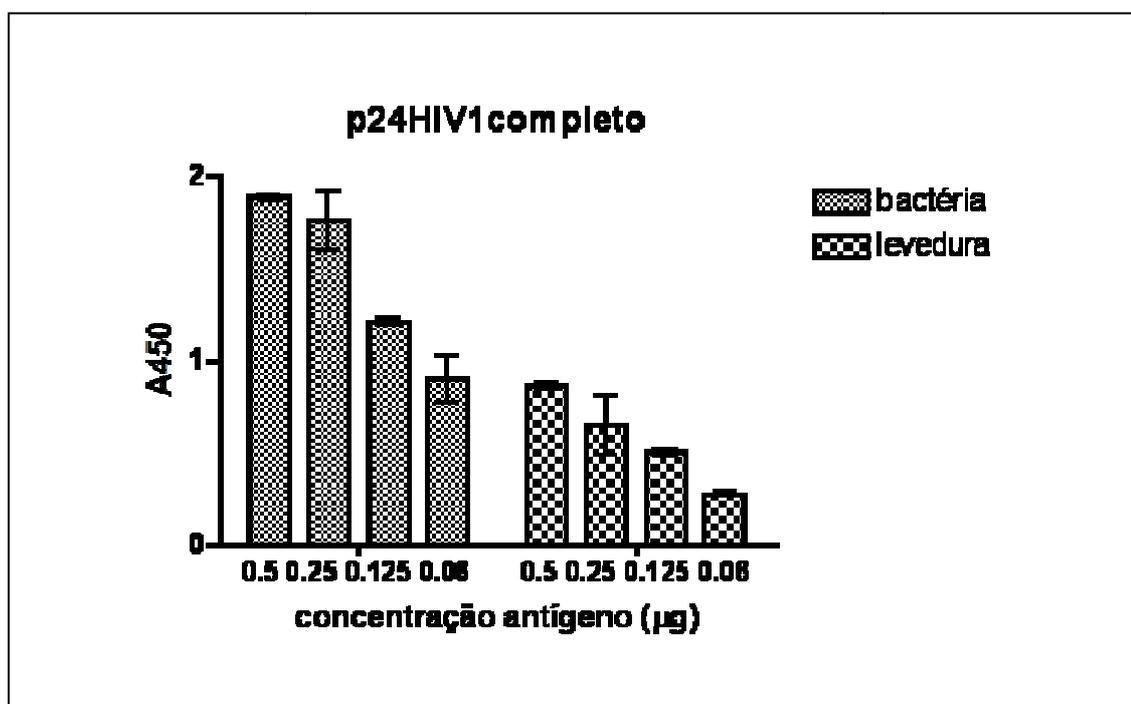
Figura 31- Expressão do antígeno p24HIV1 completo em vetor pKLCF e purificação com Chitin Beads.



Fonte: a autora

Nota: Gel de Poliacrilamida corado com Azul de Coomassie. p24HIV1 completo (PM) Peso Molecular, (SN) sobrenadante, (FT) Flow through, (LAV1) primeira lavagem, (LAV2) segunda lavagem, (EI) primeiro eluato, (EII) segundo eluato, (EIII) terceiro eluato. (retângulo) indicando a expressão da proteína;

Figura 32- Comparação dos antígenos p24HIV1 completo, expressos em bactéria e levedura, no ELISA.



Fonte: a autora

Nota: Teste realizado em duplicatas usando concentrações diferentes da proteína p24HIV1 completo expressa em bactéria e levedura e pool de soros de referência HIV+; Concentração do 2º anticorpo: 1:4000; (Eixo vertical) densidade óptica, (Eixo horizontal) quantidade de proteína recombinante em micrograma, utilizada para sensibilização da placa; Resultados expressos como média \pm desvio padrão, amostras foram analisadas estatisticamente pelo *t teste* $p < 0.0170$;

7.3 Expressão em sistema procarioto

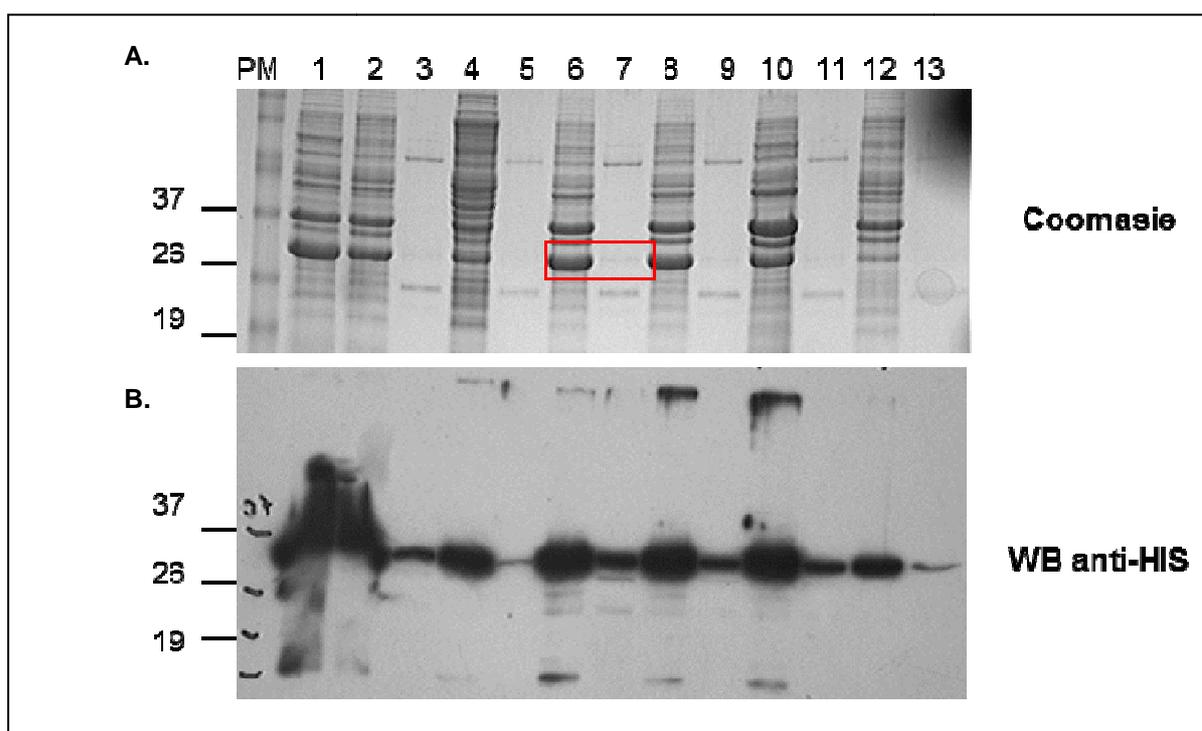
Para a avaliação dos antígenos quanto a sua capacidade de ser reconhecidos por soros de pacientes comprovadamente infectados com HIV/HTLV, através de ensaios de ELISA e Luminex, todas as construções foram expressas em *E. coli*. BL21 e expressão em Mini- e Midiescala. Apresentados aqui estão apenas as proteínas exclusivamente construídas nesta tese ou proteínas que foram utilizadas em posterior ensaio multiplex.

7.3.1 Teste de otimização para expressão

Devido ao alto *background* e dificuldade em identificar a expressão específica de algumas das proteínas, especialmente a dos antígenos cepa-específicos, foi realizada uma padronização/otimização das condições utilizando o antígeno 2.2.

Foram testadas as seguintes condições: a densidade ótica do crescimento das bactérias antes da indução (OD_{600} 0.5 ou 0.8); concentração de IPTG (0.1mM até 0.5mM); tempo de indução (2h ou 4h); temperatura (25° ou 30°C). Em um gel de poliacrilamida, porções do pellet das bactérias induzidas (e o primeiro eluato) foram fracionadas e coradas com Azul de Coomassie (figura 33A). O poço 7 (condição: crescimento OD_{600} 0.8, indução com 0.3mM IPTG por 2h à 30°C) mostra no eluato uma leve expressão da proteína com tamanho esperado, todavia ainda em nível considerado baixo. A especificidade dessa proteína foi confirmada através de ensaios de Western Blot utilizando anticorpo primário contra a cauda de histidina anti-HIS anticorpo (Figura 33B). Não obstante, o resultado demonstrou que a maioria da referida proteína, em todas as condições testadas, permanece na sua forma insolúvel no pellet. As condições escolhidas, a partir destes resultados, foram: crescimento da cultura antes da indução até OD_{600} 0.8, indução com 0.3mM IPTG por 2 horas, à 30°C. Ressaltando a necessidade da purificação dos corpos de inclusão em condições desnaturantes (utilizando uréia).

Figura 33- Otimização das condições para expressão da proteína 2.2 em BL21.



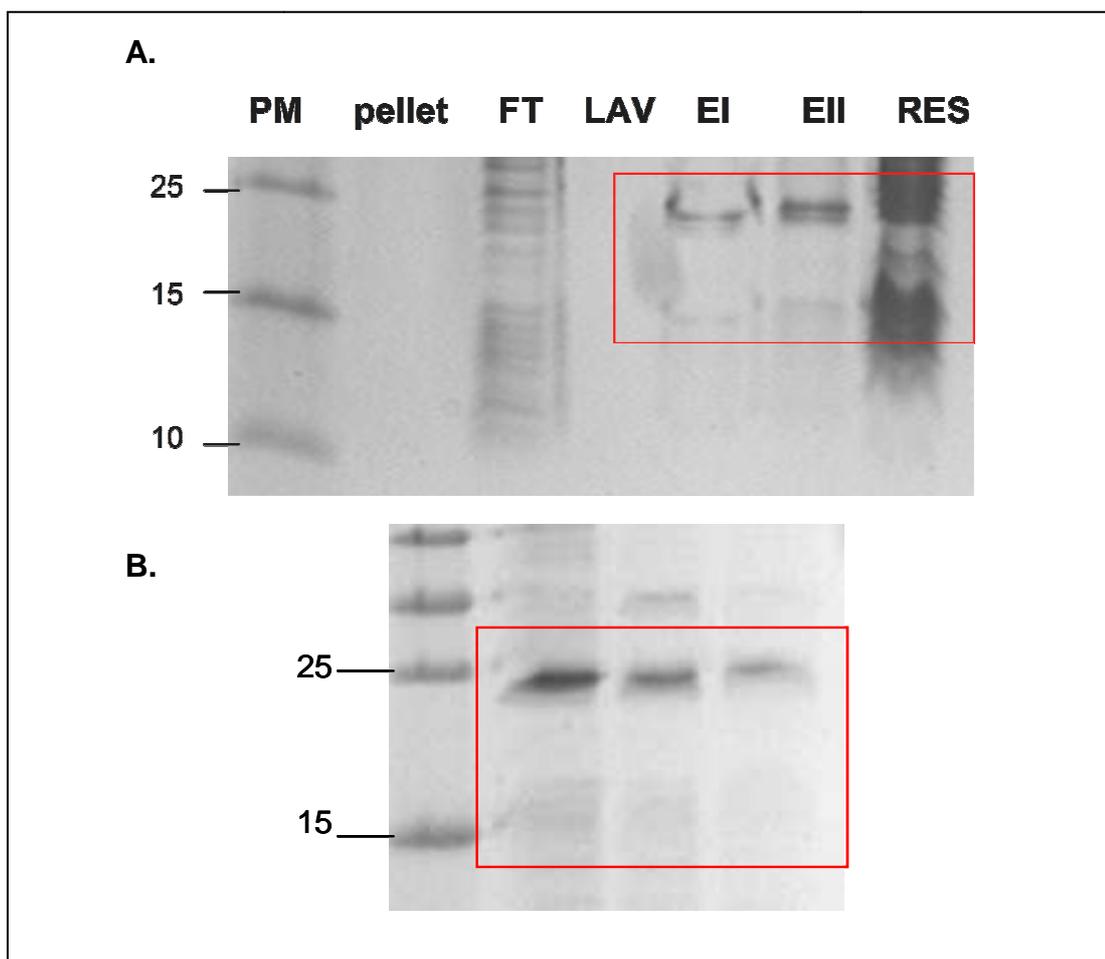
Fonte: a autora

Nota: (A) Gel de Poliacrilamida corado em Azul de Coomassie; (B). Western Blot com anti-HIS anticorpo; (PM) Peso Molecular, (1) pellet/OD₆₀₀ 0.5/0.5mM IPTG 4h 30°C, representando as condições usadas nos primeiros testes, (2) pellet/OD₆₀₀ 0.8/0.1mM IPTG 2h 30°C, (3) Eluato I/ OD₆₀₀ 0.8/0.1mM IPTG 2h 30°C, (4) pellet/OD₆₀₀ 0.8/0.2mM IPTG 2h 30°C, (5) Eluato I/OD₆₀₀ 0.8/0.2mM IPTG 2h 30°C, (6) pellet/OD₆₀₀ 0.8/0.3mM IPTG 2h 30°C, (7) Eluato I/OD₆₀₀ 0.8/0.3mM IPTG 2h 30°C, (8) pellet/OD₆₀₀ 0.8/0.4mM IPTG 2h 30°C, (9) Eluato I/OD₆₀₀ 0.8/0.4mM IPTG 2h 30°C, (10) pellet/OD₆₀₀ 0.8/0.5mM IPTG 2h 30°C, (11) pellet/OD₆₀₀ 0.8/0.5mM IPTG 2h 30°C, (12) pellet/OD₆₀₀ 0.8/0.5mM IPTG 2h 25°C (13) Eluato I/OD₆₀₀ 0.8/0.5mM IPTG 2h 25°C; (retângulo) indicando a expressão específica do antígeno 2.2;

7.3.2 Purificação dos antígenos com resina de Níquel

Das proteínas expressas neste trabalho apenas as proteínas p24HIV1 e a proteína HCV_Core1-117 foram expressas na sua forma solúvel (não sendo necessária a purificação de corpos de inclusão em condições desnaturantes). O gel de poliacrilamida indicou uma leve expressão de HCV_Core1-117, todavia boa parte desta proteína permanece ligada à resina mesmo após a sua eluição (Figura 34A). Numa segunda etapa de purificação desta proteína foi então utilizado um tampão de eluição com pH mais baixo (pH 4.5). Desta vez, a purificação resultou numa banda mais intensa nos eluatos e uma resina mais limpa (Figura 34B).

Figura 34- Expressão de HCV_Core 1-117.



Fonte: a autora

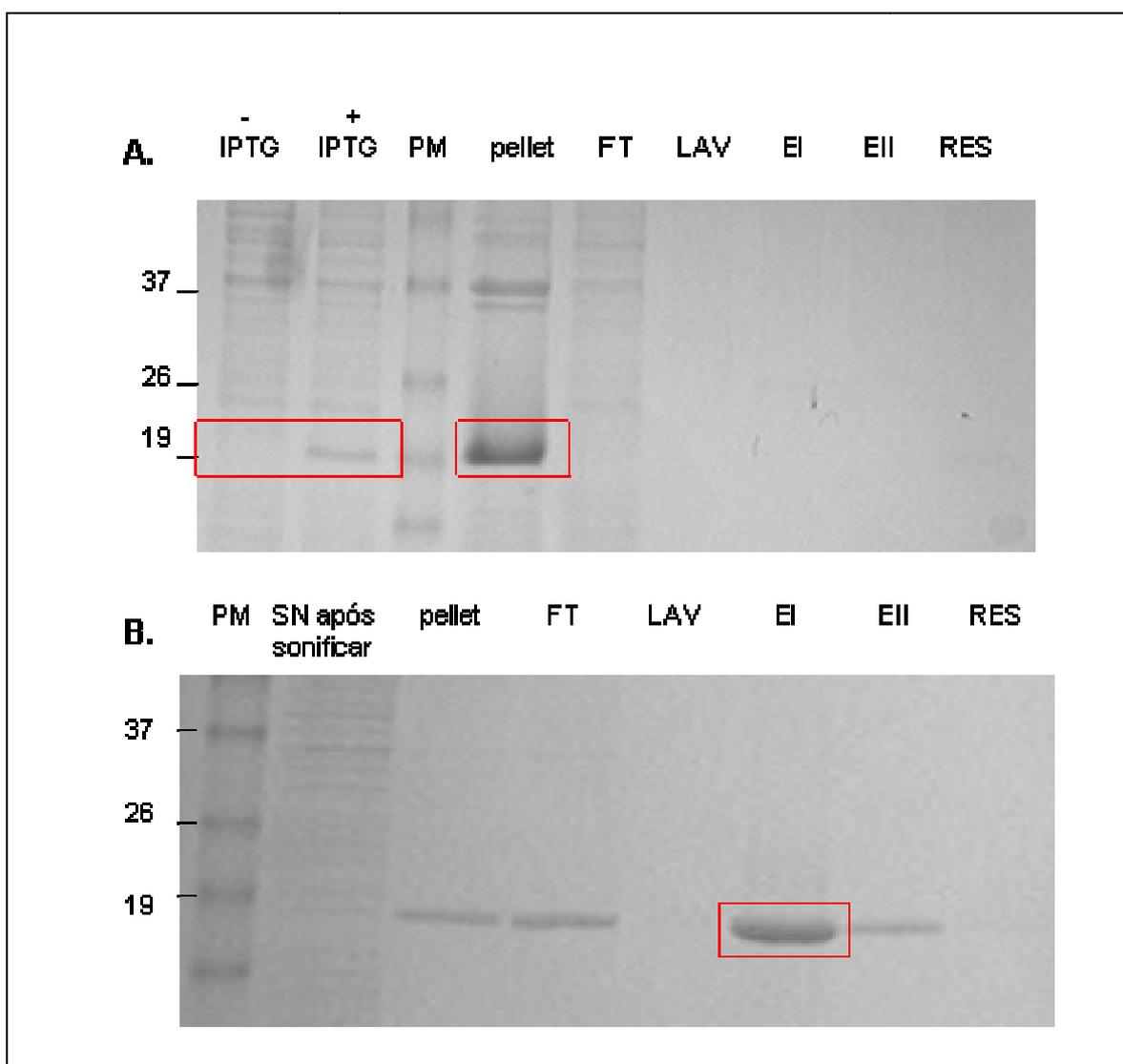
Nota: 15% Gel de Poliacrilamida corado em Azul de Coomassie; **A.** usando tampão de eluição pH8.0, (**PM**) peso molecular, (**pellet**) pellet bacteriano após sonicar, (**FT**) Flow Through, (**LAV**) lavagem, (**EI**) primeiro eluato, (**EII**) segundo eluato, (**RES**) resina. **B.** usando tampão de eluição pH 4.5; (retângulo) indica a expressão da proteína;

Um exemplo geral para o procedimento de avaliação da expressão em condições desnaturantes é dado com a proteína gp41 Δ HIV1.

A expressão mostrou uma banda específica após indução, embora insolúvel (pellet), indicando a presença da proteína em corpos de inclusão (Figura 35A). Para este fim, o uso de 8M úrea nos tampões mostrou a purificação/eluição das proteínas (EI e EII) (Figura 35B). Utilizando estas mesmas condições de expressão/purificação, foram também expressas e purificadas as seguintes proteínas abaixo, sem seus respectivos domínios trans-membranas (dados não mostrados), além das proteínas cepa-específica (Figura 36):

- a) gp41 Δ HIV1
- b) gp120 Δ HIV1 (com N- e C-terminal HIS tag)
- c) gp36 Δ internoHIV2
- d) gp46 Δ HTLV1
- e) gp52 Δ HTLV2
- f) gp21 Δ HTLV1

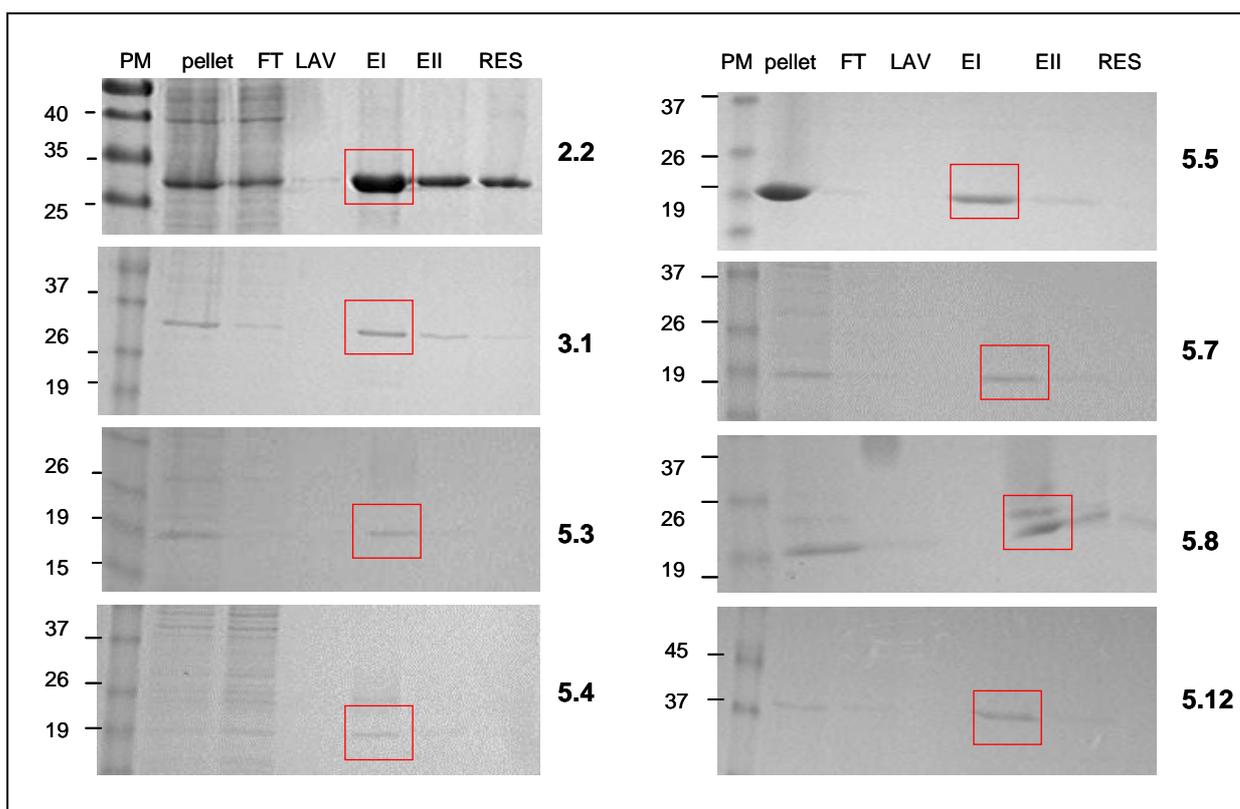
Figura 35- Expressão de gp41 Δ HIV1 em condições nativa e desnaturante.



Fonte: a autora

Nota: 15% Gel de Poliacrilamida corado em Azul de Coomassie; **A. Purificação sem uréia:** Um clone foi induzido (-) sem ou (+) com 0.5mM IPTG por 4h a 30°C; **B. Purificação com uréia:** Indução em midiescala usando tampões com 8M úrea. (retângulo vermelho) indicando a expressão, (PM) Peso Molecular; Depois de feita uma purificação em midiescala, mostrando a presença da proteína insolúvel no (pellet) pellet, (FT) Flow Through, (LAV) lavagem, (EI) primeira eluição, (EII) segunda eluição, (RES) Resina de Níquel; (retângulo) indicando a expressão;

Figura 36- Purificação dos antígenos cepa-específicos.

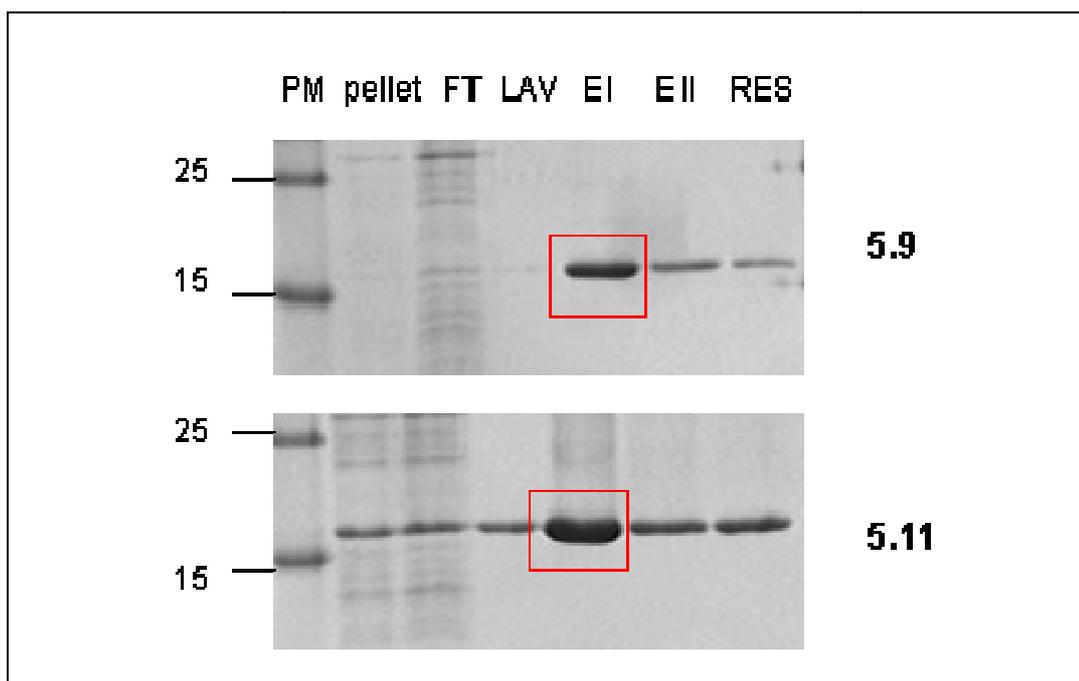


Fonte: a autora

Nota: Purificação das proteínas com 8M úreia após indução em midiescala com 0.3mM IPTG por 2h a 30°C. Uma amostra foi corrida no 15% Gel de Poliacrilamida, incluindo os controles da purificação e corado com Azul de Coomassie; **(PM)** peso Molecular; **(FT)** Flow Through; **(LAV)** lavagem; **(EI)** primeiro eluato; **(EII)** segundo eluato; **(RES)** Resina ; **(retângulo)** indica a expressão da proteína.

Devido à possibilidade que a cauda de histidina no N-terminal pudesse influenciar negativamente na expressão, os antígenos 2.1, 5.2, 5.6, 5.9, 5.10, 5.11, 6.1 foram também clonados no vetor de expressão pET28a (que permite à expressão dos mesmos fusionados à cauda de histidina C-terminal (Figura 37).

Figura 37- Purificação dos antígenos 5.9 e 5.11 com histidina C-terminal.



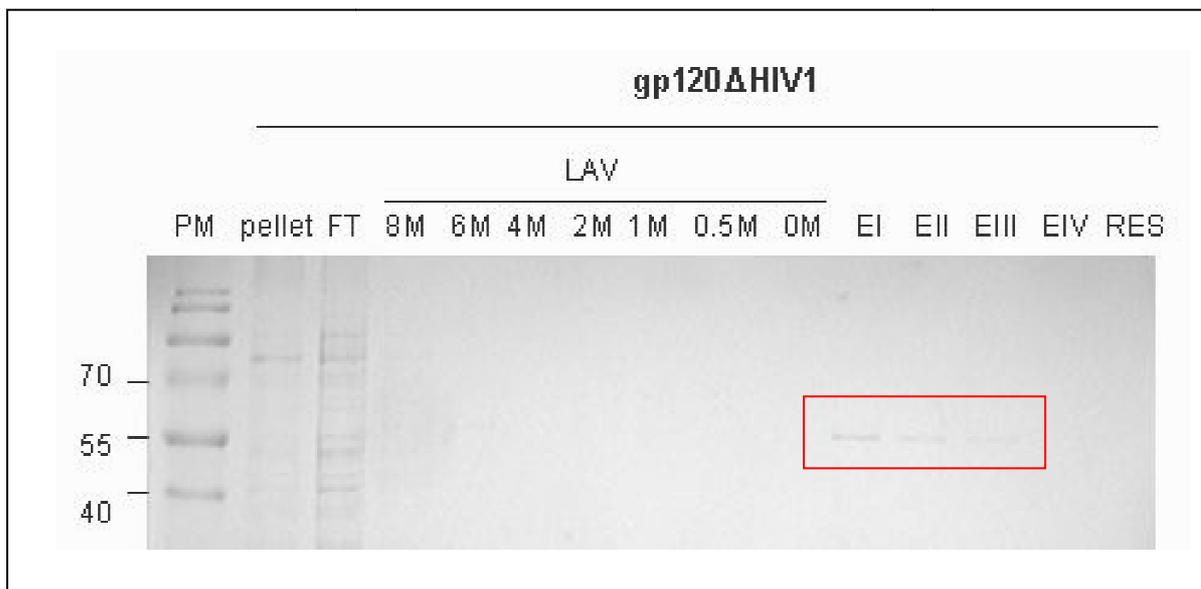
Fonte: a autora

Nota: Purificação das proteínas com 8M úreia após indução de midiescala com 0.3mM IPTG por 2h a 30°C. Uma amostra foi corrida no Gel de Poliacrilamida, incluindo os controles da purificação e corado com Azul de Coomassie; (**PM**) peso Molecular; (**FT**) Flow Through; (**LAV**) lavagem; (**EI**) primeiro eluato; (**EII**) segundo eluato; (**RES**) Resina ; (**retângulo**) indica a expressão da proteína.

7.3.3 Remoção da uréia via *matrix-assisted purification*

No caso de algumas proteínas, na maioria glicoproteínas sem o domínio TM, o nível de expressão foi considerado muito baixo. Para evitar uma perda maior das proteínas durante o processo de diálise, um procedimento necessário para a remoção da uréia da amostra, foi testada a *matrix-assisted purification* usando a proteína gp120 Δ HIV1. Esta técnica, descrita no artigo de *Rehm B.H.A. et al 2001*, permite tirar a uréia lentamente, através de lavagens da proteína ligada à resina de níquel, usando tampões de lavagem com concentrações decrescente de uréia. A figura 38 mostra a purificação de gp120 Δ HIV1_N-terminal utilizando este método.

Figura 38- Purificação da proteína gp120 Δ HIV1_N utilizando o método *Matrix-assisted in vitro purification*.



Fonte: a autora

Nota: 15% Gel de poliacrilamida corado com Azul de Coomassie, (**pellet**) controle pellet, (**FT**) controle Flow Through, (**LAV**) controle lavagem com tampões de 8M-0M uréia, (EI) primeiro eluato tampão pH8, (EII) segundo eluato tampão pH8, (EIII) terceiro eluato tampão pH8, (EIV) quarto eluato tampão pH 4.5, (**RES**) resina, (**retângulo**) indicando a purificação da proteína; tamanho esperado: 54 kDa

7.4 Verificação da antigenicidade

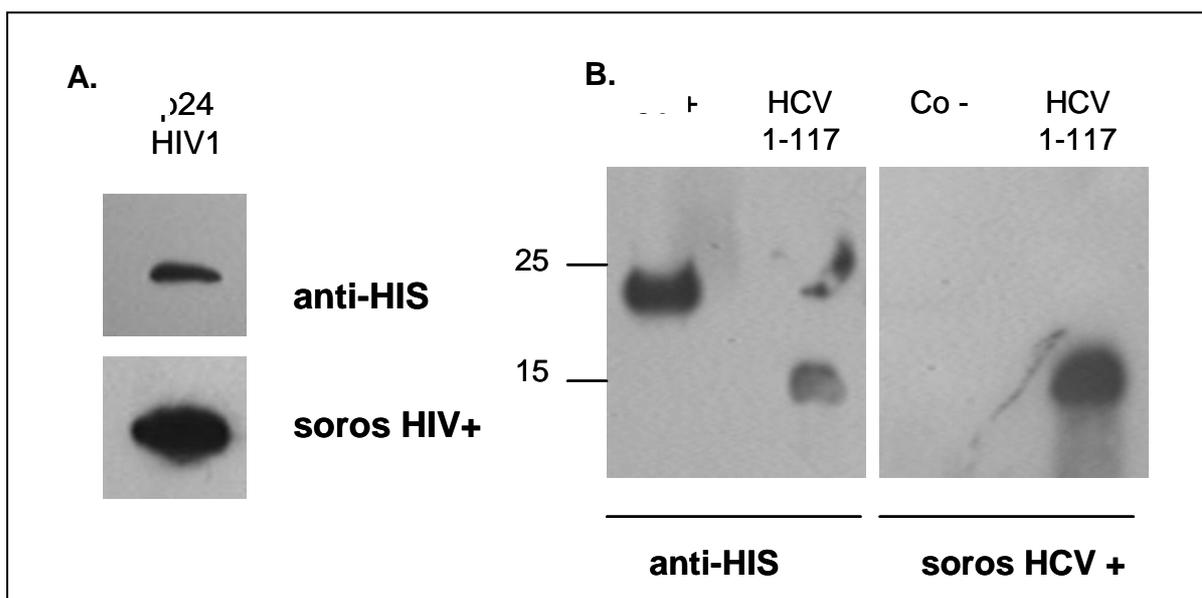
7.4.1 Western Blot

Para verificar a antigenicidade das proteínas expressas, inicialmente foram realizados ensaios de Western Blot, usando anticorpos anti-HIS e pools de 10 soros de referência positivos para HIV, HTLV ou HCV, respectivamente.

Os soros positivos para HIV e HCV foram cedidos pelo Laboratório Central de Pernambuco (LACEN-PE), sendo verificados através do ensaio comercial *ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo* (Abbott®) ou *Combo HCV* (Abbott®). Esse kit permite a detecção dos antígenos p24 e anticorpos da classe IgG e IgM dos HIV1 e HIV2, no mesmo teste, sem discriminar entre eles. Os soros positivos para HTLV foram obtidos através de painéis sorológicos comercialmente disponíveis.

A figura 39 demonstra a antigenicidade no WB com ~200ng de proteína, para p24HIV1 e HCV_Core1-117, respectivamente.

Figura 39- Expressão e antigenicidade de antígenos consenso expressos em bactéria.

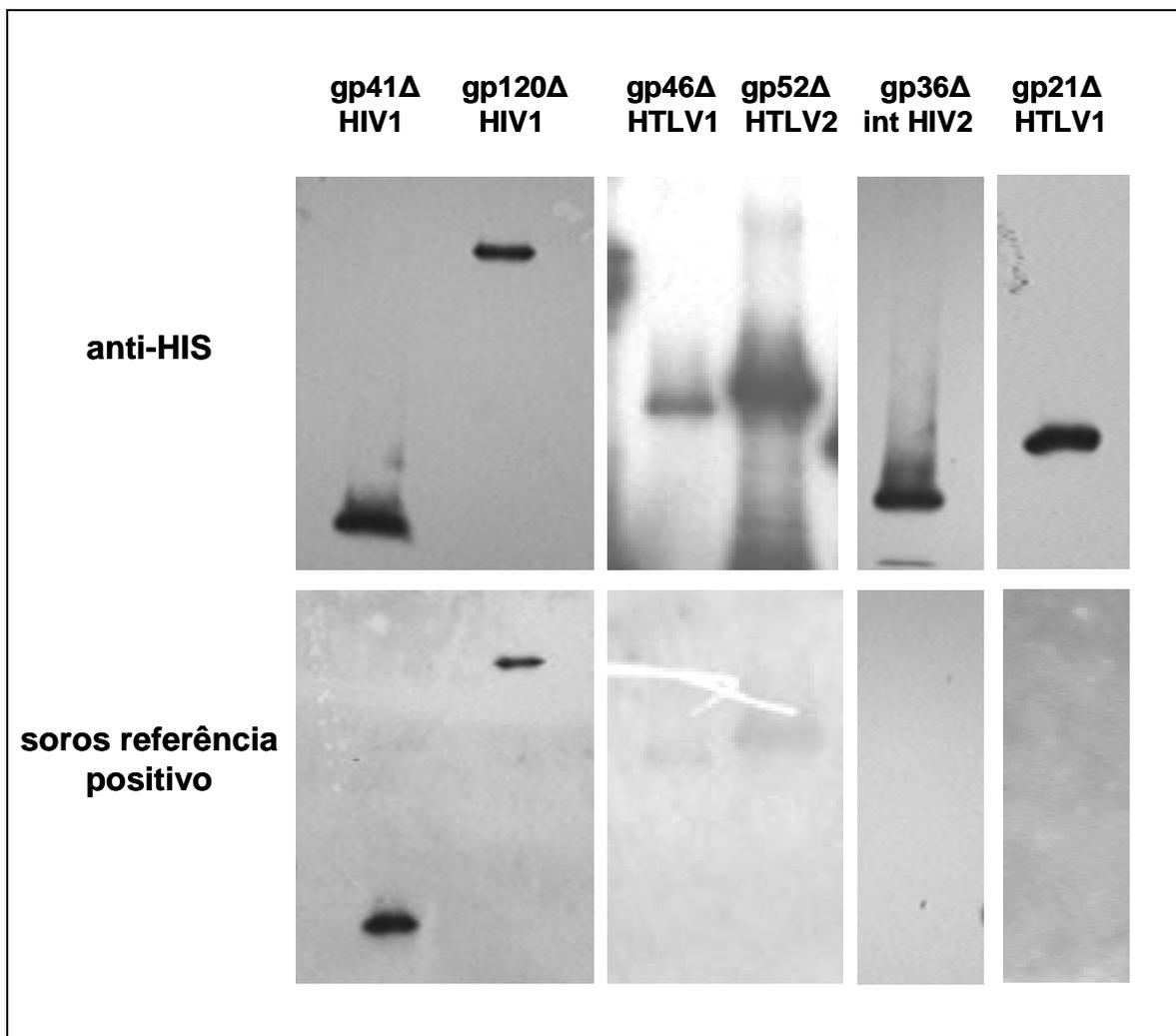


Fonte: a autora

Nota: Após fracionamento em 15% gel de poliacrilamida as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF e utilizadas nos ensaios de WB; (A) p24HIV1, (B) HCV_Core 1-117; (anti-HIS) WB com anticorpo anti-HIS monoclonal de camundongo, (soros) WB com pool de 10 soros de referência positivo para HIV e HCV;

Os resultados obtidos para as proteínas sem região trans-membrana demonstram a reatividade para todas as proteínas utilizando os anticorpos anti-HIS. Entretanto também demonstram uma ausência de reatividade com soros de referência, para os antígenos gp36 Δ internoHIV2 e gp21 Δ HTLV1 (Figura 40).

Figura 40- Western Blot das proteínas do envelope sem domínio trans-membrana.

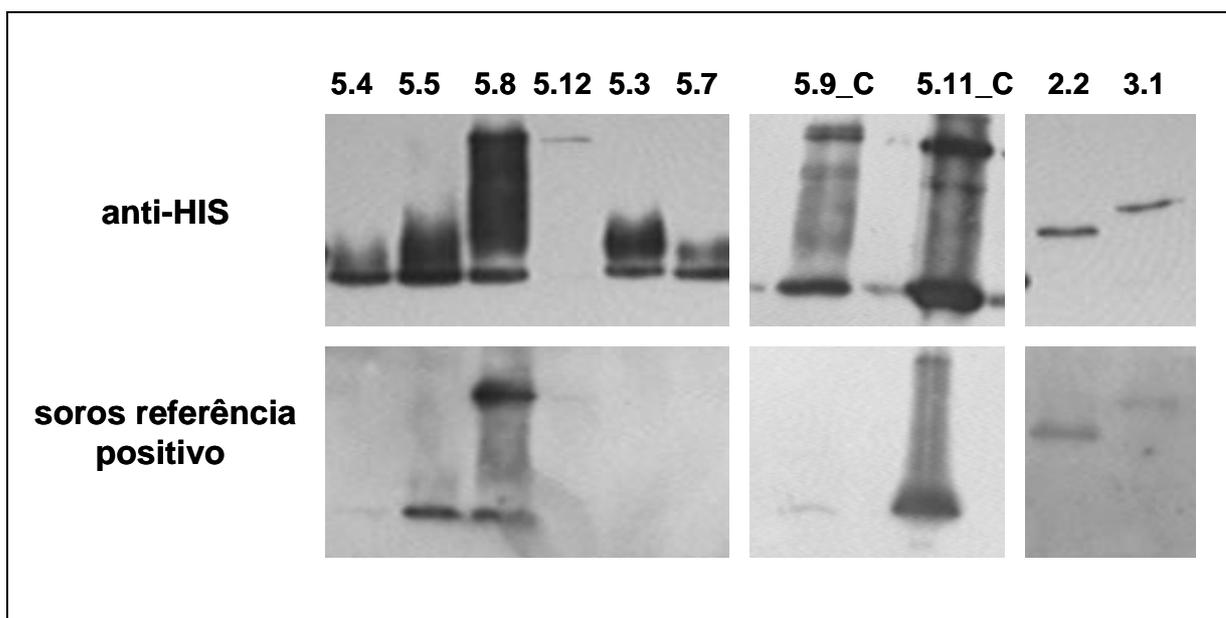


Fonte: a autora

Nota: Proteínas foram resolvidas em 15% gel de poliacrilamida e transferidas para membranas PVDF para posteriores ensaios de WB; (**anti-HIS**) WB utilizando anticorpos contra a cauda de histidina; (**soros referência positivo**) WB usando um pool de soros comprovadamente positivo para todos os vírus;

Todas as proteínas cepa-específica demonstraram bandas específicas detectadas pelo anticorpo anti-HIS. Todavia, somente os antígenos 5.5, 5.8 e 5.11-C demonstraram reatividade clara quando incubados com os soros de referência. Numa primeira tentativa, os antígenos 2.2 e 3.1 também não demonstraram reatividade no WB. Usando um segundo pool, com soros diferentes, os mesmos antígenos foram desta vez detectados com sucesso (Figura 41).

Figura 41- Western Blot dos antígenos cepa-específicos.



Fonte: a autora

Nota: Revelação da membrana PVDF carregada com os antígenos cepa-específicos; (**anti-HIS**) WB com anticorpo anti-histidina, (**soros referência positivo**) WB com pool de 10 soros de referência positivos para HIV ou HTLV, (**5.9_C e 5.11_C**) cauda de histidina C-terminal, (**5.3, 5.4, 5.5, 5.7, 5.8, 5.12**) proteínas do HIV, (**2.2 e 3.1**) proteínas do HTLV;

7.4.2 ELISA

Os soros utilizados nos ensaios de ELISA foram os mesmos utilizados nos ensaios de Western Blot. Após pre-testes de ELISA, testando concentrações diferentes de cada antígeno e diluições diferentes dos soros e do segundo anticorpo, as placas foram sensibilizadas com 0.25µg proteína recombinante por poço. Um pool de 10 soros de referência comprovadamente positivo ou negativo para determinada doença foi diluído de 1:500 para HIV ou HCV e 1:200 para HTLV. A diluição do segundo anticorpo, em ambos os casos, foi de 1:5000. Nas análises foram incluídos soros comprovadamente positivos para outros retrovírus (HIV ou HTLV) ou flavivírus (febre amarela), para indicar a especificidade do antígeno quanto ao reconhecimento pelos anticorpos dos pacientes. Os testes foram realizados em triplicatas. Além da apresentação de cada antígeno em gráficos, foi calculado também o *Índice de cut-off*, apresentado na tabela 13.

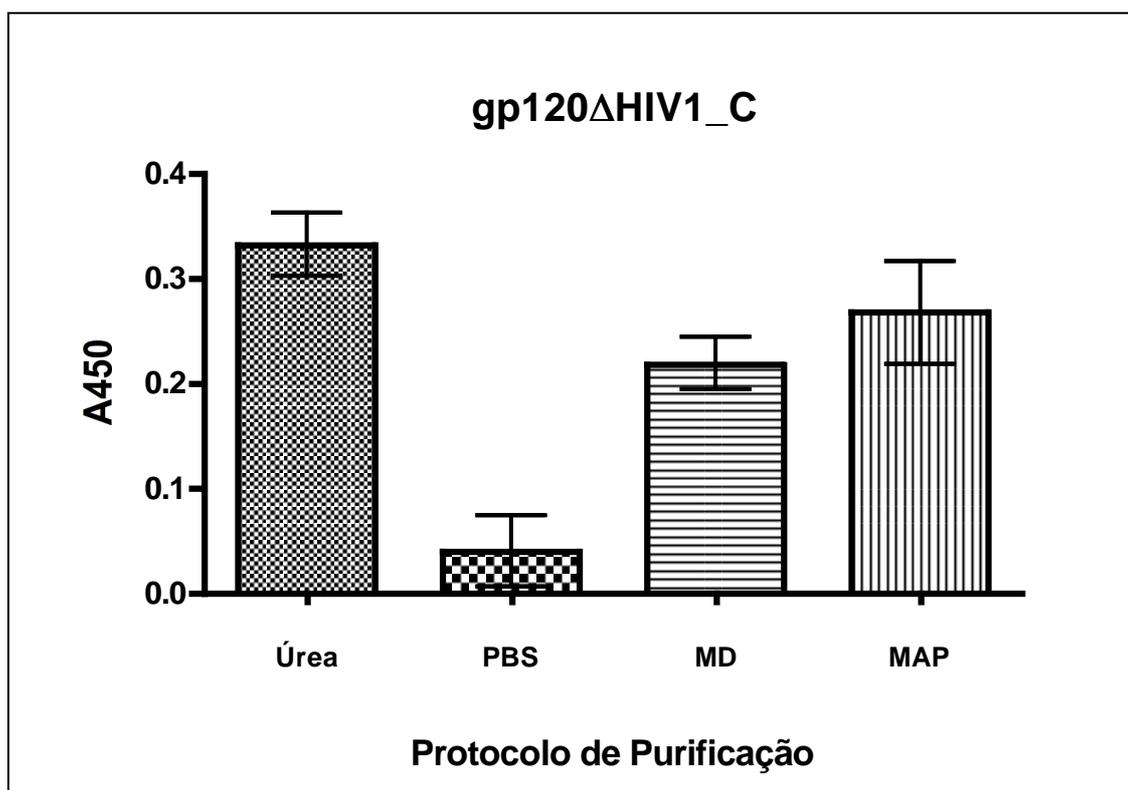
7.4.2.1 Padronização dos testes de ELISA

A desvantagem da purificação com tampões contendo uréia é a necessidade de ter de remover a mesma, no final do procedimento. A uréia deixa a proteína solúvel, desnaturada e isto pode criar problema no reconhecimento de epítomos, pelos anticorpos dos pacientes. Desta forma, é crucial restaurar o redobramento correto de cada antígeno. Isto pode ser uma tarefa delicada, pois depende da escolha do procedimento adequado para cada proteína.

Para a maioria dos antígenos purificados com uréia, a técnica de diálise foi considerada satisfatória. Entretanto, para a proteína gp120ΔHIV1 (que não foi reconhecida por soro de paciente após a diálise) foi necessário o estabelecimento de outros métodos para a remoção da uréia. Entre as técnicas que foram utilizadas estão a diálise usando tampões diferentes para baixar o conteúdo de uréia lentamente e a *purificação assistida pela matriz* (ingl. *Matrix-assisted purification*). Outro motivo para a falta de reatividade no ELISA pode ser a hidrofobicidade alta de algumas proteínas, que pode causar problema na sensibilização da placa de ELISA. Este tipo de situação levou alguns pesquisadores a sensibilizar a placa com a proteína ainda em solução de 8M uréia (SOHN et al., 1996).

Os testes das condições do redobramento e de ELISA com o antígeno gp120 Δ HIV1_C foram conduzidos nas condições descritas antes. O resultado mostrou reatividade com soros de referência positivo para HIV, usando a proteína ainda em solução de uréia 8M, dialisada com tampões decrescendo lentamente a concentração de uréia ou purificada com a técnica de *matrix-assisted purification* (Figura 42).

Figura 42- ELISA de gp120 Δ HIV1 purificada através de diferentes métodos.



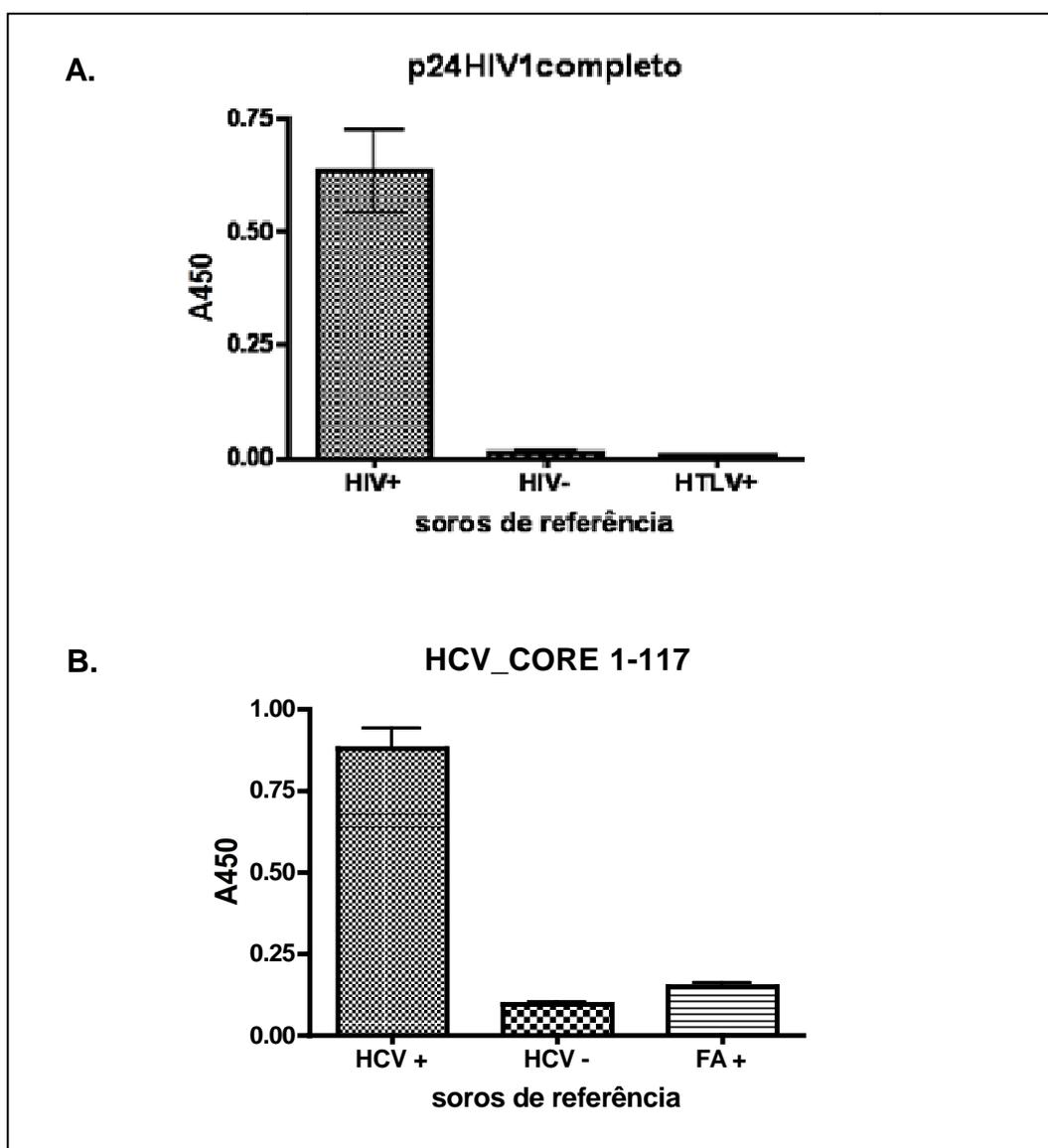
Fonte: a autora

Nota: ELISA feita em triplicata, com 0.25 μ g antígeno gp120 Δ HIV1 por poço, usando pool de soro de referência HIV+; (**uréia**) proteína purificada com 8M uréia, usada sem diálise; (**PBS**) proteína purificada com uréia e dialisada contra PBS; (**MD**) proteína purificada e dialisada pelo método *múltipla diálise*, decrescendo a concentração de uréia lentamente; (**MAP**) proteína purificada com o método de *matrix-assisted purification* utilizando a resina na coluna e tampões de lavagem com concentração decrescente de uréia; Gráficos feitos com programa PRISM; Resultados expressos como média \pm desvio padrão; As amostras foram analisadas estatisticamente pelo teste ANOVA ($p < 0.0001$).

7.4.2.2 Antígenos consenso

Os resultados indicam alta sensibilidade e especificidade para o antígeno p24HIV1 completo (Figura 43) e HCV_CORE1-117 (Figura 44).

Figura 43- Antigenicidade antígenos consenso no ELISA.



Fonte: a autora

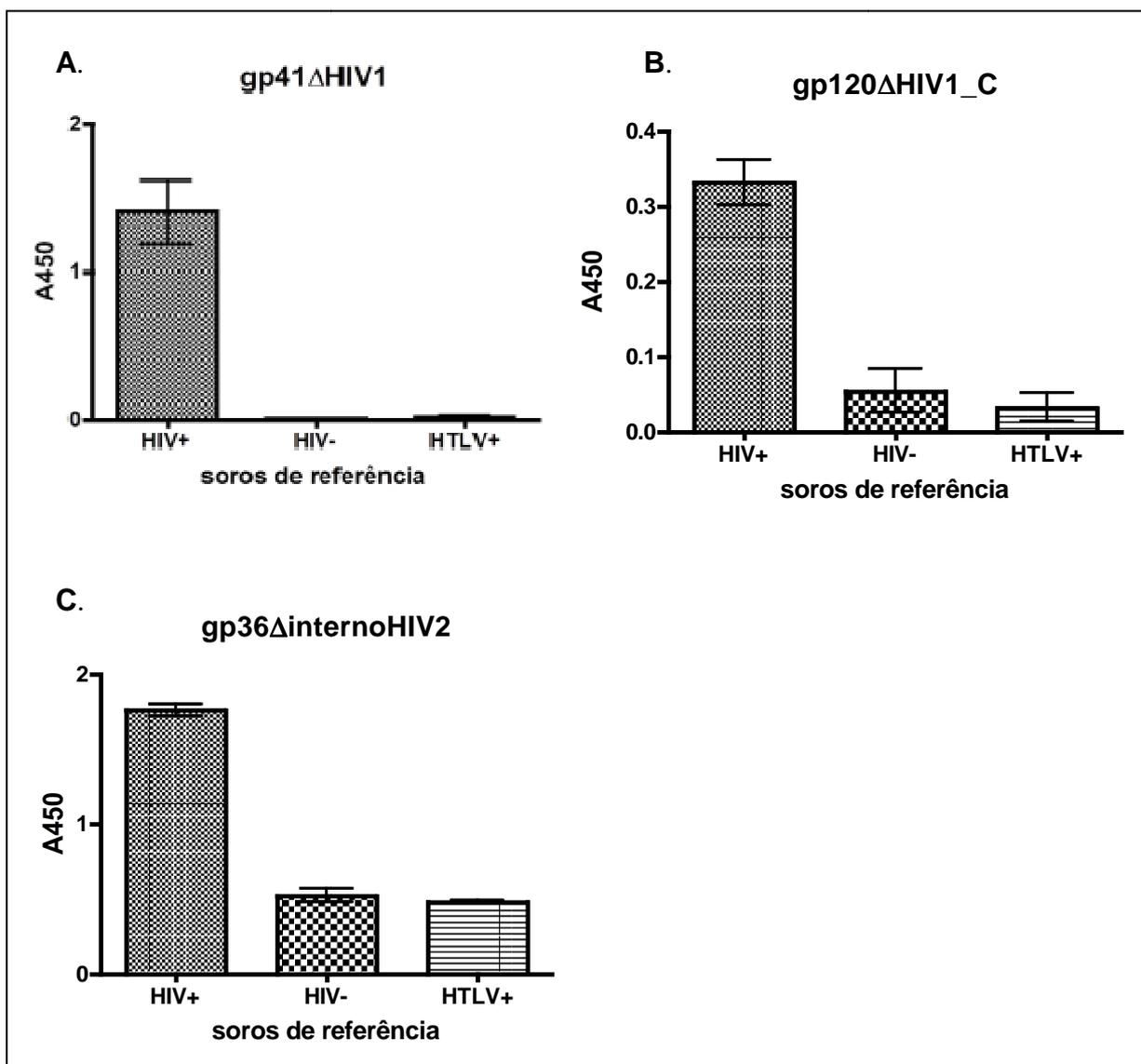
Nota: Antigenicidade dos antígenos consenso medido por ELISA usando pool de 10 soros de referência; **(A)** p24HIV1; HIV+: soro positivo, HIV- soro neg para HIV, HTLV+ soro de outro retrovirus indicando reatividade cruzada; **(B)** HCV_CORE 1-117; HCV+ soro positivo, HCV- soro negativo, FA+ (Febre Amarela) soro de outro Flavivirus indicando reatividade cruzada; Cada condição foi realizada em triplicatas. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. As amostras foram analisadas estatisticamente pelo teste ANOVA ($p < 0.0001$).

7.4.2.3 Antígenos do envelope sem região trans-membrana (TM)

Nos testes finais de ELISA, todas as proteínas utilizadas para sensibilização das placas foram aplicadas na concentração de 0.25µg/poço em solução de 8M úreia.

Os antígenos gp41ΔHIV1, gp120ΔHIV1, gp36ΔinternoHIV2 (Figura 45) e gp21ΔHTLV1 mostraram alta reatividade indicando boa sensibilidade e especificidade, enquanto os gp46ΔHTLV1 e gp52ΔHTLV2 indicaram reatividade cruzada devido a reatividade utilizando soros de outros retrovirus (HIV) (Figura 46).

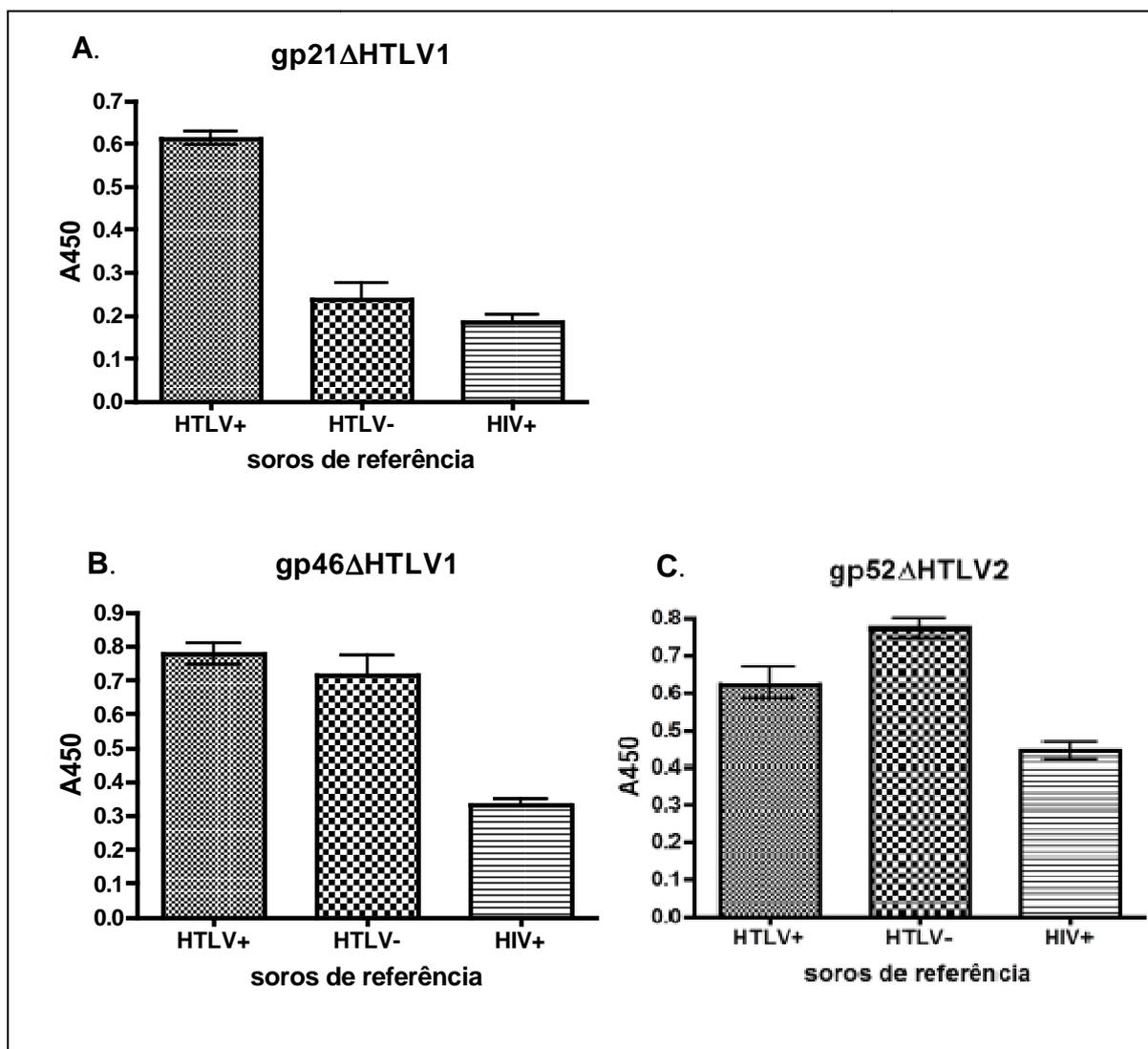
Figura 44- Antigenicidade dos antígenos HIV envelope sem a região trans-membrana no ELISA.



Fonte: a autora

Nota: Antigenicidade dos antígenos HIV sem região transmembrana medidos por ELISA usando pool de 10 soros de referência; (A) gp41 Δ HIV1, (B) gp120 Δ HIV1, (C) gp36 Δ internoHIV2; (HIV+) positivo para HIV ou (HIV-) negativo para HIV, indicando a sensibilidade dos antígenos, (HTLV+) soro positivo para HTLV+, em caso da imunoreatividade ser ausente ou baixa: indica o reconhecimento específico de anticorpos contra o retrovírus HIV; Foram realizadas triplicatas de cada condição usando 0,25 μ g antígeno por poço. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. As amostras foram analisadas estatisticamente pelo teste ANOVA ($p < 0.0001$);

Figura 45- Antigenicidade dos antígenos HTLV envelope sem a região trans-membrana no ELISA.



Fonte: a autora

Nota: Antigenicidade dos antígenos HTLV sem a região transmembrana medidos por ELISA usando pool de 10 soros de referência; (A) gp21ΔHTLV1, (B) gp46ΔHTLV1, (C) gp52ΔHTLV2); (HTLV+) positivo para HTLV ou (HTLV-) negativo para HTVL, indicando a sensibilidade dos antígenos, (HIV+) soro positivo para HIV+, em caso da imunoreatividade ser ausente ou baixa: indica o reconhecimento específico de anticorpos contra o retrovirus HTLV; Foram realizadas triplicatas de cada condição usando 0,25μg antígeno por poço Resultados expressos como média ± desvio padrão. As amostras foram analisadas estatisticamente pelo teste ANOVA ($p < 0.0001$), exceção gp46ΔHTLV1 feito em duplicata, usando *t* teste ($p < 0,0065$).

7.4.2.4 Antígenos cepa-específicos

As proteínas cepa-específicas expressas foram igualmente submetidas aos ensaios de ELISA. Todos os antígenos de HIV demonstraram alta sensibilidade e especificidade (Figura 47). A sensibilidade e especificidade dos antígenos HTLV indicada pelo teste, foram consideradas muito baixas (Figura 48).

Figura 46- Antigenicidade dos antígenos HIV cepa-específicos no ELISA.

(continua)

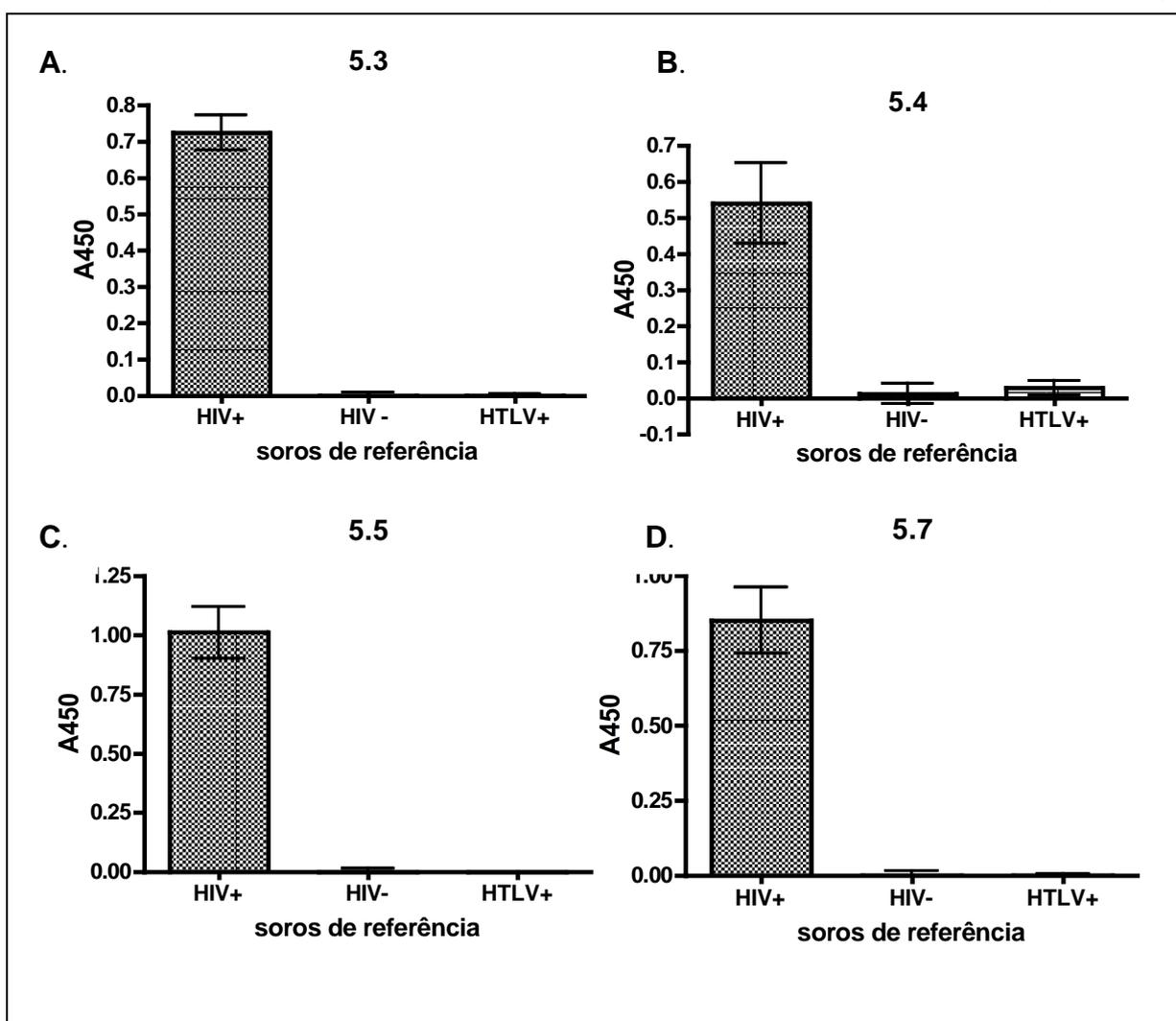
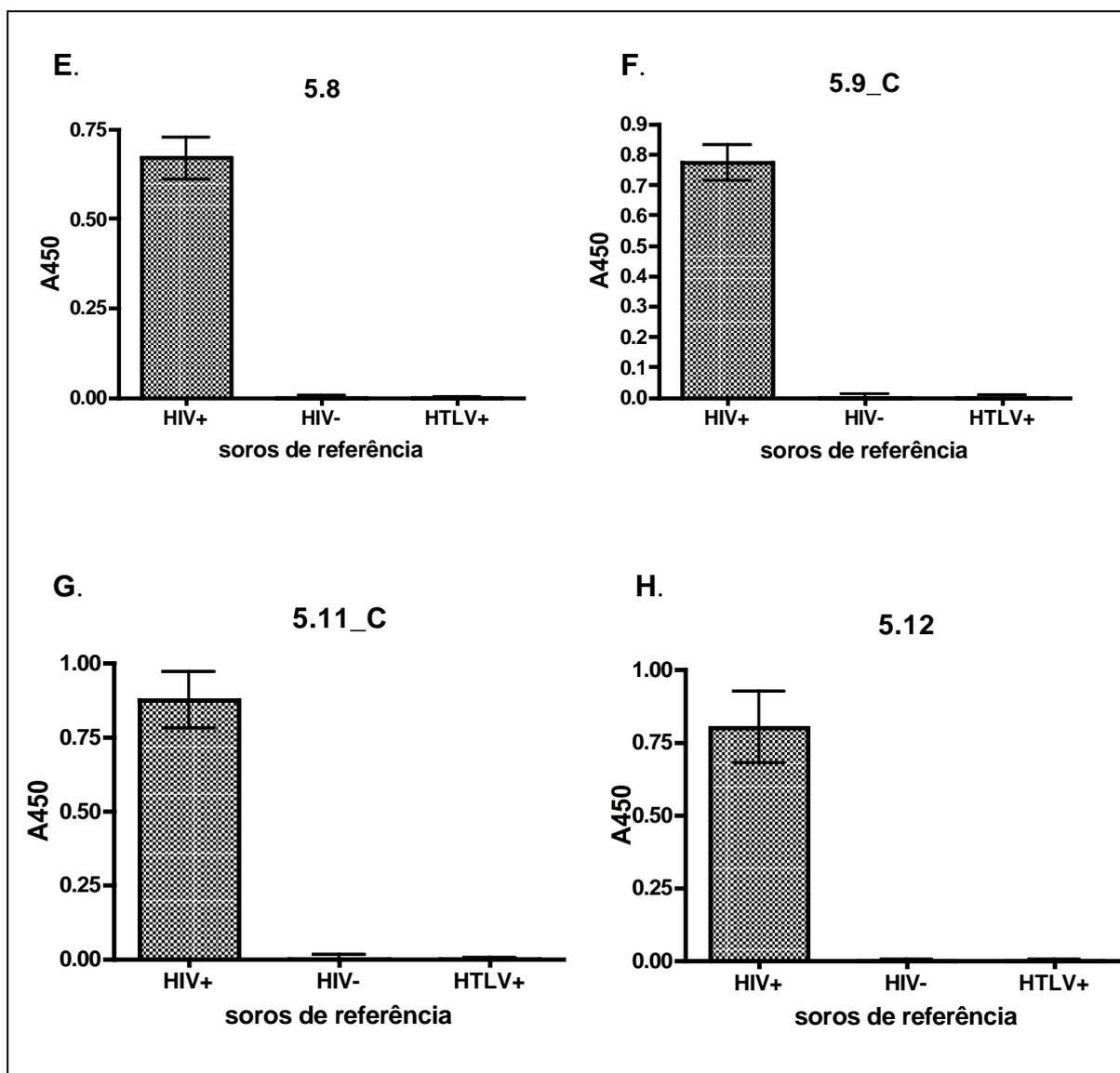


Figura 46- Antigenicidade dos antígenos HIV cepa-específicos no ELISA.

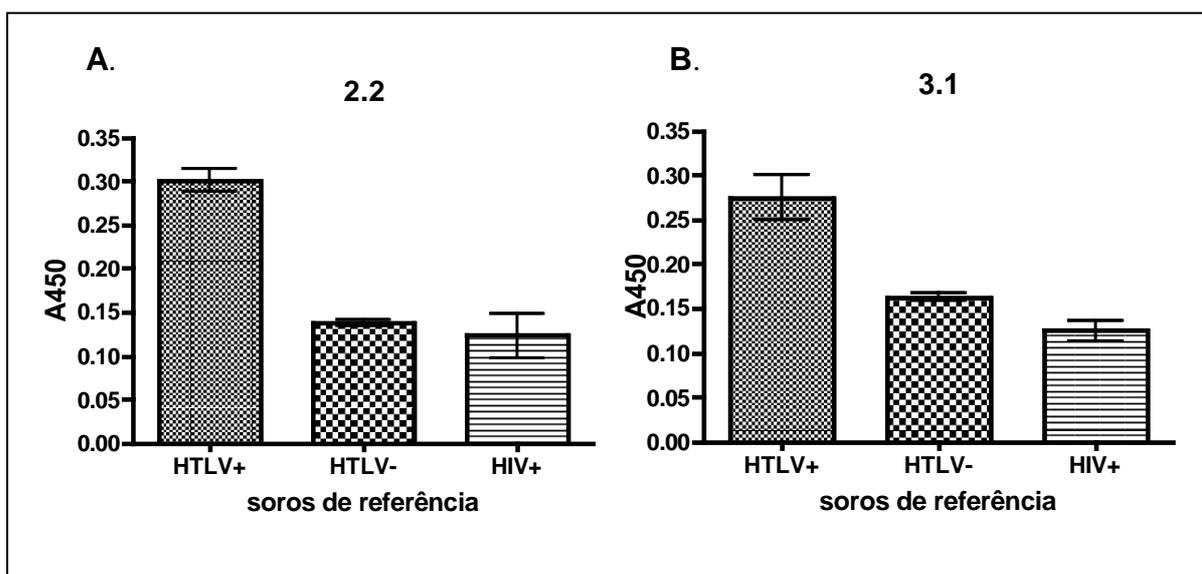
(conclusão)



Fonte: a autora

Nota: Antigenicidade dos antígenos HTLV sem a região transmembrana medidos por ELISA usando pool de 10 soros de referência (**HIV+**) positivo para HIV ou (**HIV-**) negativo para HIV, indicando a sensibilidade dos antígenos, (**HTLV+**) soro de referência HTLV+; (**A**) 5.3, (**B**) 5.4, (**C**) 5.5, (**D**) 5.7, (**E**) 5.8, (**F**) 5.9_C, (**G**) 5.11_C, (**H**) 5.12; Foram realizadas triplicatas de cada condição usando 0,25µg antígeno por poço. Resultados expressos como média ± desvio padrão. As amostras foram analisadas estatisticamente pelo teste ANOVA ($p < 0.0001$),

Figura 47- Antigenicidade dos antígenos HTLV cepa-específicos no ELISA.



Fonte: a autora

Nota: Antigenicidade dos antígenos HTLV sem a região trans-membrana medidos por ELISA, utilizando pool de 10 soros de referência; (A) 2.2, (B) 3.1; (HTLV+) positivo para HTLV ou (HTLV-) negativo para HTLV, indicando a sensibilidade dos antígenos, (HIV+) soro HIV+, em caso imunoreatividade ser ausente ou baixa: indica o reconhecimento específico de anticorpos contra o retrovirus HTLV; Foram realizadas triplicatas de cada condição usando 0,25µg antígeno por poço resultados expressos como média ± desvio padrão. As amostras foram analisadas estatisticamente pelo teste ANOVA ($p < 0.0001$),

Quadro 13- Índices de *cut-off* dos resultados do ELISA.

Antígenos HIV	Índice de cut-off	Antígenos HTLV	Índice de cut-off
p24HIVcompleto	19.18	gp21ΔHTLV1	1.40
gp41ΔHIV1	54.04	gp46ΔHTLV1	0.84
gp120ΔHIV1	2.35	gp52ΔHTLV2	0.74
gp36ΔinternoHIV2	2.70	2.2	2.05
5.3	24.1	3.1	1.50
5.4	3.10		
5.5	18.67		
5.7	13.44		
5.8	20.27		
5.9_C	13.58		
5.11_C	14.52		
5.12	33.29		

Antígenos HCV	Índice de cut-off
HCV_CORE 1-117	7.8

Fonte: a autora

Nota: Representação dos resultados dos antígenos no teste ELISA em forma de Índice.

O índice foi calculada dividindo o sinal obtido no leitor de ELISA pelo *cut-off*. Considerando, **Índice > 1.0:** reativo, **Índice 1 - 0.9:** limítrofe, **Índice < 0.9:** não reativo; o *cut-off* foi determinado da seguinte forma: média de triplicatas do controle negativo (soros comprovadamente negativo para determinada doença) + 3x desvios padrão; Dessa forma se mostram os antígenos gp46ΔHTLV1 e gp52ΔHTLV2, como únicos, com não-reativos;

7.4.3 xMAPLuminex

Os antígenos também foram ainda acoplados à microesferas, testando três tampões de acoplamento diferentes. No final, 2500 microesferas foram utilizados para a reação com soros individuais diluídos 1:200 no sistema xMAPLuminex. Após as incubações, curvas ROC foram traçadas para calcular a sensibilidade e especificidade de cada antígeno.

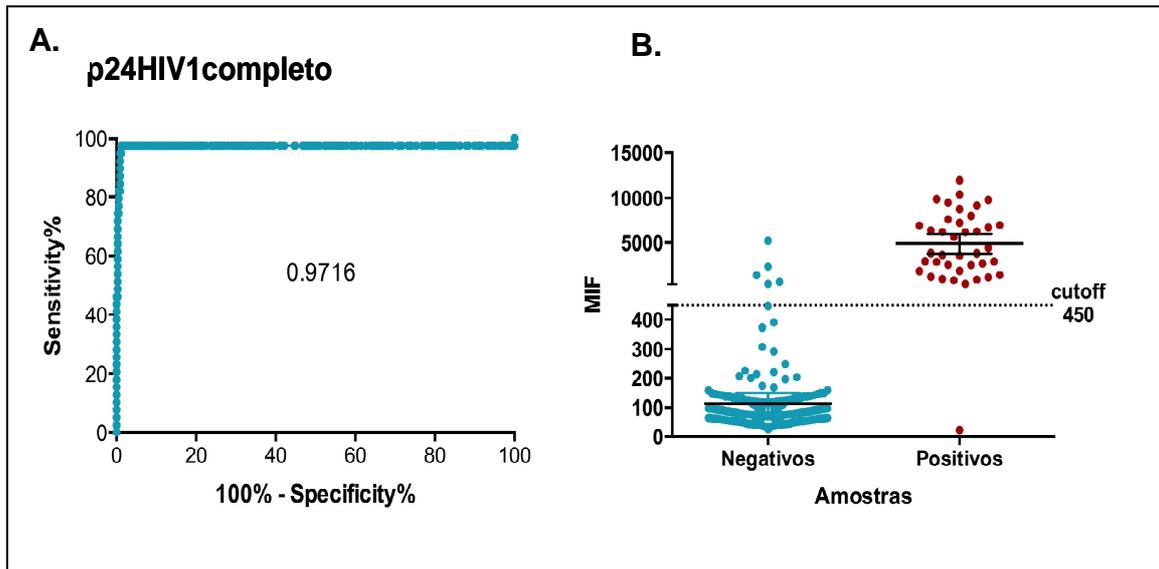
Para as análises foram utilizadas as seguintes quantidades de soros:

- a) p24HIV1: 329 negativos, 39 positivos para HIV,
- b) gp41 Δ HIV1: 326 negativos, 39 positivos para HIV
- c) gp120 Δ HIV1: 341 negativos e 26 positivos para HIV
- d) cepa-específicos: 80 negativos, 41 positivo para HIV1 e 7 para HIV-2
- e) antígenos de HTLV: 50 negativos, 37 positivos para HTLV1 e 9 para HTLV-2

Todos os antígenos de HIV, consenso (Figura 49), sem região trans-membrana (Figura 50) e cepa-específicos (Figura 51) demonstraram sensibilidade alta (entre 80%-100%) e especificidade alta (entre 95,5%-100%). Por outro lado, a sensibilidade e especificidade dos antígenos HTLV foram consideradas na maioria das vezes baixas, entre 66,67%-97,3% e 72,4%-87,4%, respectivamente.

As análises de gp21 Δ HTLV1, gp46 Δ HTLV1, gp36 Δ HIV2, 5.9_C HIV1, 5.11_C HIV1 e HCV_Core 1-117 ainda estão em andamento.

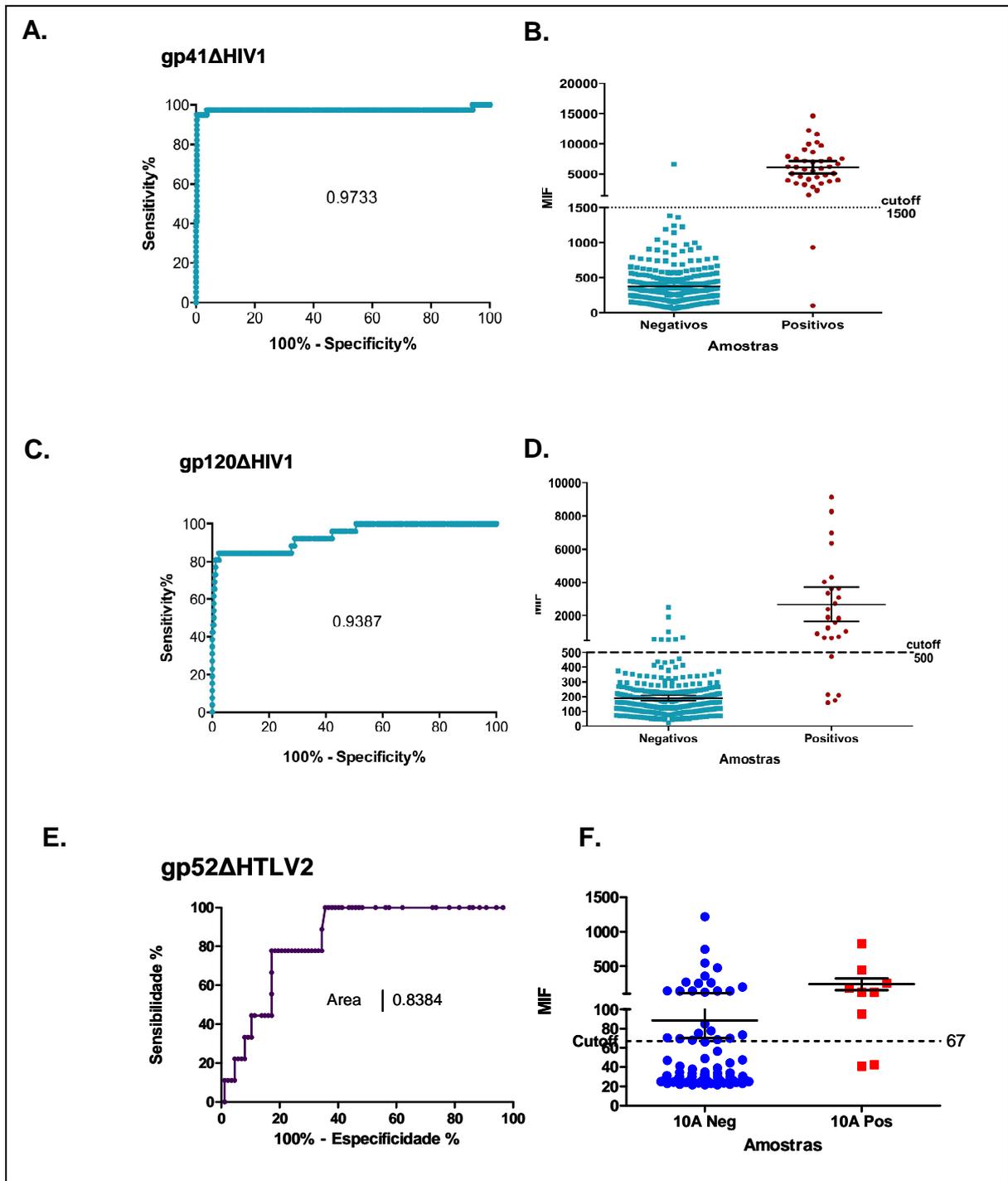
Figura 48- Análise de Luminex dos antígenos consenso.



Fonte: a autora

Nota: Análise Luminex realizada com 2500 microesferas acopladas e soros individuais; (p24HIV1 completo) (A) Curva ROC, (B) Scatter Plot;

Figura 49- Análise de Luminex dos antígenos do envelope sem a região trans-membrana.



Fonte: a autora

Nota: Antígenos sem região trans-membrana: gp41ΔHIV1, gp120ΔHIV1_C, gp52ΔHTLV2; Análise Luminex realizado com 2500 microesferas acopladas e soros individuais; (A, C, E) Curva ROC, (B, D, F) Scatter Blot;

Figura 50- Análise de Luminex dos antígenos cepa-específicos.

(continua)

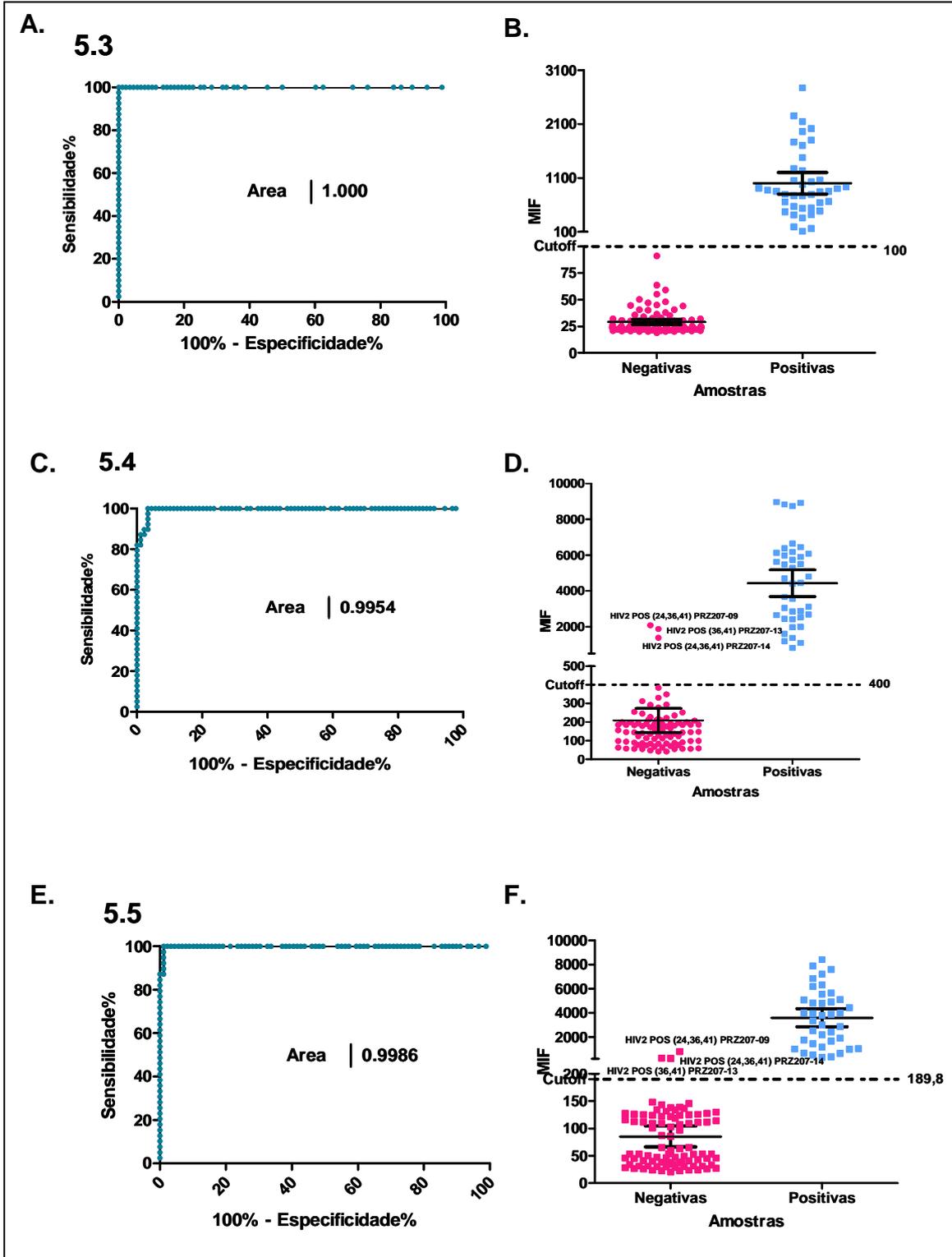


Figura 50- Análise de Luminex dos antígenos cepa-específicos.

(continuação)

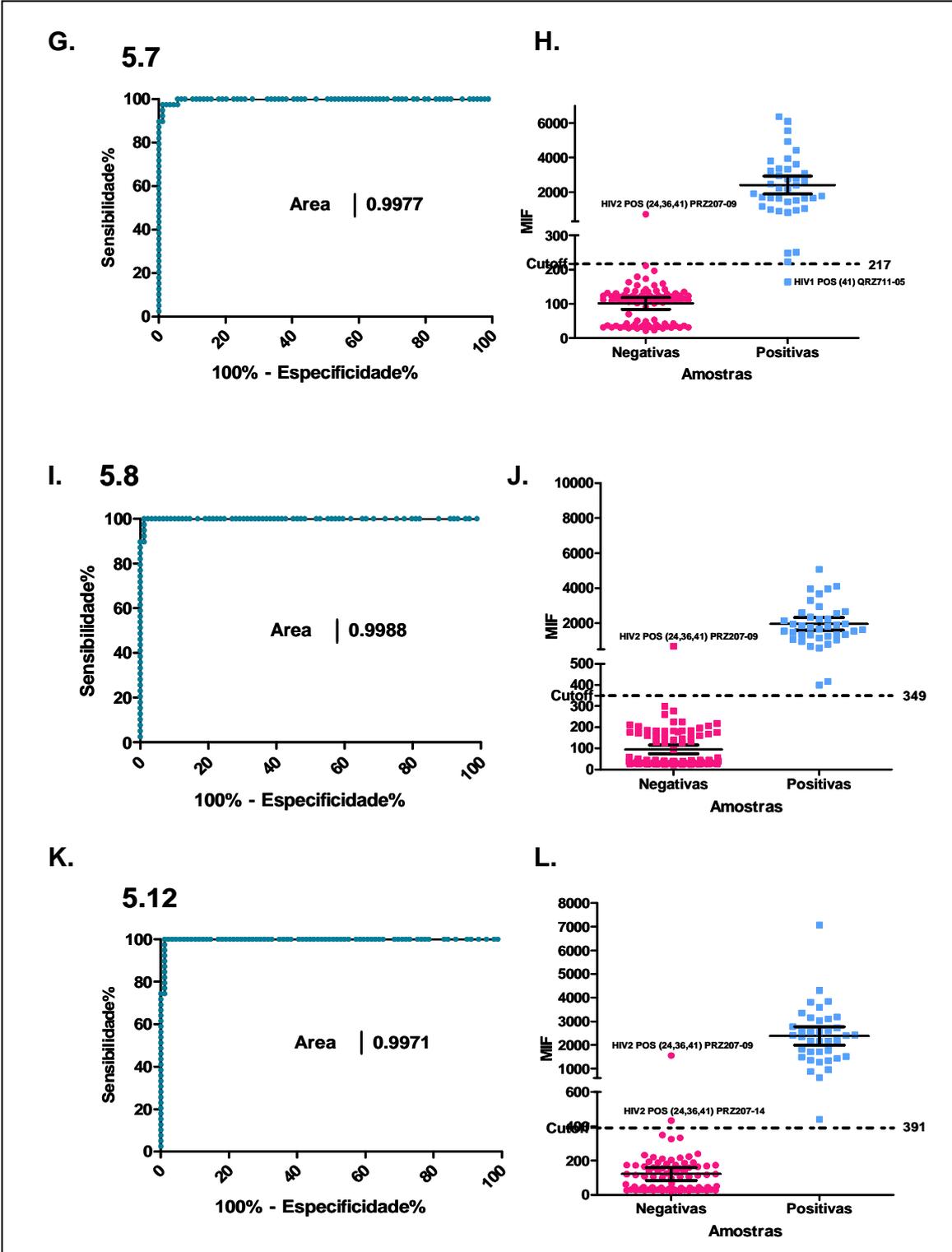
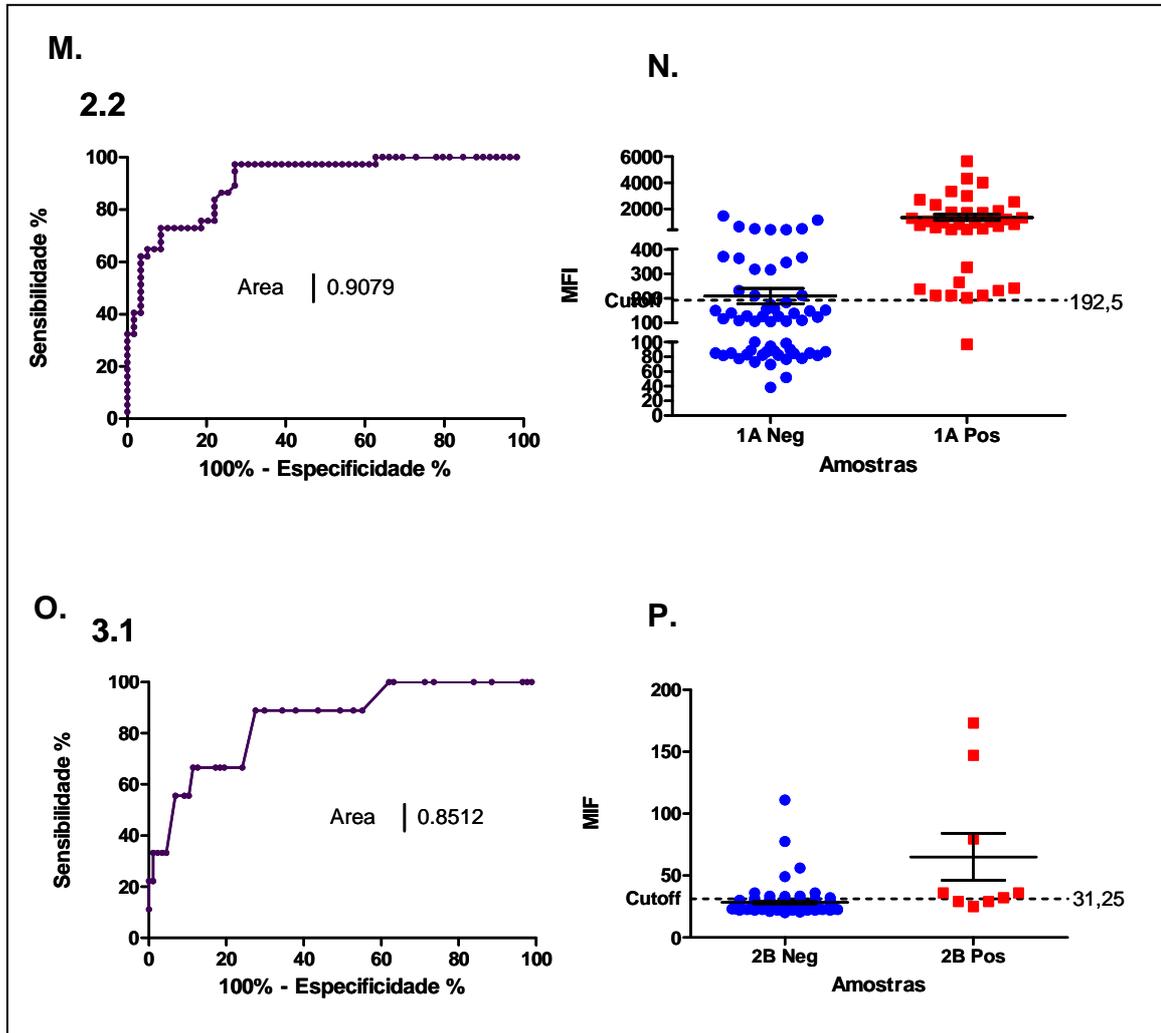


Figura 50- Análise de Luminex dos antígenos cepa-específicos.

(conclusão)



Fonte: a autora

Nota: Análise Luminex realizada com 2500 microesferas acopladas e soros individuais; (5.3) (A) curva ROC, (B) Scatter Plot; (5.4) (C) curva ROC, (D) Scatter Plot; (5.5) (E) curva ROC, (F) Scatter Plot; (5.7) (G) curva ROC, (H) Scatter Plot; (5.8) (I) curva ROC, (J) Scatter Plot; (5.12) (K) curva ROC, (L) Scatter Plot; (2.2) (M) curva ROC, (N) Scatter Plot; (3.1) (O) curva ROC, (P) Scatter Plot;

8 DISCUSSÃO

A triagem sorológica compulsória de doadores de sangue é obrigatória e regulada pela legislação brasileira. Esta tese de Doutorado faz parte de uma iniciativa nacional, projeto INDI-SAUDE (Instituto CNPq), cujo alvo é gerar insumos diagnósticos com tecnologia 100% nacional que possam ser aplicados nestas triagens sorológicas. Mais especificamente, nesta tese, a proposta foi desenhar e expressar antígenos dos vírus HIV1/2, HTLV1/2 e HCV que futuramente possam ser incluídos em testes diagnósticos para o SUS, principalmente em testes multiplex usando a tecnologia xMAPLuminex.

Assim, foram produzidos e validados diversos antígenos de HIV1 e 2, HTLV1 e 2 e HCV que demonstraram grande potencial diagnóstico, tanto através de ensaios de ELISA como no sistema xMAPLuminex. Devido aos problemas com o aparelho Luminex no CPqAM/FIOCRUZ-PE e a ausência de técnicos habilitados disponíveis, não foi possível terminar as análises de sensibilidade /especificidade de todos os antígenos e o desenvolvimento de um teste multiplex. Todavia, os antígenos individuais demonstraram sensibilidade/especificidade suficientes para serem incorporados em testes multiplex de diagnóstico. Entre eles, destacaram-se os antígenos gp41 Δ HIV1, gp120 Δ HIV1, gp36 Δ internoHIV2, HCV_Core 1-117, oito antígenos gp41HIV1 cepa-específicos, como também os p24HIV1 e p24HTLV1 já apresentados durante a dissertação de Mestrado de uma outra aluna (VIANA I, 2011).

Além disso, foram produzidos antígenos de HTLV (gp21 Δ HTLV1 e dois antígenos cepa-específicos) que mostraram menor sensibilidade e especificidade validado pelo sistema xMAPLuminex. Essas proteínas expressas podem futuramente ainda serem purificadas por gel filtração e troca iônica, além da cromatografia de afinidade e revalidadas, visando potencializar seu grau de sensibilidade/especificidade. Estes procedimentos adicionais são considerados relevantes e utilizados para a produção de testes diagnósticos comerciais (Sponsor MP Diagnostic HTLV, www.fda.gov).

O uso de microesferas e do sistema xMAPLuminex traria grandes vantagens no procedimento da triagem sorológica como, por exemplo, menor tempo para realização do teste e menor volume do material biológico a ser testado. Além disso, iria economizar espaço laboratorial e mão de obra envolvida e o fornecimento desse

teste produzido no território nacional ia diminuir os custos para o SUS. Os testes multiplex visam permitir a detecção e identificação de diferentes anticorpos contra estruturas diferentes do mesmo vírus, cada um caracterizando fases específicas da infecção aguda. O desenvolvimento de um teste diagnóstico multiplex utilizando a tecnologia xMAPLuminex envolveria a mais nova inovação tecnológica e seria o primeiro teste descrito na literatura científica. Os antígenos gerados nesta tese já estão sendo utilizados para o desenvolvimento de um teste diagnóstico xMAPLuminex multiplex por colaboradores do ICC/FIOCRUZ-PE.

Para o uso de novos insumos diagnósticos desenvolvidos no país, será também importante incluir antígenos ou sequências de cepas virais circulando no Brasil e América Latina. Os genomas de HIV, HTLV ou HCV mostram alta diversidade especialmente nos genes codificando as proteínas do envelope e por este motivo são divididos em grupos e subtipos específicos. Os testes sorológicos dependem do reconhecimento de anticorpos contra proteínas estruturais, no soro de pacientes infectados. Apesar de não ser provado que a reatividade de um teste diagnóstico contra HIV é influenciada por anticorpos e antígenos de subtipos diferentes, existe uma indicação de que variações de sequências virais podem levar ao escape de detecção imunológica (DORN et al., 2000; HORAL et al., 1991). Testes diagnósticos contra outros vírus, como por exemplo, Hepatite B (HBV) demonstraram uma sensibilidade 10 vezes mais baixa quando antígenos de diferentes subtipos virais foram incluídos no teste (WEBER et al., 2005). Neste trabalho, geramos sequências consenso visando detectar cepas virais que representam os vários subtipos virais circulantes no Brasil e/ou América Latina. Devido a forte interação da população mundial por negócios ou turismo, é importante considerar também uma disseminação de subtipos virais (“importados”) no Brasil. Por este motivo foram desenvolvidos paralelamente antígenos cepa-específicos de HIV e HTLV circulando também em outras áreas geográficas do mundo, como por exemplo, os subtipos O e U de gp41HIV1. Estes também podem ser incluídos futuramente nos testes multiplex em desenvolvimento devido à vantagem do sistema xMAPLuminex, que permite a inclusão de até 500 alvos diferentes em um único teste.

Contúdo seria interessante testar os antígenos consenso e cepa-específicos com painéis sorológicos comprovadamente positivos para os sorotipos supracitados.

Devido ao alto custo deste tipo de painel comercial não foi possível incluí-los nas análises realizadas nesta tese.

As sequências consensos e cepa-específicos foram otimizadas para expressão em sistema eucariota e/ou procariota. A otimização leva geralmente ao aumento significativo nos níveis de expressão em sistemas heterólogos (GUSTAFFSON et al., 2012). Os níveis de expressão obtidos neste trabalho oscilou entre 1.5mg/L até 80mg/L, corroborando com os dados de expressão de genes otimizados obtidos na literatura (PIEFER et al., 2002; MAHBOUDI et al., 2006).

Diversas tentativas para a expressão de proteínas virais de HIV já foram realizadas por outros grupos. Como por exemplo, a fusão de fragmentos de gp41 e gp120 (SOHN et al., 1996) ou a criação e junção de múltiplos epítomos de proteínas diferentes (TALHA et al., 2010). Todavia, ainda não houve a descrição do uso desses antígenos no sistema xMAPLuminex e o desenvolvimento de um teste diagnóstico multiplex para infecções virais diferentes.

A maioria dos antígenos produzidos nesta tese foram glicoproteínas do envelope viral. Na seleção das regiões protéicas para subclonagem foram excluídas as regiões trans-membranas. A deleção de regiões trans-membranas, consideradas regiões altamente hidrofóbicas, aumentam o nível de expressão em bactérias (SISK et al., 1992). Possivelmente a presença destas regiões TM foi o motivo pelo qual nossas primeiras tentativas de expressão, dos antígenos precursoras de HIV (ENVHIV1) e HTLV (ENVHTLV1, ENVHTLV2) falharam. Outro cuidado, tomado durante a definição de nossos alvos antigênicos foi a manutenção de epítomos imunodominantes. A seleção do antígeno gp120 Δ , por exemplo, incluiu a região do epítomo chamado *V3loop*. Como foi demonstrada por outros pesquisadores, esta região deve estar presente nos antígenos utilizados para o teste diagnóstico de HIV, sendo considerada crucial para a reatividade (TIWARI et al., 2013).

Mesmo assim, foi observado que alguns antígenos demonstraram ausência na imunoreatividade com *pool de soros* no Western Blot, apesar de serem reativos nos testes de ELISA. O procedimento de WB desnatura as proteínas durante o fracionamento no gel de SDS-PAGE que leva à destruição da conformação protéica. Dessa forma, epítomos conformacionais e domínios protéicos, necessários para o reconhecimento de alguns anticorpos podem ter sido destruídos. Além disso, foi usado pool de soros que pode mostrar um nível de anticorpos mais baixa, no caso,

foram incluídos soros que tem uma quantidade menor de anticorpos contra certas proteínas virais.

Além do WB, também foi observado a ausência da reatividade de alguns soros individuais no sistema xMAPLuminex, levando a resultados falsos negativos. A reatividade, no entanto, depende da presença de anticorpos contra determinados antígenos no soro. Como o Imunoblot realizado com os soros individuais demonstrou, nem todos os soros têm o mesmo perfil de anticorpos. A presença dos anticorpos contra p24, gp41 ou gp120 depende da fase da infecção por HIV (TOMARAS et al., 2009; DASKALAKIS et al., 2011). Sobretudo, os soros de referências comprovadamente positivos para HIV podem vir de indivíduos com AIDS e em tratamento *HAART* (ingl. *highly active antiretroviral therapy*), levando a uma menor produção de anticorpos contra proteínas do envelope (DEAYTON et al., 2002). Devido a estes fatos, o motivo da ausência de imunoreatividade em nossos testes pode ser relacionado a ausência ou ao nível baixo de anticorpos, sejam eles contra antígenos específicos (p24, gp41 etc.) ou contra subtipos virais diferentes (subtipo B, F etc.).

Em nosso estudo, tivemos também de lidar com a ausência de expressão de alguns antígenos no sistema procariótico. Em alguns casos, foi necessária a amplificação por PCR de alguns domínios específicos (retirando possíveis elementos negativos da expressão) antes da sua subclonagem em vetores de expressão. Para verificar erros durante a amplificação e possíveis mutações que pudessem alterar o código genético para aminoácidos e a expressão, foram sequenciados todos esses antígenos. Nenhuma alteração foi observada e dessa forma não pode ser motivo da ausência da expressão.

Outro problema relativo à expressão consiste na chamada *regra N-terminal* (ingl. *N-end rule*). Nesta regra se determina que aminoácidos como HIS (H), Arg (R), Lys (K), Leu (L), Phe (F), Tyr (Y) e Trp (W) presentes no N-terminal de uma proteína, diminuem significativamente a sua meia-vida sendo Phe, Leu, Trp e Tyr os únicos resíduos atingíveis para degradação em *E. coli*. Testes demonstraram que a meia-vida de uma proteína pode diminuir para 2 minutos quando duraria 10 horas com outro aminoácido no seu N-terminal (VARSHAVSKY et al., 1996). Em relação aos nossos antígenos, não houve aminoácidos desfavoráveis no N-terminal para expressão em sistema procariota.

No entanto, foram produzidos antígenos com nível de expressão extremamente baixo, como o caso do gp46 Δ HTLV1. Apesar da remoção de sua região hidrofóbica e do mesmo não apresentar aminoácidos desfavoráveis, a quantidade produzida no sistema procarioto foi considerada muito baixa. O interessante é que esta proteína é utilizada em um teste diagnóstico comercial, como o ABBOTT HTLV1/2 EIA. Todavia, segundo as informações do fabricante esta proteína é produzida sinteticamente, enquanto outras proteínas incluídas no mesmo teste foram geradas por expressão em sistema procarioto. Indicando assim, dificuldades por motivos desconhecidos na expressão procarioto especificamente dessa proteína.

Ao longo do estudo também foi testado a expressão das proteínas em sistema eucarioto, especificamente em levedura *K. lactis*. O sistema não foi considerado satisfatório demonstrando a ausência de expressão na maioria dos casos, até em proteínas que sem nenhum problema expressaram no sistema procariota, como por exemplo gp41 Δ HIV1.

Considerando a regra N-terminal, usando o vetor pKLAC2 para subclonagem, foram observados aminoácidos desfavoráveis no N-terminal dos antígenos HCV E1 (sendo Tyr) e HCV E2 (sendo HIS), mas não para os outros. A falta de expressão pode ser devido também a outros fatores, como o uso da cepa de levedura não apropriada. Um estudo feito, comparando a expressão da glicoproteína E2 de HCV (em cepas diferentes) demonstrou que houve uma expressão 3 vezes menor em *K. lactis* do que observado em *S. cerevisiae* (MUSTILLI et al., 1999). Artigos científicos mais recentes mostram a tentativa contínua em melhorar a expressão de proteínas recombinantes em *K. lactis*, alterando a cepa geneticamente para diminuir a produção de proteases. Também a empresa NEB, a qual comercializou o Kit usado neste nosso estudo, oferece recentemente no seu catálogo uma cepa modificada de *K. lactis* com menor atividade de proteases (MEHUL et al., 2011; FENG et al., 2011).

Uma terceira consideração importante é o impacto de uma glicosilação não-humana em proteínas que necessitam uma glicosilação-humana e a sua influência na secreção dessas proteínas. Em nosso caso foram utilizados principalmente sequências de glicoproteínas virais que devido ao seu ciclo viral deveriam conter glicosilação humanas. Em contraste com o tipo da glicosilação-humana, a N-glicosilação da levedura é de tipo *mannose rico*, que leva a uma meia-vida curta da proteína, que por sua vez pode levar ao rendimento baixo na expressão. Este

assunto, apesar de ser complexo para ser modificado, atualmente virou foco na engenharia de novas cepas de levedura (IDIRIS et al., 2010).

Por fim, o objetivo principal dessa tese de Doutorado foi alcançado e antígenos com alta especificidade e sensibilidade produzidos. Não obstante, podem ser feitas reflexões sobre as estratégias escolhidas. Possíveis alternativas para a produção de futuros antígenos podem incluir a estratégia esquematizada para subclonagem, usando o sistema Gateway® e *E.coli Rosetta* para expressão (OSTERMANN et al., 2012). Neste sistema podem ser inseridos os produtos de PCR diretamente num vetor de entrada e depois em múltiplos vetores de diferentes sistemas de expressão por recombinação sitio específico. Isto evita a adição de sítios de restrição, diferentes para cada vetor, um processo de subclonagem prolongado e a otimização dos códons que deveria ser feito especificamente para cada sistema de expressão usada. Outra possibilidade, apesar de necessitar de tecnologia e conhecimento especializado é o uso do mais novo avanço tecnológico, chamado *protein scaffolding*, onde epítomos são inseridos em uma *proteína scaffold acceptor* (p.e. a proteína sintética TOP7), alcançando maior estabilidade conformacional. Estas *chimeras* são construídas e testadas primariamente via simulações computacionais através de programas da biologia estrutural e as mais promissoras selecionadas para expressão (VIANA et al., 2013).

9 CONCLUSÃO

Através de ferramentas de bioinformática, conseguimos obter sequências consensos, utilizando cepas circulando no Brasil ou América Latina. Essas foram utilizadas para selecionar regiões de aminoácidos e a criação de um amplo espectro de antígenos potencialmente imunogênicos, incluindo sequências completas, motivos hidrofílicos, sequências híbridas e sequências desprovidas de sua região trans-membrana. Além disso, foram criadas também sequências cepa-específicos. A geração de uma sequência consenso para a construção de antígenos recombinantes de HIV, HTLV e HCV ainda não havia sido reportada na literatura científica.

A estratégia metodológica utilizada para criação de antígenos recombinantes e o estabelecimento dos protocolos para expressão e purificação de cada antígeno, levou a expressão de 27 antígenos de todos os vírus incluídos no estudo. Visando suas vantagens e desvantagens, foram testados sistemas de expressão procariotos e eucariotos. Melhores resultados foram obtidos utilizando o sistema procarioto.

Os antígenos expressos foram verificados em ELISA utilizando painéis sorológicos de referência mostrando antigenicidade e um *Índice de cut-off* acima de 1 (considerado reativo) para 16 antígenos. Esses incluem o p24HIV, HCV_Core 1-117, os sem região trans-membrana gp41ΔHIV1, gp120ΔHIV1, gp36ΔHIV2, gp21ΔHTLV1 e os cepa-específicos 2.2 (HTLV), 3.1 (HTLV), 5.3, 5.4, 5.5, 5.7, 5.8, 5.9_C, 5.11_C, 5.12 (sendo todos de HIV).

A verificação da sensibilidade e especificidade dos antígenos utilizando soros de referência individuais e o ensaio xMAPLuminex, apresentou 10 antígenos (p24HIV1, gp41ΔHIV1, gp120ΔHIV1, 5.3, 5.4, 5.5, 5.7, 5.8, 5.12, p24HTLV1) adequados para a triagem sorológica. Mostrando sensibilidade entre 81-100% e especificidade entre 94-100%. Enquanto os antígenos de HTLV apresentaram mais baixa capacidade diagnóstica.

10 PERSPECTIVAS

Devido aos problemas com o aparelho de xMAPLuminex no CPqAM, cinco antígenos de vírus diferentes, ainda precisam ser avaliados. Entre eles o gp36 Δ internoHIV2, gp21 Δ HTLV1, 5. 9, 5.11 e HCV_Core 1-117. A especificidade desses antígenos, em caso seja baixa, ainda pode aumentar por purificação dos antígenos na cromatografia.

Adicionalmente, o número dos soros de referência positivos incluídos no estudo de todos os antígenos precisa ainda aumentar para conseguir resultados estatisticamente relevantes.

Visando melhorar o desempenho geral dos ensaios diagnósticos, os melhores antígenos desenvolvidos nesta Tese de Doutorado estão sendo atualmente combinados em ensaios multiplex. Os testes multiplex e ensaios de verificação no sistema xMAPLuminex estão sendo realizados por colaboradores do Instituto Carlos Chagas – ICC/FIOCRUZ, visando futuramente a serem repassados para o Ministério da Saúde – SUS.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMID, M. et al. Comparison of Second- and Third-Generation Enzyme Immunoassays for Detecting Antibodies to Hepatitis C Virus. **Journal of clinical Microbiology**, Washington, v. 40, p. 1656–1659, 2002.
- ALBELDAWI, L. et al. Hepatitis C virus: Prevention, screening, and interpretation of assay. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, Lyndhurst, v. 77, p. 616-626, 2010.
- ALCARO, M. C. et al. Synthetic Peptides in the Diagnosis of HIV Infection. **Current Protein and Peptide Science**, Oak Park, v. 4, p. 285-290, 2003.
- ALLONSO, D. et al. Polyclonal antibodies against properly folded Dengue virus NS1 protein expressed in *E. coli* enable sensitive and early dengue diagnosis. **Journal of Virological Methods**, Philadelphia, v. 175, p. 109–116, 2011.
- ALTER, G.; MOODY, M. A. The Humoral response to HIV-1: New Insights, renewed Focus. **Journal of Infectious Disease**, Cambridge, v. 202, s. 2-3, p. 315–322, 2010.
- ALVARADO, E.C.; LEROUX-ROELS G. Hepatitis C immunology. **Revista de Investigación Clínica**, Mexico, v. 51, p. 315-322, 1999.
- ANDERSON, E.; DAVIS S. AIDS blood scandels: What China can learn form the World's Mistakes. **Asia Catalyst**, New York, p. 1-41, oct, 2007.
- BABA, E. et al. A peptide-based human T cell leukemia vírus type I Vaccine containing T and B cell epitopos that induces high titers of neutralizing antibodies. **The American Association of Immunologists**, Bethesda, v. 154, p. 399-412, 1995.
- BANGHAM, R. M. C. The immune response to HTLV-1. **Current Opinion in Immunology**, Boston, v. 12, p. 397–402, 2000.
- BANGHAM, R. M. C. The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. **Journal of General Virology**, Cambridge, v. 84, p. 3177–3189, 2003.
- BARR, P. J. et al. Antigenicity and immunogenicity of domains of the human immunodeficiency virus (HIV) envelope polypeptide expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Vaccine**, Philadelphia, v. 5, p. 90-101, 1987.
- BOULANT, S. et al. Hepatitis C Virus Core Protein Is a Dimeric Alpha-Helical Protein Exhibiting Membrane Protein Features. **Journal of Virology**, New York, v. 79, p. 11353–11365, 2005.
- BOVING, M. K. et al. Eight-Plex PCR and Liquid-Array Detection of Bacterial and Viral Pathogens in Cerebrospinal Fluid from Patients wit Suspected Meningitis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 47, p. 908-913, 2009.

BRANDEN, C.; TOOZE J. Introduction to Protein Structure. Editor: **Garland Publishing Inc**, New York, cap. 13, p. 210-211, 1991.

BRASIL. Secretária de Vigilância em Saúde. **Uma visão Geral**. Brasília, 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/clipping_11_12_13_09_2010.pdf>. Acesso em: 16. Out. 2013.

BRISTER, J. R et al. Towards Viral Genome Annotation Standards, Report from the 2010 NCBI Annotation Workshop. **Viruses**, Basel, v. 2, p. 2258-2268, 2010.

BRUN-VÉZINET, F.; CHARPENTIER, C. Update on the Human immunodeficiency virus. **Médecine et maladies infectieuses**, Paris, v. 43, p. 177–184, 2013.

BUTLER, I. et al. HIV Genetic Diversity: Biological and Public Health Consequences. **Current HIV Research**, Oak Oark, v. 5, p. 23-45, 2007.

CADEONT, S. et al. New Insights in HTLV-I Phylogeny by Sequencing and Analyzing the Entire Envelope Gene. **AIDS Research and Human Retroviruses**, New York, v. 21, p. 28-42, 2005.

CAI, W. et al. Expression, purification and immunogenic characterization of hepatitis C virus recombinant E1E2 protein expressed by *Pichia pastoris* yeast. **Antiviral Research**, Philadelphia, v. 88, p. 80-85, 2010.

CARNEIRO-PROIETTI, A. B. et al. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de célula T (HTLV1/2) no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 35, p. 499-508, 2002.

CARRAZONE, C. F. V. Importância da avaliação sorológica pré-transfusional em receptores de sangue. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, São Paulo, v. 26, p. 93-98, 2004.

CATALAN-SOARES, B. et al. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses 1 and 2 (HTLV1/2): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, p. 926-931, 2005.

CELIK, E.; CALIK, P. Production of recombinant proteins by yeast cells. **Biotechnology Advances**, Philadelphia, v. 30, p. 1108-1118, 2012.

CELUM, C. L. et al. Risk factors for repeatedly reactive HIV-1 EIA and indeterminate western blots. A population-based case-control study. **Archives of Internal Medicine**, San Francisco, v. 154, p. 1129 –1137, 1994.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (Estados Unidos). **Interpretive criteria used to report western blot results for HIV-1-antibody testing—United States. Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 40, p. 692–695, 1991.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (Estados Unidos). **Falsepositive serologic tests for human T-cell lymphotropic virus type I among blood donors following influenza vaccination. Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 42, p. 173-175, 1993.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (Estados Unidos). **Analysis of the november 3, Performance Evaluation Testing Results for Human T-lymphotropic Virus Types I and II Antibody**. Atlanta, 1997. Disponível em: <www.cdc.gov/mpep/pdf/htlv/9711anal.pdf>. Acesso: 29 nov. 2013.

CHANG, C. S. et al. Feasibility of human T-lymphotropic virus type I screening using pooled sera. **Journal of the Formosan Medical Association**, Atlanta, v. 101, p. 775-778, 2002.

CHEN, J. et al. HTLV isolated from a Pygmy in Cameroon is related but distinct from the known Central African type. **AIDS Research and Human Retroviruses**, New York, v. 11, p. 1529–1531, 1995.

CHEN, M. et al. Limited humoral immunity in hepatitis C virus infection. **Gastroenterology**, Michigan, v. 116, p. 135-143, 1999.

CHEN, P.; RAYNER, S.; HU, K-H. Advances of Bioinformatics Tools Applied in Virus Epitopes Prediction. **Virologica Sinica**, Heidelberg, v. 26, p. 1-7, 2011.

CHEVALIEZ, S.; PAWLOTZKY, J-M. Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and management of antiviral therapy. **World Journal of Gastroenterology**, Hong Kong, v. 13, p. 2461-2466, 2007.

CHOW, M. K. M. et al. REFOLD: An analytical database of protein refolding methods. **Protein Expression and Purification**, Philadelphia, v. 46, p. 166–171, 2006.

CLERGEOT, P. H. et al. *PLS1*, a gene encoding a tetraspanin-like protein, is required for penetration of rice leaf by the fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. **Proceedings of Natural Academic Science**, Washington, v. 98, p. 6963–6968, 2001.

COHEN, M. S. et al. The detection of acute HIV infection. **Journal of Infectious Diseases**, Cambridge, v. 202, suppl. 2, p. 270–277, 2010.

COLIN, C. et al. Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature. **Journal of Viral Hepatitis**, Malden, v. 8, p. 87-95, 2001.

DASKALAKIS, D. HIV diagnostic testing: Evolving technology and testing strategys. **Topics in antiviral medicine**, Charlottesville, v. 19, p.18-22, 2011.

DE ALMEIDA REGO, F. et al. Seroprevalence and Molecular Epidemiology of HTLV-1 Isolates from HIV-1 Co-Infected Women in Feira de Santana, Bahia, Brazil. **AIDS Research and Human Retrovírus**, New York, v. 26, p. 1333-1339, 2010.

DEAYTON, J. R. et al. Rapid reconstitution of humoral immunity against cytomegalovirus but not HIV following highly active antiretroviral therapy. **AIDS**, London, v.16, p. 2129-2135.

DELANEY, K. et.al. Evaluation of the Performance Characteristics of 6 Rapid HIV Antibody Tests. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 52, p. 257–263, 2011.

DELWART, E. L. et al. First report of human immunodeficiency virus transmission via an RNA-screened blood donation. **Vox Sanguines**, Malden, v. 86, p. 171-177, 2004.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, Waterloo, v. 27, p. 297–306, 2009.

DIPTI, C. A. et al. A novel recombinant multiepitope protein as a hepatitis C diagnostic intermediate of high sensitivity and specificity. **Protein Expression and Purification**, Madison, v. 47, p. 319-328, 2006.

DORN, J. et al. Analysis of genetic variability within the immunodominant epitopes of envelope gp41 form human Immunodeficiency virus type i (HIV-1) group M and its impact on HIV-1 antibody detection. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 773-780, 2000.

DWYRE, D. M. et al. Hepatitis B, hepatitis C and HIV transfusion-transmitted infections in the 21st century. **Vox Sanguinis**, Malden, v. 100, p. 92–98, 2011.

ELLINGTON, A. A. et al. Antibody-Based Protein Multiplex Platforms: Technical and Operational Challenges. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 56, p. 186-193, 2010.

ERICKSON, C. P.; MCNIFF, T.; KLAUSNER, JD. Influenza vaccination and false positive HIV results. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 354, p. 1422–1423, 2006.

EVANS, T. C. **Heterologous Gene Expression in E. coli, (Adjustment of Codon Usage Frequencies by Codon Harmonization Improves Protein Expression and Folding.**

Disponível em: <
http://www.lifesensors.com/pdf/2011_PeroutkaRJ_MethMolBiol_SUMO_fusion_technology_for_enhanced_protein_expression_and_purification_in_prokaryotes_and_eukaryotes.pdf>. Acesso em: 15 jun 2012.

FABIANI, F. L. Hepatitis C virus proteins. **World Journal of Gastroenterology**, Hong Kong, v. 13, p. 2406-2415, 2007.

FENG Z. et al. Disruption of PMR1 in Kluyveromyces lactis improves secretion of calf prochymosin. **Journal of Science of Food and Agriculture**, Malden, v. 91, p. 100-103, 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (Estados Unidos). **Vaccines, Blood and Biologics.** Silver Spring, 2013. Disponível em: <http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/InVitrODiagnOstics/default.htm>. Acesso em: 25 nov. 2013.

FIELDS VIROLOGY. **Lippincott Williams&Wilkins**, Philadelphia/EUA, 5th edition, v. 2, cap. 57, p. 2107-2108, 2007.

FONSECA, B. P. F. et al. Development of a Multiplex Bead-Based Assay for Detection of Hepatitis C Virus. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 18, p. 802– 806, 2011.

FOURNIER-WIRTH, C.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; COSTE, J. Detection of blood-transmissible agents: can screening be miniaturized? **Transfusion**, Bethesda, v. 50, p. 2032-2045, 2010.

FRANKL, A. D, YOUNG J. A. T. HIV-1: Fifteen proteins and an RNA. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 67, p.1-25, 1998.

FREED, E. O. HIV-1 replication. **Somatic Cell and Molecular Genetics**, Heidelberg, v. 26, p.13-33, 2002.

FU, Q. et al. Comparison of Multiplex Immunoassay Platforms. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 56, p. 314-318, 2010.

GADELHA, C. A. G. Seminário sobre Complexo Econômico-Industrial da Saúde. **Banco Nacional do Desenvolvimento**, Rio de Janeiro, 2008.

GHEZ, D. et al. Current concepts regarding the HTLV-1 receptor complex. **Retrovirology**, London, v.7, p. 99, 2010.

GONÇALVES, U. D. et al. Epidemiology, Treatment, and Prevention of Human T-Cell LeukemiaVirus Type 1-Associated Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 23, p. 577–589, 2010.

GONDIM MARTINS, D. B. et al. The β -Galactosidase Activity in *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 Decreases by High Concentrations of Galactose. **Current Microbiology**, Heidelberg, v. 44, p. 379-382, 2002.

GORNY, M. K. et al. Repertoire of Neutralizing Human Monoclonal Antibodies Specific for the V3 Domain of HIV-1 gp120. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 150, p. 635-643, 1993.

GRANGUEIRO, A. et al. IMGASS-HIV/Aids: balanço da resposta brasileira, 2001-2005. **Revista Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 40, p. 5-8, 2006.

GUSTAFFSON, C. et al. Engineering genes for predictable protein expression. **Protein expression and purification**, Philadelphia, v. 83, p.37-46, 2012.

GUYADER, M. et al. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. **Nature**, London, v. 326, p. 662-669, 1987.

HADZIYANNIS, S. Milestones and perspectives in viral hepatitis B. **Liver International**, Malden, DOI:10.1111/j.1478-3231.2010.02406.x, 2011.

HELEMAR, J. et al. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinantes in 2004. **AIDS**, San Francisco, v. 20, p. 13-23, 2006.

HIGHTOWER, M. et al. Treatment and Antiretroviral Resistance of HIV-2. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, Philadelphia, v. 7, p. 7-15, 2003.

HORAL, P. et al. Continuous epitopes of the Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmembrane glycoprotein and reactivity of human sera to synthetic peptides representing various HIV-1 isolates. **Journal of Virology**, New York, v. 65, p. 2718-2723, 1991.

HORAL, P. et al. Identification of type-specific linear epitopes in the glycoproteins gp46 and gp21 of human T-cell leukemia viruses type I and type II using synthetic peptides. **Proceedings of the national Academy of Science (PNAS)**, Washington, v. 88, p. 5754-5758, 1991.

HUANG, M. L et al. Development of Multiplexed Real-Time Quantitative PCR Assay for Detecting Human Adenoviruses. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disiase**, Philadelphia, v. 62, p. 263- 271, 2008.

IDRIS, A. et al. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. **Applied Micorbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 86, p. 403-417, 2010.

ISHAK, R. et al. Epidemiological aspects of retrovirus (HTLV) infection among Indian populations in the Amazon Region of Brazil. **Cadernos Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, p. 109-114, 2003.

JAHIC, M. et al. Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. **Journal of Biotechnology**, Philadelphia, v. 102, p. 45-53, 2003.

JANEWAY, C. A. et al. Antibodies bind to conformational shapes on the surfaces of antigens. **ImmunoBiology**, the immune system in health and disease. 6. Ed. New York: Garland Science Publishing, 2005. cap. 3, p.113.

JANEWAY, C. A. et al. Antigen-antibody interactions involve variety of forces. **ImmunoBiology**, the immune system in health and disease. 6. Ed. New York: Garland Science Publishing, 2005. cap. 3, p.115.

JANEWAY, C. A. et al. Immunization. **ImmunoBiology**, the immune system in health and disease. 6. Ed. New York: Garland Science Publishing, 2005. appendix 1, p.683.

JANEWAY, C. A. et al. Preceptin reaction. **ImmunoBiology**, the immune system in health and disease. 6. ed. New York: Garland Science Publishing, 2005. App. 1, p.693.

KALYANARAMAN, V. S. et al. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-2) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science**, Washington, v. 21, p. 571, 1982.

KARPAS, A. Human Retroviruses in leukaemia e AIDS: reflections on their discovery, biology and epidemiology. **Biological Reviews**, Malden, v. 79, p. 911–933, 2004.

KEHL, S. C.; KUMAR, S. Utilization of Nucleic Acid Amplification Assays for the Detection of Respiratory Viruses. **Clinical Laboratory Medicine**, San Francisco, v. 29, p. 661-671, 2009.

KERSHENOBICH, D. et al. Trends and projections of hepatitis C virus epidemiology in Latin America. **Liver International**, Malden, s. 2, p. 18-29, 2011.

KROGH, A. et al. Predicting Transmembrane Protein Topology with a Hidden Markov Model: Applications to complete Genomes. **Journal of Molecular Biology**, Philadelphia, v. 305, p. 567-580, 2001.

KUGA, T. et al. Expression of human T-cell leukemia virus type I envelope protein in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, Philadelphia, v. 44, p. 337-340, 1986.

KUHNS M. C.; BUSCH M. P. New strategies for blood donor screening for hepatitis B virus: nucleic acid testing versus immunoassay methods. **Molecular Diagnosis and Therapy**, Heidelberg, v. 10, p. 77-91, 2006.

KUIKEN, C. et al. The hepatitis C sequence database in Los Alamos. **Nucleic Acids Research**, Southhampton, v. 36, p. 512-516, 2008.

KUIKEN, C. et al. HIV Sequence Databases. **AIDS Reviews**, Barcelona, v. 5, p. 52–61, 2003.

KYTE, J.; DOOLITTLE, R. A simple method for displaying the hydrophatic character of a protein. **Journal of Molecular Biology**, Philadelphia, v. 157, p. 105-132, 1982.

LAL, R. B. et al. Immune reactivity of HTLV-IIa-infected Kayapo Indians with HTLV-IIb extended tax epitope. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrom and Human Retrovirus**, New York, v. 14, p. 476-477, 1997.

LANDRY, M. L. Diagnostic tests for influenza infection. **Current Opinion in Pediatrics**, London, v. 23, p. 91-97, 2011.

LAVANCHY, D. The global burden of Hepatitis C. **Liver Internacional**, Malden, v. 29, s. 1, p. 74-81, 2009.

LAVILETTE, D. et al. Human Serum Facilitates Hepatitis C Virus Infection, and Neutralizing Responses Inversely Correlate with Viral Replication Kinetics at the Acute Phase of Hepatitis C Virus Infection. **Journal of Virology**, New York, v. 79, p. 6023–6034, 2005.

LEACH, A. R. Molecular Modeling. Principles and Applications. **Editor Pearson Education**, Essex/England, chp.10, p.509, 2001.

LEJON, V. et al. Low Specificities of HIV Diagnostic Tests Caused by *Trypanosoma brucei gambiense* Sleeping Sickness. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, p. 2836–2839, 2010.

LEWIS, B. Livro: Genes VIII. **Editor Pearson Education**, Upper Saddle River-NJ/EUA, chp. 7, p. 167-169, 2004.

LI, H. et al. Large-scale production, purification and bioactivity assay of recombinant human interleukin-6 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Yeast Research**, Malden, v.11, p. 160-167, 2011.

LING, A. E. et al. Failure of routine HIV-1 tests in a case involving transmission with preseroconversion blood components during the infectious window period. **Journal of American Medical Association (JAMA)**, Chicago, v. 284, p. 210-214, 2000.

LIVINGSTON, B. et al. A Rational Strategy to Design Multi-epitope Immunogens Based on Multiple Th Lymphocyte Epitopes, **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 168, p. 5499-5506, 2002.

LOBATO MARTINS, M. et al. Long-Term Serological Follow-Up of Blood Donors With an HTLV-1 Indeterminate Western Blot: Antibody Profile of Seroconverters and Individuals With False Reactions, **Journal of Medical Virology**, Washington, v. 82, p. 1746–1753, 2010.

Lookfordiagnosis. **Ciclo viral HIV**. Alicante. Disponível em: <http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Inibidores+Da+Fus%C3%A3o+De+Hiv&lang=3>. Acesso em: 30. maio 2014.

LYNCH, M. P.; KAUMAYA, P. T. P. Advances in HTLV-1 Peptide Vaccines and Therapeutics. **Current Protein and Peptide Science**, Oak Park, v. 7, p. 137-145, 2006.

LUMINEX CORP. **Applications**. Austin. Disponível em: <<http://www.luminexcorp.com/Applications/>>. Acesso em: 06. Maio 2013.

LUMINEX CORP. **Products**. Austin. Disponível em: <<http://www.luminexcorp.com/Products/>>. Acesso em: 06. Maio 2013.

MAHIEUX, R.; GESSAIN, A. New human retroviruses: HTLV-3 and HTLV-4. **Journal of Tropical Medicine**, Philadelphia, v. 65, p. 525-528, 2005.

MAHBOUDI, F. et al. A serological screening assay of human immunodeficiency virus type I antibodies based on recombinant protein p24-gp41 as a fusion protein expressed in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, Philadelphia, v. 125, p. 295-303, 2006.

MAHONEY, J. B. et al. Development of a Respiratory Virus Panel Test for Detection of Twenty Human Respiratory Viruses by Use of Multiplex PCR and a Fluid Microbead-Based Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, p. 2965-2970, 2007.

MAHONEY, J. B. Detection of Respiratory Viruses by Molecular Methods. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 21, p. 716-747, 2008.

MAKINO, T.; SKRETAS, G.; GEORGIU, G. Strain engineering for improved expression of recombinant proteins in bacteria. **Microbial Cell Factories**, London, v. 10, p. 32, 2011.

MALM, K. et al. Evaluation of a New Screening Assay for HTLV-1 and -2 antibodies for large-scale use. **Journal of Medical Virology**, Malden, v. 82, p. 1606-1611, 2010.

MANEL, N. et al. HTLV-1 tropism and envelope receptor. **Oncogene**, London, v. 24, p. 6016–6025, 2005.

MANGANO, A. M. et al. Human T Lymphotropic Virus Types I and II proviral sequences in argentinian blood donors with indeterminate Western Blot patterns. **Journal of Medical Virology**, Malden, v. 74, p. 323–327, 2004.

MANNERVIK, M. et al. Identification of B-cell antigenic sites on HIV-2 gp125. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrom and Human Retrovirus**, v. 5, p. 177-187, 1992.

MANNS, A. et al. Detection of Early Human T-cell Lymphotropic Virus Type I Antibody Patterns During Seroconversion Among Transfusion Recipients. **Blood**, Washington, v. 77, p. 896-905, 1991.

MARCELINO J. M. et al. Use of a New Dual-antigen Ezyme-linked Immunosorbent Assay to detect and characterize the Human Antibody response to the human immunodeficiency cirus type 2 envelope gp125 and gp36 glicoproteins. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 2, p. 607-611, 2006.

MARESCH, C. et al. Residual infectious disease risk in screened blood transfusion from a high-prevalence population: Santa Catarina, Brazil. **Transfusion**, Malden, v. 48, p. 273-281, 2008.

MARTINS, T. et al. Epidemiology of hepatitis C virus infection. **Revista Associação Medica Brasileira**, São Paulo, v. 57, p. 105-110, 2011.

MARTINEZ, E. Z. et al. A curva ROC para testes diagnósticos. **Cadernos Saúde Coletivo**, Rio de Janeiro, v.11, p. 7-31, 2003.

MATHERS, C. D.; LONCAR D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002-2030. **PLoS Medicine**, Cambridge, v. 3, n.11, p. 442, 2006.

MATSUOKA. M. et al. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. **Nature Review**, London, v. 7, p. 270-280, 2007.

MEHUL, B. et al. A set of aspartyl protease-deficient strains for improved expression of heterologous proteins in *Kluyveromyces lactis*. **FEMS Yeast Research**, Malden, v. 11, p. 168-178, 2011.

MOLENKAMP, R. et al. Simultaneous detection of five different DNA targets by real-time Taqman PCR using the Roche LightCycler480: Application in viral molecular diagnostics. **Journal of Virology Methods**, Amsterdam, v. 141, p. 205-211, 2007.

MUSTILLI, A. C. et al. Comparison of secretion of a hepatitis C virus glycoprotein in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. **Research in Microbiology**, Philadelphia, v. 150, p. 179-187, 1999.

New England Biolabs. **Manual Protein Expression Kit K. lactis**. Ipswich, 2010. Disponível em: < <https://www.neb.com>>. Acesso em: 03.março 2010;

NOVAGEN. **Competent cells, User Protocol TB009**. Darmstadt, 2004. Disponível em: < <http://www.emdmillipore.com/>>. Acesso em: 03. jan 2010.

OLAH, I. et al. Neither molecular diversity of the envelope, immunosuppression status, nor proviral load causes indeterminate HTLV western blot profiles in samples from human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-2)-infected individuals. **Journal of Medical Virology**, Washington, v. 82, p. 837-42, 2010.

OLIVEIRA DE, P. S. et al. Dengue: A Review of the Laboratory Tests, a Clinician Must Know to Achieve a Correct Diagnosis. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, Salvador, v. 8, p. 390-398, 2004.

OLIVEIRA, L.; COZAC A. Reações transfusional: Diagnóstico e tratamento. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 36, p. 431-438, 2003.

OPALKA, D. et al. Analysis of the HIV-1 gp41 specific immune response using a multiplexed antibody detection assay. **Journal of Immunological Methods**, Philadelphia, v. 287, p. 49-65, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **HIV Assays characteristics, Repot 15**. Geneva, 2005. Disponível em: < http://www.who.int/diagnostics_laboratory/publications/en/HIV_Report15.pdf>. Acesso em: 03. jan 2012.

OSTERMAN, A. et al. Systematic screening for novel, serologically reactive Hepatitis E Virus epitopes. **Virology Journal**, London, v. 9, p. 28-37, 2012.

PALKER, T. J. et al. Mapping of immunogenic regions of human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) gp46 and gp21 envelope glycoproteins with env-encoded synthetic peptides and a monoclonal antibody to gp46. **Journal of Immunology**, Bethesda , v. 142, p. 971-978, 1989.

PIEFER, A. J.; JONSSON, C. B. A comparative study of the human T-cell leukemia virus type-2 integrase expressed in and purified from *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, Philadelphia, v. 25, p. 291-299, 2002.

PIERCENET. **Protein stability and storage and Elisa**. Disponível em: <<http://www.piercenet.com/files/TR0043-Protein-storage.pdf>>. Acesso em: 10. Oct. 2012.

PRUITT, K. D.; TATUSOVA, T.; MAGLOTT, D. R. NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. **Nucleic Acids Research**, Southhampton, v. 35, p. 61-65, 2007.

PU S. Y. et. al. Successful propagation of Flavivirus infectious cDNAs by a novel method to reduce the cryptic bacterial promoter activity of virus genomes. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 85, p. 2927-2941, 2011.

RAYMOND, F. et al. Comparison of Automated Microarray Detection with Real-Time PCR Assays for Detection of Respiratory Viruses in Specimens Obtained from Children. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 47, p. 743-750, 2009.

READ, J. D et al. Acetamide Selection of *Kluyveromyces lactis* Cells transformed with an integrative vector leads to high-frequency formation of multicopy strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 5088-5096, 2007.

REHERMANN, B.; NASCIMBENI, M. Immunology of Hepatitis B virus and Hepatitis C virus infection. **Nature Reviews**, London, v. 5, p. 215-229, 2005.

REHM, B. H. A. et. al. Matrix-assisted in vitro refolding of *Pseudomonas aeruginosa* class II polyhydroxyalkanoate synthase from inclusion bodies produced in recombinant *Escherichia coli*. **Biochemical Journal**, London, v. 358, p. 263-268, 2001.

REIMER, U. Prediction of linear B-cell Epitopes. Methods in Molecular Biology, Epitope Mapping Protocols. **Human Press**, New York, chp. 24, 2009.

RENNER, J. D. P. et al. Molecular evidence of HTLV-II subtype b among urban population living in South Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses**, Chicago, v. 22, p. 301-306, 2006.

REQUEJO, H. I. Z. Worldwide molecular epidemiology of HIV. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, n. 2, p. 331-345, 2006.

REEVES, J. D, Doms R. W. Human immunodeficiency virus type 2. **Journal of General Virology**, London, v. 83, p. 1253-1265, 2002.

RICHARDSON, J. H. et al. In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type I. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 64, p. 5682-5687, 1990.

RUSSO-CARBOLANTE DE SOUSA, E. M. et al. Cloning and expression of the transmembrane glycoprotein from human T cell lymphotropic virus in a prokaryotic system. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40, p. 277-281, 2007.

SANTOS, F. L. N.; Medonça Lima, F. W. Epidemiologia, fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-I. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 41, p. 105-116, 2005.

SCHLICK, T. Molecular Modeling and Simulation. **Editor Springer**, Nova York, cap. 3, p. 77-85, 2010.

SCHINDERA, C. et al. Immunofluorescence versus xTAG multiplex PCR for the detection of respiratory picornavirus infections in children. **Journal of Clinical Virology**, Washington, v. 48, p. 223-225, 2010.

SEDDON, J.; BAGHANI, S. Antimicrobial therapy for the treatment of opportunistic infections in HIV/AIDS patients: a critical appraisal. **Journal of HIV/AIDS - Research and Palliative Care**, Princeton, v. 3, p.19–33, 2011.

SHARMA, V. K. et al. Polyethylene Glycol-Induced Precipitation of Interferon Alpha-2a Followed By Vacuum Drying: Development of a Novel Process for Obtaining a Dry, Stable Powder. **AAPS PharmSciTEch**, Arlington, v. 6, p. 1-14, 2004.

SHIMOTONHO, K. et al. Complete nucleotide sequence of a new infectious clone of human T-cell leukemia virus type II: an open reading frame for the protease gene. **Proceedings of the national Academy of Science (PNAS)**, Washington, v. 82, p. 3101–3105, 1985.

SISK, W. P. et al. Deletion of hydrophobic domains of viral glycoproteins increases the level of their production in Escherichia coli. **Gene**, Philadelphia, v. 112, p. 157-162, 1992.

SOHN, M. J. et al. Overexpression and purification of human immunodeficiency virus type 1 env derived epitopes in Escherichia coli. **Journal of Biotechnology**, Philadelphia, v. 45, p. 211-216, 1996.

SILLANPAA, M. et al. Hepatitis C virus core, NS3, NS4B and NS5A are the major immunogenic proteins in humoral immunity in chronic HCV infection. **Virology Journal**, London, v. 6, p. 84, 2009.

SIMARD, C. et al. Simple and Rapid Method for Production of Whole-Virus antigen for Serodiagnosis of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay., **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 8, p. 352-356, 2001.

SIMMONDS, P. et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, Malden, v. 42, p. 962-973, 2005.

SLATTERY, J. P. et al. Genomic Evolution, Patterns of global dissemination, and interspecies transmission of human and simian T-cell Leukemia/Lymphotropic Viruses. **Genome Research**, Woodbury, v. 9, p. 525-540, 1999.

SODROSKI, J. et al. Sequence of the envelope Glycoprotein Gene of Type II Human T Lymphotropic Virus. **Science**, Washington, v. 225, p. 421-424, 1984.

SORENSEN, H. P. et al. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, Philadelphia, v. 115, p. 113–128, 2005.

Souza, C. R. **A Curva de Receiver Operating Characteristic (ROC)**. Disponível em: <<http://crsouza.blogspot.com.br/2009/07/analise-de-poder-discriminativo-atraves.html>>. Acesso em: 04. maio 2014.

STUERMER, M.; DOERR, HW.; GUERTLER, L. Human immunodeficiency virus: 25 years of diagnostic and therapeutic strategies and their impact on hepatitis B and C virus. **Medical Microbiology and Immunology**, Heidelberg, v. 198, p.147-155, 2009.

SZEWCZUK, E. et al. Rapid semi-automated quantitative multiplex tandem PCR (MT-PCR) assays for the differential diagnosis of influenza-like illness. **BMC Infectious Disease**, London, v. 10, p. 113, 2010.

TALHA, S. M. et al. Inexpensive Designer Antigen for Anti-HIV Antibody Detection with High Sensitivity and Specificity. **Clinical and Vaccine Immunology**, San Francisco, v. 17, p. 335-341, 2010.

TANAKA, T. et al. Rapid and simultaneous detection of 6 types of human herpes virus (herpes simplex virus, varicella-zoster virus, Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, human herpes virus 6A/B, human herpes virus 7) by multiplex PCR assay. **Biomedical Research**, Philadelphia, v. 30, p. 279-285, 2009.

TANG, H.; GRISÉ, H. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. **Clinical Science**, London, v. 117, p. 49–65, 2009.

TIGHE, P. et. al. **Utility, reliability and reproducibility of immunoassay multiplex kits**. Philadelphia, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jymeth.2013.01.003>>. Acesso em: 20. Nov. 2013.

TIWARI, R. P. et al. Designing of novel antigenic peptide cocktail for the detection of antibodies to HIV-1/2 by ELISA. **Journal of Immunological Methods**, Philadelphia, v. 387, p.157-166, 2013.

TOMARAS, G. D et al. HIV-1 specific antibody responses during acute and chronic HIV-1 infection. **Current Opinion in HIV and AIDS**, San Francisco, v. 4, p. 373–379, 2009.

TSAO, K-C.; CHEN, G-W. False Positive Antibody Results Against Human T-Cell Lymphotropic Virus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. **Journal of Medical Virology**, Washington, v. 77, p. 331–336, 2005.

UNAIDS (Estados Unidos). **Report on the global AIDS epidemic 2010**. WHO library catalogue. Geneva, ISBN 978-92-9173-871-7.

VALLEJO, L. F.; RINAS, U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding bacterial inclusion body proteins. **Microbial Cell Factories**, London, v. 3, p. 11, 2004.

VALERIE, L. N. et al. Serological Diagnosis with Recombinant Peptides/Proteins. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 37, p. 1667-1668, 1991.

VAN ANKEN, E. et al. Only five of 10 strictly conserved disulfide bonds are essential for folding and eight for function of the HIV-1 envelope glycoprotein. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 19, p. 4298–4309, 2008.

VAN OOYEN, A. J. J. et al. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. **FEMS Yeast Research**, Malden, v. 6, p. 381–392, 2006.

VARSHARAVSKY, A. The N-end rule: functions, mysteries, uses. **Proceedings of the national Academy of Science (PNAS)**, Washington, v. 93, p. 12142-12149, 1996.

VIANA, I. F. T. Produção e validação de antígenos recombinantes dos vírus HIV1?2 e HTLV1/2 para o desenvolvimento de kits de diagnóstico através de microarranjos líquidos; Dissertação de Mestrado; **Universidade Federal de Pernambuco**, Departamento de Genética, Recife-PE; 2011.

VIANA, I. F. T. et al. De novo design of immunoreactive conformation-specific HIV-1 epitopes based on Top7 scaffold. **RSC Advances (Royal Society of Chemistry)**, Cambridge, v. 3, p. 11790-11800, 2013.

VIGNALI, D. A. A. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. **Journal of Immunological Methods**, Philadelphia, v. 242, p. 243-255, 2000.

VIRACORIBT. **Learning-Lab/Luminex**. Disponível em: <<http://www.viracoribt.com/Learning-Lab/Luminex>>. Acesso em: 05. out. 2013.

VLASUK, G. P. et al. Purification and Characterization of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Core Precursor (p55) Expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 264, p. 12106-12112, 1989.

WALTERS, A. et al. Multiplex real-time PCR for the detection and quantitation of HTLV-1 and HTLV-2 proviral load: Addressing the issue of indeterminate HTLV results. **Journal of Clinical Virology**, Washington, v. 52, p. 38– 44, 2011.

WAUGH, D. S. An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. **Protein Expression and Purification**, Philadelphia, v. 80, p. 283-293, 2011.

WEBER, B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. **Journal of Clinical Virology**, Philadelphia, v. 32, p. 102-112, 2005.

WICKNER, R. B.; FUJIMURA, T.; ESTEBAN, R. Viruses and Prions of *Saccharomyces cerevisiae*. **Advances in Virus Research**, Philadelphia, chapter 1, v. 86, p. 1-36, 2013.

YAO, J.; WIGDAHL, B. Human T cell Lymphotropic virus type I genomic expression and impact on intracellular signaling pathways during neurodegenerative disease and leukemia. **Frontiers in Bioscience**, Irvine, v. 5, p. 138-168, 2000.

YAO, K. et al. Human T Lymphotropic Virus Types I and II Western Blot Seroindefinite Status and Its Association with Exposure to Prototype HTLV-I. **Journal of Infectious Disease**, Oxford, v. 193, p. 427-437, 2006.

YIN, T. et al. Optimized Medium Improves Expression and Secretion of Extremely Thermostable Bacterial Xylanase, XynB, in *Kluyveromyces lactis*. **Microbial Biotechnology**, Malden, v. 20, p. 1471–1480, 2010.

ZHAO, L.H. et al. Studies on antigenicity of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) external glycoprotein as well as its expression in *Pichia pastoris*. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, Shanghai, v. 23, p. 457-61, 2007.

ZHANG, L. et al. Disulfide bond formation and its impact on the biological activity and stability of recombinant therapeutic proteins produced by *Escherichia coli* expression system. **Biotechnology Advances**, Philadelphia, v. 29, p. 923-929, 2011.

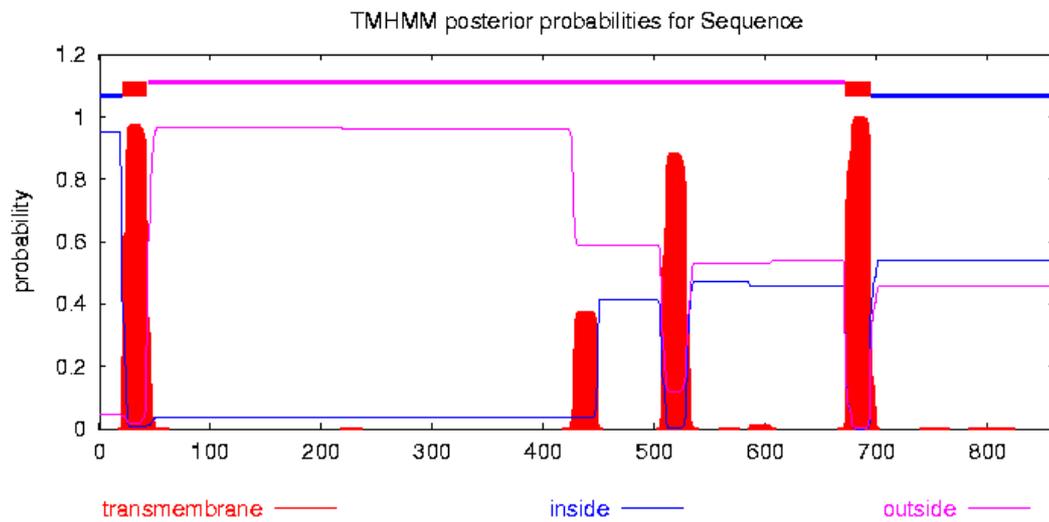
ZHANG, Y.; LIU, R.; WU, X. The proteolytic systems and heterologous proteins degradation in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Annals of Microbiology**, Heidelberg, v. 57, p. 553-560, 2007.

APÊNDICES

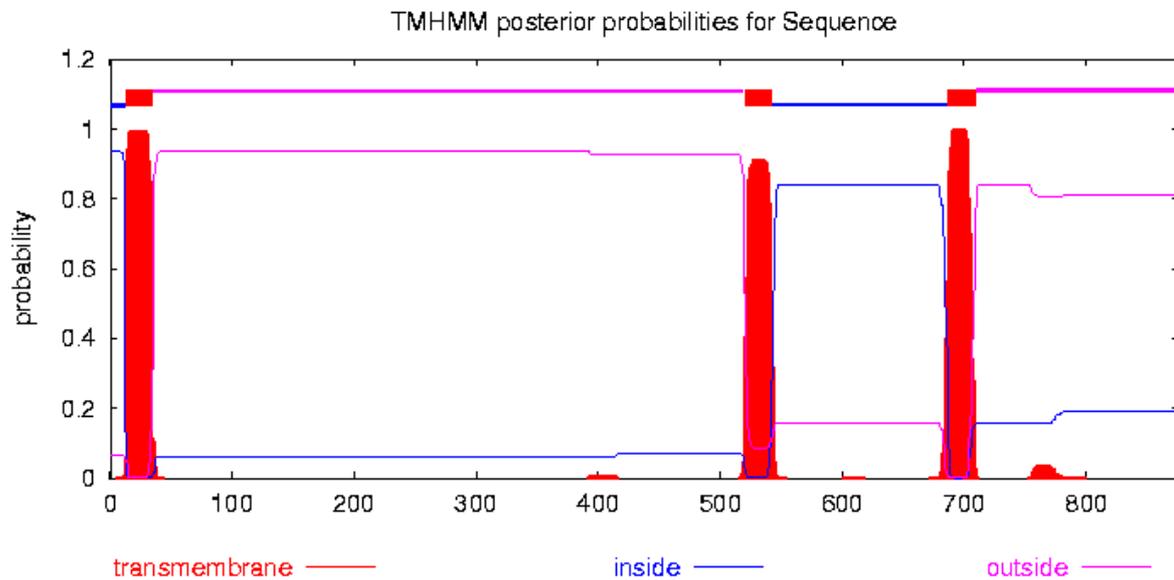
APÊNDICE A- Identificação das regiões transmembranas com o programa TMHMM 2.0.

(continua)

A. ENVHIV1 completo

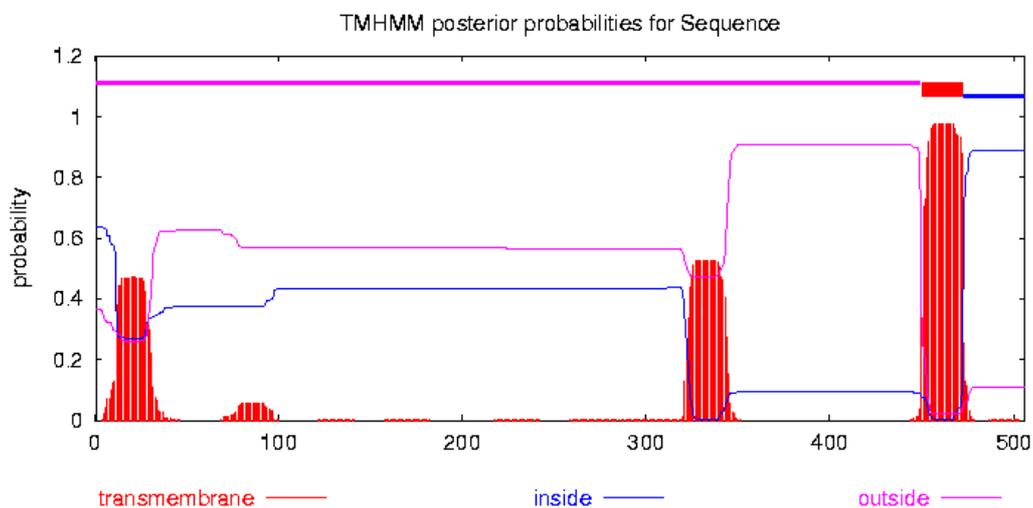


B. ENVHIV2 completo

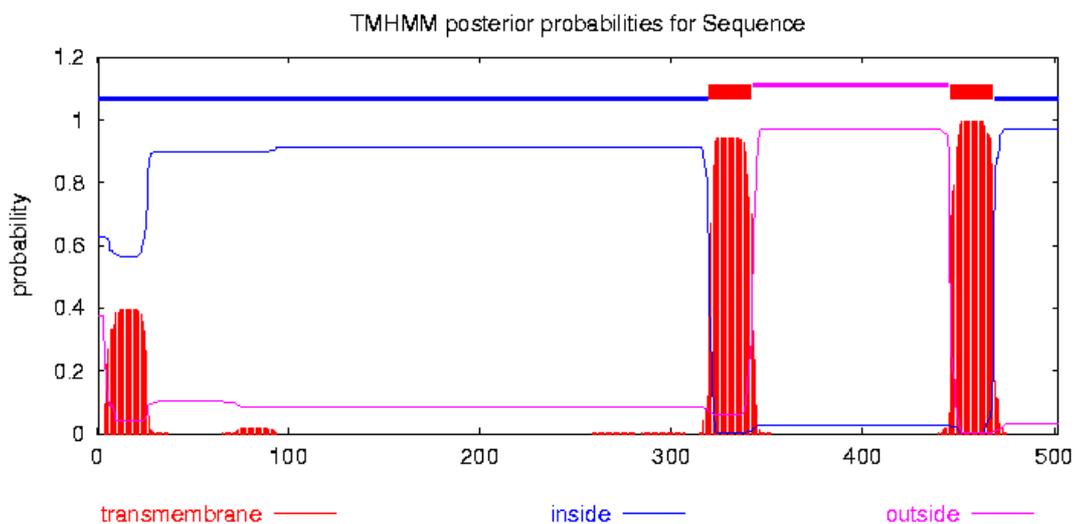


APÊNDICE A- Identificação das regiões transmembranas com o programa TMHMM 2.0.
(conclusão)

C. ENVHTLV1 completo

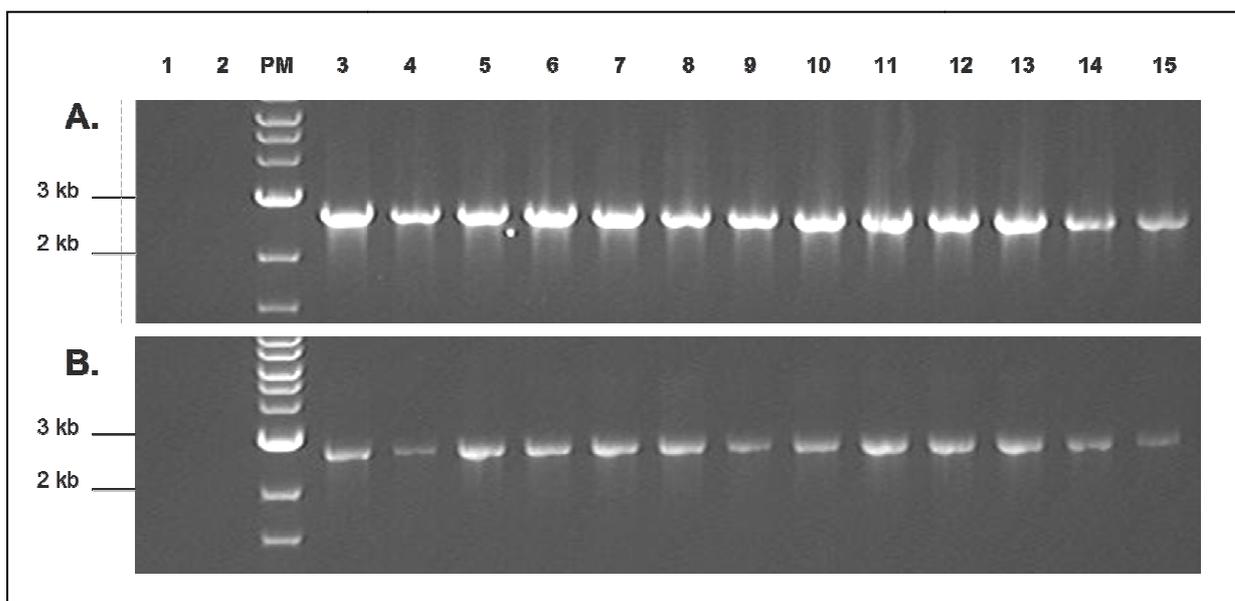


ENVHTLV2 completo



Fonte: a autora

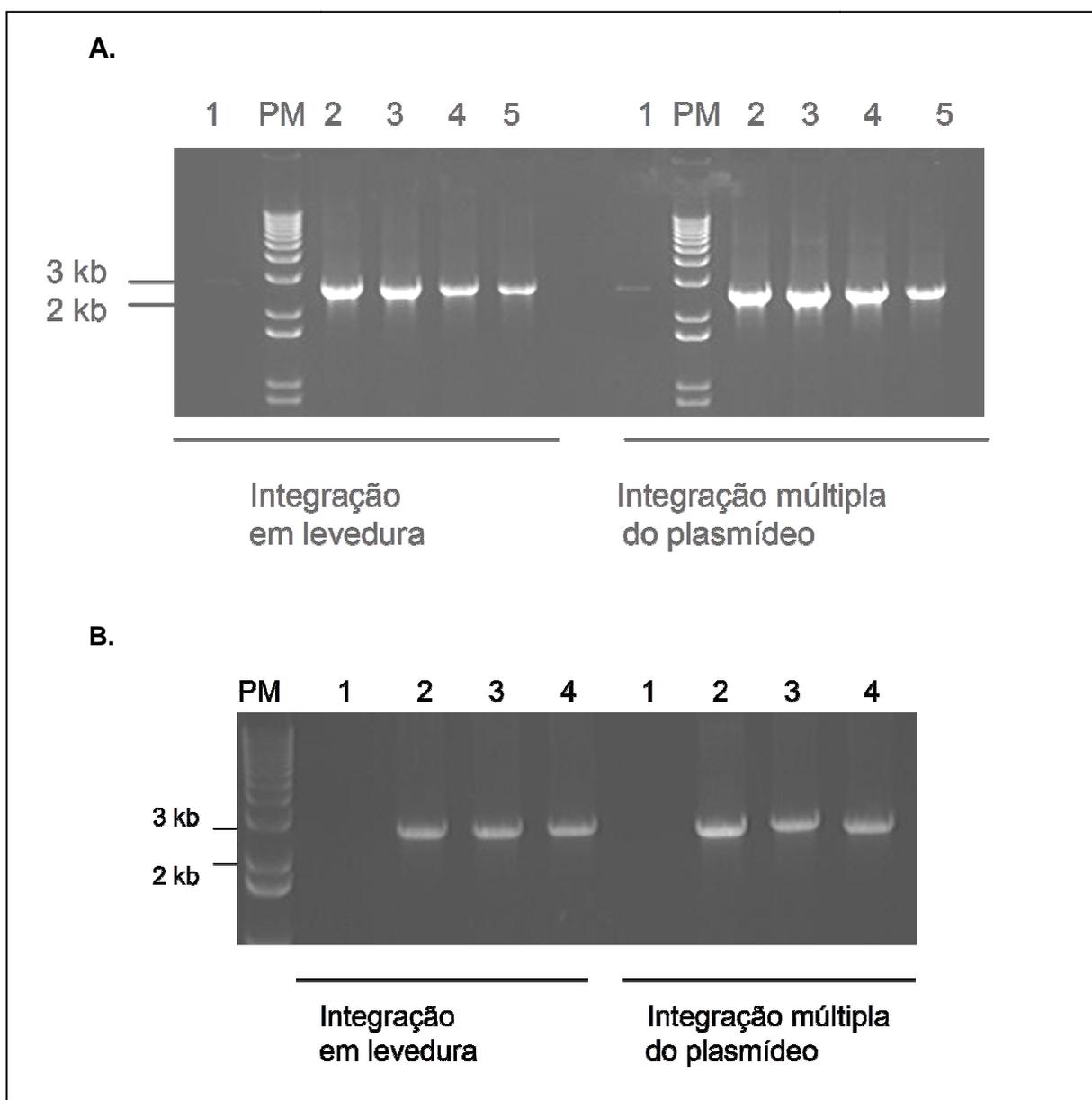
APÊNDICE B- Integração dos antígenos subclonados em plasmídeo pKLAC2 em levedura.



Fonte: a autora

Nota: PCR aplicado em Gel de Agarose corado com Brometo de Etídeo; tamanho esperado: **(A.)** integração simples 2.4kb, **(B.)** Integração múltipla 2.3kb; **(1)** controle negativo PCR, **(2)** controle negativo transformação sem plasmídeo, **(PM)** Peso molecular, **(3)** controle positivo mAIE, **(4)** HCV_E1, **(5)** HCV_E2, **(6)** HCV_E1/E2híbrida, **(7)** p24HTLV1completo, **(8)** ENVHTLV1completo, **(9)** ENVHTLV2compeyto, **(10)** ENVHIV1hidrofílico, **(11)** ENVHIV2hidrofílico, **(12)** p24HIV1completo clonA, **(13)** p24HIV1completo clonB, **(14)** p24HIV1completo clonC, **(15)** p24HIV1completo clonD;

APÊNDICE C- Integração dos antígenos subclonados em plasmídeos pKLCF em levedura.



Fonte: a autora

Nota: PCR aplicado em Gel de Agarose corado com Brometo de Etídeo; **A.** Antígenos consenso, (1) Co neg, (PM) Peso molecular, (2) mAIE controle positivo, (3) p24HIV1 completo, (4) ENVHTLV1 em pKLCF-C, (5) ENVHTLV1 em pKLCF-N; **B.** Antígenos sem TM, (1) Co neg, (2) mAIE controle positivo, (3) gp41 Δ HIV1 em pKLCF-N, (4) gp120 Δ HIV1 em pKLCF-N; tamanho esperada: integração simples: 2.4kb, integração múltipla 2.3 kb;

ANEXOS

ANEXO A- Parecer do Comitê de Ética



Título do Projeto: "Avaliação de antígenos sintéticos produzidos em sistemas procarióticos de expressão: desenvolvimento de kits p/ triagem sorológica obrigatório para diversas infecções virais".

Pesquisador responsável: Heike Erna Brand.

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/FIOCRUZ

Data de apresentação ao CEP: 24/05/2011

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 25/11

Registro no CAAE: 0024.0.095.000-11

PARECER Nº 38 /2011

O Comitê avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 29 de setembro de 2014. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 29 de setembro de 2011.

Giselle Campos da Gouveia
 Giselle Campos da Gouveia
 Farmacêutica
 Coordenadora
 Mat. SIAPE 0463378
 CPqAm / FIOCRUZ

Observação:

Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 29/09/2012.

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n
 CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639
 Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639
 Recife - PE - Brasil
 comitedeetica@cpqam.fiocruz.br



ANEXO B- Carta da submissão do artigo.

Novo Responder Excluir Arquivar Lixo Eletrônico Limpar Mover para Categorias

Submission Confirmation

 **Journal of Virological Methods** (jvmeth@ucl.ac.uk) Adicionar aos contatos 12:41
Para: heikebrand@hotmail.com, heikebrand@cpqam.fiocruz.br

Dear Mrs. Heike Brand,

Your submission entitled "Generation of consensus env and core antigens, derived from HIV subtypes of the human immunodeficiency virus type I (HIV) prevalent in Brazil and evaluation by ELISA and xMAPLuminex technology." has been received by Journal of Virological Methods

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/virmet/>.

Your username is: heikebrand@hotmail.com

If you need to retrieve password details, please go to:
http://ees.elsevier.com/virmet/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

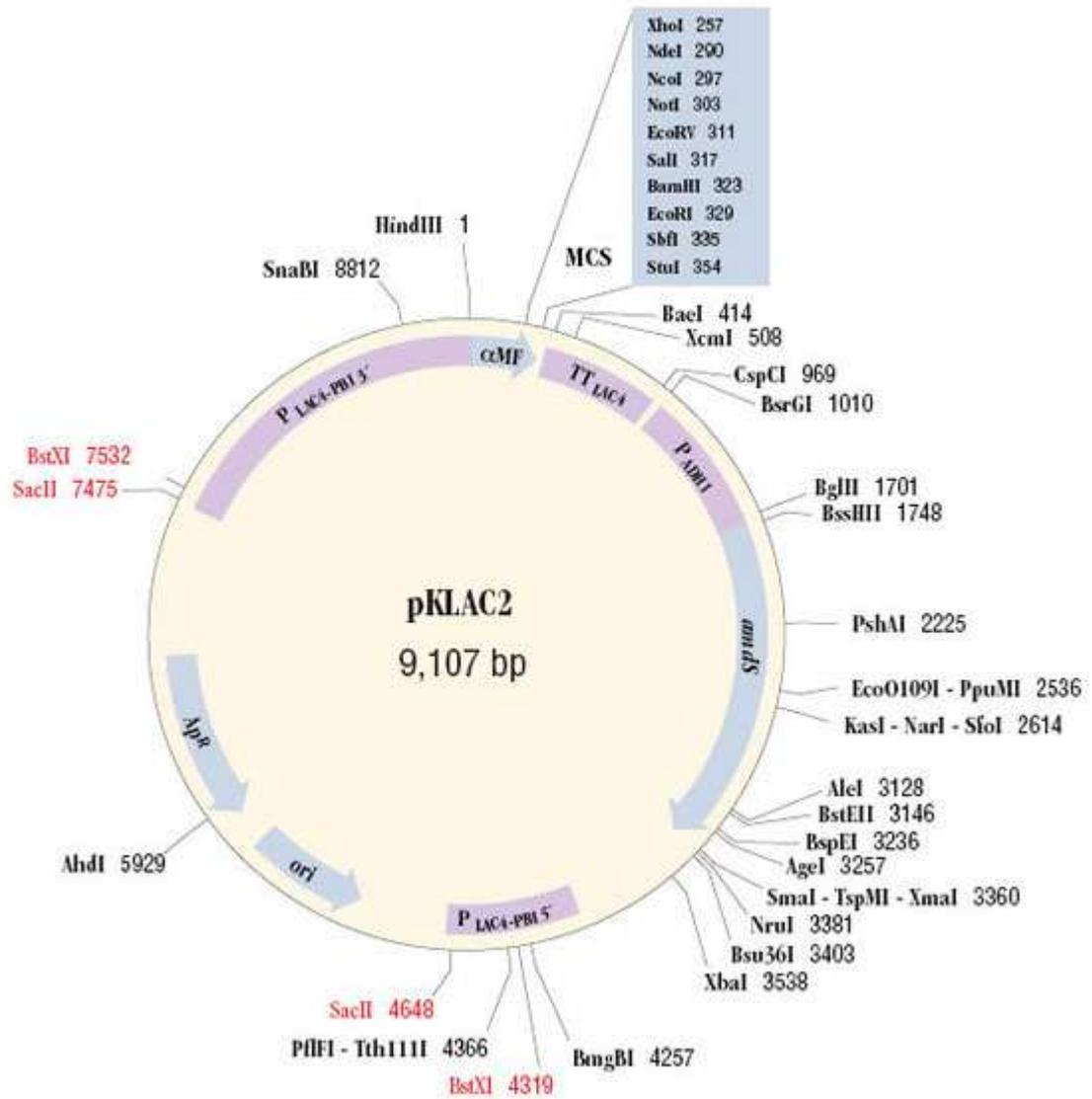
Kind regards,

Elsevier Editorial System
Journal of Virological Methods

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

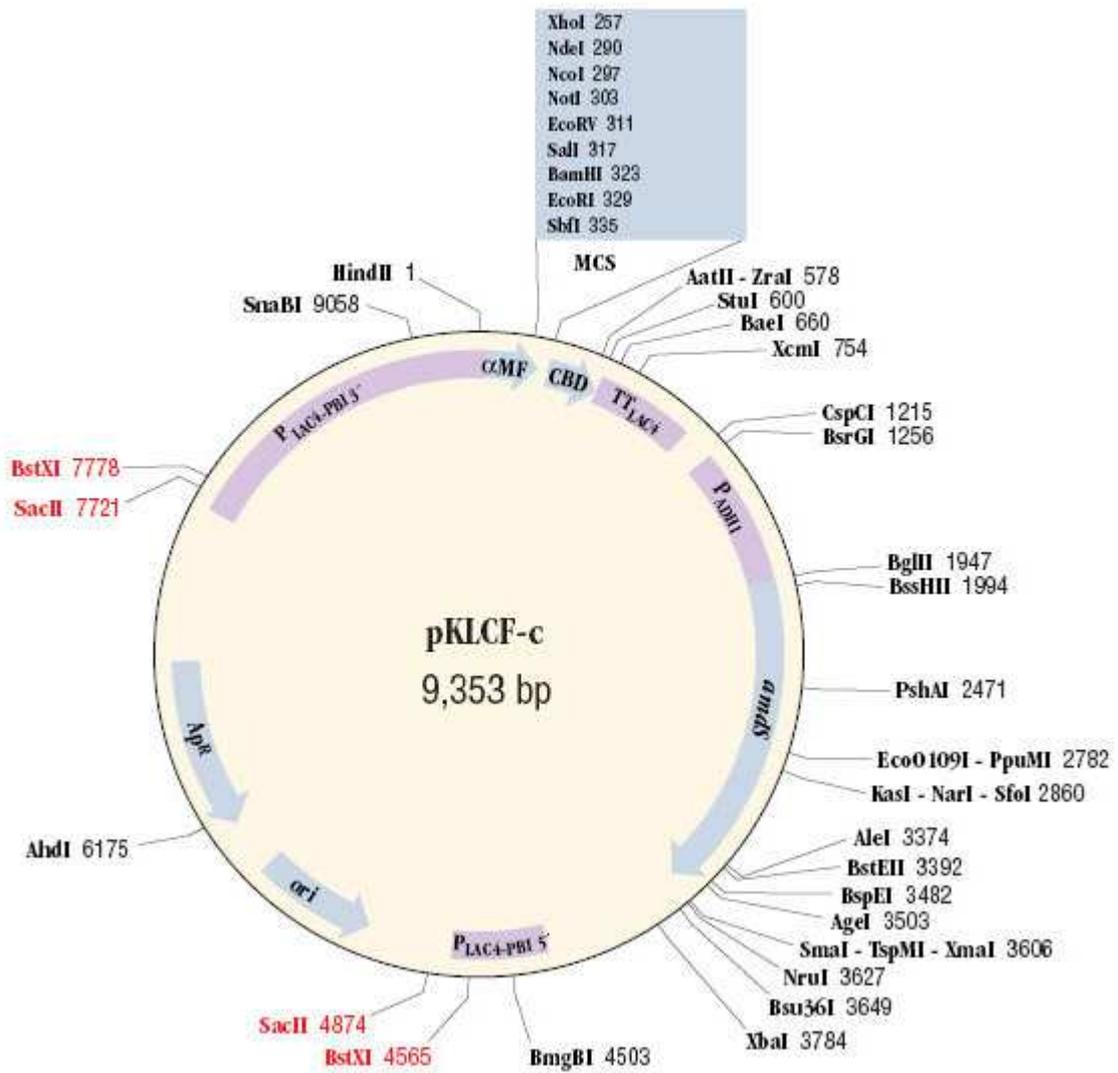
ANEXO C- Mapa dos plasmídeos eucariotas

Vetor pKLAC2



Fonte: New England Biolabs (2011)

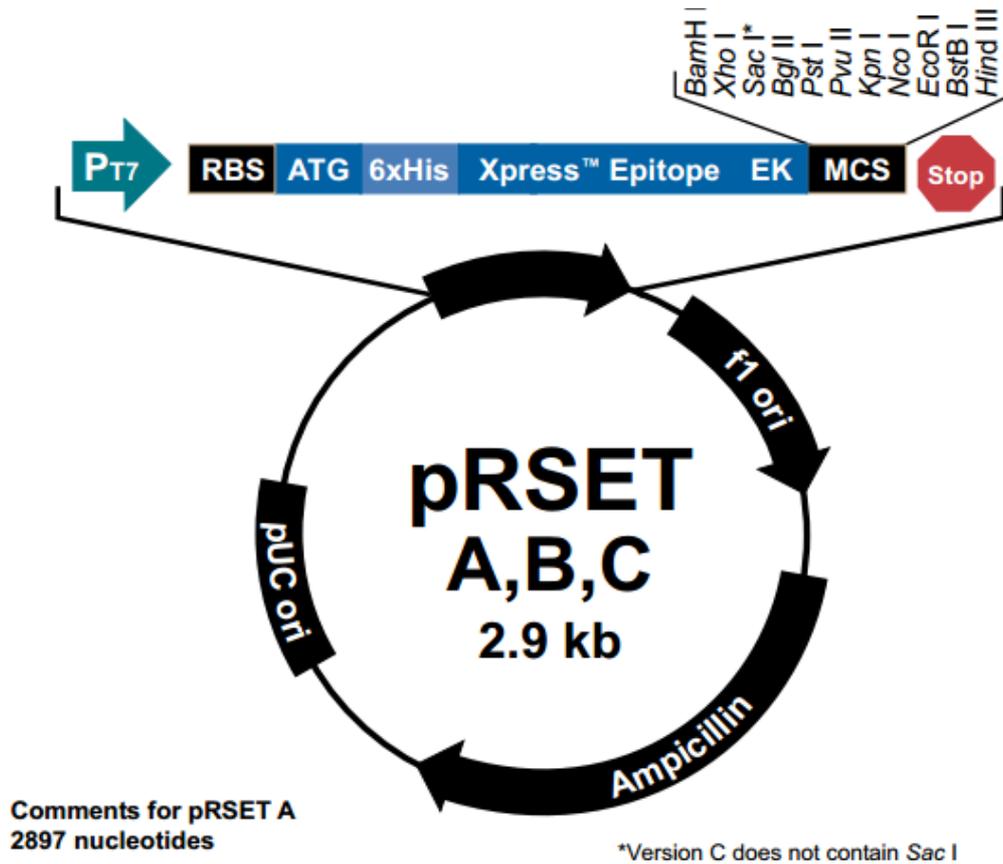
Vetor pKLCF-C



Fonte: New England Biolabs (2011)

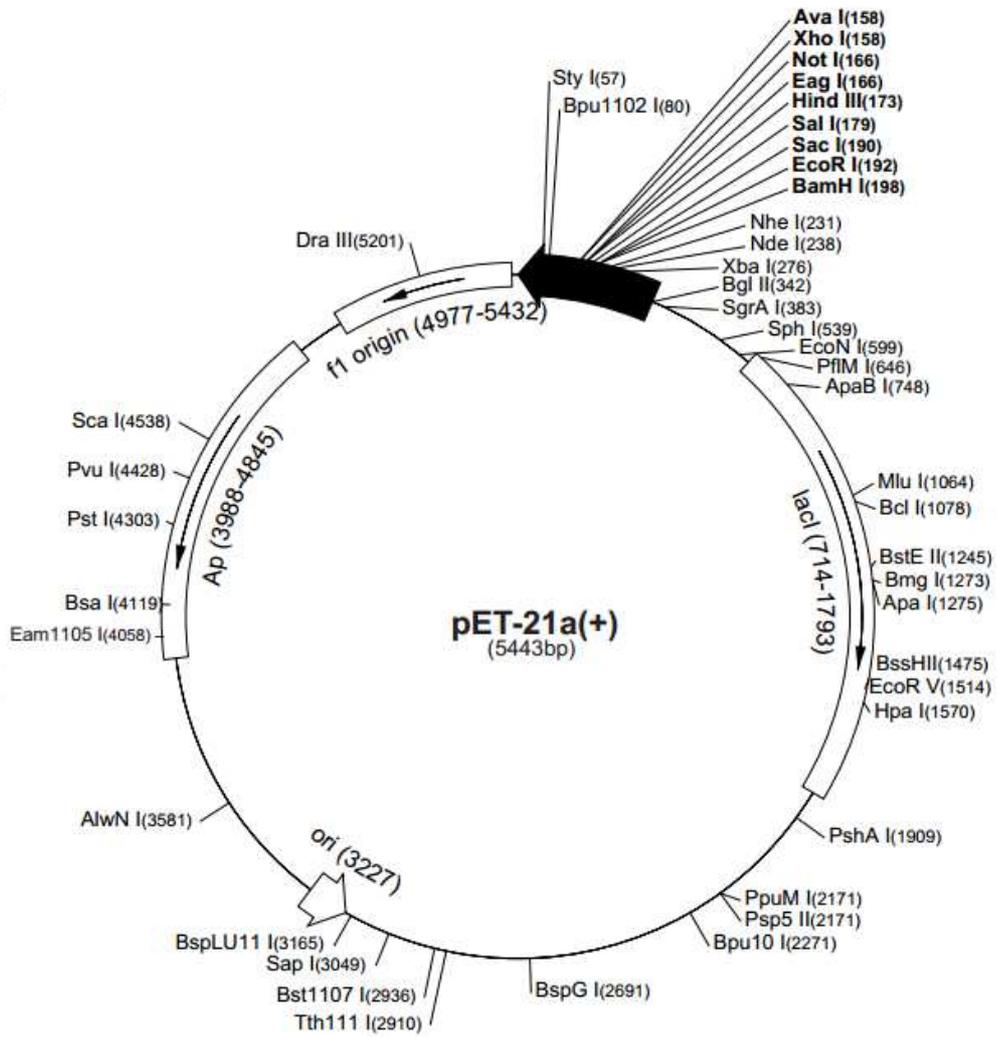
ANEXO D- Mapa dos plasmídeos procariota.

Vetor pRSETA



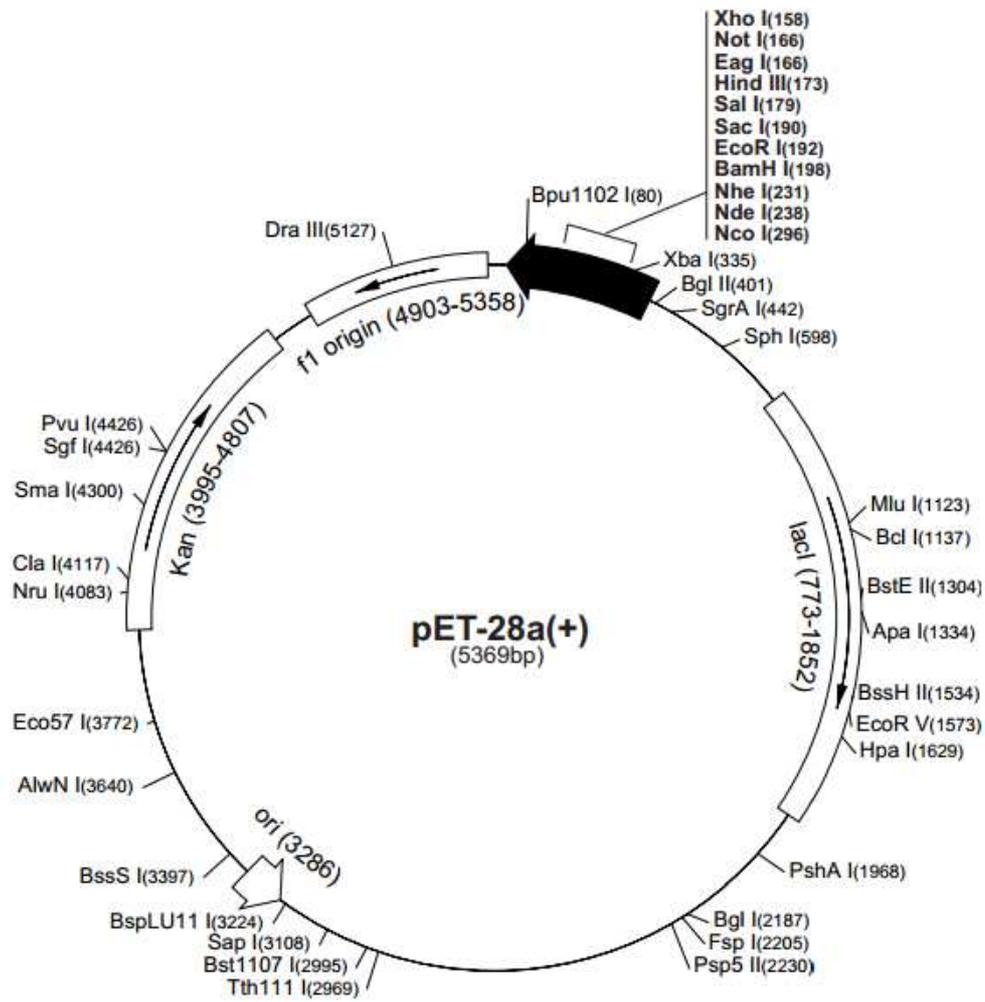
Fonte: Novagen (2011)

Vetor pET21a



Fonte: Novagen (2011)

Vetor pET28a



Fonte: Novagen (2011)