

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

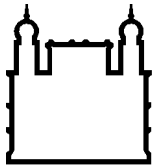
Doutorado em Biologia Celular e Molecular

EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS DO VÍRUS
DA HEPATITE A E AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE

HAROLDO CID DA SILVA JUNIOR

Rio de Janeiro

2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Haroldo Cid da Silva Junior

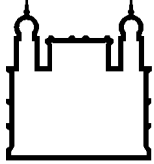
**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS DO VÍRUS DA
HEPATITE A E AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Orientadores: Prof. Dr. Marco Alberto Medeiros
Prof. Dr. Ricardo Galler

RIO DE JANEIRO

2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

HAROLDO CID DA SILVA JUNIOR

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS DO VÍRUS DA HEPATITE A E
AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE**

Orientadores: Prof. Dr. Marco Alberto Medeiros

Prof. Dr. Ricardo Galler

Aprovada em: 09/06/2015.

EXAMINADORES:

Membros titulares

Prof. Dr. José Paulo Gagliardi Leite (Presidente) – Fundação Oswaldo Cruz / IOC

Profa. Dra. Vanessa Salete de Paula – Fundação Oswaldo Cruz / IOC

Prof. Dr. Bergmann Moraes Ribeiro – Universidade de Brasília

Membros suplentes

Debora Regina Lopes dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Natalia Motta de Araujo – Fundação Oswaldo Cruz / IOC

Rio de Janeiro, 09 de junho de 2015

Trabalho realizado no Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz – RJ, sob a orientação do Prof. Dr. Marco Alberto Medeiros e do Prof. Dr. Ricardo Galler.

Agradecimentos

A Deus, pela força para superar as adversidades e por guiar meus passos.

Aos meus queridos pais, Haroldo Cid da Silva e Eliete de Araujo Cid da Silva, pelo amor, carinho, educação, paciência e apoio incondicional.

Ao meu querido irmão, Ricardo de Araujo Cid da Silva, pelo carinho, amizade, incentivo e momentos de descontração.

Ao meu querido tio, Gilberto Ribeiro de Araújo, pela generosidade e momentos de descontração.

À minha querida avó paterna, Deolinda Cid da Silva (*in memorium*), pelo carinho e incentivo durante os anos de convivência.

Aos meus queridos avós maternos, Jorge Carlos de Araujo (*in memorium*) e Luiza Ribeiro de Araujo (*in memorium*), pelos anos de convivência e aprendizado.

Ao meu primo Mário Jorge Ribeiro de Araújo, pelo incentivo e amizade.

À Sharlene Lopes Pereira, pela amizade, incentivo e ajuda.

Aos amigos Luiz Gaspar Pereira e Sueli Lopes Pereira pela amizade e incentivo.

Aos amigos Cláudia, Romullo e André (*in memorium*), pelas palavras de incentivo.

Ao amigo José Geraldo Salgado de Mendonça, pelas conversas e incentivo.

Ao grande amigo Carlos Otávio Alves Viana, pela ajuda, conselhos e risadas.

Ao Dr. Marco Alberto Medeiros, pela orientação e atenção dispensada durante o período do Doutorado.

Ao Dr. Ricardo Galler, por ter me aceitado como aluno.

À Dra. Vanessa Salete de Paula, pelo excelente trabalho de revisão desta tese.

Aos membros da banca examinadora, pela atenção dispensada a este trabalho.

A toda a equipe do LAEAN/Bio-Manguinhos, pela realização das etapas que envolviam o manejo de animais.

À Maria Luiza Borges de Azevedo, pela atenção e ajuda na parte de expressão em baculovírus/células de inseto.

À Aline Bonifácio, pela ajuda com a parte de clonagem e expressão das proteínas recombinantes.

À Dra. Patrícia Cristina da Costa Neves, pela ajuda na discussão dos resultados de imunologia.

À Kamilla Feres Boroto, pela ajuda com os ensaios de avidéz.

À Ana Paula e Fernanda, pela ajuda com a otimização e interpretação dos resultados de avidéz.

Ao Dr. Marcelo Alves Pinto, por ter cedido os soros de pacientes infectados com o vírus da hepatite A.

À Dr. Lia Laura Lewis, por ter fornecido os dados sorológicos dos pacientes infectados com o vírus da hepatite A.

Ao colega Gentil Arthur Lins, pela ajuda com o experimento de neutralização do vírus da hepatite A.

Ao Dr. Bergmann Morais Ribeiro, pela ajuda com os ensaios de microscopia eletrônica e pelo aprendizado proporcionado durante a minha estadia no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia (UnB).

Aos colegas do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia (UnB), em especial ao Daniel Ardisson-Araújo, Claudia Natércia e Mayarha Baggio.

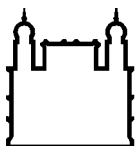
Aos amigos do LATER/Bio-Manguinhos, Gabriela Esteves, Maria Luiza de Souza, Eliane Baroni, Eneida Santos, Maria da Glória, José Procópio, Luis Vidal, Anna Érika, Natália Plínio, Claudio Rocha, Cristiane Pinheiro, Leonora Vieira, Carolina Aquino, Ana Emília, Patrícia Gonzalez, Daniel Tait, Thiago Santos, Fernanda de Almeida, Ana Paula Argondizzo e Mariana Miguez.

Aos colegas do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA) – IOC, em especial ao Dr. José Paulo Gagliardi, ao Alexandre Fialho, ao Dr. Eduardo Volotão e ao Dr. Túlio Machado, pela ajuda durante a execução deste trabalho.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

À FIOCRUZ, IOC, Bio-Manguinhos, CNPq e FAPERJ, pelo financiamento e todo suporte técnico-científico.

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

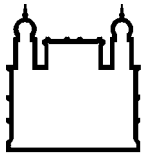
RESUMO

EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS DO VÍRUS DA HEPATITE A E AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE

TESE DE DOUTORADO

Haroldo Cid da Silva Junior

O vírus da hepatite A (HAV) é o principal agente etiológico das hepatites virais agudas e estima-se que ocasione 1,5 milhão de novas infecções no mundo anualmente. Apesar da eficácia apresentada pelas vacinas comerciais, a replicação do HAV em cultura de células é lenta e apresenta baixo rendimento, o que torna a sua produção difícil e dispendiosa. Nesse contexto, o uso de proteínas recombinantes do HAV pode representar uma alternativa ao modelo de vacina existente. O presente trabalho teve como objetivo expressar e avaliar a imunogenicidade das partículas virais destituídas de ácido nucleico (VLPs) e da proteína VP1 do HAV. As VLPs foram geradas a partir do sistema baculovírus/células de inseto através da infecção de células de inseto com baculovírus recombinantes contendo as regiões P1-2A e P3 do genoma do HAV. A poliproteína P1-2A foi expressa, clivada e se organizou em estruturas que continham epitopos conformacionais de neutralização. Partículas com características similares ao HAV foram identificadas por microscopia eletrônica, sugerindo que as proteínas expressas se montaram em VLPs. Em paralelo, a VP1 foi expressa nos sistemas baculovírus/células de inseto e *Escherichia coli*. Níveis mais elevados de expressão foram obtidos em *E. coli*, o que conseqüentemente aumentou a taxa de recuperação da proteína purificada. A VP1 derivada de *E. coli* foi utilizada nos ensaios de antigenicidade e mostrou reatividade frente aos soros de pacientes infectados pelo HAV, o que demonstra seu potencial como um marcador para diagnóstico. Para os estudos de imunogenicidade, a VP1 derivada de *E. coli* foi combinada a dois adjuvantes, o hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) e o adjuvante a base de saponina. A formulação VP1+Al(OH)₃ induziu polarização da resposta Th2, enquanto que a formulação VP1r+saponina gerou um balanço maior entre as respostas Th1 e Th2. O adjuvante saponina permitiu a administração de uma dose menor da VP1 sem afetar a intensidade da resposta. Resultados preliminares sugerem que os anticorpos anti-VP1 induzidos pela formulação com saponina apresentaram reatividade cruzada com o HAV. Além disso, testes iniciais indicam que os camundongos imunizados com a VP1 em associação com ambos os adjuvantes apresentaram resposta anamnésica contra o HAV. Os resultados aqui apresentados sugerem que a VP1 e as VLPs podem ser úteis para o desenvolvimento de uma nova vacina contra a hepatite A.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ABSTRACT

HETEROLOGOUS EXPRESSION OF HEPATITIS A VIRUS PROTEINS AND IMMUNOGENICITY EVALUATION

TESE DE DOUTORADO

Haroldo Cid da Silva Junior

The hepatitis A virus (HAV) is the primary etiological agent of acute viral hepatitis and it is estimated to cause 1.5 million of new infections each year worldwide. Despite the effectiveness of commercial vaccines, the replication of HAV in cell culture is slow and has low yield, which makes it difficult and expensive to manufacture. In this context, the use of recombinant HAV proteins could represent an alternative model to the existing vaccines. This study aimed to express and evaluate the immunogenicity of virus-like-particles (VLPs) and VP1 protein of HAV. The VLPs were generated using the baculovirus/insect cell expression system by the infection of insect cells with recombinant baculovirus containing HAV P1-2A and P3 regions. The P1-2A polyprotein was successfully expressed, cleaved and organized into structures that contained neutralizing conformational epitopes. HAV-like particles were identified by electron microscopy, suggesting that the expressed proteins were assembled into VLPs. In parallel, VP1 was expressed in both baculovirus/insect cell and *Escherichia coli* expression systems. Higher protein levels were obtained in *E. coli*, which consequently increased the recovery rate after protein purification. The *E. coli*-derived VP1 was then used in antigenicity assays and showed reactivity against sera from patients infected with HAV, demonstrating its potential as a diagnostic marker. For immunogenicity studies, the *E. coli*-derived VP1 was combined with two adjuvants, aluminum hydroxide (Al(OH)₃) and the saponin-based adjuvant. The VP1+Al(OH)₃ induced Th2 polarization, while VP1+saponin generated a Th1 and Th2 balanced immune response. Saponin-based adjuvant formulations allowed the administration of lower dose of VP1 without affecting the intensity of the response. Preliminary results suggest that the anti-VP1 antibodies induced by saponin-based adjuvant showed cross-reactivity with HAV. Furthermore, initial tests indicate that immunization of mice with VP1 in association with both adjuvants generated anamnestic response against HAV. The results presented here suggest that VP1 and VLPs might be useful to develop a new vaccine against hepatitis A.

Lista de Quadros

Quadro 1.1: Proteínas recombinantes, produzidas em <i>Escherichia coli</i> , aprovadas para uso terapêutico recentemente.....	26
Quadro 4.1: Mistura dos reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) para confirmação da transposição do gene <i>VP1</i> para o bacmídeo.	36
Quadro 4.2: Tamanhos dos <i>amplicons</i> esperados, a partir do bacmídeo-VP1 e do bacmídeo vazio, de acordo com os oligonucleotídeos iniciadores utilizados.	36
Quadro 4.3: Tamanhos dos <i>amplicons</i> esperados, a partir do bacmídeo-HBM-VP1 e do bacmídeo vazio, de acordo com os oligonucleotídeos iniciadores utilizados.	42
Quadro 4.4: Mistura dos reagentes da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para amplificação do gene <i>VP1</i> a ser clonado no vetor pET100/D-TOPO®.....	43
Quadro 4.5: Mistura dos reagentes utilizados nas reações em cadeia pela polimerase (PCR) para confirmar a transposição do cassete de expressão contendo os genes <i>P1-2A</i> e <i>P3</i>	50
Quadro 4.6: Tamanhos dos <i>amplicons</i> esperados a partir do bacmídeo-P1-2A+P3 e do bacmídeo vazio, de acordo com os oligonucleotídeos iniciadores utilizados.	51
Quadro 5.1: Detergentes adicionados ao tampão base e suas respectivas concentrações.....	85
Quadro A.5.1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações em cadeia pela polimerase (PCRs) e no sequenciamento dos genes <i>VP1</i> , <i>P1-2A</i> e <i>P3</i>	147

Lista de Tabelas

Tabela 5.1: Análise da curva ROC construída para avaliar o desempenho do ensaio imunoenzimático (ELISA) <i>in house</i> (VP1r) para detecção de anticorpos da classe IgM nos soros de pacientes infectados com o vírus da hepatite A.....	76
Tabela 5.2: Predição da solubilidade das proteínas do vírus da hepatite A e do poliovírus humano.....	89
Tabela 5.3: Títulos de anticorpos IgG anti-VP1 induzidos nos camundongos (<i>pool</i>) imunizados com 20 µg e 2 µg da proteína VP1 recombinante, utilizando o hidróxido de alumínio (Al(OH) ₃) como adjuvante.....	90
Tabela 5.4: Títulos de anticorpos IgG anti-VP1 induzidos nos camundongos (<i>pool</i>) imunizados com 20 µg e 2 µg da proteína VP1 recombinante, utilizando adjuvante a base de saponina.....	92
Tabela 5.5: Títulos de anticorpos IgG anti-VP1 induzidos nos camundongos (<i>pool</i>) imunizados com 20 µg e 2 µg da proteína VP1 recombinante, utilizando hidróxido de alumínio (Al(OH) ₃) e saponina como adjuvantes.....	93
Tabela 5.6: Títulos das subclasses de IgG induzidas nos camundongos (<i>pool</i>) imunizados com 20 µg da proteína VP1 recombinante adsorvida em hidróxido de alumínio (Al(OH) ₃).....	95
Tabela 5.7: Títulos das subclasses de IgG induzidas nos camundongos (<i>pool</i>) imunizados com 2 µg da proteína VP1 recombinante adsorvida em hidróxido de alumínio (Al(OH) ₃).....	96
Tabela 5.8: Títulos das subclasses de IgG induzidas nos camundongos (<i>pool</i>) imunizados com 20 µg da proteína VP1 recombinante combinada com o adjuvante a base de saponina.....	97
Tabela 5.9: Títulos das subclasses de IgG induzidas nos camundongos (<i>pool</i>) imunizados com 2 µg da proteína VP1 recombinante combinada com o adjuvante a base de saponina.....	98

Lista de Figuras

Figura 1.1: Micrografia eletrônica das partículas virais da hepatite A	3
Figura 1.2: Organização do genoma do vírus da hepatite A e processamento da poliproteína precursora	5
Figura 1.3: Representação esquemática do ciclo replicativo do vírus da hepatite A.	11
Figura 1.4: Modelo mostrando a montagem do capsídeo do vírus da hepatite A	12
Figura 1.5: Curso natural da infecção pelo vírus da hepatite A.....	14
Figura 1.6: Prevalência estimada da hepatite A em 2005	18
Figura 1.7: Esquema representativo da regulação da expressão gênica no sistema pET.....	27
Figura 1.8: Etapas envolvidas na obtenção do baculovírus recombinante a partir do sistema <i>Bac-to-Bac</i> [®]	30
Figura 4.1: Esquema representativo do gene HBM-VP1 sintetizado pela empresa Integrated DNA Technologies	41
Figura 5.1: Eletroforese em gel de agarose (1,2%) dos produtos da clivagem enzimática da construção pFastBac™ Dual+VP1 com as endonucleases de restrição <i>Xba</i> I e <i>Hind</i> III.....	61
Figura 5.2: Eletroforese em gel de agarose (1,2%) dos <i>amplicons</i> obtidos pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) do bacmídeo-VP1	62
Figura 5.3: <i>Western blotting</i> dos extratos e dos sobrenadantes das células Sf9 infectadas com baculovirus-VP1 e baculovírus vazio, após 72 horas de infecção....	63
Figura 5.4: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (<i>SDS-PAGE</i> , 4%/12%) e <i>Western blotting</i> da proteína VP1 recombinante expressa em células de inseto e purificada por cromatografia de afinidade por íons metálicos.....	64
Figura 5.5: <i>Western blotting</i> das frações solúveis e insolúveis dos extratos de células Sf9 infectadas com baculovírus-VP1, coletadas entre 24h e 96h pós-infecção	65

Figura 5.6: Eletroforese em gel de agarose (1,2%) dos produtos da clivagem enzimática dos possíveis clones recombinantes pFastBac™ Dual+HBM-VP1 com as endonucleases <i>Xba</i> I e <i>Hind</i> III.....	66
Figura 5.7: Eletroforese em gel de agarose (1,2%) dos <i>amplicons</i> obtidos pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) do bacmídeo+HBM-VP1	67
Figura 5.8: <i>Western blotting</i> dos extratos e dos sobrenadantes das células Sf9 infectadas com baculovirus-HBM-VP1 e baculovírus vazio, após 72 horas de infecção.....	68
Figura 5.9: <i>Western blotting</i> das frações solúveis e insolúveis das células Sf9 infectadas com baculovírus+HBMVP1, coletadas entre 24h e 96h pós-infecção.....	69
Figura 5.10: Eletroforese em gel de agarose (1,2%) do gene <i>VP1</i> amplificado pela reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	70
Figura 5.11: Eletroforese em gel de agarose (1,2%) dos <i>amplicons</i> obtidos pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) a partir dos possíveis clones recombinantes pET100/D-TOPO®+VP1	70
Figura 5.12: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (<i>SDS-PAGE</i> , 4%/12%) do extrato de células BL-21 Star™ (DE3) induzidas e não induzidas para a expressão da proteína VP1 recombinante	71
Figura 5.13: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (<i>SDS-PAGE</i> , 4%/12%) para avaliar a solubilidade da proteína VP1 recombinante em BL-21	71
Figura 5.14: Cromatograma da purificação da VP1 recombinante através da afinidade por íons metálicos.....	72
Figura 5.15: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (<i>SDS-PAGE</i> , 4%/12%) e <i>Western blotting</i> da proteína VP1 recombinante expressa em <i>Escherichia coli</i> e purificada por cromatografia de afinidade por íons metálicos	73
Figura 5.16: Ensaio imunoenzimático (ELISA) <i>in house</i> para avaliar a reatividade da VP1 recombinante com anticorpos totais presentes no <i>pool</i> dos soros de pacientes infectados com o vírus da hepatite A	74
Figura 5.17: Ensaio imunoenzimático (ELISA) <i>in house</i> para avaliar a reatividade da VP1 recombinante com anticorpos da classe IgM presentes no <i>pool</i> dos soros de pacientes infectados com o vírus da hepatite A	74

Figura 5.18: Ensaio imunoenzimático (ELISA) <i>in house</i> para avaliar a reatividade da VP1 recombinante com anticorpos da classe IgG presentes no <i>pool</i> dos soros de pacientes infectados com o vírus da hepatite A	75
Figura 5.19: Curva ROC construída para avaliar o ensaio imunoenzimático (ELISA) <i>in house</i> (VP1r) para detecção de anticorpos da classe IgM nos soros de pacientes infectados com o vírus da hepatite A	76
Figura 5.20: Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos produtos da clivagem enzimática da construção pFastBac™ Dual+P1-2A com as endonucleases de restrição <i>Xba</i> I e <i>Not</i> I.....	77
Figura 5.21: Eletroforese em gel de agarose (1,2%) dos produtos da clivagem enzimática das construções pFastBac™ Dual+P1-2A+P3 com as endonucleases de restrição <i>Nhe</i> I e <i>Xho</i> I.....	78
Figura 5.22: Eletroforese em gel de agarose (1,2%) dos <i>amplicons</i> obtidos pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) do bacmídeo-P1-2A+P3	79
Figura 5.23: <i>Western blotting</i> dos extratos de células Sf9 infectadas com as construções baculovírus-P1-2A+P3, baculovírus vazio e baculovírus-P1-2A, após 72 horas de infecção	80
Figura 5.24: <i>Western blotting</i> dos extratos de células Sf9 infectadas com as construções baculovírus-P1-2A+P3, baculovírus-P12A e baculovírus vazio, após 72 horas de infecção	81
Figura 5.25: Ensaio imunoenzimático (ELISA) realizado com os extratos totais de células Sf9 infectadas com as construções baculovírus vazio, baculovírus-P1-2A+P3, baculovírus-VP1 e baculovírus-P1-2A, após 72 horas de infecção	82
Figura 5.26: Microscopia eletrônica de transmissão realizada com o extrato de células Sf9 infectadas com baculovírus-P1-2A+P3 (contrastação negativa).....	83
Figura 5.27: <i>Western blotting</i> das frações coletadas a partir do gradiente de sacarose.....	84
Figura 5.28: Ensaio imunoenzimático (ELISA) realizado com as frações solúveis e insolúveis das células Sf9 infectadas com as construções baculovírus vazio, baculovírus-P1-2A+P3, baculovírus-VP1 e baculovírus-P1-2A, após 96 horas de infecção.....	85
Figura 5.29: Ensaio imunoenzimático (ELISA) realizado para avaliar a diferença de solubilidade das VLPs no tampão base (10 mM tris-HCl + 0,1 M EDTA + 1 mM PMSF, pH 8,0) associado a diferentes detergentes	86

Figura 5.30: Ensaio imunoenzimático (ELISA) realizado para avaliar a diferença de solubilidade das VLPs no tampão inicial (50 mM tris-HCl + 1% (v/v) Triton X-100 + 150 mM NaCl + 1 mM PMSF, pH 8,0) e no tampão otimizado (10 mM tris-HCl + 0,1 mM EDTA + 1% (v/v) triton X-100 + 0,1% (v/v) SDS + 1 mM PMSF, pH 8,0)	87
Figura 5.31: <i>Western blotting</i> das frações solúveis e insolúveis das células Sf9 infectadas com baculovírus-P1-2A, coletadas entre 24h e 96h.....	88
Figura 5.32: Ensaio imunoenzimático (ELISA) <i>in house</i> para avaliar o título de anticorpos IgG anti-VP1 induzidos nos camundongos (<i>pool</i>) imunizados com 20 µg e 2 µg da proteína VP1 recombinante adsorvida em hidróxido de alumínio (Al(OH) ₃)..	91
Figura 5.33: Análise individual dos soros dos camundongos imunizados (n=4) com a proteína VP1 recombinante adsorvida em hidróxido de alumínio (Al(OH) ₃), utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA) <i>in house</i>	91
Figura 5.34: Ensaio imunoenzimático (ELISA) <i>in house</i> para avaliar o título de anticorpos IgG anti-VP1 induzidos nos camundongos (<i>pool</i>) imunizados com 20 µg e 2 µg da proteína VP1 recombinante combinada ao adjuvante a base de saponina...	92
Figura 5.35: Análise individual dos soros dos camundongos imunizados (n=4) com a proteína VP1 recombinante combinada ao adjuvante a base de saponina, utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA) <i>in house</i>	93
Figura 5.36: Ensaio imunoenzimático (ELISA) <i>in house</i> para avaliar o título de anticorpos IgG anti-VP1 induzidos nos camundongos (<i>pool</i>) imunizados com 20 µg e 2 µg da proteína VP1 recombinante combinada ao hidróxido de alumínio (Al(OH) ₃ e à saponina.....	94
Figura 5.37: Análise individual dos soros dos camundongos imunizados (n=4) com a proteína VP1 recombinante combinada à saponina e ao hidróxido de alumínio (Al(OH) ₃), utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA) <i>in house</i> para detecção de anticorpos IgG anti-VP1	94
Figura 5.38: Ensaio imunoenzimático (ELISA) <i>in house</i> para determinação dos títulos das subclasses de IgG anti-VP1 induzidas nos camundongos (<i>pool</i>) imunizados com 20 µg da proteína VP1 recombinante adsorvida em hidróxido de alumínio (Al(OH) ₃)	96
Figura 5.39: Ensaio imunoenzimático (ELISA) <i>in house</i> para determinação dos títulos das subclasses de IgG anti-VP1 induzidas nos camundongos (<i>pool</i>) imunizados com 2 µg da proteína VP1 recombinante adsorvida em hidróxido de alumínio (Al(OH) ₃)	97

Figura 5.40: Ensaio imunoenzimático (ELISA) <i>in house</i> para determinação dos títulos das subclasses de IgG anti-VP1 induzidas nos camundongos (<i>pool</i>) imunizados com 20 µg da proteína VP1 recombinante combinada com o adjuvante a base de saponina	98
Figura 5.41: Ensaio imunoenzimático (ELISA) <i>in house</i> para determinação dos títulos das subclasses de IgG anti-VP1 induzidas nos camundongos (<i>pool</i>) imunizados com 2 µg da proteína VP1 recombinante combinada com o adjuvante a base de saponina	99
Figura 5.42: Ensaio imunoenzimático (ELISA) <i>in house</i> para determinação do índice de avidéz dos anticorpos IgG anti-VP1 induzidos nos camundongos (n=4) imunizados com as diferentes formulações vacinais.....	100
Figura 5.43: Ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizado para avaliar a ligação cruzada entre os anticorpos anti-VP1, induzidos com as formulações vacinais, e o vírus da hepatite A	101
Figura 5.44: Ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizado para avaliar a produção de anticorpos anti-HAV induzidos por diferentes formulações vacinais após a administração de uma dose subimunogênica da vacina comercial HAVRIX®	102
Figura 5.45: Ensaio imunoenzimático (ELISA) para avaliar a ligação dos anticorpos, induzidos pela formulação 20µg VP1r+Al(OH) ₃ , ao vírus da hepatite A.....	103
Figura 5.46: Ensaio imunoenzimático (ELISA) para avaliar a ligação dos anticorpos, induzidos pela formulação 20µg VP1r+saponina, ao vírus da hepatite A	104
Figura A.1.1: Mapa do plasmídeo pIDTSmart Kan.....	140
Figura A.1.2: Mapa do plasmídeo doador pFastBac™ Dual	141
Figura A.1.3: Mapa do plasmídeo pUCIDT	142
Figura A.1.4: Mapa do vetor de expressão pET100/D-TOPO®	143

Lista de siglas e abreviaturas

- aa – aminoácidos
- ALT – alanina aminotransferase
- ANOVA – análise de variância
- AST – aspartato aminotransferase
- BCA – ácido bicinconínico
- Bio-Manguinhos – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
- BSA – albumina sérica bovina (do inglês *bovine serum albumin*)
- BV – vírus extracelular (do inglês *budded virus*)
- CAAE – certificado de apresentação para apreciação ética
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
- C_f – concentração final
- D.O. – densidade ótica
- DOC – deoxicolato de sódio
- eIF – fator de iniciação da tradução (do inglês *eukaryotic translation initiation factor*)
- ELISA – ensaio imunoenzimático (do inglês *enzyme linked immunosorbent assay*)
- ELISPOT – imunospot enzimático (do inglês *enzyme linked immunospot*)
- EU – unidades de endotoxina (do inglês *endotoxin unit*)
- FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
- Fw – do inglês *Forward*
- g – força gravitacional
- GSK – GlaxoSmithKline
- GV – *Granulovirus*
- HAV – vírus da hepatite A (do inglês *hepatitis A virus*)
- HBM – proteína melitina de abelha (do inglês *Honeybee Melittin*)
- HBsAg – antígeno de superfície do vírus da hepatite B (do inglês *hepatitis b surface antigen*)
- HCV – vírus da hepatite C (do inglês *hepatitis C virus*)
- HIV – vírus da imunodeficiência humana (do inglês *human immunodeficiency virus*)
- HLA – antígenos leucocitários humanos (do inglês *human leukocyte antigen*)
- HPV – papilomavírus humano
- HSH – homens que fazem sexo com homens
- IA – índice de avidéz
- IFN – interferon

Ig – imunoglobulina
IL – interleucina
IMAC – cromatografia de afinidade por íons metálicos (do inglês *immobilized metal ion affinity chromatography*)
IOC – Instituto Oswaldo Cruz
IRES – sítio interno de entrada do ribossomo (do inglês *internal ribosome entry site*)
ISCOM – complexo imunoestimulatório (do inglês *immunostimulating complex*)
kb – quilobases
kDa – quilodáton
IPTG – isopropil-β-D-tiogalactosídeo
LAEAN – Laboratório de Experimentação Animal
LATER – Laboratório de Tecnologia Recombinante
LB – Luria Bertani
LPS – lipopolissacarídeos
MET – microscopia eletrônica de transmissão
MOI – multiplicidade de infecção (do inglês *multiplicity of infection*)
m/m – razão massa por massa
m/v – razão massa por volume
NCBI – do inglês *National Center for Biotechnology Information*
NPV – *Nucleopolyhedrovirus*
NTR – não traduzida
OB – vírus ocluso (do inglês *occlusion bodies*)
ORF – fase aberta de leitura (do inglês *open reading frame*)
pb – pares de base
PCR – reação em cadeia pela polimerase
pfu – unidades formadoras de placa (do inglês *plaque forming units*)
p.i. – pós-infecção
PNI – Programa Nacional de Imunizações
PTA – ácido fosfotúngstico (do inglês *phosphotungstic acid*)
R – do inglês *Reverse*
RNAm – RNA mensageiro
RNA (+) – RNA de polaridade positiva
RNA (-) – RNA de polaridade negativa
ROC – do inglês *receiving operator characteristic*
rpm – rotações por minuto

RT-PCR – transcrição reversa seguida por reação em cadeia pela polimerase (do inglês *reverse transcriptase polymerase chain reaction*)

S – Svedberg

SAP – fosfatase alcalina de camarão (do inglês *shrimp alkaline phosphatase*)

SARS – síndrome respiratória aguda grave (do inglês *severe acute respiratory syndrome*)

SDS – dodecil sulfato de sódio (do inglês *sodium dodecyl sulfate*)

SFB – soro fetal bovino

TB – Terrific Broth

TMB – tetrametilbenzidina

tRNAs – RNAs transportadores

UE – unidades de ELISA

UnB – Universidade de Brasília

UV – ultravioleta

VC – volumes de coluna

VLPs – partículas virais destituídas de ácido nucleico (do inglês *virus-like-particles*)

VP1r – proteína VP1 recombinante

v/v – razão volume por volume

X-Gal – 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactosídeo

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Histórico	1
1.2. Classificação do vírus da hepatite A	2
1.3. Morfologia e propriedades físico-químicas	3
1.4. Organização genômica.....	4
1.5. Proteínas	6
1.6. Sorotipo e estrutura antigênica.....	7
1.7. Cultivo celular	8
1.8. Transmissão do vírus da hepatite A	9
1.9. Ciclo replicativo	10
1.10. Aspectos Clínicos	13
1.11. Resposta Imune	14
1.12. Modelo animal	16
1.13. Epidemiologia.....	17
1.14. Diagnóstico.....	20
1.15. Prevenção	21
1.16. Recomendações para a imunização e a situação no Brasil	23
1.17. Tratamento	24
1.18. Expressão heteróloga de proteínas.....	25
1.18.1. Expressão em <i>Escherichia coli</i>	25
1.18.2 Expressão no sistema baculovírus/células de inseto	28
2. Justificativa	31
3. Objetivos	32
3.1. Objetivo Geral	32
3.2. Objetivos específicos	32
4. Material e Métodos	33
4.1. Obtenção da proteína VP1 recombinante (VP1r) a partir do sistema baculovírus/células de inseto	33
4.1.1. Gene sintético <i>VP1</i>	33
4.1.2. Construção do vetor pFastBac™ Dual+VP1	33
4.1.3. Transformação de células bacterianas e análise dos clones obtidos.....	34
4.1.4. Transformação de células DH10Bac™ e purificação do bacmídeo recombinante.....	34

4.1.5. Análise da transposição do gene <i>VP1</i> para o bacmídeo	35
4.1.6. Produção dos baculovírus recombinantes.....	37
4.1.7. Amplificação dos baculovírus recombinantes.....	37
4.1.8. Sequenciamento nucleotídico	37
4.1.9. Titulação dos baculovírus por formação de placas de lise	38
4.1.10. Ensaio de expressão da proteína VP1 recombinante (VP1r) em células Sf9	38
4.1.11. Análise da expressão da proteína VP1 recombinante (VP1r) por <i>SDS-PAGE</i>	39
4.1.12. Análise da expressão da proteína VP1 recombinante (VP1r) por <i>Western blotting</i>	39
4.1.13. Cinética de expressão da proteína VP1 recombinante (VP1r) em células de inseto Sf9	40
4.1.14. Cultivo de células Sf9 em frasco <i>spinner</i>	40
4.1.15. Purificação da proteína VP1 recombinante (VP1r) por cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC)	40
4.1.16. Cinética de distribuição intracelular da proteína VP1 recombinante (VP1r) em células Sf9.....	41
4.1.17. Expressão extracelular da proteína VP1 recombinante (VP1r) através da adição de peptídeo sinal	41
4.2. Obtenção da proteína VP1 recombinante (VP1r) a partir de <i>Escherichia coli</i>	43
4.2.1. Amplificação do gene <i>VP1</i>	43
4.2.2. Construção do vetor pET100/D-TOPO [®] +VP1	44
4.2.3. Indução da expressão da proteína VP1 recombinante (VP1r)	45
4.2.4. Análise da expressão da proteína VP1 recombinante (VP1r)	45
4.2.5. Análise da solubilidade da proteína VP1 recombinante (VP1r).....	45
4.2.6. Purificação da proteína VP1 recombinante (VP1r) por cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC)	46
4.2.7. Produção de soro de camundongo hiperimune anti-VP1	47
4.2.8. Soros de pacientes.....	47
4.2.9. Avaliação da antigenicidade da proteína VP1 recombinante (VP1r) por ensaio imunoenzimático (ELISA) <i>in house</i>	48
4.2.10. Avaliação do desempenho do ensaio imunoenzimático (ELISA) <i>in house</i> para detecção de IgM.....	49

4.3. Obtenção das partículas virais destituídas de ácido nucleico (VLPs) a partir do sistema baculovírus/células de inseto	49
4.3.1. Genes sintéticos <i>P1-2A</i> e <i>P3</i>	49
4.3.2. Construção do vetor pFastBac™ Dual+P12A+P3	50
4.3.3. Análise do bacmídeo e produção do baculovírus-P1-2A+P3	50
4.3.4. Análise da expressão e clivagem da poliproteína P1-2A por <i>Western blotting</i>	52
4.3.5. Avaliação da formação das partículas virais destituídas de ácido nucleico (VLPs) por ensaio imunoenzimático (ELISA)	53
4.3.6. Avaliação da formação de partículas virais destituídas de ácido nucleico (VLPs) por microscopia eletrônica de transmissão (MET)	53
4.3.7. Avaliação da cinética de expressão das partículas virais destituídas de ácido nucleico (VLPs) por ensaio imunoenzimático (ELISA)	54
4.3.8. Purificação das partículas virais destituídas de ácido nucleico (VLPs) por gradiente de sacarose	54
4.3.9. Avaliação da solubilidade das partículas virais destituídas de ácido nucleico (VLPs) e da poliproteína P1-2A.....	55
4.3.10. Otimização das condições de extração das partículas virais destituídas de ácido nucleico (VLPs).....	55
4.3.11. Predição da solubilidade das proteínas do vírus da hepatite A e do poliovírus humano	56
4.4. Caracterização da resposta imune induzida pela proteína VP1 recombinante (VP1r) em modelo murino	56
4.4.1. Imunização e sangria dos camundongos	56
4.4.2. Determinação dos títulos de imunoglobulina G (IgG) anti-VP1	57
4.4.3. Análise das subclasses de imunoglobulina G (IgG) anti-VP1.....	58
4.4.4. Determinação do índice de avidéz (IA) dos anticorpos anti-VP1.....	58
4.4.5. Avaliação da reatividade cruzada entre os anticorpos anti-VP1 e o vírus da hepatite A por ensaio imunoenzimático (ELISA) competitivo	59
4.4.6. Avaliação da reatividade cruzada entre os anticorpos anti-VP1 e o vírus da hepatite A por ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto	59
4.4.7. Imunização dos camundongos seguida por dose subimunogênica de HAVRIX®	60
4.4.8. Análise estatística	60
5. Resultados	61

5.1. Obtenção da proteína VP1 recombinante (VP1r) a partir do sistema baculovírus/células de inseto	61
5.2. Obtenção da proteína VP1 recombinante (VP1r) a partir de <i>Escherichia coli</i>	69
5.3. Obtenção das partículas virais destituídas de ácido nucleico (VLPs) a partir do sistema baculovírus/células de inseto	77
5.4. Caracterização da resposta imune induzida pela proteína VP1 recombinante (VP1r) em camundongos	89
6. Discussão	105
6.1. Obtenção da proteína VP1 recombinante (VP1r) a partir do sistema baculovírus/células de inseto	105
6.2. Obtenção da proteína VP1 recombinante (VP1r) a partir de <i>Escherichia coli</i> ..	107
6.3. Obtenção das partículas virais destituídas de ácido nucleico (VLPs) a partir do sistema baculovírus/células de inseto	108
6.4. Caracterização da resposta imune induzida pela proteína VP1 recombinante (VP1r) em camundongos	113
7. Conclusões	119
8. Referências bibliográficas	120
Anexos	140

1. Introdução

1.1. Histórico

Relatos sobre a ocorrência de icterícia são conhecidos desde as antigas civilizações grega e romana (Zuckerman, 1983). Entretanto, foi somente a partir do século XVII que essa doença passou a ser registrada com maior frequência. Neste período, a doença era comum entre militares e, por isso, foi chamada de icterícia de campanha. Embora a visão predominante fosse a de que todos os tipos de icterícia apresentavam características obstrutivas, alguns médicos já suspeitavam que agentes infecciosos poderiam estar envolvidos, especialmente nas formas mais leves e contagiosas da doença. Estas formas foram chamadas de icterícia catarral epidêmica (Hollinger & Emerson, 2007).

No início do século XX, Cockayne (1912) realizou a primeira descrição de uma epidemia da doença, na ilha de Minorca, Espanha. Ele utilizou o termo hepatite infecciosa para descrever a forma epidêmica da doença e sugeriu que a mesma fosse capaz de atingir o fígado através do sangue. Contudo, considerou erroneamente a transmissão por aerossóis como a principal via de transmissão da doença. Ainda no início do século passado, McDonald (1908) postulou que a atrofia aguda do fígado, observada durante a doença, poderia ser causada por um vírus.

Em seguida, estudos epidemiológicos e experimentos em voluntários, realizados durante e após a Segunda Guerra Mundial, confirmaram que a hepatite infecciosa era transmitida por um vírus (Havens Jr, 1944; MacCallum & Bauer, 1944; MacCallum & Bradley, 1944; Havens Jr, 1947). Além disso, estes estudos permitiram a identificação de outra forma da doença, a qual apresentava modo de transmissão e período de incubação distintos da hepatite infecciosa. Esta doença foi, inicialmente, chamada de hepatite do soro homólogo. Posteriormente, MacCallum (1947) introduziu o termo hepatite A para a hepatite infecciosa e hepatite B para a hepatite do soro homólogo.

Em 1973, o vírus da hepatite A (HAV) foi, finalmente, detectado nas fezes de voluntários infectados, através da técnica de imunomicroscopia eletrônica (Feinstone *et al.*, 1973). A partir deste momento, foi observado um grande avanço na caracterização do vírus e da doença. Nesse contexto, foram desenvolvidos testes

imunoenzimáticos altamente sensíveis para a detecção de antígenos e anticorpos específicos, que contribuíram para o diagnóstico laboratorial da hepatite A. Além disso, o HAV foi isolado e propagado em cultura de células (Provost & Hilleman, 1979), o que representou um importante passo para o posterior desenvolvimento de vacinas anti-HAV e testes sorológicos.

1.2. Classificação do vírus da hepatite A

Inicialmente, o HAV foi provisoriamente classificado como enterovírus tipo 72, devido à grande semelhança biofísica e bioquímica com os enterovírus (Gust *et al.*, 1983). Com o aumento do número de estudos, foram observadas diferenças que distinguiam o HAV dos demais enterovírus, tais como: (i) sequências de nucleotídeos e aminoácidos, (ii) massas moleculares das proteínas, (iii) estabilidade em pH 1, (iv) ausência de reação com anticorpos anti-enterovírus, (v) replicação lenta e sem efeito citopático em cultura celular, (vi) resistência à temperaturas e drogas que inativavam muitos picornavírus e (vii) presença de apenas um único sorotipo (Yousef *et al.*, 1987). Em virtude de tais diferenças, o HAV foi classificado dentro de um novo gênero da família *Picornaviridae*, o gênero *Hepatovirus* (Minor, 1991).

Os primeiros experimentos de sequenciamento utilizando um fragmento de 168 nucleotídeos, presente na região VP1/2A, revelaram variações entre as diferentes cepas do HAV. Dessa forma, sete genótipos (I–VII) foram identificados, utilizando essa curta região do genoma. Recentemente, esses genótipos foram reclassificados em 6 genótipos (I–VI) com base em sequências derivadas da região VP1 completa. Os genótipos I, II e III são ainda subdivididos em tipos A e B, com diferença genética de 7%-7,5% entre os subtipos na região VP1/2A. Recentemente, um novo subtipo C foi proposto no genótipo I. Ressalta-se que os genótipos I-III têm sido associados a infecções em humanos, uma vez que os genótipos IV-VI apresentam origem símia (Vaughan *et al.*, 2014).

1.3. Morfologia e propriedades físico-químicas

O HAV é um vírus não envelopado, com simetria icosaédrica e que apresenta diâmetro de 27 a 32 nm (Figura 1.1). O genoma viral é constituído por uma fita simples de RNA, polaridade positiva (+), que possui aproximadamente 7500 nucleotídeos (Hollinger & Emerson, 2007).

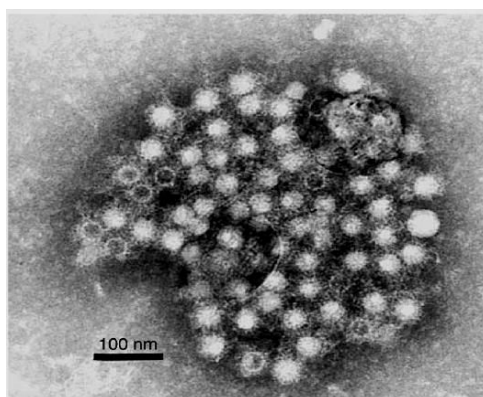


Figura 1.1: Micrografia eletrônica das partículas virais da hepatite A. (Adaptada de Bell *et al.*, 2006).

Os virions do HAV apresentam densidade de 1,32 g/mL a 1,34 g/mL em cloreto de cério e coeficiente de sedimentação de 156 S a 160 S em soluções neutras de sacarose (Siegl *et al.* 1981). Contudo, populações adicionais do vírus, com diferentes características de sedimentação, foram isoladas a partir de fezes e de cultura de células. Partículas sem o RNA viral, com densidade de 1,20 g/mL a 1,31 g/mL e coeficiente de sedimentação de 50 S a 90 S, são abundantes em fezes coletadas durante a fase inicial da infecção ou como uma proporção variável obtida a partir de cultura de células (Lemon *et al.*, 1985). Acredita-se que essas estruturas representem pró-capsídeos (Bishop & Anderson 1993) e partículas prematuras ou defectivas (Hollinger & Emerson, 2007).

O HAV, obtido a partir de cultura de células e não purificado, é capaz de manter sua infectividade quando submetido a pH 1,0 por 2 horas à temperatura ambiente, enquanto que o HAV purificado mantém sua infectividade por mais de 8 horas nestas mesmas condições (Scholz *et al.*, 1989).

Em virtude da natureza não envelopada, o HAV é capaz de resistir ao éter e ao clorofórmio a 20% (v/v) (Provost *et al.*, 1975; Siegl, 1984). Além disso, o HAV é

relativamente resistente ao calor. A integridade do vírus não é afetada quando o mesmo é incubado a 60°C em pH neutro por 1 hora, sendo parcialmente inativado somente após 10 a 12 horas (Parry & Mortimer, 1984).

A infectividade do HAV pode ser preservada por até 1 mês após liofilização e armazenamento à temperatura ambiente, com 42% de umidade, ou por anos quando mantido a -20°C ou temperaturas inferiores (McCaustland *et al.*, 1982). O HAV também resiste por dias ou até meses em águas contaminadas, depósitos marinhos, solos e alimentos (Sobsey *et al.*, 1988).

A utilização de etanol 70% (v/v) é capaz de reduzir a infectividade do HAV, quando aplicado à temperatura ambiente. Além disso, o HAV pode ser inativado por (i) radiação ultravioleta (1,1 W em uma profundidade de 0,9 cm por 1 minuto), (ii) autoclavação (121°C por 20 minutos), (iii) formalina (3% por 5 minutos a 25°C), (iv) β -propiolactona (0,03% por 72 horas a 4°C), (v) iodo (3 mg/L por 5 minutos), (vi) hipoclorito de sódio (30 mg/mL por 15 minutos) e (vii) permanganato de potássio (30 mg/L por 5 minutos) (Provost *et al.*, 1975; Grabow *et al.*, 1983; Coulepsis *et al.*, 1987).

1.4. Organização genômica

Assim como outros picornavírus, o genoma do HAV pode ser dividido em três regiões: (i) uma região 5' não traduzida (NTR), que compreende aproximadamente 10% do genoma (734 a 740 nucleotídeos), (ii) uma única fase aberta de leitura (ORF), que codifica uma poliproteína de 2.225 a 2.227 aminoácidos (aa) (6.675 a 6.681 nucleotídeos) e (iii) uma região 3' NTR, que apresenta cerca de 60 nucleotídeos (Baroudy *et al.*, 1985; Cohen *et al.*, 1987; Hollinger & Emerson, 2007) (Figura 1.2).

A região 5' NTR é a mais conservada do genoma, com identidade nucleotídica acima de 89% entre as cepas dos genótipos I, II e III. Essa região é covalentemente ligada a uma pequena proteína viral (VPg) (Brown *et al.*, 1994) e apresenta estruturas secundárias e terciárias, as quais se organizam em seis domínios (Cohen *et al.*, 1987). Os domínios I e II são importantes para a síntese de RNA, enquanto que os domínios III, IV, V e VI formam o sítio interno de entrada do ribossomo (IRES), o qual direciona a tradução da ORF (Totsuka & Moritsugu, 1999).

A ORF do HAV é traduzida em uma poliproteína precursora, que é dividida em três regiões: P1, que codifica as proteínas estruturais (VP1, VP2, VP3 e VP4), P2 e P3, que codificam as proteínas não estruturais (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C e 3D). Esse precursor é processado por uma cascata de clivagens proteolíticas, dando origem às proteínas virais maduras (Hollinger & Emerson, 2007).

A região 3' NTR possui mais de 20% de heterogeneidade entre as cepas de HAV e possui uma cauda poli-A em sua extremidade. Essa região também possui estruturas secundárias, as quais apresentam papel importante na síntese de RNA viral (Totsuka & Moritsugu, 1999).

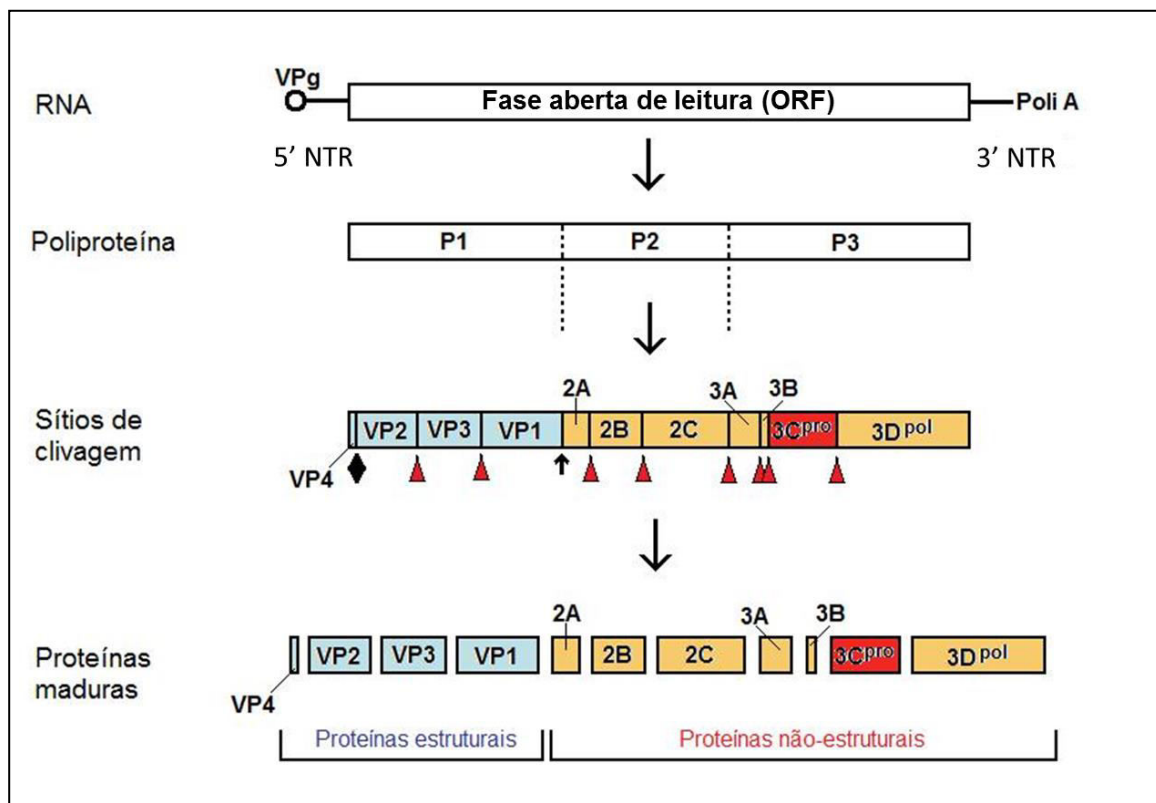


Figura 1.2: Organização do genoma do vírus da hepatite A e processamento da poliproteína precursora. O RNA genômico contém uma única fase aberta de leitura, que codifica uma poliproteína. A poliproteína sofre diversas clivagens, gerando as proteínas estruturais e não estruturais. Os triângulos vermelhos representam os sítios clivados pela protease 3C, enquanto que a seta curta mostra o sítio clivado pela protease celular. No sítio identificado com o losango, ocorre uma clivagem proteolítica desconhecida. (Adaptada de Martin & Lemon, 2006 e Totsuka & Moritsugu, 1999).

1.5. Proteínas

As proteínas estruturais do HAV estão presentes na região P1 do genoma viral, que é dividida em 1A, 1B, 1C e 1D. As regiões 1A e 1B dão origem ao precursor VP0, que sofre clivagem autocatalítica para formar as proteínas VP4 (2,5 kDa) e VP2 (24 kDa). A proteína VP4 não é detectada nas partículas virais maduras (Totsuka & Moritsugu, 1999), mas alguns dados sugerem que ela seja importante para a formação do virion (Probst *et al.*, 1999). A região 1C codifica a proteína VP3, que possui 246 aminoácidos e massa molecular de 28 kDa. Por fim, a região 1D é responsável por codificar a proteína VP1, que é formada por 300 aminoácidos e apresenta massa molecular de aproximadamente 34 kDa (Totsuka & Moritsugu, 1999).

Na região P2, encontram-se as proteínas não estruturais 2A, 2B e 2C. Diferentemente do que ocorre com a maioria dos picornavírus, a proteína 2A do HAV não apresenta atividade proteolítica. Em contrapartida, estudos indicam que essa proteína apresenta papel importante na montagem do capsídeo do HAV (Probst *et al.*, 1999; Cohen *et al.*, 2002; Kusov *et al.*, 2007). A proteína 2B apresenta a propriedade de se associar à membrana intracelular e induzir um rearranjo estrutural, que parece ser importante para a replicação do RNA viral (Gosert *et al.*, 2000). A proteína 2C possui atividade helicase e NTPase (Totsuka & Moritsugu, 1999; Yokosuka 2000).

As proteínas não estruturais 3A, 3B, 3C e 3D se localizam na região P3. A proteína 3A, provavelmente, ajuda no ancoramento do complexo replicativo à membrana celular. A proteína 3B é denominada de VPg e se encontra covalentemente ligada ao RNA do HAV. Essa proteína funciona como um *primer* para a síntese de RNA intermediário de polaridade negativa (-) e de moléculas de RNA polaridade positiva (+) da progênie viral (Weitz *et al.*, 1986; Martin & Lemon, 2006). A proteína 3C é a única protease presente no HAV, atuando na clivagem da poliproteína para gerar as proteínas estruturais e não estruturais (Martin & Lemon, 2006). A proteína 3D atua como RNA polimerase RNA-dependente e apresenta alta identidade aminoacídica com as polimerases de outros picornavírus (Totsuka & Moritsugu, 1999).

1.6. Sorotipo e estrutura antigênica

Embora o HAV apresente heterogeneidade genética, apenas um único sorotipo do vírus é encontrado. Indivíduos infectados pelo HAV em uma parte do mundo estão protegidos contra uma reinfecção pelo HAV de outras partes do mundo. Preparados de imunoglobulinas anti-HAV, independente da sua origem geográfica, fornecem proteção contra a doença. Além disso, vacinas preparadas a partir de isolados da Austrália ou Costa Rica protegem de infecções pelo HAV em todo o mundo (Innis *et al.*, 1994; Nalin *et al.*, 1993).

Proteínas individuais, polipeptídeos ou precursores não clivados do HAV, produzidos pela tecnologia do DNA recombinante, parecem ser pouco efetivos na indução de anticorpos neutralizantes anti-HAV. Por outro lado, partículas virais sem ácido nucleico parecem ser antigenicamente indistinguíveis das partículas infecciosas. Dessa forma, acredita-se que os epítomos de neutralização do HAV sejam dependentes da conformação assumida pelas proteínas estruturais na partícula viral (Stapleton *et al.*, 1993; Khudyakov *et al.*, 1999; Hollinger & Emerson, 2007).

Existem pelo menos três sítios de neutralização descritos na literatura, os quais foram determinados através de mutantes de escape de neutralização. Um desses sítios é composto por um *cluster* de resíduos de aminoácidos presentes nas proteínas VP3 (resíduos 70 e 74) e VP1 (resíduos 102, 171 e 176). O segundo sítio é formado apenas pelo resíduo 221 da VP1 (Ping & Lemon, 1992), enquanto que a localização do terceiro sítio permanece indeterminada (Lemon & Robertson, 1993).

Apesar dos epítomos de neutralização dependerem da conformação presente na partícula viral, estudos demonstraram que a imunização com proteínas estruturais do HAV foi capaz de induzir anticorpos neutralizantes em coelhos, após a administração de uma dose subimunogênica do HAV (Johnston *et al.*, 1988; Gauss-Müller *et al.* 1990; Powdrill & Johnston; 1991). Além disso, Karayiannis e colaboradores (1991) demonstraram que a imunização com vírus vaccinia recombinante, contendo a região codificante para a poliproteína P1, foi capaz de proteger macacos após o desafio com uma cepa virulenta do HAV, mesmo na ausência de evidências de clivagem da poliproteína e montagem de capsídeos vazios.

1.7. Cultivo celular

Células humanas, de origem hepatocitária ou não, assim como células de primatas não humanos são capazes de permitir o crescimento do HAV. As células de rim de macaco verde africano (AGMK) e as células de fibroblasto de pulmão humano (MRC-5) são utilizadas principalmente para a produção de vacinas. Para os estudos de replicação viral, as linhagens mais frequentemente utilizadas são àquelas derivadas da AGMK (BS-C-1, VERO e BGMK), células de rim fetal de macaco Rhesus (FRhK-4 e FRhK-6) e células de hepatoma humano (PLC/PRF/5) (Daemer *et al.*, 1981; Siegl *et al.*, 1984; Binn *et al.*, 1986).

O HAV apresenta características de crescimento que o diferencia dos demais vírus da família *Picornaviridae*. Cepas isoladas de espécimes clínicos apresentam um ciclo lento de replicação, sem causar efeito citopático e nem interferência na síntese de proteínas da célula. Após várias passagens, o vírus pode se adaptar à célula, causando uma infecção persistente. Essa condição difere da infecção *in vivo*, na qual não é observada persistência (Gauss-Müller & Deinhardt, 1984; Vallbracht *et al.*, 1984; Lemon *et al.*, 1991).

Mecanismos vêm sendo propostos para explicar a baixa taxa de replicação do HAV em cultura de células. Um dos mecanismos estaria relacionado ao sítio interno de entrada do ribossomo (IRES) do HAV. Esse elemento possui baixa eficiência em direcionar a tradução da poliproteína viral quando comparado ao IRES dos demais picornavírus (Whetter *et al.*, 1994). Um segundo mecanismo estaria relacionado à incapacidade do vírus em inibir a síntese proteica celular. Enquanto que o HAV codifica apenas uma única protease (3C), outros picornavírus apresentam uma protease adicional, que é capaz de clivar o fator de iniciação da tradução (eIF) 4G. Essa clivagem favorece a tradução IRES-dependente (viral) e inibe a tradução *cap*-dependente, utilizada pela célula. Além de não clivar o eIF4G, o HAV ainda o utiliza no seu complexo de iniciação da tradução (Borman *et al.*, 1997; Pintó *et al.*, 2007). Outro mecanismo que merece destaque está relacionado ao *codon usage*. O HAV se adaptou na utilização de códons raros em relação àqueles utilizados pela maquinaria celular. O *codon usage* do HAV é sempre complementar ao da célula hospedeira, nunca adotando como códons abundantes aqueles que também são abundantes na célula. Essa característica do HAV pode ser interpretada como um mecanismo para evitar a competição pelos RNAs transportadores (tRNAs) da célula

hospedeira, uma vez que esse vírus não apresenta um mecanismo de inibição da síntese de proteínas celulares (Sánchez *et al.*, 2003; Pintó *et al.*, 2007).

1.8. Transmissão do vírus da hepatite A

A forma mais comum de transmissão da hepatite A acontece pela via fecal-oral, através da ingestão de alimentos e água contaminada ou através do contato pessoa-pessoa (Morais *et al.*, 2006). Em ocasiões raras, o vírus pode ser transmitido por transfusão de sangue ou hemoderivados originados de doadores infectados, durante o período de viremia (Kreuz *et al.*, 1993; Soucie *et al.*, 1998; Pereira & Gonçalves, 2003). A transmissão entre usuários de drogas também pode ocorrer (Broman *et al.*, 2010).

Além disso, a transmissão do HAV pode acontecer por contato sexual. Alguns estudos têm mostrado altos níveis de prevalência de hepatite A em homens que fazem sexo com homens (HSH). Contudo, esse perfil estaria mais relacionado com o contato oral-anal do que com a orientação sexual (Ballesteros *et al.*, 1996; Pereira & Gonçalves, 2003).

O HAV pode ser detectado na saliva de pacientes com hepatite A (Mackiewicz *et al.*, 2004; Amado *et al.*, 2008), mas ainda não existem dados epidemiológicos sugerindo que a saliva seja uma fonte de transmissão (Nainan *et al.*, 2006). Entretanto, é importante destacar que Amado e colaboradores (2010a) demonstraram a ocorrência de replicação extra-hepática do HAV nas glândulas salivares de macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) infectados experimentalmente. Diante disso, estudos adicionais são necessários para avaliar o potencial infeccioso de amostras de saliva na transmissão do HAV.

1.9. Ciclo replicativo

Após a ingestão, o HAV é transportado através do epitélio intestinal por um mecanismo ainda pouco conhecido. Em seguida, as partículas virais são transportadas para o fígado, através das veias mesentéricas, onde infectam os hepatócitos (Kemer & Miskovsky, 2000). O ciclo de replicação se inicia com a adsorção do HAV aos hepatócitos, através da interação com um receptor da célula hospedeira. Embora ainda não exista consenso em relação à identidade desse receptor, estudos em cultura de células apontam para uma glicoproteína da classe I (Silberstein *et al.*, 2009).

A penetração do vírus, provavelmente, acontece pelo mecanismo de endocitose. Ao atingir o citoplasma, o genoma do HAV é liberado e começa a atuar como RNA mensageiro (RNAm), sendo traduzido em uma única poliproteína precursora (Palmenberg, 1990). Essa tradução é mediada pelo IRES, situado na região 5' NTR, através de um processo *cap*-independente. O processamento da poliproteína ocorre simultaneamente ao processo de tradução e acontece através de uma série de clivagens proteolíticas mediadas por 3C para gerar as proteínas individuais maduras (Hollinger & Emerson, 2007). As proteínas não estruturais e estruturais permitem a continuidade do ciclo replicativo, através da produção de novas moléculas de RNA genômico e montagem do capsídeo viral (Figura 1.3) (Martin & Lemon, 2006).

Para gerar novas moléculas de RNA viral, as proteínas não estruturais se organizam em um complexo de replicação. Esse complexo se liga a região 3' NTR do RNA genômico e inicia a síntese de uma cópia de RNA (-). Em seguida, essa cópia é utilizada como molde para a síntese de novas cópias do RNA genômico (+). Algumas cópias recém-sintetizadas de RNA genômico são utilizadas para a síntese de RNA (-) ou tradução, enquanto que as demais são empacotadas em novas partículas virais, formadas pela montagem das proteínas estruturais (Figura 1.3) (Martin & Lemon, 2006).

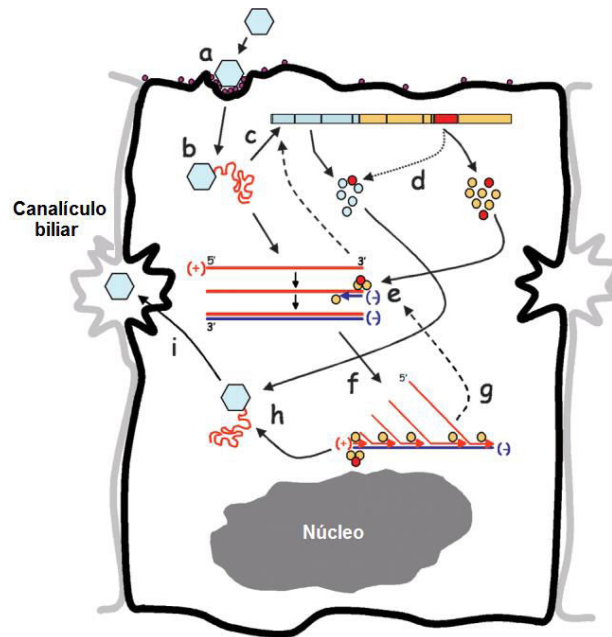


Figura 1.3: Representação esquemática do ciclo replicativo do vírus da hepatite A. (a) Adsorção e penetração; (b) Liberação do RNA genômico no citoplasma; (c) O sítio interno de entrada do ribossomo direciona a tradução da poliproteína precursora; (d) A poliproteína sofre clivagens enzimáticas mediadas pela protease 3C; (e) Proteínas não estruturais formam o complexo de replicação, que inicia a síntese de fitas de RNA com polaridade negativa (-); (f) A fita de RNA (-) é usada como molde para a síntese de novas cópias de RNA genômico (+); (g) Algumas fitas de RNA (+) recém-sintetizadas são usadas para síntese de RNA (-) ou tradução (linhas pontilhadas); (h) outras fitas de RNA (+) são empacotadas na partícula viral; (i) As partículas virais são secretadas através da membrana apical do hepatócito nos canalículos biliares. (Adaptada de Martin & Lemon, 2006).

A formação do capsídeo começa com a clivagem na junção 2A/2B, produzindo o precursor P1-2A. Esse polipeptídeo se agrupa em pentâmeros 13 S, provavelmente, devido a um processo de sinalização mediado pela proteína 2A (Probst *et al.*, 1999). Em seguida, a protease 3C catalisa outras clivagens, as quais produzem os pentâmeros 14 S (5 x [VP0, VP3 e VP1-2A]) (Borovec & Anderson, 1993). Doze pentâmeros 14 S se agrupam para formar os procapsídeos, em uma etapa que parece depender da proteína VP4 (Figura 1.4) (Probst *et al.*, 1999). No estágio final da formação do capsídeo, ocorre a clivagem da VP0 e da VP1-2A, provavelmente, através de um processo autocatalítico e por proteases celulares, respectivamente (Hollinger & Emerson, 2007). Após a formação das partículas virais, as mesmas são secretadas através da membrana apical do hepatócito nos canalículos biliares e, assim, alcançam a bile e o intestino (Figura 1.3) (Martin & Lemon, 2006).

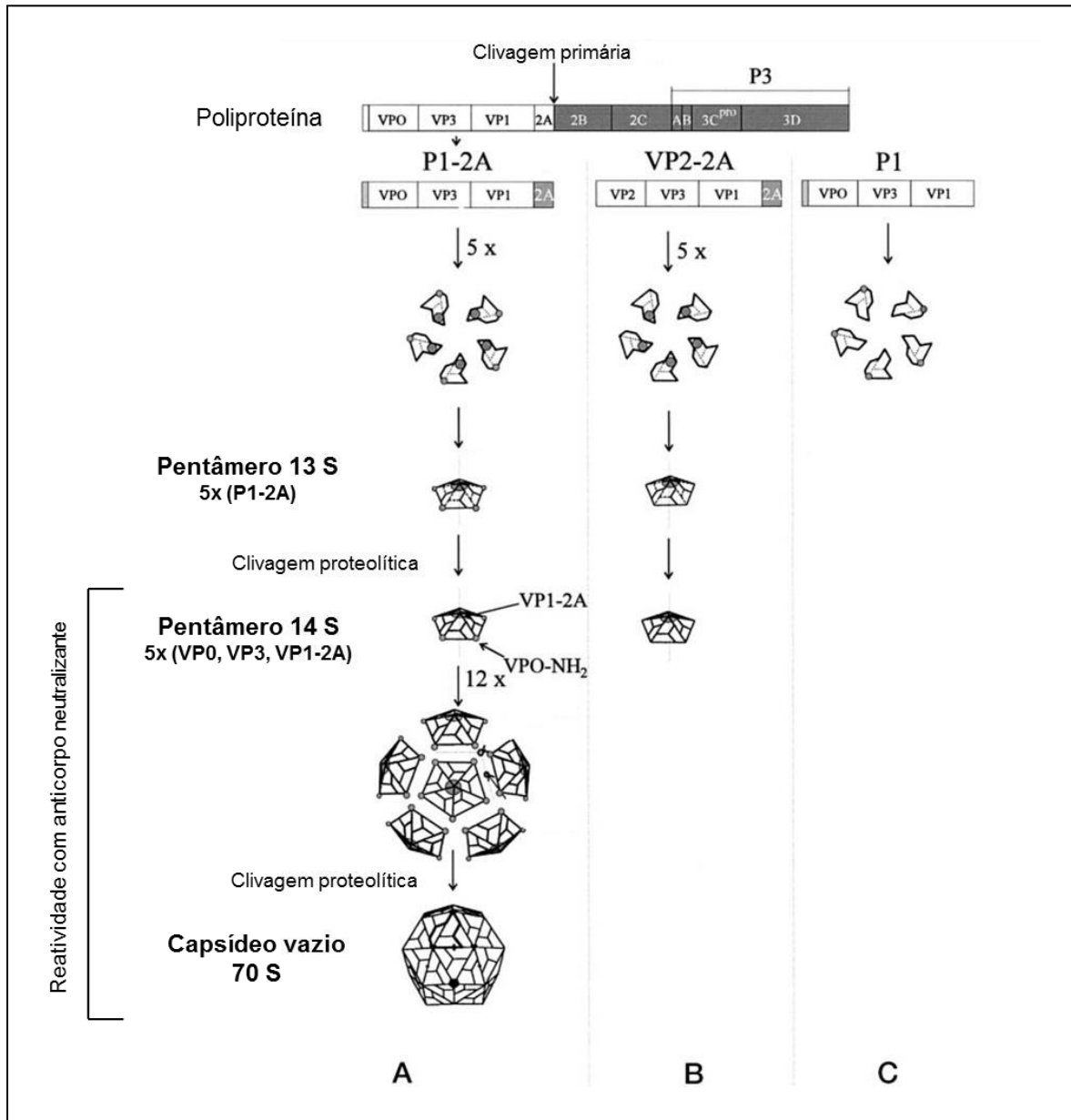


Figura 1.4: Modelo mostrando a montagem do capsídeo do vírus da hepatite A. (A) Após as clivagens realizadas por 3C, cinco moléculas de P1-2A se montam em pentâmeros 13 S. Após novas clivagens, os pentâmeros 14 S são formados. Doze pentâmeros 14 S podem se agregar para formar os capsídeos vazios. O RNA viral recém-sintetizado pode ser empacotado pelos pentâmeros 14 S (não mostrado). Os pentâmeros 14 S e os capsídeos são reconhecidos pelo anticorpo neutralizante K2-4F2. (B) Na ausência de VP4, os pentâmeros 14 S não se montam em capsídeos. (C) Na falta do sinal fornecido por 2A, o precursor P1 não se monta em pentâmeros 13 S. (Adaptada de Probst et al., 1999).

1.10. Aspectos Clínicos

A hepatite A apresenta um aspecto clínico muito variado, podendo se apresentar como infecção assintomática, hepatite anictérica, hepatite icterica e hepatite fulminante (Hollinger & Emerson, 2007). A probabilidade de doença clinicamente aparente aumenta com a idade do indivíduo. Em crianças com idade inferior a 6 anos, a maioria das infecções (70%) é assintomática, sendo que nos casos em que ocorrem manifestações clínicas da doença, geralmente, não é observada icterícia (Hadler *et al.*, 1980). Entre adolescentes e adultos, as infecções são geralmente sintomáticas, com icterícia ocorrendo em 70% dos casos (Lednar *et al.*, 1985).

O curso da hepatite A pode ser dividido em quatro fases: (i) incubação, (ii) prodrômica ou pré-icterícia, (iii) icterica e (iv) convalescência. No período de incubação, que pode variar entre 15 e 50 dias, não há presença de sintomas, porém ocorre grande eliminação de vírus nas fezes (Hollinger & Emerson, 2007). A fase prodrômica é caracterizada pelo aparecimento de sintomas inespecíficos, com duração de 2 a 15 dias. As manifestações clínicas são indistinguíveis de outras viroses e, geralmente, incluem febre, mal-estar, anorexia, náuseas e desconforto abdominal (WHO, 2000a; Nainan *et al.*, 2006). O início da fase icterica é precedido por relatos de colúria, seguido de acolia fecal e icterícia (Zuckerman, 1965). A duração dessa fase é variável, sendo mais frequente e longa em adultos. Observa-se um aumento dos níveis das enzimas hepáticas (Figura 1.5) assim como do nível de bilirrubina no soro. Por fim, surge a fase de convalescência, na qual a resolução da doença é lenta, mas a recuperação do paciente é completa na grande maioria dos casos (Koff, 1992; Hollinger & Emerson, 2007).

A hepatite fulminante é uma complicação da infecção pelo HAV, que ocorre em menos de 1% dos casos. A hepatite fulminante é caracterizada pelo aparecimento de febre alta, vômito, icterícia, encefalopatia e lesões mais graves no fígado, que podem levar a morte. A presença de complicações como infecções por bactérias e fungos, insuficiência pulmonar e complicações eletrolíticas pioram o prognóstico. Entre as opções de tratamento disponíveis, o transplante de fígado é o mais indicado, com uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 64% (O'Grady *et al.*, 1993; Ciocca, 2000).

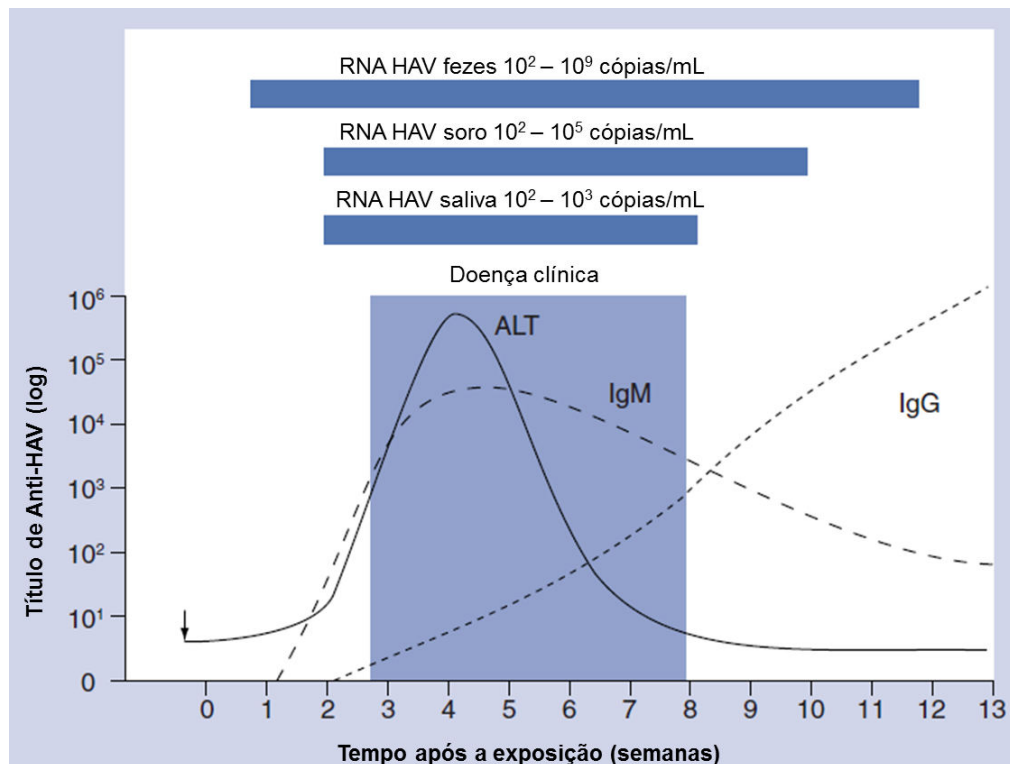


Figura 1.5: Curso natural da infecção pelo vírus da hepatite A. Marcadores bioquímicos (ALT, alanina aminotransferase) e sinais clínicos da doença são correlacionados com a detecção do vírus da hepatite A (HAV) por PCR quantitativo nas fezes, soro e saliva. A resposta de IgM e IgG anti-HAV é mensurada por ensaio imunoenzimático com amostras de soro. As barras indicam por quanto tempo é possível detectar o RNA do HAV por PCR quantitativo. Os anticorpos IgM anti-HAV atingem o pico durante a fase sintomática e declinam dentro de 3 a 6 meses após a doença. Os títulos de IgG anti-HAV permanecem detectáveis. (adaptada de de Paula, 2012).

1.11. Resposta Imune

A infecção pelo HAV é capaz de induzir tanto a resposta imune humoral quanto a resposta celular, sendo ambas as respostas importantes nos mecanismos de defesa e patogênese (Pereira & Gonçalves, 2007).

Anticorpos das classes imunoglobulina (Ig) M e IgA, direcionados contra epítopos do HAV, são induzidos e detectados no início das manifestações clínicas (Berelowitz *et al.*, 1995). Na maioria dos casos, a resposta de IgM anti-HAV é intensa na fase inicial da infecção e, por isso, pode ser utilizada como marcador de doença aguda (Figura 1.5). O papel de anticorpos da classe IgA na infecção pelo HAV ainda é incerto. Teoricamente, se os anticorpos IgA fossem transportados para o trato intestinal, a circulação entero-hepática das partículas virais poderia ser

interrompida por neutralização do vírus. Contudo, nos casos de hepatite A natural ou experimental, os anticorpos neutralizantes são raramente encontrados nas fezes (Stapleton *et al.*, 1991).

A resposta de IgG anti-HAV surge depois do aparecimento dos anticorpos IgM (Figura 1.5), mas é de longa duração e fornece resistência à reinfecção. Em uma tribo isolada de ameríndios, o anticorpo anti-HAV estava presente em todos os indivíduos com idade superior a 50 anos, mas não foi detectado nos mais jovens (Black & Jacobson, 1986). Essa observação sugere que os membros da tribo não foram expostos ao HAV por 50 anos e que o anticorpo IgG anti-HAV persistiu durante esse período, sem a necessidade de uma exposição adicional (Cuthbert, 2001).

Claramente, a resposta de anticorpos anti-HAV previne as infecções secundárias e pode limitar a disseminação viral durante a infecção. Contudo, esses anticorpos parecem não desempenhar papel importante na eliminação do vírus dos hepatócitos infectados (Gabriel *et al.*, 1986). Por outro lado, linfócitos T CD8+ apresentam papel importante tanto na eliminação do vírus quanto na indução de lesões no fígado (Vallbracht *et al.*, 1989; Fleischer *et al.*, 1990).

Múltiplos epítomos de células T podem ser identificados nas proteínas VP1, VP2, VP3, 2B, 2C e 3D (Schulte *et al.*, 2011). Essa quantidade de epítomos de células T combinada com o efeito inibidor do HAV sobre as células T reguladoras de linfócitos TCD8+ parece resultar em uma forte ativação desses linfócitos citotóxicos (Dotzauer & Kraemer, 2012; Manangeeswaran *et al.*, 2012). Durante a atividade dos linfócitos T CD8+ citotóxicos, ocorre produção de IFN- γ , que pode estimular a expressão dos antígenos leucocitários humanos (HLA) da classe I nos hepatócitos. Assim, ocorre aumento da apresentação de antígenos normalmente pouco expressos nas células do fígado, resultando na destruição das células infectadas pelo HAV (Fleischer *et al.*, 1990; Maier *et al.*, 1988).

O vírus inativado, utilizado como vacina, também é capaz de ativar linfócitos T CD4+ e CD8+, conforme indicado pela resposta blastogênica observada *in vitro*, após estimulação com o vírus. Além disso, a vacina também é capaz de induzir a produção de IFN- γ nas células mononucleares do sangue periférico, quando ensaios *in vitro* são realizados. Estas observações demonstram que além da produção de anticorpos neutralizantes, a vacina também é capaz de induzir resposta celular, a qual apresenta importância na eliminação das células infectadas pelo HAV (Pereira & Gonçalves, 2003).

1.12. Modelo animal

Apesar das tentativas de transmitir o HAV para uma variedade de animais de laboratório, a transmissão só tem sido bem sucedida em primatas não humanos. Diversas espécies são susceptíveis à infecção, tais como: chimpanzés (*Pan troglodytes*) (Cohen *et al.*, 1989), macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) (Lapin & Shevtsova, 1990), macaco de rabo curto (*Macaca speciosa*) (Mao *et al.*, 1981) e diversas espécies do novo mundo como saguis da América do Sul, mais notadamente *Saguinus mystax*, *S. labiatus* e *Callithrix jacchus* (Baptista *et al.*, 1993; Vitral *et al.*, 1995; Vitral *et al.*, 1998a).

A hepatite A em primatas não humanos se assemelha à doença observada em humanos, mas ocorre, geralmente, de forma mais branda ou subclínica, seguida por recuperação completa. Após a infecção pela via intragástrica ou intravenosa, o HAV é primeiramente detectado nos hepatócitos, e, em seguida, no soro, na bile e nas fezes. Esses eventos precedem as lesões no fígado, as quais aparecem concomitantemente com a soroconversão (Vital *et al.*, 1998a).

Algumas espécies de primatas susceptíveis à infecção natural pelo HAV, como *Macaca fascicularis* e *Macaca arctoides*, não desenvolvem a doença quando inoculados com algumas cepas humanas (Hollinger & Emerson, 2007). Entretanto, Amado e colaboradores (2010a) obtiveram sucesso em demonstrar a infecção experimental de *Macaca fascicularis* com a cepa humana HAF-203, indicando que essa espécie pode ser um modelo útil para estudar a patogênese do HAV e avaliar protótipos vacinais.

Estudos visando ao estabelecimento de cobaias como modelo alternativo para o estudo da hepatite A foram reportados, mas com resultados controversos. No estudo realizado por Hornei e colaboradores (2001), cobaias (*Cavia porcellus*) inoculados com variantes da cepa HM-175 apresentaram infecção sub-clínica, com eliminação do vírus nas fezes e presença de RNA viral no soro por até 52 dias após a infecção. Em contrapartida, Araujo e colaboradores (2010) não observaram RNA viral nas fezes nem no fígado de cobaias infectados com a cepa HAF-203, sugerindo ausência de infecção.

Embora camundongos (*Mus musculus*) não sejam infectados pelo HAV, estudos relatam a utilização desses animais na avaliação da imunogenicidade do HAV inativado (Provost *et al.*, 1986; Flehmig *et al.*, 1987). O estudo conduzido por Elbert

e colaboradores (1992) demonstrou que camundongos, da linhagem BALB/c, foram capazes de produzir níveis mais elevados de anticorpos anti-HAV do que ratos e cobaias, quando estes foram imunizados com a vacina inativada (Elbert *et al.*, 1992).

1.13. Epidemiologia

A hepatite A representa a causa mais comum de hepatite viral aguda no mundo (Vital *et al.*, 2006). Cerca de 1,5 milhão de casos são reportados anualmente, segundo a Organização Mundial de Saúde. Contudo, dados de soroprevalência indicam que cerca de 10 milhões de novos casos podem ocorrer a cada ano (Wasley *et al.* 2006). A taxa de mortalidade aumenta com a idade, podendo variar de 0,3% em indivíduos com menos de 30 anos até 1,7% naqueles com mais de 49 anos de idade (Hollinger & Emerson, 2007).

Fatores como baixos níveis educacionais, socioeconômicos e sanitários estão associados à prevalência elevada da infecção pelo HAV. Por outro lado, a melhoria desses fatores contribui para o controle da infecção, redução da prevalência e modificação do quadro epidemiológico, deslocando a infecção da infância para a vida adulta (Duval *et al.*, 2005; Jacobsen & Koopman, 2005).

Atualmente, existem quatro padrões de endemicidade baseados na prevalência por idade: (i) alta, (ii) intermediária, (iii) baixa e (iv) muito baixa (Figura 1.6). Em áreas de alta endemicidade, o HAV é transmitido principalmente pelo contato pessoa-pessoa. Embora 90% das crianças se tornem infectadas até os 10 anos de idade, a hepatite A não representa um problema clínico e os surtos são incomuns. Esse perfil epidemiológico é típico da África e Oriente médio, mas também é observado em algumas nações da América Latina e Ásia (Vital *et al.*, 2006). Nas áreas de endemicidade intermediária, a incidência da infecção pelo HAV é alta e ocorre frequentemente em crianças mais velhas, adolescentes e adultos jovens. Nessas áreas, os surtos são comuns, com a transmissão acontecendo pelo contato pessoa-pessoa ou através da ingestão de água e alimentos contaminados com o vírus. Esse perfil de transmissão tem sido observado em áreas anteriormente classificadas como de alta endemicidade (regiões da América Latina, Ásia e Oriente Médio), mas que vêm apresentando declínio nas taxas médias de prevalência nos últimos anos (Tanaka, 2000; Kang *et al.*, 2004). Em países desenvolvidos, a

endemicidade é baixa e as taxas de infecção são mais altas entre adultos jovens (Pham *et al.*, 2005). O vírus é transmitido principalmente através do consumo de água e alimentos contaminados, embora alguns casos de transmissão pessoa-pessoa também possam ocorrer. Nessas áreas, os surtos também são considerados comuns (Vilar *et al.*, 2006). Por fim, em áreas de muito baixa endemicidade, a taxa da doença é muito baixa e a infecção ocorre na vida adulta. Os casos de infecção são esporádicos e os indivíduos são, geralmente, contaminados durante viagens a regiões endêmicas. Esse perfil pode ser visto na Escandinávia, uma das regiões com as menores taxas de soroprevalência para o HAV (CDC, 1999).

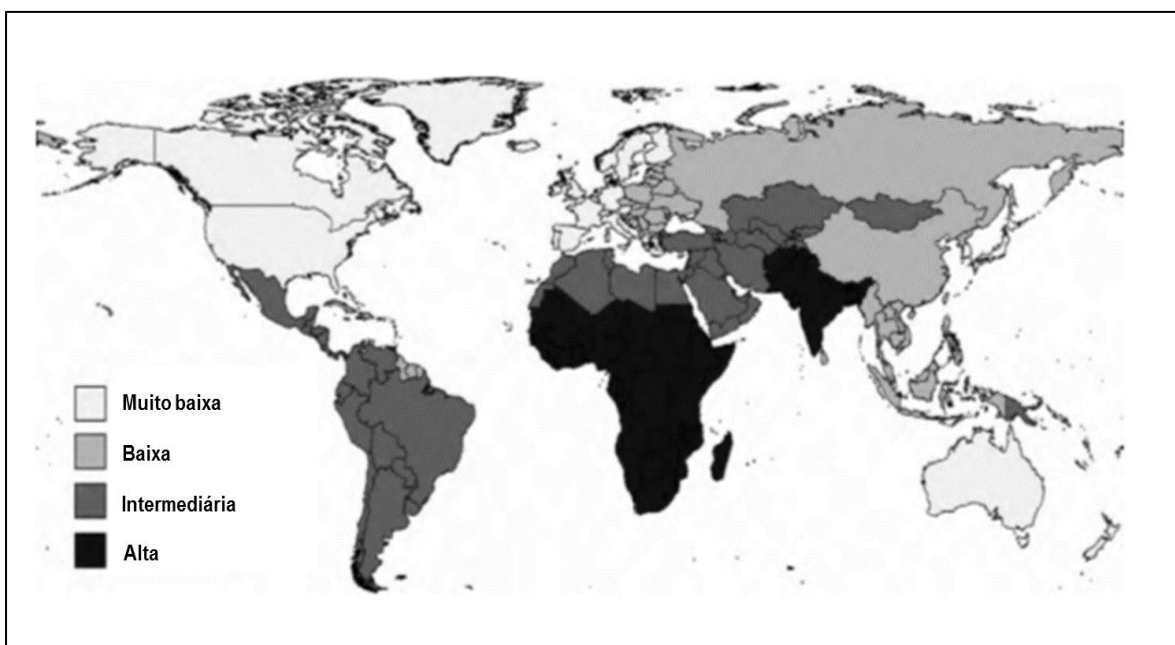


Figura 1.6: Prevalência estimada da hepatite A em 2005. (Adaptada de Jacobsen & Wiersma, 2010).

Estudos recentes têm demonstrado que a prevalência de anticorpos anti-HAV está diminuindo em diversos países da América do Sul. Além disso, é possível observar a ocorrência de mudanças nos padrões de endemicidade desses países, passando de alta endemicidade para endemicidade intermediária (Tapia-Conyer *et al.*, 1999; Tanaka 2000). Resultados de estudos de soroprevalência, conduzidos em diferentes regiões do Brasil, mostram que a exposição ao HAV nas fases iniciais da vida é maior nas regiões Norte e Nordeste do que nas cidades do Sul e Sudeste,

especialmente quando crianças com idade inferior a 10 anos são consideradas (Clemens *et al.*, 2000). Menores taxas de prevalência anti-HAV foram vistas nas regiões Sudeste e Sul (25% e 42%, respectivamente), quando comparadas com as regiões Nordeste e Norte (67% e 95%, respectivamente). Essas taxas podem ser claramente correlacionadas com as condições sanitárias de cada região (Vital *et al.* 2008).

Mudanças na prevalência de anti-HAV foram observados em grupos populacionais com baixos e altos níveis socioeconômicos, que vivem em regiões metropolitanas brasileiras. Esse perfil foi visto em dois estudos com amostras coletadas a partir de dois grupos populacionais que apresentavam níveis socioeconômicos distintos, na cidade do Rio de Janeiro. No primeiro estudo, as amostras foram coletadas em 1978 e novamente em 1995, a partir de indivíduos com idade entre 0 e 23 anos, que possuíam baixo nível socioeconômico (Vital *et al.*, 1998b). Embora a renda média da população tenha se mantido estável neste período, melhorias nas condições sanitárias tornaram-se disponíveis, o que pode ter contribuído para a diminuição da taxa de prevalência de anticorpos anti-HAV, que caiu de 98% para 19% entre as crianças com idade inferior a 6 anos (Vital *et al.* 2008). Em um segundo estudo, realizado com amostras coletadas em 1986 e 2007, a prevalência de anticorpos anti-HAV foi investigada entre estudantes da área da saúde, que possuíam níveis socioeconômicos altos e intermediários. Nesse estudo, foi observada uma redução acentuada na prevalência de anticorpos anti-HAV, que caiu de 54% para 9% (Oliveira *et al.*, 1991; Vital *et al.*, 1998c; Vital *et al.*, 2008).

A análise da evolução das taxas de mortalidade por hepatite A, ao longo das duas últimas duas décadas no Brasil, mostrou declínio progressivo em todas as regiões do país (Vital *et al.* 2006). As taxas declinaram continuamente de 0,2 casos por 100.000 habitantes (0,2/100.000) em 1980 para 0,02/100.000 em 2002. Durante esse período, a taxa de mortalidade no Norte do país foi 3 a 4 vezes maior do que a média nacional. Contudo, as taxas nessa região também seguiram tendência de queda. Esses dados sugerem um declínio progressivo na incidência de casos fatais relacionados à infecção pelo HAV no Brasil (Vital *et al.*, 2008).

1.14. Diagnóstico

As manifestações clínicas observadas durante o curso da hepatite A, quando analisadas de forma isolada, não são suficientes para distingui-la de outras hepatites virais. As provas bioquímicas de função hepática, que incluem dosagens de bilirrubina sérica total, fosfatase alcalina, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), são indicativas de dano no parênquima hepático e caracterizam hepatite, mas não são provas específicas de infecção pelo HAV (Ishak, 1976). Nesse contexto, os testes sorológicos apresentam-se como ferramentas importantes para o diagnóstico da hepatite A.

A pesquisa de anticorpos anti-HAV, da classe IgM, utilizando testes imunoenzimáticos de captura em fase sólida, é amplamente utilizada para o diagnóstico da hepatite A (Pereira & Gonçalves, 2003). Na maioria das pessoas, os anticorpos IgM anti-HAV tornam-se detectáveis 5 a 10 dias antes do início dos sintomas e podem persistir por até 6 meses após a infecção (Figura 1.5) (CDC, 2006). Ressalta-se que os testes comerciais são ajustados de forma que a pequena concentração de IgM, encontrada quatro a seis meses após o início da infecção, não seja capaz de produzir resultado positivo no teste (Stapleton, 1995).

Infecções prévias e resolvidas podem ser diagnosticadas pela detecção de anticorpos IgG anti-HAV. Esses anticorpos são detectados após o aparecimento da IgM anti-HAV (Figura 1.5), permanecendo detectáveis por vários anos e conferindo proteção duradoura contra a reinfecção. Embora existam testes para a detecção de IgG anti-HAV, a maioria dos testes comerciais detectam anticorpos totais anti-HAV (IgM e IgG). Dessa forma, a diferenciação entre infecção passada e atual pode ser feita pela presença de anticorpos totais anti-HAV e a ausência de IgM anti-HAV (Nainan *et al.*, 2006).

A utilização de ensaios imunoenzimáticos para a detecção de anticorpos presentes na saliva poderia facilitar a identificação de indivíduos infectados e susceptíveis ao HAV, devido à simplicidade para a coleta da amostra. Entretanto, a detecção da imunidade induzida pelo HAV em fluidos orais requer ensaios extremamente sensíveis, e a maioria dos ensaios imunoenzimáticos desenvolvidos para a detecção de anticorpos no soro carece de sensibilidade para esse propósito (de Paula, 2012). Nesse contexto, a utilização de técnicas moleculares para a

detecção do RNA viral a partir da saliva tem mostrado resultados promissores (Mackiewicz *et al.*, 2004; Amado *et al.*, 2008; Amado *et al.*, 2011).

A amplificação do RNA viral por nested-PCR é, atualmente, o método mais sensível para a detecção do HAV em diferentes tipos de amostras (soro, plasma, saliva, suspensão fecal e amostras ambientais). Estudos mostram que a detecção do RNA do HAV apresenta papel importante no diagnóstico inicial da infecção, especialmente, no período de janela imunológica durante surtos e em casos de hepatite com etiologia desconhecida. Entretanto, o diagnóstico molecular da hepatite A não é utilizado em laboratórios de análises clínicas e em bancos de sangue, ao contrário do que já acontece para HIV e HBV (de Paula, 2012).

A técnica de PCR quantitativo é utilizada para a detecção e quantificação do HAV. A rapidez e a alta sensibilidade dessa técnica permitem a análise de amostras em larga escala, o que pode ser particularmente importante em situações de surto. Atualmente, essa técnica vem sendo amplamente utilizada para a detecção do HAV em diversos tipos de águas ambientais e em alimentos como ostras, mexilhões e mariscos, constituindo uma importante ferramenta para investigação das fontes de contaminação e disseminação do vírus (Amado, 2010b).

1.15. Prevenção

As medidas de prevenção à hepatite A devem considerar a imunobiologia da doença e as principais vias de transmissão. As medidas de controle devem prevenir a contaminação fecal das mãos, alimentos e água por indivíduos infectados, antes do aparecimento dos sintomas. Além disso, a infecção pelo HAV pode ser prevenida e controlada pelo uso da Ig humana anti-HAV e de vacinas apropriadas (Hollinger & Emerson, 2007).

A prevenção das manifestações clínicas da hepatite A, através da administração de Ig humana anti-HAV, pela via intramuscular, foi documentada, inicialmente, por Stokes Jr e Neefe (1945), durante um surto ocorrido em um acampamento de verão. A utilização dessa abordagem possibilitou a redução das manifestações clínicas da hepatite A em 87% dos indivíduos que receberam a terapia. Estudos similares foram realizados com militares e crianças (Gellis *et al.*, 1945; Havens Jr & Paul, 1945). Em ambos os casos, a terapia com Ig anti-HAV foi capaz de prevenir a hepatite A anictérica ou ictérica em 80% a 90% dos participantes (Hollinger & Emerson, 2007).

Atualmente, os lotes de Ig humana anti-HAV são preparações estéreis de anticorpos concentrados, com testes negativos para HBsAg, HIV e HCV (Hollinger & Emerson, 2007). A Ig pode ser administrada na pré-exposição ao HAV, conferindo imunidade de 3 a 5 meses, dependendo da dose administrada. Na utilização pós-exposição, a Ig confere proteção em 69% a 89% dos casos, quando administrada até duas semanas após o contato com o vírus (Cuthbert, 2001).

Até o início dos anos 1990, a imunização passiva com Ig humana representava a única opção disponível para prevenir a infecção pelo HAV. Entretanto, o potencial para a obtenção de imunidade em longo prazo tornou-se realidade com o desenvolvimento de vacinas contra o HAV (Hollinger & Emerson, 2007).

A primeira vacina inativada contra o HAV (Havrix[®], GlaxoSmithKline) tornou-se disponível na Europa em 1991 e foi aprovada nos Estados Unidos em 1995. A segunda vacina inativada foi licenciada em 1996 (Vaqta[®], Merck Sharp & Dohme). Ambas as vacinas utilizam como base cepas atenuadas do HAV em cultura de células. A Havrix[®] utiliza a cepa HM-175, enquanto que a Vaqta[®] utiliza a cepa CR326F (Cuthbert, 2001). Os vírus atenuados são purificados, inativados com formalina e adsorvidos no adjuvante hidróxido de alumínio.

As vacinas Havrix[®] e Vaqta[®] são altamente imunogênicas e possuem grande eficácia, induzindo soroconversão em 90% a 98% dos indivíduos, após uma dose e, em 100%, após duas doses. Os níveis de anticorpos protetores persistem por no mínimo seis anos em adultos. Além disso, modelos matemáticos de cinética de decréscimo de anticorpos indicam que estes anticorpos protetores podem persistir por até 20 anos. Efeitos adversos importantes, após a aplicação da vacina, não têm sido descritos. As vacinas são aplicadas em duas doses com intervalo de seis meses (Innis *et al.*, 1994; Koff, 1998; Pereira & Gonçalves, 2003).

Além das vacinas mencionadas, outras vacinas inativadas encontram-se comercialmente disponíveis, são elas: (i) Epaxal[®], (ii) Avaxim[®] e (iii) Twinrix[®]. A Epaxal[®] (Berna) é uma vacina na qual o HAV inativado é incorporado em virossomas. Estes virossomas apresentam glicoproteínas e fosfolípidios do vírus influenza, que facilitam a entrega do antígeno às células imunocompetentes. A vacina Avaxim[®] (Aventis Pasteur) é preparada de forma similar às vacinas Havrix[®] e Vaqta[®]. Em contraste, a Twinrix[®] (GlaxoSmithKline) é uma vacina bivalente, que fornece proteção contra a hepatite A e a hepatite B. Esta vacina foi introduzida na Austrália, Canadá e alguns outros países. Na formulação indicada para adultos, ela contém 720 UE (unidades de ELISA) do antígeno hepatite A (Havrix[®]) e 20 µg do

antígeno de superfície do vírus da hepatite B (Engerix[®]-B) (Poovorawan *et al.*, 1995; Koff, 1998; Wasley *et al.* 2006).

Na China, vacinas baseadas em vírus atenuado vêm sendo licenciadas e utilizadas na rotina de vacinação. Essas vacinas são atenuadas por múltiplas passagens em cultura de células e, subsequentemente, propagadas em células fibroblásticas de pulmão de embrião humano. As vacinas são administradas em uma única dose, pela via intramuscular, e são capazes de fornecer proteção contra o HAV (WHO, 2000b, Hollinger & Emerson, 2007). Ressalta-se que não há evidências de eliminação do HAV nas fezes ou infecções associadas à vacinação (Hollinger & Emerson, 2007).

1.16. Recomendações para a imunização e a situação no Brasil

A Organização Mundial da Saúde recomenda que a vacinação contra o HAV seja incluída na rotina de imunização de crianças com idade superior a 1 ano, sempre que houver indicação baseada na incidência da doença, na modificação do perfil epidemiológico e no custo-benefício (WHO, 2000b).

Em países com alta endemicidade, quase todas as pessoas são infectadas pelo HAV na infância e, por isso, a maioria dos casos ocorre de forma assintomática. Nesses países, os programas de vacinação em grande escala não são recomendados. Por outro lado, países que vêm apresentando melhorias nas condições sanitárias e socioeconômicas podem rapidamente sofrer mudanças no perfil epidemiológico, migrando de alta endemicidade para endemicidade intermediária. Nesses países, uma proporção relativamente grande da população adulta está susceptível ao HAV e, portanto, a vacinação em larga escala é recomendada (WHO, 2000b).

A vacinação de grupos de alto risco deve ser considerada para fornecer benefícios individuais de saúde. Os grupos de maior risco incluem os viajantes de regiões não endêmicas para áreas endêmicas, HSH, usuários de drogas injetáveis, portadores de hepatite crônica, hemofílicos e pesquisadores que trabalham com primatas não humanos e com o HAV (WHO, 2000; CDC, 2006).

O regime de imunização adotado pela maioria dos países, que incluíram a vacina inativada contra o HAV no calendário de imunizações, utiliza duas doses da vacina, conforme recomendado pelo fabricante. Contudo, a utilização de uma única

dose pode ser considerada como uma estratégia alternativa para viabilizar a inclusão dessa vacina no calendário de imunizações de alguns países. Essa opção, adotada pela Argentina em 2005, é mais barata e mais fácil de implementar do que o esquema clássico de duas doses (WHO, 2006).

Os estudos realizados na Argentina têm demonstrado que a imunização com uma dose da vacina Avaxim[®] (Sanofi Pasteur) é capaz de fornecer anticorpos persistentes e proteção contra a infecção pelo HAV, por pelo menos 5 anos (Espul *et al.*, 2015). Contudo, estudos mais longos sobre a duração da proteção precisam ser realizados, de modo a direcionar futuras decisões a respeito da necessidade de inclusão da dose de reforço (Ott & Wiersma, 2013).

Em julho de 2014, O Brasil introduziu a vacina Vaqta[®] (Merck Sharp & Dohme) no Programa Nacional de Imunizações (PNI). As doses são direcionadas para crianças de 12 a 23 meses de idade e o esquema vacinal prevê uma única dose. Em paralelo, será realizado o monitoramento da situação epidemiológica para definir a inclusão ou não da segunda dose no calendário de imunização (Portal Brasil, 2014).

O investimento inicial do Ministério da Saúde para a introdução dessa vacina no PNI foi de R\$ 111 milhões. Esse montante permitiu a compra de 5,6 milhões de doses, que seriam suficientes para o primeiro ano de vacinação. Além disso, o Ministério da Saúde celebrou um acordo de transferência de tecnologia com o laboratório farmacêutico Merck Sharp & Dohme, produtor da vacina Vaqta[®], que vai transferir gradativamente a tecnologia de produção da vacina para o Instituto Butantan. Existe a expectativa de que a produção 100% nacional dessa vacina aconteça em meados de 2018 (Portal Brasil, 2014).

1.17. Tratamento

Até o momento, não existe tratamento específico para a hepatite A. A terapia deve ser de suporte e ter como objetivo a manutenção do balanço nutricional adequado. Ressalta-se que não existem evidências de que a restrição de gorduras tenha qualquer efeito benéfico sobre o curso da doença. Em contrapartida, o consumo de bebidas alcoólicas deve ser evitado, devido ao efeito hepatotóxico do álcool (Hollinger & Emerson, 2007).

Corticóides e Ig humana anti-HAV não possuem qualquer efeito na resolução da hepatite A. Além disso, drogas antivirais também não apresentam benefícios

clínicos, uma vez que o período de viremia é curto e os danos hepáticos parecem ser mediados pela resposta imune do hospedeiro (WHO, 2000b; Hollinger & Emerson, 2007).

O encaminhamento para um centro de transplante de fígado é apropriado para os casos de hepatite fulminante. Nos casos de insuficiência hepática subaguda, o transplante temporário de fígado pode ser uma alternativa para a regeneração do fígado nativo (WHO, 2000b; Hollinger & Emerson, 2007).

1.18. Expressão heteróloga de proteínas

Nas últimas décadas, o número de pesquisas relacionadas ao estudo de proteínas de interesse biotecnológico vem apresentado grande crescimento (Lehninger *et al.*, 2007). Contudo, o baixo rendimento de algumas proteínas extraídas diretamente dos organismos que a produzem bem como a necessidade de obter proteínas a partir de organismos patogênicos dificulta a realização de tais estudos. Diante disso, a expressão em sistemas heterólogos pode facilitar a produção e a caracterização dessas proteínas. Nesse contexto, destacam-se a expressão em *Escherichia coli* e a expressão no sistema baculovírus/células de inseto (Silva, 2007).

1.18.1. Expressão em *Escherichia coli*

A bactéria gram-negativa *Escherichia coli* é uma das células hospedeiras mais comumente utilizadas para a expressão de proteínas recombinantes. A utilização desse microorganismo representa um método simples e rápido para a expressão de proteínas. Além disso, os meios para crescimento de *E. coli* são baratos, os níveis de expressão são elevados e o escalonamento é relativamente fácil (Brondyk, 2009).

Atualmente, existem mais de 151 proteínas recombinantes aprovadas para uso em humanos, com diferentes indicações clínicas. Um terço dessas proteínas é produzido em *E. coli*, indicando que essa plataforma de expressão é amplamente utilizada para a produção de proteínas terapêuticas (Quadro 1.1) (Huang *et al.*, 2012).

Quadro 1.1: Proteínas recombinantes, produzidas em *Escherichia coli*, aprovadas para uso terapêutico recentemente.

Nome genérico/proteína (nome fantasia)	Indicações	Ano da aprovação, lugar e empresa
Somatropina (Accretropin)	Deficiência do hormônio do crescimento	2008, EUA, Cangene
Interferon alfa PEG (PegIntron)	Hepatite C crônica	2008, EUA, Schering-Plough
Interferon beta 1b (Extavia)	Esclerose múltipla	2008, EUA, Novartis
Romiplostim (Nplate)	Púrpura trombocitopênica	2008, EUA, Amgen
Pegloticase (Krystexxa)	Gota crônica	2010, EUA, Savient Pharms

Fonte: adaptado de Huang et al., 2012.

Em *E. coli*, as proteínas recombinantes são normalmente direcionadas para o citoplasma ou periplasma e, em menor extensão, são secretadas. As proteínas direcionadas para o citoplasma são expressas de forma mais eficiente, podendo representar até 30% da biomassa produzida (Jana & Deb, 2005). Entretanto, os altos níveis de expressão podem levar ao acúmulo de agregados insolúveis, que formam os chamados corpos de inclusão. Os corpos de inclusão têm sido observados não somente para as proteínas de eucariotos, mas também para as proteínas de procariotos superexpressas nestas células. Os corpos de inclusão podem dificultar a obtenção de proteínas solúveis e ativas. Contudo, em alguns casos, os corpos de inclusão são vantajosos porque resistem à proteólise, são fáceis de serem concentrados por centrifugação e são minimamente contaminados com outras proteínas (Anderson *et al.*, 1982; Brondyk, 2009).

Muitos sistemas comerciais foram desenvolvidos para diversas aplicações e compatibilidades. Nesse contexto, o sistema pET (Novagen) se destaca, já que vem sendo amplamente utilizado para a expressão de proteínas recombinantes. A expressão nesse sistema requer uma cepa de *E. coli* contendo um fragmento do bacteriófago DE3, que codifica a T7 RNA polimerase (T7 gene 1). Esse fragmento

encontra-se sob o controle do promotor lacUV5 e pode ser induzido com isopropil- β -D-tiogalactosídeo (IPTG). Outro componente do sistema é o gene *lacI*, que está presente tanto no genoma da *E. coli* quanto no vetor pET. O gene *lacI* codifica o monômero do repressor, que forma tetrâmeros. Esses tetrâmeros são responsáveis por reprimir o promotor lacUV5 (*E. coli*) e o promotor híbrido T7/lac (pET), através da ligação com o operador *lac* (Figura 1.7). Quando o indutor (IPTG) é adicionado ao sistema, o repressor é convertido em uma forma inativa, liberando a região do operador. Assim, ocorre a transcrição da T7 RNA polimerase, que será responsável pela transcrição do gene heterólogo a partir do promotor híbrido T7/lac (Sørensen & Mortensen, 2005).

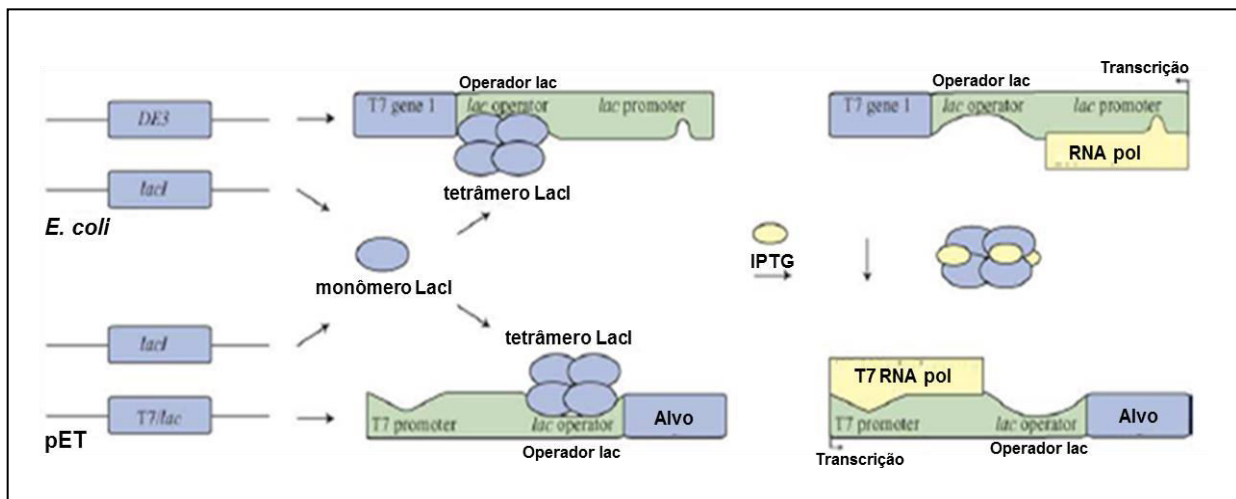


Figura 1.7: Esquema representativo da regulação da expressão gênica no sistema pET. A adição do indutor IPTG inativa os tetrâmeros de *lacI*, permitindo a liberação do operador *lac*. Assim, ocorre a transcrição da T7 RNA polimerase, que será responsável por transcrever o gene heterólogo (alvo). (Adaptada de Sørensen & Mortensen, 2005).

1.18.2 Expressão no sistema baculovírus/células de inseto

Os baculovírus pertencem à família *Baculoviridae*. O genoma destes vírus é composto por um DNA fita dupla, circular, covalentemente fechado, cujo tamanho pode variar de 80 quilobases (kb) a 200 kb (de Castro *et al.*, 1999). O nome *Baculoviridae* tem origem a partir da palavra latina *baculum* que significa bastão, caracterizando a forma das partículas virais dessa família (Friesen, 2007).

A família *Baculoviridae* é dividida em dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV). Os NPV possuem corpos de oclusão, também chamados de poliedros, os quais podem conter diversos virions. O principal constituinte dos poliedros é a poliedrina, uma proteína com cerca de 30 kDa, que corresponde a cerca de 95% do conteúdo dessas estruturas. Os GV formam corpos de oclusão menores, chamados de grânulos, onde, normalmente, apenas um virion se encontra ocluído. Assim como a poliedrina, a granulina é o principal constituinte proteico do grânulo (Friesen, 2007).

Os baculovírus infectam mais de 700 espécies de artrópodes (de Castro *et al.*, 1999) e apresentam duas formas morfológicamente distintas durante o ciclo de infecção: o vírus extracelular (BV, *budded virus*), que é responsável pela transmissão do vírus célula a célula, e o vírus ocluído (OB, *occlusion bodies*), responsável pela transmissão do vírus de inseto a inseto (Engelhard *et al.*, 1994; Friesen, 2007).

Além do grande potencial como agentes de controle biológico de insetos-praga na agricultura, os baculovírus também podem ser utilizados como vetores para a produção de proteínas heterólogas. Originalmente, o principal atrativo dos baculovírus como vetor de expressão foi o gene da poliedrina. Esse gene produz grandes quantidades de poliedrina durante estágios tardios do ciclo replicativo. Embora, a poliedrina seja necessária para infectar insetos *per os*, sua produção não é necessária para manter a infecção em cultura de células. Dessa forma, o gene da poliedrina pode ser substituído pela sequência do gene heterólogo, de modo a mantê-lo sob o controle do forte promotor da poliedrina (King & Possee, 1992).

As principais vantagens do sistema de expressão baculovírus/células de inseto consistem na capacidade de realizar modificações pós-traducionais como N-glicosilação, O-glicosilação, clivagens proteolíticas, clivagem de peptídeo sinal, acilação, amidação, fosforilação e carboximetilação (de Castro *et al.*, 1999); na expressão de proteínas heterólogas em níveis moderados a elevados (King &

Possee, 1992; de Castro *et al.*, 1999); na capacidade para clonagem de grandes insertos de DNA (de Castro *et al.*, 1999; Hu, 2005); e na biossegurança, uma vez que os baculovírus, naturalmente, não infectam humanos (Hu, 2005).

Inicialmente, a produção de baculovírus recombinantes era realizada através do processo de recombinação homóloga. Assim, células de inseto eram co-transfectadas com o genoma do baculovírus selvagem e com o DNA plasmideal de transferência, produzindo vírus parenterais e vírus recombinantes. A progênie era separada por ensaio em placa e os clones recombinantes, os quais apresentavam fenótipo negativo para corpos de oclusão, eram identificados por microscopia óptica. Entretanto, a identificação desses clones representava uma etapa difícil e laboriosa (Kost *et al.*, 2005).

Esforços para eliminar a necessidade do ensaio em placa levaram ao desenvolvimento de um método de transposição bacteriana *in vitro*, descrito em 1993 e, posteriormente, comercializado como sistema *Bac-to-Bac*[®] (Life Technologies). Esse método é baseado na transposição sítio-específica de um gene heterólogo do plasmídeo doador para o bacmídeo. Visto que os clones de *Escherichia coli*, contendo o bacmídeo recombinante, adquirem um marcador de resistência a antibiótico e perdem o marcador *lacZ*, os mesmos podem ser facilmente identificados e selecionados. Assim, o bacmídeo isolado a partir de um clone bacteriano positivo é utilizado para transfectar células de inseto e, com isso, produzir vírus recombinantes (Figura 1.8) (Kost *et al.*, 2005).

Atualmente, existem duas vacinas virais sendo produzidas na plataforma baculovírus/células de inseto, a Cervarix[™] e a FluBlok[®]. A vacina Cervarix[™], produzida pela GlaxoSmithKline (GSK), é baseada em VLPs. Essa vacina é utilizada na prevenção das infecções causadas pelos tipos 16 e 18 de papilomavírus humano (HPV). A vacina FluBlok[®], produzida pela empresa Protein Science, é uma vacina de subunidade, que utiliza a proteína hemaglutinina do vírus influenza como antígeno. Essa vacina é adaptada, anualmente, para fornecer proteção contra as últimas cepas circulantes do vírus influenza (Liu *et al.*, 2013).

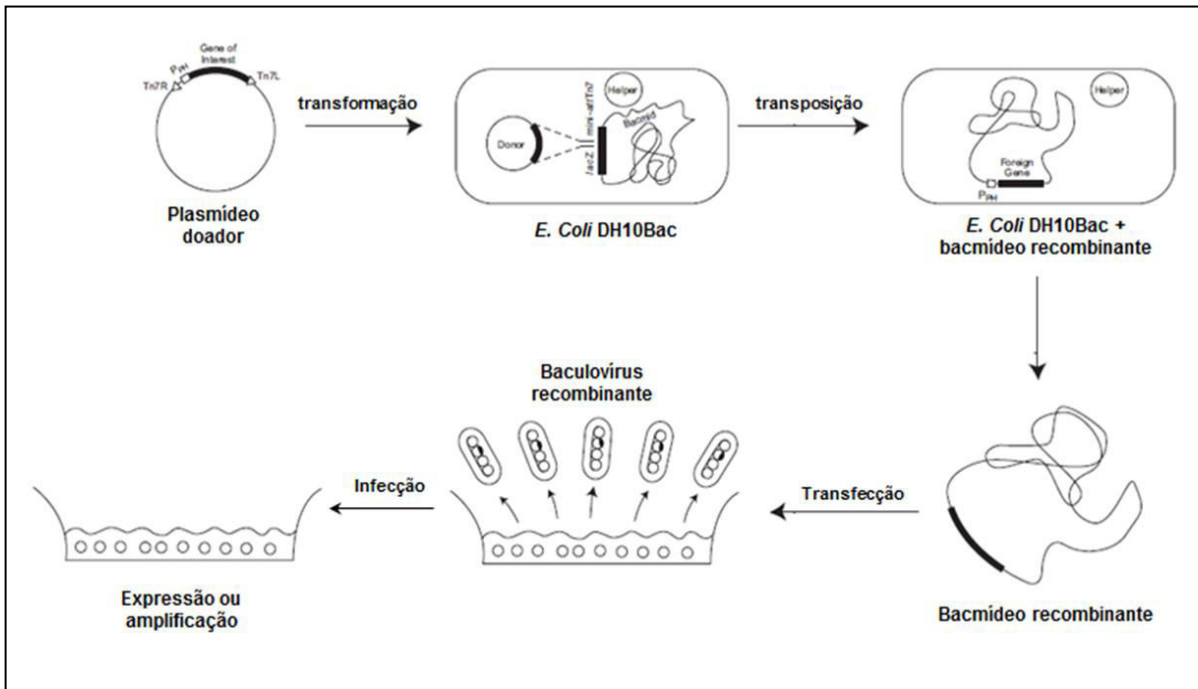


Figura 1.8: Etapas envolvidas na obtenção do baculovírus recombinante a partir do sistema *Bac-to-Bac*[®]. A primeira etapa consiste na transformação de células de *Escherichia coli*, cepa DH10Bac[™], com o plasmídeo contendo o gene heterólogo. No interior dessas células, ocorre a transposição do gene heterólogo para o bacmídeo. As células contendo o bacmídeo recombinante são selecionadas através do fenótipo lacZ negativo e da resistência aos antibióticos de seleção. O bacmídeo recombinante é extraído e utilizado para transfectar células de inseto, com o objetivo de gerar os baculovírus recombinantes. Os baculovírus gerados são utilizados para os ensaios de expressão ou amplificação viral. (Adaptada do manual *Bac-to-Bac*[®] Baculovirus Expression System, Life Technologies).

2. Justificativa

O HAV é o principal agente etiológico das hepatites virais agudas e estima-se que ocasione 1,5 milhão de novas infecções no mundo a cada ano. Atualmente, existem vacinas comerciais contra o HAV, baseadas em vírus inativado ou vírus atenuado. Apesar da eficácia dessas vacinas, a replicação do HAV em cultura de células é lenta e apresenta baixo rendimento, o que torna a sua produção difícil e dispendiosa.

Em julho de 2014, o Brasil incluiu a vacina Vaqta[®] (Merck & Sharpe Dohe) no PNI. Contudo, a inclusão dessa vacina representou investimento inicial de R\$ 111 milhões, o qual foi suficiente para atender apenas ao primeiro ano de vacinação. Embora o acordo de transferência de tecnologia celebrado com a Merck possa reduzir esses custos, a utilização de uma vacina recombinante, produzida com tecnologia nacional, provavelmente, permitiria a economia de recursos financeiros.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial da proteína VP1 recombinante (VP1r) e das partículas virais destituídas de ácido nucleico (VLPs) como possíveis alvos para o desenvolvimento de uma vacina recombinante contra o vírus da hepatite A (HAV).

3.2. Objetivos específicos

- Expressar e purificar a VP1r a partir dos sistemas baculovírus/células de inseto e *Escherichia coli*;
- Expressar e purificar as VLPs a partir do sistema baculovírus/células de inseto;
- Avaliar a reatividade da VP1r e das VLPs frente a soros de pacientes infectados pelo HAV;
- Caracterizar a resposta imune induzida pela VP1r e pelas VLPs em camundongos, quando combinadas ao adjuvante hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) e ao adjuvante a base de saponina;
- Avaliar a presença de resposta anamnésica nos animais imunizados com a VP1r.

4. Material e Métodos

4.1. Obtenção da proteína VP1 recombinante (VP1r) a partir do sistema baculovírus/células de inseto

O sistema *Bac-to-Bac*[®] *Baculovirus Expression System* (Life Technologies) foi utilizado para expressar a VP1r em células de inseto Sf9.

4.1.1. Gene sintético VP1

O gene *VP1* do HAV foi sintetizado pela empresa Integrated DNA Technologies e enviado no vetor plasmideal pIDTSmart Kan (Anexo 1, Figura A.1.1). Ressalta-se que o gene *VP1* foi sintetizado de acordo com a sequência disponível no GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>; número de acesso: M14707.1; cepa HM-175) e que uma cauda de histidina foi inserida na porção C-terminal.

4.1.2. Construção do vetor pFastBac[™] Dual+VP1

O vetor pIDTSmart Kan+VP1 foi clivado com as endonucleases de restrição *Xba*I (New England Biolabs) e *Hind*III (New England Biolabs), conforme as instruções do fabricante. A clivagem enzimática proporcionou a liberação de um fragmento referente à *VP1* com 924 pb. O volume total da reação de clivagem enzimática foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v). O gel foi corado com solução de brometo de etídio (Life Technologies), na concentração final (C_f) de 0,5 µg/mL, e visualizado sob luz ultravioleta (UV). Em seguida, o fragmento de 924 pb foi purificado do gel utilizando o *kit* Wizard[®] SV Gel and PCR Clean Up System (Promega). Simultaneamente, foi realizada a clivagem enzimática do vetor doador pFastBac[™] Dual (Anexo 1, Figura A.1.2) com as endonucleases de restrição *Xba*I e *Hind*III. Após a clivagem, o vetor doador foi submetido à reação de defosforilação com a enzima fosfatase alcalina de camarão (SAP, Promega). O vetor defosforilado também foi purificado com o *kit* Wizard[®] SV Gel and PCR Clean Up System. O vetor e o inserto foram quantificados utilizando a plataforma NanoDrop 1000 (Thermo

Scientific) e a reação de ligação foi realizada com a enzima T4 DNA ligase (Life Technologies), conforme instruções do fabricante. A proporção utilizada entre vetor e inserto foi de 1:10 (m/m), respectivamente (Sambrook & Russel, 2001).

4.1.3. Transformação de células bacterianas e análise dos clones obtidos

Células competentes de *E. coli*, cepa TOP10, foram preparadas para eletroporação, conforme descrito por Sambrook & Russel (2001). Cerca de 10% do volume da ligação pFastBac™ Dual+VP1 foi adicionado a 100 µL de células TOP10 competentes. O material foi transferido para uma cubeta e submetido à eletroporação usando o aparelho MicroPulser™ (Bio-Rad). Em seguida, adicionou-se 900 µL de meio de cultura Luria Bertani (LB) à cubeta e o volume total foi transferido para um tubo de 15 mL, o qual foi mantido a 37°C, sob agitação de 200 rotações por minuto (rpm), por 1 hora. Posteriormente, as células foram semeadas em uma placa de Petri contendo meio de cultura LB Ágar e o antibiótico ampicilina na C_f de 100 µg/mL. As placas foram incubadas na estufa a 37°C por 16 horas. As colônias obtidas foram transferidas, separadamente, para tubos contendo 5 mL de meio LB e o antibiótico ampicilina na C_f de 100 µg/mL. Os tubos foram incubados por 16 horas, com agitação de 200 rpm a 37°C. Posteriormente, foi feita a extração do DNA plasmídeo dos possíveis clones recombinantes, utilizando o *kit* High Pure Plasmid Isolation (Roche Life Science). Para confirmar a presença do gene *VP1*, os plasmídeos foram submetidos a clivagens enzimáticas com as endonucleases *XbaI* e *HindIII*. Os produtos das clivagens enzimáticas foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v). Estoques de bactérias contendo os plasmídeos recombinantes foram preparados e mantidos a -70°C, de acordo com protocolos descritos por Sambrook & Russel (2001).

4.1.4. Transformação de células DH10Bac™ e purificação do bacmídeo recombinante

Células competentes de *E. coli*, cepa DH10Bac™, foram preparadas para transformação por choque térmico, conforme descrito por Sambrook & Russel (2001). Cerca de 1 ng da construção pFastBac™ Dual+VP1 foi adicionado em 200 µl

de células DH10Bac™. O material foi mantido no gelo durante 30 minutos e, em seguida, procedeu-se com o choque térmico a 42°C, durante 45 segundos. Após esse período, o tubo contendo as células foi transferido para o gelo e resfriado por 2 minutos. A seguir, adicionou-se 800 µL de meio LB ao tubo e as células foram incubadas a 37°C, com agitação de 225 rpm, durante 4 horas. Após esse período, 90% e 10% das células transformadas foram semeadas, separadamente. As placas de Petri utilizadas continham meio LB ágar com canamicina ($C_f = 50 \mu\text{g/mL}$), gentamicina ($C_f = 7 \mu\text{g/mL}$), tetraciclina ($C_f = 10 \mu\text{g/mL}$), IPTG ($C_f = 40 \mu\text{g/mL}$) e X-gal ($C_f = 20 \mu\text{g/mL}$). As placas foram incubadas a 37°C, por 48 horas. As colônias contendo o bacmídeo recombinante apresentaram fenótipo branco, quando foram cultivadas em meio contendo X-gal/IPTG. Para confirmar o fenótipo dessas colônias, as mesmas foram ressemeadas em placa de Petri contendo LB ágar, X-gal/IPTG e antibióticos de seleção. Uma das colônias que cresceram isoladas e que mantiveram o fenótipo branco foi colhida assepticamente e inoculada em 2 mL de LB, contendo os antibióticos de seleção. Os tubos foram incubados a 37°C, com agitação de 225 rpm, por 16 horas. Uma colônia azul também foi colhida para ser utilizada como controle negativo. A purificação dos bacmídeos foi realizada com o *kit* Sephaglas FlexiPrep (GE Healthcare), conforme as instruções do fabricante.

4.1.5. Análise da transposição do gene *VP1* para o bacmídeo

Para confirmar a ocorrência da transposição do gene *VP1*, o bacmídeo de cada construção foi submetido a PCR. As reações foram realizadas utilizando a mistura de reagentes descrita no quadro 4.1. Nos ensaios, foram utilizados oligonucleotídeos que flanqueiam a região de transposição (pUC/M13 Fw e pUC/M13 R) assim como combinações desses com oligonucleotídeos específicos para o gene *VP1* (VP1ins Fw e VP1ins R; Anexo 5, Quadro A.5.1). Os tamanhos dos *amplicons* esperados a partir do bacmídeo contendo o gene *VP1* (bacmídeo-*VP1*) e do bacmídeo sem o gene *VP1* (bacmídeo vazio) estão descritos no quadro 4.2. As condições de termociclagem foram as seguintes: (i) denaturação inicial de 94°C por 2 minutos; (ii) 35 ciclos de 94°C por 1 minuto (denaturação), 55°C por 1 minuto (hibridização) e 68°C por 5 minutos (extensão); (iii) extensão final de 68°C por 7 minutos.

Quadro 4.1: Mistura dos reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) para confirmação da transposição do gene *VP1* para o bacmídeo.

Reagente	Concentração	Volume/Reação
Água livre de DNase/RNase (Life Technologies)	---	38,80 µL
Tampão da PCR sem MgSO ₄ (Life Technologies)	10x	5,00 µL
dNTPs: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Life Technologies)	10 mM	1,00 µL
MgSO ₄ (Life Technologies)	50 mM	2,00 µL
<i>Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity</i> (Life Technologies)	5 U/µL	0,20 µL
Oligonucleotídeo sense (Fw)	10 µM	1,00 µL
Oligonucleotídeo anti-sense (R)	10 µM	1,00 µL
Bacmídeo	100 ng	1,00 µL
Volume final	---	50,00 µL

Quadro 4.2: Tamanhos dos *amplicons* esperados, a partir do bacmídeo-VP1 e do bacmídeo vazio, de acordo com os oligonucleotídeos iniciadores utilizados.

Oligonucleotídeos utilizados*	Plasmídeo	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb)
pUC/M13 Fw + pUC/M13 R	bacmídeo-VP1	3460
VP1ins Fw + pUC/M13 R	bacmídeo-VP1	1463
pUC/M13 Fw + VP1ins R	bacmídeo-VP1	2907
pUC/M13 Fw + pUC/M13 R	bacmídeo vazio	300
VP1ins Fw + pUC/M13 R	bacmídeo vazio	----
pUC/M13 Fw + VP1ins R	bacmídeo vazio	----

* As sequências dos oligonucleotídeos estão descritas no Anexo 5, Quadro A.5.1.

4.1.6. Produção dos baculovírus recombinantes

Cerca de $2,5 \times 10^6$ células de inseto Sf9 foram semeadas em frascos T (25cm², Corning) e incubadas a 28°C. Após 18 horas, as células foram transfectadas com o bacmídeo-VP1 e com o bacmídeo vazio. A reação de transfecção foi realizada com 6 µg de cada bacmídeo e com o reagente *Cellfectin*[®] (Life Technologies), conforme instruções do fabricante. Seis dias após a transfecção, os sobrenadantes contendo os baculovírus recombinantes foram coletados. Como as transfecções foram realizadas em meio livre de soro, adicionou-se 2% (v/v) de soro fetal bovino (SFB, Cultilab) aos estoques virais para preservar os baculovírus. Esse primeiro estoque foi chamado de P1 e foi armazenado a 4°C, protegido da luz.

4.1.7. Amplificação dos baculovírus recombinantes

Para aumentar o título de baculovírus, os estoques P1 foram utilizados para infectar células Sf9. Assim, $1,5 \times 10^7$ células foram semeadas em frascos T (75 cm², Corning) e infectadas com os estoques P1 de baculovírus-VP1 e baculovírus sem o gene heterólogo (baculovírus vazio). Após a adição dos inóculos, os frascos T75 foram agitados, suavemente, a cada 15 minutos, durante 1 hora. Em seguida, as células foram mantidas em estufa a 28°C, por 72 horas. Após esse período, os sobrenadantes foram coletados e clarificados por centrifugação a 500 x *g*, por 5 minutos. Esses estoques, denominados de P2, foram armazenados a 4°C e protegidos da luz. O volume do inóculo viral foi calculado de acordo com o manual do fabricante (*Bac-to-Bac*[®] *Baculovirus Expression System*, Life Technologies), utilizando multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1 e assumindo que o título dos estoques P1 eram de 1×10^6 PFU/mL.

4.1.8. Sequenciamento nucleotídico

O gene *VP1* das construções pFastBac[™] Dual+VP1, bacmídeo-VP1 e baculovírus-VP1 foi sequenciado através do método de Sanger (1977). As sequências foram editadas e uma sequência consenso foi gerada através do programa SeqMan (DNAS[™]). A sequência obtida foi alinhada com a sequência de

gene sintético, fornecida pela Integrated DNA Technologies. O alinhamento das sequências foi realizado com o programa BLAST, disponível no National Center for Biotechnology Information (NCBI).

4.1.9. Titulação dos baculovírus por formação de placas de lise

Células Sf9 foram semeadas em placas de 6 cavidades (9,6 cm², Nunc), na densidade de 1 x 10⁶ células/cavidade. Essas células foram incubadas a 28°C, por 18 horas. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas (10⁻¹ a 10⁻⁹) do estoque viral P2 em meio Sf900-III SFM (Life Technologies). O meio de cultura foi removido das placas e substituído por 1mL das diluições do estoque viral P2 (10⁻⁴ a 10⁻⁹). Após a adição dos inóculos, as placas foram agitadas, suavemente, a cada 15 minutos, durante 1 hora. Em seguida, o inóculo foi retirado e as células foram imobilizadas com 2 mL de agarose 1% (m/v, Life Technologies). Ressalta-se que foram realizadas duplicatas para cada diluição do estoque viral. Após incubação por 7 dias a 28°C, as células foram coradas com solução de *neutral red* 0,1% (m/v, Life Technologies), conforme as recomendações do fabricante. O título viral foi calculado usando a fórmula abaixo:

$$\text{PFU/mL} = \text{fator de diluição} \times \text{n}^{\circ} \text{ de placas de lise} \times \frac{1}{(\text{mL do inóculo por cavidade})}$$

4.1.10. Ensaio de expressão da proteína VP1 recombinante (VP1r) em células Sf9

Células Sf9 foram semeadas em placas de 6 cavidades (9,6 cm², Nunc), na densidade de 1 x 10⁶ células/cavidade. Em seguida, as células foram infectadas com os estoques P2 de baculovírus-VP1 e de baculovírus vazio, utilizando MOI de 5. Após setenta e duas horas, as células infectadas foram separadas dos sobrenadantes por centrifugação a 500 x *g*, por 5 minutos.

4.1.11. Análise da expressão da proteína VP1 recombinante (VP1r) por *SDS-PAGE*

Os precipitados das células infectadas com baculovírus-VP1 e baculovírus vazio foram lisados com 200 µL de tampão de amostra (50 mM tris-HCl, 2% (m/v) dodecil sulfato de sódio (SDS), 0,1% (m/v) azul de bromofenol, 10% (v/v) glicerol, 100 mM β-mercaptoetanol). Vinte microlitros dos extratos celulares e dos sobrenadantes foram submetidos à *SDS-PAGE*, conforme descrito por Laemmli (1975). Para a realização da *SDS-PAGE*, foi utilizado o sistema Miniprotean (Bio-Rad), conforme instruções do fabricante. O gel foi corado com solução de Coomassie® Blue (Promega) e descorado com solução descorante (30% (v/v) metanol, 7% (v/v) ácido acético), conforme descrito por Silva-Junior (2000).

4.1.12. Análise da expressão da proteína VP1 recombinante (VP1r) por *Western blotting*

Vinte microlitros dos extratos e dos sobrenadantes de células infectadas com as construções baculovírus-VP1 e baculovírus vazio foram submetidos à *SDS-PAGE*. As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose 0,45 µm (Bio-Rad) utilizando o equipamento *Semi-dry* (BioRad), conforme instruções do fabricante. Em seguida, a membrana foi corada com solução de Ponceau (Promega) para verificar o êxito do processo de transferência. Após a coloração, prosseguiu-se com a reação de *Western blotting*, conforme descrito por Vianna et al. (2006). O anticorpo policlonal de cabra anti-HAV (Abcam) foi utilizado como anticorpo primário na diluição de 1:500. O anticorpo anti-IgG de cabra conjugado com fosfatase alcalina (Abcam) foi utilizado como anticorpo secundário, na diluição de 1:10.000. A revelação das bandas foi realizada pelo método cromogênico, utilizando o *kit AP Conjugate Substrate* (Bio-Rad).

4.1.13. Cinética de expressão da proteína VP1 recombinante (VP1r) em células de inseto Sf9

Células Sf9 foram infectadas com a construção baculovírus-VP1, utilizando MOI de 5. As células foram coletadas com intervalos de 24 horas, durante 5 dias. Em seguida, as células foram lisadas com tampão de amostra e 20 µL dos extratos celulares foram analisados por *Western blotting*.

4.1.14. Cultivo de células Sf9 em frasco *spinner*

As células Sf9 foram cultivadas, inicialmente, em frascos T (75cm²). Após atingir a confluência, estas células foram semeadas em frasco *spinner* de 250 mL, na densidade de 1×10^6 células/mL, utilizando 100 mL como volume de trabalho. As células foram cultivadas a 28°C e a agitação foi mantida em 120 rpm. Passagens foram realizadas sempre que a densidade ultrapassou 2×10^6 células/mL, de modo a manter as células em fase exponencial.

4.1.15. Purificação da proteína VP1 recombinante (VP1r) por cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC)

Cerca de 300 mL de cultura de células Sf9, cultivadas em frasco *spinner* e com densidade entre 1×10^6 e 2×10^6 células/mL, foram infectadas com a construção baculovírus-VP1. As células foram coletadas 96h pós-infecção (p.i.) e rompidas com tampão de lise para células eucariontes (50 mM tris-HCl + 1% (v/v) Triton X-100 + 150 mM NaCl + 1 mM PMSF, pH 8,0). Cinco mililitros da resina NI-NTA superflow (Qiagen) foram empacotados em uma coluna (Bio-Rad), que foi, então, lavada e equilibrada com o tampão de lise. A fração solúvel do extrato celular foi aplicada na coluna a um fluxo de 1,0 mL/min, o qual foi mantido por uma bomba peristáltica (Bio-Rad). Em seguida, foram realizadas as seguintes etapas de lavagem: 20 volumes de coluna (VC) de tampão fosfato + 0,5 M NaCl + 20 mM imidazol (pH 8,0) e 20 VC de tampão fosfato pH 8,0 + 0,5 M NaCl + 40 mM imidazol (pH 8,0). A etapa de eluição foi realizada com tampão fosfato + 0,5 M NaCl + 500 mM imidazol (pH 8,0). As

frações coletadas foram analisadas por *SDS-PAGE*, seguida por coloração com Coomassie[®] Blue, e *Western blotting*.

4.1.16. Cinética de distribuição intracelular da proteína VP1 recombinante (VP1r) em células Sf9

Células Sf9 infectadas com baculovírus-VP1 foram coletadas entre 24h e 96h p.i. As células foram incubadas com tampão de lise para células eucariontes (50 mM tris-HCl + 1% (v/v) Triton X-100 + 150 mM NaCl + 1 mM PMSF, pH 8,0) por 10 minutos a temperatura ambiente (20°C – 22°C). Em seguida, os extratos celulares foram centrifugados a 10.000 x *g*, por 10 minutos. As frações solúveis foram separadas dos precipitados (frações insolúveis), os quais foram solubilizados com tampão de amostra. As frações solúveis e insolúveis foram analisadas por *Western blotting*.

4.1.17. Expressão extracelular da proteína VP1 recombinante (VP1r) através da adição de peptídeo sinal

O gene *VP1*, fusionado a sequência codificante para o peptídeo sinal da melitina de abelha (HBM, *Honeybee Melittin*), foi sintetizado pela empresa Integrated DNA Technologies e enviado no vetor pIDTSmart Kan. Além disso, foi adicionado um sítio de clivagem para a protease do vírus etch do tabaco, em uma região *upstream* à cauda de histidina (hexahistidina). Ressalta-se que a estratégia para montar essa construção foi elaborada com base no vetor comercial pFastBac/HBM-TOPO (Life Technologies). A construção foi denominada de HBM-VP1 (Figura 4.1).

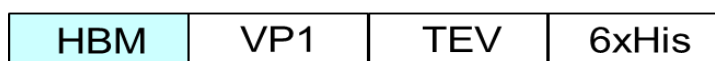


Figura 4.1: Esquema representativo do gene HBM-VP1 sintetizado pela empresa Integrated DNA Technologies. TEV – sítio de clivagem para a protease do vírus etch do tabaco, 6xHis – cauda de histidina (hexahistidina).

O vetor pIDTSmart Kan+HBM-VP1 foi clivado com as endonucleases de restrição *Xba*I e *Hind*III, conforme as instruções do fabricante. A clivagem enzimática proporcionou a liberação de um fragmento de aproximadamente 1000 pb, referente ao gene *HBM-VP1*. Esse fragmento foi clonado no vetor pFastBac™ Dual, utilizando as metodologias previamente descritas. A construção pFastBac™ Dual+HBMVP1 foi utilizada para transformar células competentes DH10Bac™ e a seleção dos bacmídeos recombinantes foi realizada por PCR, conforme previamente descrito (item 4.1.5). Os tamanhos dos *amplicons* esperados a partir do bacmídeo contendo o gene *HBM-VP1* (bacmídeo-HBM-VP1) e do bacmídeo vazio estão descritos no quadro 4.3. Os procedimentos para a obtenção dos baculovírus-HBM-VP1, análise da expressão e distribuição intracelular foram realizados conforme descrito para o baculovírus-VP1.

Quadro 4.3: Tamanhos dos *amplicons* esperados, a partir do bacmídeo-HBM-VP1 e do bacmídeo vazio, de acordo com os oligonucleotídeos iniciadores utilizados.

Oligonucleotídeos utilizados*	Plasmídeo	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb)
pUC/M13 Fw + pUC/M13 R	bacmídeo-HBM-VP1	3583
VP1 368 Fw + pUC/M13 R	bacmídeo-HBM-VP1	1243
pUC/M13 Fw + VP1 368 R	bacmídeo-HBM-VP1	2647
pUC/M13 Fw + pUC/M13 R	bacmídeo vazio	300
VP1 368 Fw + pUC/M13 R	bacmídeo vazio	----
pUC/M13 Fw + VP1 368 R	bacmídeo vazio	----

* As sequências dos oligonucleotídeos estão descritas no Anexo 5, Quadro A.5.1.

4.2. Obtenção da proteína VP1 recombinante (VP1r) a partir de *Escherichia coli*

O sistema *Champion™ pET Directional TOPO® Expression* (Life Technologies) foi utilizado para expressar a VP1 em *E. coli*. Esse sistema é baseado em uma estratégia de clonagem direcional, na qual regiões complementares entre o produto da PCR e o vetor são ligadas por uma topoisomerase. Para isso, o oligonucleotídeo sense, utilizado para amplificar o gene heterólogo (inserto), é desenhado de modo a conter a sequência CACC na sua extremidade 5'.

4.2.1. Amplificação do gene VP1

Para realizar a etapa de clonagem no vetor pET100/D-TOPO® (Anexo 1, Figura A.1.4), foi necessário amplificar o gene *VP1* com o oligonucleotídeo VP1coli Fw, o qual contém a região CACC na extremidade 5'. Ressalta-se que o gene sintético *VP1*, sintetizado pela empresa Integrated DNA Technologies, foi utilizado como molde para essa amplificação. A PCR foi realizada utilizando a mistura de reagentes descrita no quadro 4.4 e os oligonucleotídeos VP1coli Fw e VP1ins R (Anexo 5, Quadro A.5.1). As condições de termociclagem foram as seguintes: (i) denaturação inicial de 94°C por 2 minutos; (ii) 35 ciclos de 94°C por 15 segundos (denaturação), 55°C por 30 segundos (hibridização) e 68°C por 1 minuto (extensão); (iii) extensão final de 68°C por 5 minutos. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v) e purificado com o *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean Up System*. A quantificação foi realizada com o NanoDrop 1000.

Quadro 4.4: Mistura dos reagentes da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para amplificação do gene *VP1* a ser clonado no vetor pET100/D-TOPO®.

Reagente	Concentração	Volume/Reação
Água livre de DNase/RNase (Life Technologies)	---	38,80 µL
Tampão da PCR sem MgSO ₄ (Life Technologies)	10x	5,00 µL
dNTPs: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Life Technologies)	10 mM	1,00 µL
MgSO ₄ (Life Technologies)	50 mM	2,00 µL
<i>Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity</i> (Life Technologies)	5 U/µL	0,20 µL
Oligonucleotídeo sense (Fw)	10 µM	1,00 µL
Oligonucleotídeo anti-sense (R)	10 µM	1,00 µL
pIDTSmart KanVP1	100 ng	1,00 µL
Volume final	---	50,00 µL

4.2.2. Construção do vetor pET100/D-TOPO®+VP1

O produto da PCR, realizada com o oligonucleotídeo VP1coli Fw, foi utilizado para fazer a reação de ligação com o vetor pET100/D-TOPO®. Para esta etapa, as condições recomendadas pelo fabricante foram empregadas. Em seguida, células competentes de *E. coli*, cepa TOP10, foram transformadas por eletroporação, conforme previamente descrito (item 4.1.3). Posteriormente, foi realizada a extração do DNA plasmideal dos possíveis clones recombinantes, utilizando o *kit* High Pure Plasmid Isolation. Para confirmar a presença do gene *VP1*, os plasmídeos foram submetidos a PCR, utilizando as mesmas condições utilizadas para amplificação do gene *VP1*. Estoques de bactérias contendo os plasmídeos recombinantes foram preparados e mantidos a -70°C, de acordo com os protocolos descritos por Sambrook & Russel (2001).

4.2.3. Indução da expressão da proteína VP1 recombinante (VP1r)

Células de *E. coli*, cepa BL-21 Star™ (DE3), foram transformadas por eletroporação com o plasmídeo purificado pET100/D-TOPO®+VP1. Para gerar o pré-inóculo, uma colônia foi colhida assepticamente e transferida para 10 mL de meio Terrific Broth (TB), contendo ampicilina na C_f de 100 µg/ml e glicose na C_f de 1% (v/v). O pré-inóculo foi cultivado a 37°C por 16 horas, com agitação de 200 rpm. Após esse período, cerca de 10 mL de meio TB, contendo ampicilina ($C_f = 100$ µg/ml) e glicose ($C_f = 1\%$, v/v), foram inoculados com 200 µL do pré-inóculo (diluição 1:50). As células foram cultivadas a 37°C, com agitação de 200 rpm, até atingir a densidade ótica (D.O.) de 0,8, no comprimento de onda de 600 nm. Uma alíquota de 1 mL da cultura foi coletada, centrifugada e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi congelado a -20°C para servir como controle negativo, já que essas células não foram induzidas. Para expressar a proteína VP1, a cultura foi induzida com 1 mM de IPTG a 37°C por 4 horas, com agitação de 200 rpm. Após esse período, foi realizada a leitura da $D.O._{600nm}$ da cultura, conforme descrito anteriormente. Alíquotas de 1 mL foram centrifugadas e os sobrenadantes descartados. Os precipitados foram congelados a -20°C para posterior análise.

4.2.4. Análise da expressão da proteína VP1 recombinante (VP1r)

Os precipitados das células induzidas e não induzidas foram ressuspensos em tampão de amostra (item 4.1.11), usando a proporção de 25 µL de tampão para cada 0,1 de $D.O._{600nm}$. Dez microlitros de cada amostra foram analisados por *SDS-PAGE*.

4.2.5. Análise da solubilidade da proteína VP1 recombinante (VP1r)

O precipitado de células induzidas foi ressuspenso em tampão 20 mM tris + 1 mM EDTA + 1 mM PMSF (pH 8,0), utilizando a proporção descrita no item 4.2.4. A amostra foi submetida a três ciclos de sonicação (amplitude de 30%, 10 segundos) no gelo e cerca de 30 µL do extrato total foram separados para análise. Em seguida, o extrato foi centrifugado por 10.000 x *g* e o sobrenadante (fração solúvel) foi

coletado. O precipitado foi ressuspensão em tampão de amostra (item 4.1.11), utilizando o mesmo volume empregado inicialmente para lisar as células. Por fim, 10 μ L do extrato total, da fração solúvel e da fração insolúvel foram analisados por *SDS-PAGE*.

4.2.6. Purificação da proteína VP1 recombinante (VP1r) por cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC)

Vinte e cinco mililitros de células BL-21 Star™ (DE3), transformadas com o plasmídeo pET100/D-TOPO®+VP1, foram induzidas conforme previamente descrito (item 4.2.3). O precipitado das células induzidas foi ressuspensão com 10 mL do tampão A (2,7 mM KCl + 10 mM Na₂HPO₄ + 2 mM KH₂PO₄ + 1,2 M NaCl + 0,1% tween 80 + 1 mM EDTA + 1 mM PMSF). Em seguida, o material foi submetido a 2 ciclos de sonicação (amplitude de 30%, 10 segundos) no gelo e centrifugado por 10 minutos a 10.000 x *g*. O sobrenadante foi descartado e essa etapa foi repetida por mais uma vez. Ao final da segunda centrifugação, o precipitado foi ressuspensão em 10 mL do tampão B (20 mM Tris-HCl + 0,5% triton X-100 + 1 mM PMSF + 1 mM EDTA + 10mM imidazol, pH 8,0) e submetido a nova etapa de sonicação (3 ciclos, amplitude de 50%, 30 segundos) para solubilização da VP1r. Para a remoção de substâncias particuladas, o material foi submetido à centrifugação (10.000 x *g*, 10 minutos), seguida por filtração em membrana de 0,22 μ M. A fração solúvel foi acrescida de uréia a 3M e, em seguida, foi aplicada em uma coluna HisTrap™ de 1 mL (GE Healthcare), utilizando fluxo de 1 mL/min com o auxílio de uma bomba peristáltica. As etapas de lavagem e eluição foram conduzidas no cromatógrafo ÄKTA purifier 100 (GE Healthcare). As lavagens foram realizadas com o tampão B (20 mM Tris-HCl + 3 M uréia + 0,5% triton X-100, pH 8,0) acrescido de concentrações crescentes de imidazol (20 mM, 40 mM, 50 mM e 60 mM). A eluição foi realizada com o tampão B + 500 mM de imidazol. A uréia, presente na amostra purificada, foi removida por diálise. Assim, foram realizadas 3 trocas de 2 L com o tampão 20 mM Tris-HCl + 0,5% tritonX-100 (pH 8,0) a 4°C, com agitação. O intervalo mínimo entre as trocas foi de 4 horas, sendo a primeira troca realizada *overnight*. A concentração da VP1r, após a diálise, foi determinada pelo método do ácido bicinonínico (BCA), utilizando o *kit* Pierce® BCA Protein Assay (Thermo Scientific). A VP1r foi analisada por *SDS-PAGE* e *Western blotting*, antes e após a diálise.

Ressalta-se que a concentração de lipopolissacarídeos (LPS) na amostra purificada foi mensurada com o sistema Endosafe®-PTS Portable Test System (Charles River Laboratories).

4.2.7. Produção de soro de camundongo hiperimune anti-VP1

Dez camundongos da linhagem BALB/c, fêmeas, com idade entre 4 e 6 semanas, foram imunizados com 10 µg de VP1r adsorvida em 0,1 mg de hidróxido de alumínio (Al(OH)₃; Alhydrogel®, Brenntag). Os animais receberam 3 doses da formulação vacinal, pela via intramuscular, com intervalo de 7 dias entre cada inoculação. Sete dias após a terceira dose, os animais receberam uma dose de reforço, pela via intraperitoneal, com 10 µg da VP1r sem adjuvante. Três dias após o reforço, os camundongos foram submetidos à punção cardíaca e eutanásia. Os tubos contendo o sangue dos camundongos foram centrifugados por 10 minutos a 1000 x g. Os soros foram reunidos em um único tubo (*pool*), o qual foi armazenado a -20°C. Ressalta-se que os procedimentos experimentais foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ/RJ, protocolado com a numeração P-6/12-2 (Anexo 6).

4.2.8. Soros de pacientes

Os soros de pacientes infectados com o HAV foram gentilmente cedidos pelo Dr. Marcelo Alves Pinto, chefe do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, IOC – FIOCRUZ/RJ. A utilização desses soros foi autorizada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), CAAE: 30350614.5.0000.5248 (Anexo 7). Ressalta-se que os soros são provenientes de um surto de hepatite A, ocorrido na cidade de Mangaratiba – RJ, em 2012.

4.2.9. Avaliação da antigenicidade da proteína VP1 recombinante (VP1r) por ensaio imunoenzimático (ELISA) *in house*

Placas de 96 poços (MaxiSorp[®], Nunc) foram sensibilizadas com 100 ng de VP1r por cavidade. Para isso, a VP1r foi diluída em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6) para a C_f de 1 ng/μL e 100 μL foram aplicados em cada cavidade. As placas foram incubadas durante 18 horas a 4°C. Após esse período, as placas foram submetidas a 3 ciclos de lavagem com PBS + 0,05% de Tween 20 (PBS-T). Em seguida, as placas foram bloqueadas com 300 μL de tampão de bloqueio (5% SFB + 0,1% BSA + 5% de leite em PBS-T) por 2 horas a 37°C. A solução de bloqueio foi removida e 3 ciclos de lavagem foram realizados. Os soros de pacientes infectados com HAV foram reunidos em *pool* e diluídos 1:100 em PBS + 0,5% BSA. As amostras foram adicionadas às placas e incubadas por 1 hora a 37°C. Após a incubação, as amostras foram removidas e as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T. Em seguida, adicionou-se 100 μL do anticorpo secundário e prosseguiu-se com incubação a 37°C por 1 hora. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e, por fim, adicionou-se 100 μL da solução de TMB (Life Technologies). As placas foram mantidas ao abrigo da luz por 10 minutos e a reação colorimétrica foi interrompida com 50 μL de solução 2N de ácido sulfúrico. A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 450 nm, utilizando o leitor para placas de ELISA (Sunrise, Tecan). Ressalta-se que foram utilizados diferentes conjugados para determinar quais as classes de Igs seriam capazes de reconhecer a VP1r em ELISA. Os anticorpos secundários utilizados estão listados a seguir: (i) anticorpo anti-IgA, IgG e IgM de humano conjugado com peroxidase (diluição 1:10.000, Pierce), (ii) anticorpo anti-IgM de humano conjugado com peroxidase (diluição 1:2500, Sigma-Aldrich) e (iii) anticorpo anti-IgG de humano conjugado com peroxidase (diluição 1:10.000, Sigma-Aldrich).

4.2.10. Avaliação do desempenho do ensaio imunoenzimático (ELISA) *in house* para detecção de IgM

Para avaliar o potencial da VP1r como insumo para diagnóstico, soros de pacientes, infectados e não infectados com o HAV, foram analisados, individualmente, por ELISA *in house* para detecção de IgM, conforme previamente descrito (item 4.2.9). Foram avaliados 37 soros, os quais foram previamente testados pelo Laboratório de Referência em Hepatites Virais (IOC – FIOCRUZ/RJ), utilizando o kit HAVAb-IgM (Abbott). Os valores obtidos no ELISA *in house* foram analisados pela curva ROC, onde a taxa de verdadeiros positivos (sensibilidade) é plotada em função da taxa de falsos positivos (100 - especificidade) para diferentes valores de *cut-off*. Assim, o valor ótimo do *cut-off*, a sensibilidade e a especificidade foram determinados. A exatidão do teste foi mensurada através da área sob a curva. As análises foram realizadas com o auxílio do *software* GraphPad Prism 5.

4.3. Obtenção das partículas virais destituídas de ácido nucleico (VLPs) a partir do sistema baculovírus/células de inseto

O sistema *Bac-to-Bac*[®] *Baculovirus Expression System* foi utilizado para a obtenção das VLPs em células de inseto Sf9. Para construir o vetor doador pFastBac[™] Dual+P12A+P3, optou-se por clonar a região *P1-2A* sob o controle transcricional do promotor da poliedrina e o gene *P3* sob o controle do promotor p10. Ressalta-se que a utilização do vetor pFastBac[™] Dual permite a geração de um único baculovírus expressando dois genes simultaneamente.

4.3.1. Genes sintéticos *P1-2A* e *P3*

Os genes *P1-2A* e *P3* do HAV foram sintetizados pela empresa Integrated DNA Technologies e enviados no vetor plasmideal pUCIDT (Anexo 1, Figura A.1.3). Os genes foram sintetizados com otimização de códons para expressão em *Spodoptera frugiperda*, a partir da sequência disponível no GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>; número de acesso: M14707.1; cepa HM-175).

4.3.2. Construção do vetor pFastBac™ Dual+P12A+P3

O vetor pUCIDT+P1-2A foi clivado com as endonucleases de restrição *XbaI* (New England Biolabs) e *NotI* (New England Biolabs), conforme as instruções do fabricante. A clivagem enzimática proporcionou a liberação de um fragmento referente ao gene *P1-2A*, com aproximadamente 3000 pb. Simultaneamente, foi realizada a clivagem enzimática do vetor doador pFastBac™ Dual com as endonucleases de restrição *XbaI* e *NotI*. Os procedimentos para a ligação entre o gene *P1-2A* e o vetor pFastBac™ Dual, assim como para a seleção dos clones recombinantes foram realizados conforme previamente descritos (itens 4.1.2 e 4.1.3). Após a obtenção do vetor pFastBac™ Dual+P1-2A, prosseguiu-se com a clonagem do gene *P3*. Assim, o vetor pFastBac™ Dual+P1-2A foi clivado com as endonucleases de restrição *NheI* (Promega) e *XhoI* (Promega). Em paralelo, o vetor pUCIDT+P3 também foi clivado com as mesmas enzimas de restrição, proporcionando a liberação do fragmento referente ao gene *P3* (~2400 pb). Por fim, foram realizados os procedimentos para a ligação do inserto com o vetor, bem como a seleção dos clones recombinantes.

4.3.3. Análise do bacmídeo e produção do baculovírus-P1-2A+P3

A construção FastBac™ Dual+P1-2A+P3 foi utilizada para transformar células competentes DH10Bac™, conforme protocolo previamente descrito (item 4.1.4). Após a transposição do cassete de expressão, o bacmídeo recombinante foi extraído e analisado pela PCR. A reação foi realizada com a mistura de reagentes descrita no quadro 4.5. Nesse ensaio, foram utilizados oligonucleotídeos que flanqueiam a região de transposição (pUC/M13 Fw e pUC/M13 R; Anexo 5, Quadro A.5.1), assim como combinações desses com oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes *P1-2A* (P1-2A 480 Fw; Anexo 5, Quadro A.5.1) e *P3* (P3 42 Fw; Anexo 5, Quadro A.5.1). Os tamanhos dos *amplicons* esperados a partir do bacmídeo contendo os genes *P1-2A* e *P3* (bacmídeo-P1-2A+P3) estão descritos no quadro 4.6. As condições de termociclagem foram as seguintes: (i) denaturação inicial de 94°C por 2 minutos; (ii) 10 ciclos de 94°C por 30 segundos (denaturação), 55°C por 30 segundos (hibridização) e 68°C por 8 minutos (extensão); (iii) 25 ciclos de 94°C

por 30 segundos (denaturação), 50°C por 30 segundos (hibridização) e 68°C por 8 minutos (extensão); (iv) extensão final de 68°C por 7 minutos. Para gerar o baculovírus recombinante, células de inseto Sf9 foram transfectadas com o bacmídeo-P1-2A+P3. Os procedimentos empregados para transfecção, amplificação, titulação e sequenciamento do baculovírus-P1-2A+P3 foram seguidos conforme previamente descrito para o baculovírus-VP1 (itens 4.1.6 - 4.1.9).

Quadro 4.5: Mistura dos reagentes utilizados nas reações em cadeia pela polimerase (PCR) para confirmar a transposição do cassete de expressão contendo os genes *P1-2A* e *P3*.

Reagente	Concentração	Volume/Reação
Água livre de DNase/RNase (Life Technologies)	----	38,80 µL
Tampão da PCR sem MgSO ₄ (Life Technologies)	10x	5,00 µL
dNTPs: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Life Technologies)	10 mM	1,00 µL
MgSO ₄ (Life Technologies)	50 mM	2,00 µL
<i>Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity</i> (Life Technologies)	5 U/µL	0,20 µL
Oligonucleotídeo sense (Fw)	10 µM	1,00 µL
Oligonucleotídeo anti-sense (Fw)	10 µM	1,00 µL
Bacmídeo	100 ng	1,00 µL
Volume final	---	50,00 µL

Quadro 4.6: Tamanhos dos *amplicons* esperados a partir do bacmídeo-P1-2A+P3 e do bacmídeo vazio, de acordo com os oligonucleotídeos iniciadores utilizados.

Oligonucleotídeos utilizados*	Bacmídeo	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb)
pUC/M13 Fw + pUC/M13 R	bacmídeo-P1-2A+P3	7947
P1-2A 480 Fw + PUC/M13 R	bacmídeo-P1-2A+P3	3027
PUC/M13 Fw + P3 42 Fw	bacmídeo-P1-2A+P3	4265
PUC/M13 Fw + PUC/M13 R	bacmídeo	300
P1-2A 480 Fw + PUC/M13 R	bacmídeo	---
PUC/M13 Fw + P3 42 Fw	bacmídeo	---

* As sequências dos oligonucleotídeos estão descritas no Anexo 5, Quadro A.5.1.

4.3.4. Análise da expressão e clivagem da poliproteína P1-2A por *Western blotting*

Células Sf9 foram semeadas em placas de 6 cavidades (9,6 cm², Nunc), na densidade de 1 x 10⁶ células/cavidade. Em seguida, as células foram infectadas com os estoques P2 de baculovírus-P1-2A, baculovírus-P1-2A+P3 e baculovírus vazio, utilizando MOI de 5. Após setenta e duas horas, as células infectadas foram separadas dos sobrenadantes por centrifugação e os precipitados foram lisados com 200 µL de tampão de amostra. Em seguida, 20 µL dos extratos e dos sobrenadantes foram analisados por *Western blotting*. Para identificar a poliproteína P1-2A e as proteínas estruturais liberadas após a clivagem realizada pela protease viral, optou-se por utilizar os seguintes anticorpos: (i) anticorpo policlonal de cabra anti-HAV (diluição 1:500, Abcam) e (ii) soro de camundongo hiperimune anti-VP1 (diluição 1:100, item 4.2.7). Os anticorpos anti-IgG de cabra conjugado com fosfatase alcalina (diluição 1:10.000, Abcam) e anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (diluição 1:10.000, Sigma-Aldrich) foram utilizados como anticorpos secundários.

4.3.5. Avaliação da formação das partículas virais destituídas de ácido nucleico (VLPs) por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Células Sf9 infectadas com baculovírus-VP1, baculovírus-P1-2A, baculovírus-P1-2A+P3 e baculovírus vazio foram coletadas 72 horas p.i. e rompidas com 200 µL do tampão de lise para células eucariontes (50 mM tris-HCl + 1% (v/v) Triton X-100 + 150 mM NaCl + 1 mM PMSF, pH 8,0). Os extratos totais das células infectadas foram analisados por ELISA comercial, utilizando o *kit* HAV-Antigen (Mediagnost). Esse teste é utilizado para detecção do HAV em fezes e em cultura de células. Os procedimentos para análise das amostras foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, 50 µL dos extratos celulares e dos controles (negativo e positivo) foram adicionados à placa. As amostras teste e o controle positivo foram mantidos por 2 horas a 37°C, em duas condições distintas: (i) com 50µL de tampão diluente e (ii) com 50 µL de soro contendo anticorpos neutralizantes para o HAV. Após o período de incubação, a placa foi lavada e o anticorpo secundário foi adicionado. Assim, prosseguiu-se com incubação a 37°C por 2 horas, seguida pelas etapas de lavagem e revelação. A absorbância foi medida no comprimento de onda de 450 nm, utilizando leitor para placas de ELISA (Sunrise, Tecan). As amostras que apresentaram absorbância maior do que o *cut-off* foram consideradas positivas. O valor do *cut-off* foi considerado como 10% do valor da absorbância do controle positivo. De acordo com o fabricante, o resultado do teste só deve ser considerado válido quando a absorbância do controle positivo for reduzida em pelo menos 80%, sob condições neutralizantes.

4.3.6. Avaliação da formação de partículas virais destituídas de ácido nucleico (VLPs) por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Células Sf9 foram infectadas com baculovírus-P1-2A+P3 e coletadas 72 horas p.i. Essas células foram incubadas com 200 µL tampão de lise para células eucariontes por 10 minutos, a temperatura ambiente (20°C – 22°C). Após centrifugação, o sobrenadante (fração solúvel) do extrato foi analisado por MET. Assim, telas de cobre de 2,5 mm foram previamente preparadas com Formvar e 10 µL da amostra foram colocados em contato com as telas. As telas foram incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, prosseguiu-se com a

contrastação com ácido fosfotúngstico (PTA) 2% (m/v), por 5 minutos. As telas foram observadas no MET JEM 1011 (JEOL) da Universidade de Brasília (UnB), com a colaboração do Prof. Dr. Bergmann Moraes Ribeiro, chefe do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia (UnB).

4.3.7. Avaliação da cinética de expressão das partículas virais destituídas de ácido nucleico (VLPs) por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Células Sf9 infectadas com baculovírus-P1-2A+P3 foram coletadas entre 24 e 144 horas p.i. As células foram lisadas com tampão de lise para células eucariontes (50 mM tris-HCl + 1% (v/v) Triton X-100 + 150 mM NaCl + 1 mM PMSF, pH 8,0) e os extratos totais foram analisados por ELISA comercial (HAV-Antigen, Mediatech).

4.3.8. Purificação das partículas virais destituídas de ácido nucleico (VLPs) por gradiente de sacarose

Cerca de 300 mL de células Sf9, cultivadas em suspensão, foram infectadas com a construção baculovírus-P1-2A+P3. A suspensão de células foi coletada 96 horas p.i. e submetida a 3 ciclos de congelamento e descongelamento. Em seguida, o material foi centrifugado a 30.000 rpm (rotor tipo 35, Beckman[®]) durante 1 hora a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em tampão 10 mM tris-HCl + 1% (v/v) triton X-100 + 100 mM NaCl (pH 7,4). O material ressuspenso foi centrifugado a 45.000 rpm (rotor SW55Ti, Beckman[®]) por 1:30 hora a 4°C, através de 1 mL de solução de sacarose a 30% (m/v), preparada em tampão 10 mM tris-HCl + 100 mM NaCl (pH 7,4). O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em tampão 10 mM Tris + 100 mM NaCl (pH 7,4). Como não foi possível solubilizar todo o precipitado, realizou-se mais uma etapa de centrifugação (10 minutos a 10.000 x g) para a remoção do material insolúvel. Em seguida, a fração solúvel foi centrifugado contra um gradiente descontínuo de sacarose 5%-30% (0,5 mL de sacarose a 5%, 1 mL a 10%, 1 mL a 20%, 1 mL a 25% e 1 mL a 30%). A etapa de centrifugação foi realizada a 40.000 rpm (rotor SW55Ti, Beckman[®]) por 2 horas a 4°C. Após a centrifugação, todo o líquido foi coletado em frações com cerca de 500 µL, a partir do fundo do tubo. O material coletado foi analisado por ELISA (HAV-Antigen) e por *Western blotting* (anticorpo de cabra anti-

HAV). O material que permaneceu insolúvel, após a etapa do colchão de sacarose a 30%, foi ressuspensão em tampão de amostra (item 4.1.11) e analisado por *Western blotting*.

4.3.9. Avaliação da solubilidade das partículas virais destituídas de ácido nucleico (VLPs) e da poliproteína P1-2A

Células Sf9 infectadas com baculovírus-P1-2A+P3 e baculovírus-P1-2A foram coletadas 96 horas p.i. As células foram lisadas com tampão de lise para células eucariontes (50 mM tris-HCl + 1% (v/v) Triton X-100 + 150 mM NaCl + 1 mM PMSF, pH 8,0) e as frações solúveis foram separadas dos precipitados por centrifugação. Os precipitados foram ressuspensos em tampão de lise, utilizando o mesmo volume empregado inicialmente para lisar as células. As frações solúveis e insolúveis foram analisadas por ELISA comercial (HAV-Antigen, Mediagnost), conforme as recomendações do fabricante.

4.3.10. Otimização das condições de extração das partículas virais destituídas de ácido nucleico (VLPs)

Precipitados obtidos a partir de 1×10^6 células infectadas com baculovírus-P1-2A+P3 foram utilizados para a otimização das condições de extração. Dessa forma, os precipitados foram ressuspensos em tampão 10 mM tris-HCl + 0,1 mM EDTA + 1 mM PMSF (pH 8,0), acrescido de diferentes detergentes. As amostras foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e, em seguida, submetidas a uma etapa de centrifugação a $10.000 \times g$, por 10 minutos. As frações solúveis, obtidas nas diferentes condições de extração, foram analisadas por ELISA comercial (HAV-Antigen). Os detergentes e as respectivas concentrações utilizadas estão descritas a seguir: (i) 1% triton X-100, (ii) 1% triton X-100 + 0,1% SDS, (iii) 1% DOC, (iv) 1% DOC + 0,1% SDS e (v) 1% SDS.

4.3.11. Predição da solubilidade das proteínas do vírus da hepatite A e do poliovírus humano

A ferramenta ESPRESSO, disponível on-line (<http://mbs.cbrc.jp/ESPRESSO>), foi utilizada para prever a solubilidade das proteínas do HAV (cepa HM-175; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, número de acesso: M14707.1) e do poliovírus humano (poliovírus tipo 2; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, número de acesso: AY184220). A solubilidade foi avaliada utilizando o modelo de predição baseado em propriedades estruturais de proteínas expressas em sistema livre de células - germe de trigo (Hirose & Noguchi, 2013).

4.4. Caracterização da resposta imune induzida pela proteína VP1 recombinante (VP1r) em modelo murino

A VP1r, produzida em *E. coli*, foi utilizada para realizar os ensaios de imunogenicidade em camundongos. Ressalta-se que os procedimentos experimentais foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ/RJ, protocolado com a numeração P-6/12-2 (Anexo 6).

4.4.1. Imunização e sangria dos camundongos

Camundongos da linhagem BALB/c, fêmeas, com idade entre 4 e 6 semanas, foram utilizados para o ensaio de imunogenicidade. Assim, grupos contendo 4 animais (n= 4) foram imunizados com 20 µg ou 2 µg da VP1r combinada a dois adjuvantes distintos, hidróxido de alumínio (Al(OH)₃; Alhydrogel[®], Brenntag) e adjuvante a base de saponina. Para facilitar o entendimento e a redação desse trabalho, o adjuvante a base de saponina será mencionado também como saponina. As formulações vacinais utilizadas estão descritas a seguir: (i) 20 µg da VP1r adsorvida em 0,2 mg de hidróxido de alumínio (Al(OH)₃), (ii) 2 µg da VP1r adsorvida em 0,2 mg Al(OH)₃, (iii) 0,2 mg Al(OH)₃, (iv) 20 µg da VP1r combinada a 12 µg de saponina, (v) 2 µg da VP1r combinada a 12 µg de saponina, (vi) 12 µg de saponina e

(vii) 40 unidades de ELISA (UE) da vacina comercial HAVRIX[®]. Os animais receberam 2 doses das formulações vacinais, pela via intramuscular, com intervalo de 15 dias entre cada inoculação. Os animais de todos os grupos foram submetidos a 4 sangrias via plexo retro-orbital. A primeira sangria foi realizada para a obtenção do soro pré-imune, antes do início das inoculações. As sangrias subsequentes foram realizadas 14, 29 e 45 dias após a primeira dose. A punção cardíaca e eutanásia foram realizadas 60 dias após a primeira dose. Os tubos contendo o sangue dos camundongos foram centrifugados por 10 minutos a 1000 x *g* e os soros obtidos foram armazenados a -20°C. Destaca-se que todas as etapas envolvendo o manejo de animais foram realizadas no LAEAN/Bio-Manguinhos, por profissionais treinados.

4.4.2. Determinação dos títulos de imunoglobulina G (IgG) anti-VP1

Os soros dos camundongos imunizados com as formulações vacinais foram analisados por ELISA *in house*, estabelecido para a detecção de anticorpos anti-VP1 da classe IgG. Os procedimentos para sensibilização e bloqueio das placas de 96 cavidades (MaxiSorp[®], Nunc) foram realizados conforme previamente descrito (item 4.2.9). Para a determinação dos títulos de IgG, os soros das sangrias de cada grupo foram reunidos em *pool*. Esses soros foram submetidos a diluição seriada na base 2, iniciando em 1:100. Os soros diluídos foram adicionados à placa e incubados por 1 hora a 37°C. Após a incubação, as amostras foram removidas e as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T. Em seguida, adicionou-se 100 µL do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (diluição de 1:30.000, Sigma-Aldrich) e prosseguiu-se com incubação a 37°C por 1 hora. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e, por fim, adicionou-se 100 µL da solução de TMB. As placas foram mantidas ao abrigo da luz por 10 minutos e a reação colorimétrica foi interrompida com 50 µL de solução 2 N de ácido sulfúrico. A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 450 nm, utilizando o leitor para placas de ELISA (Sunrise, Tecan). O título de anticorpos foi expresso como a diluição mais alta da amostra, na qual o valor de absorbância ainda permanecia 3 vezes maior do que o valor do controle negativo. Para avaliar se as diferenças entre os títulos de anticorpos eram estatisticamente significativas, os soros foram analisados individualmente, usando uma única diluição.

4.4.3. Análise das subclasses de imunoglobulina G (IgG) anti-VP1

Os procedimentos para a análise das subclasses de IgG foram seguidos conforme descrito para a titulação de IgG total (item 4.4.2), mas com alteração do anticorpo secundário. Para a detecção de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 foram utilizados os anticorpos listados a seguir: (i) anticorpo anti-IgG1 de camundongo conjugado com peroxidase, (ii) anticorpo anti-IgG2a de camundongo conjugado com peroxidase, (iii) anticorpo anti-IgG2b de camundongo conjugado com peroxidase e (iv) anticorpo anti-IgG3 de camundongo conjugado com peroxidase. Todos os conjugados foram adquiridos da empresa Santa Cruz Biotechnology e utilizados na diluição 1:3000.

4.4.4. Determinação do índice de avides (IA) dos anticorpos anti-VP1

A avides dos anticorpos anti-VP1 foi analisada por ELISA *in house*. Os procedimentos para a sensibilização e o bloqueio das placas de 96 cavidades (MaxiSorp[®], Nunc) foram realizados conforme previamente descrito (item 4.2.9). Após essas etapas, as placas foram incubadas por 1 hora a 37°C com o soro padrão e os soros dos camundongos imunizados com as formulações vacinais descritas no item 4.4.1. O soro padrão, na diluição de 1:20.000, foi adicionado às placas e diluições seriadas na base 2 foram realizadas. Os soros dos camundongos imunizados com as formulações vacinais foram diluídos da mesma forma, mas partindo de diluições iniciais diferentes. Após o tempo de incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão PBS-T. Em seguida, as amostras foram incubadas na presença e na ausência de tiocianato de amônio (agente caotrópico), por 15 minutos a temperatura ambiente. Para essa etapa, foi utilizada uma solução 0,29 M de tiocianato de amônio, pois essa concentração foi capaz de reduzir em aproximadamente 50% a absorbância do soro padrão. As placas foram lavadas e incubadas com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (diluição 1:30.000, Sigma-Aldrich). As placas foram incubadas a 37°C por 1 hora. Os procedimentos para revelação e leitura das placas foram conduzidos conforme descrito no item 4.4.2. O *software* SoftMaxPro foi empregado para calcular a concentração dos soros nas condições utilizadas, com e sem tiocianato de amônio. O índice de avides (IA) foi calculado a partir da fórmula descrita abaixo:

$$\text{Índice de Avidéz (IA)} = ([\text{soro com tiocianato}] / [\text{soro sem tiocianato}]) \times 100$$

Ressalta-se que o soro hiperimune anti-VP1, produzido em camundongos (item 4.2.7), foi utilizado como soro padrão. A faixa de aceitação para o IA desse soro foi de 46% a 53%. Testes com valores fora da faixa de aceitação para o soro padrão não foram considerados.

4.4.5. Avaliação da reatividade cruzada entre os anticorpos anti-VP1 e o vírus da hepatite A por ensaio imunoenzimático (ELISA) competitivo

Os soros dos camundongos imunizados com as formulações vacinais foram analisados com o *kit* Bioelisa HAV (Biokit). Ressalta-se que esse teste é um ELISA competitivo para detecção de anticorpos anti-HAV, no qual o vírus da hepatite A inativado encontra-se fixado à placa. Os procedimentos para análise das amostras foram seguidos conforme determinado pelo fabricante. Resumidamente, 10 µL dos soros dos camundongos (*pool*), sem diluição prévia, foram adicionados à placa juntamente com 100 µL do anticorpo anti-HAV conjugado com peroxidase. Após 1 hora de incubação a 37°C, a placa foi submetida à lavagem e revelação com o substrato TMB. A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 450 nm, utilizando o leitor para placas de ELISA (Sunrise, Tecan). A amostra foi considerada positiva quando a razão entre *cut-off* e a absorbância foi maior ou igual a 1. Ressalta-se que o *cut-off* foi calculado de acordo com as instruções do fabricante.

4.4.6. Avaliação da reatividade cruzada entre os anticorpos anti-VP1 e o vírus da hepatite A por ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto

Os soros dos camundongos imunizados com as formulações vacinais foram analisados com o *kit* Bioelisa HAV (Biokit), mas com alterações. Esse teste é, originalmente, baseado em um ensaio competitivo, no qual os anticorpos da amostra teste competem com o conjugado anti-HAV pela ligação ao HAV inativado presente na placa. Assim, o teste foi modificado para um ensaio indireto. Brevemente, 100 µL

dos soros dos camundongos (*pool*), na diluição 1:2, foram adicionados à placa e prosseguiu-se com incubação a 37°C por 1 hora. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS-T e adicionou-se 100 µL do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase, na diluição de 1:70.000. Após incubação por 1 hora a 37°C, a placa foi lavada e submetida ao protocolo de revelação com TMB. A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 450 nm, utilizando o leitor para placas de ELISA (Sunrise, Tecan).

4.4.7. Imunização dos camundongos seguida por dose subimunogênica de HAVRIX®

Camundongos da linhagem BALB/c foram imunizados conforme previamente descrito (item 4.4.1). A única alteração realizada consistiu na inoculação de uma dose de reforço da HAVRIX® (10 UE), realizada 30 dias após a primeira dose. Para verificar a presença de resposta anamnésica, os soros dos animais imunizados foram avaliados por ELISA competitivo (item 4.4.5) e por ELISA indireto (item 4.4.6).

4.4.8. Análise estatística

As análises foram realizadas com o auxílio do *software* GraphPad Prism 5. Os dados foram reportados como média ± erro-padrão da média. Os níveis de significância foram avaliados por análise de variância (ANOVA) ou teste t de Student bi-caudal. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Obtenção da proteína VP1 recombinante (VP1r) a partir do sistema baculovírus/células de inseto

Com o objetivo de expressar a VP1r no sistema baculovírus/células de inseto, o gene *VP1* foi removido do vetor pIDTSmart Kan e subclonado no vetor doador pFastBac™ Dual, de modo a ficar sob o controle transcricional do promotor da poliedrina. Em seguida, foram realizadas clivagens enzimáticas com as endonucleases de restrição *Xba*I e *Hind*III para confirmar a clonagem do gene *VP1* no vetor pFastBac™ Dual. Assim, foram observados fragmentos de aproximadamente 900 pb, os quais correspondiam ao tamanho esperado para o gene *VP1* (Figura 5.1). Os clones obtidos foram sequenciados e o resultado mostrou que as sequências do gene *VP1* estavam de acordo com a sequência sintetizada pela empresa Integrated DNA Technologies (Anexo 8). Dessa forma, a construção pFastBac™ Dual+VP1 clone 9 foi selecionada para ser utilizada nos ensaios de transposição.

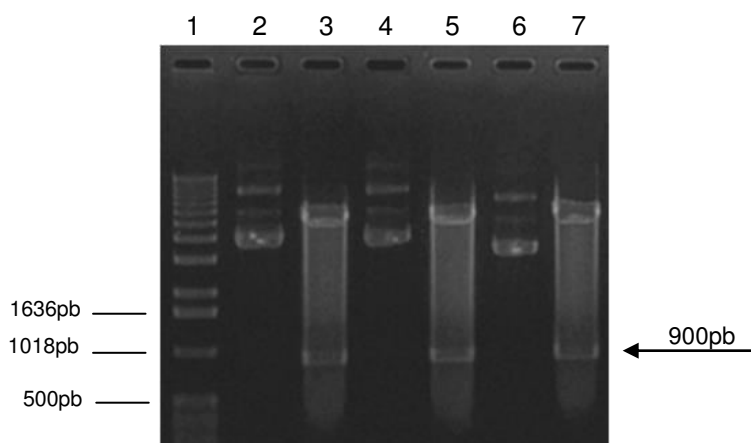


Figura 5.1: Eletroforese em gel de agarose (1,2%) dos produtos da clivagem enzimática da construção pFastBac™ Dual+VP1 com as endonucleases de restrição *Xba*I e *Hind*III. Linha 1- marcador 1kb DNA Ladder™ (Life Technologies); linha 2- clone 2 não digerido; linha 3- clone 2 digerido; linha 4- clone 3 não digerido; linha 5- clone 3 digerido; linha 6- clone 9 não digerido; linha 7- clone 9 digerido.

A construção pFastBac™ Dual+VP1 clone 9 foi utilizada para transformar células competentes DH10Bac™. Para confirmar a ocorrência da transposição do gene *VP1*, os bacmídeos extraídos foram submetidos à PCR. Foram observados *amplicons* de 3460 pb, 2907 pb e 1463 pb, confirmando a transposição do gene *VP1* para o bacmídeo (Figura 5.2). O *amplicon* obtido com os oligonucleotídeos pUC/M13 Fw e pUC/M13 R foi sequenciado e analisado. A sequência do gene *VP1*, presente no bacmídeo recombinante, estava de acordo com a sequência do gene sintético (Anexo 8).

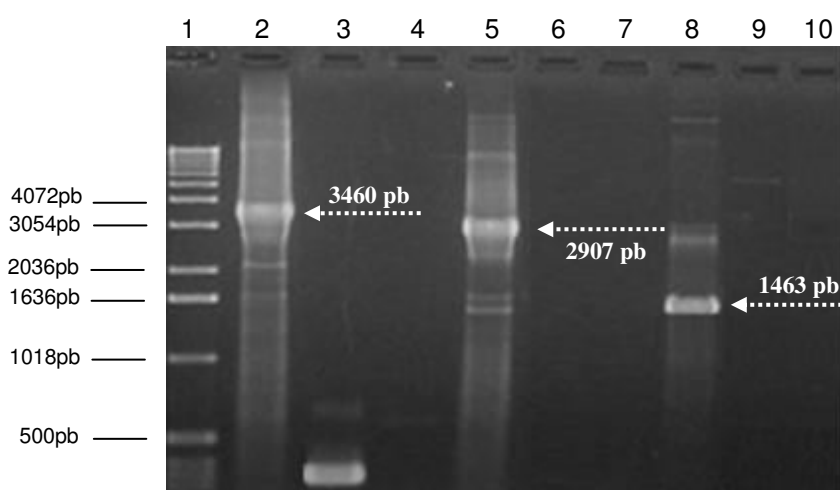


Figura 5.2: Eletroforese em gel de agarose (1,2%) dos *amplicons* obtidos pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) do bacmídeo-VP1. Linha 1- marcador 1kb DNA Ladder™ (Life Technologies); linha 2- bacmídeo-VP1 (pUC/M13 Fw e pUC/M13 R); linha 3- bacmídeo vazio (pUC/M13 Fw e pUC/M13 R); linha 4- controle de mix (pUC/M13 Fw e pUC/M13 R); linha 5- bacmídeo-VP1 (pUC/M13 Fw e VP1ins R); linha 6- bacmídeo vazio (pUC/M13 Fw e VP1ins R); linha 7- controle de mix (pUC/M13 Fw e VP1ins R); linha 8- bacmídeo-VP1 (VP1ins Fw e pUC/M13 R); linha 9- bacmídeo vazio (VP1ins Fw e pUC/M13 R); linha 10- controle de mix (VP1ins Fw e pUC/M13 R).

Células Sf9 foram utilizadas para gerar os baculovírus recombinantes. O estoque P2 de baculovírus-VP1 foi sequenciado e analisado. O resultado do sequenciamento mostrou que a sequência do gene *VP1* do baculovírus estava de acordo com a sequência molde sintetizada (Anexo 8).

Com o objetivo de avaliar a expressão da VP1r, células de inseto Sf9 foram infectadas com as construções baculovírus-VP1 e baculovírus vazio. As células infectadas e os sobrenadantes foram coletados 72 horas p.i. e analisados por SDS-

PAGE, seguida por coloração com Coomassie[®] Blue. Contudo, não foram observadas bandas referentes à VP1r (dados não apresentados).

O sobrenadante e o extrato celular foram analisados por *Western blotting*, utilizando o anticorpo de cabra anti-HAV (Figura 5.3). Através dessa técnica, foi possível detectar uma banda específica no extrato celular. Essa banda apresentou aproximadamente 35 kDa, o que corresponde à massa molecular esperada para a VP1 (~34 kDa) mais a cauda de histidina (~1 kDa). As bandas inferiores a 35 kDa, provavelmente, correspondem a degradação proteica. Ressalta-se que não foram observadas bandas específicas no sobrenadante.

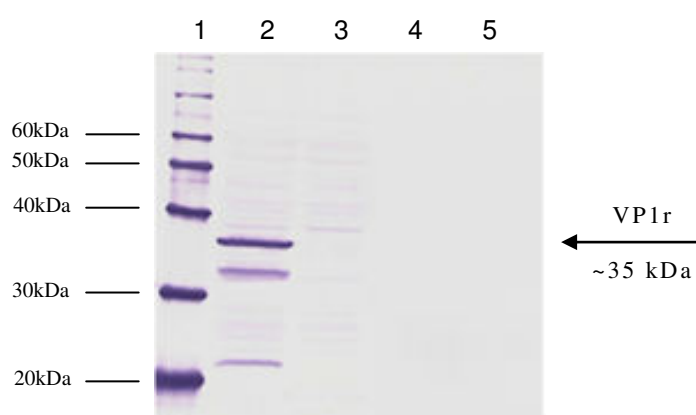


Figura 5.3: *Western blotting* dos extratos e dos sobrenadantes das células Sf9 infectadas com baculovírus-VP1 e baculovírus vazio, após 72 horas de infecção. Linha 1- marcador MagicMark[™] XP Western Protein Standard (Life Technologies); linha 2- extrato baculovírus-VP1; linha 3- extrato baculovírus vazio; linha 4- sobrenadante baculovírus-VP1; linha 5- sobrenadante baculovírus vazio. Anticorpo primário: anticorpo policlonal de cabra anti-HAV.

Para realizar a purificação da VP1r, células Sf9 foram infectadas com baculovírus-VP1. As células foram coletadas 96 horas p.i., pois este tempo possibilitou a obtenção de maiores níveis de expressão da proteína recombinante (dados não mostrados). Em seguida, as células foram lisadas e a fração solúvel foi submetida à IMAC. O grau de pureza e a identidade da VP1r purificada foram avaliados por *SDS-PAGE* (Figura 5.4) e *Western blotting* (Figura 5.4), respectivamente. O resultado da *SDS-PAGE* indicou que a amostra foi enriquecida na VP1r e grande parte dos contaminantes foram removidos. O *Western blotting*

confirmou a identidade da VP1r purificada. A recuperação da VP1r submetida à IMAC foi de aproximadamente 0,15 mg para 300 mL de cultura infectada (0,5 mg/L).

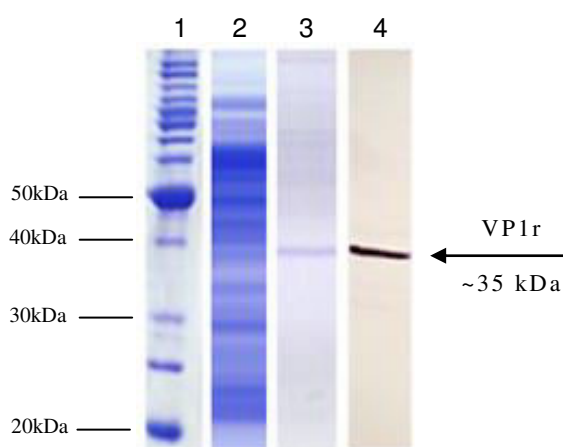


Figura 5.4: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (*SDS-PAGE*, 4%/12%) e *Western blotting* da proteína VP1 recombinante expressa em células de inseto e purificada por cromatografia de afinidade por íons metálicos. (*SDS-PAGE*) Linha 1- marcador BenchMark™ Protein Ladder (Life Technologies); linha 2- lisado de células Sf9 infectadas com baculovírus-VP1; linha 3- VP1 purificada. (*Western blotting*) Linha 4- VP1 purificada. Anticorpo primário: anticorpo policlonal de cabra anti-HAV.

Com o objetivo de analisar o perfil de distribuição intracelular da VP1r, células Sf9 foram infectadas com baculovírus-VP1 e coletadas entre 24 e 96 horas p.i. As frações obtidas após a lise foram analisadas por *Western blotting* (Figura 5.5). Foi possível observar que a VP1r se distribuiu entre a fração solúvel e insolúvel do extrato celular em todos os tempos analisados. Esse resultado sugere que parte da VP1r pode estar formando agregados insolúveis no interior das células infectadas, o que pode ter contribuído para a baixa recuperação da proteína após a purificação.

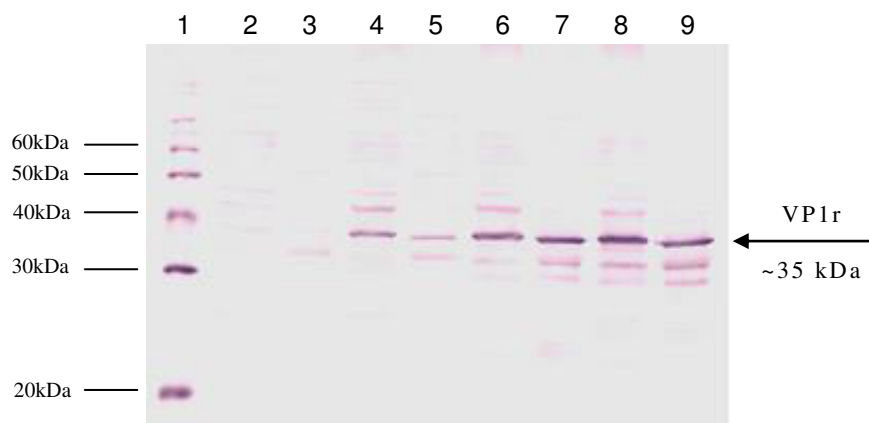


Figura 5.5: *Western blotting* das frações solúveis e insolúveis dos extratos de células Sf9 infectadas com baculovírus-VP1, coletadas entre 24h e 96h pós-infecção. Linha 1 - marcador MagicMark™ XP Western Protein Standard (Life Technologies); linha 2- fração solúvel 24h; linha 3- fração insolúvel 24h; linha 4- fração solúvel 48h; linha 5- fração insolúvel 48h; linha 6- fração solúvel 72h; linha 7- fração insolúvel 72h; linha 8- fração solúvel 96h; linha 9- fração insolúvel 96h. Anticorpo primário: anticorpo policlonal de cabra anti-HAV.

Com o intuito de evitar a formação de agregados insolúveis nas células e aumentar a massa de proteína produzida, optou-se por direcionar a expressão da VP1r para o meio extracelular, utilizando o peptídeo sinal HBM. Desse modo, o gene sintético *HBM-VP1* foi removido do vetor pIDTSMART-KAN e subclonado no vetor doador pFastBac™ Dual, de modo a ficar sob o controle transcricional do promotor da poliedrina. Para confirmar a clonagem, foram realizadas clivagens enzimáticas com as endonucleases de restrição *Xba*I e *Hind*III. Foram observados fragmentos de aproximadamente 1000 pb, os quais correspondem ao gene *HBM-VP1* (Figura 5.6). Os clones obtidos foram sequenciados e analisados (Anexo 9). A construção pFastBac™ Dual+HBM-VP1 clone 1 foi selecionada e utilizada na etapa de transposição.

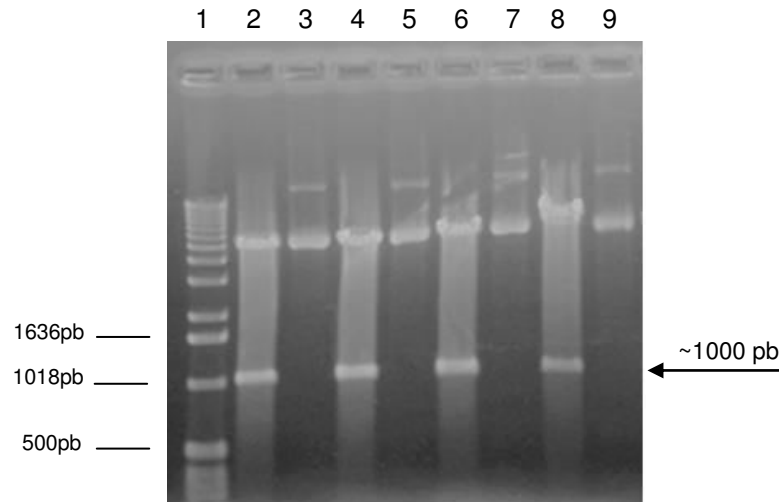


Figura 5.6: Eletroforese em gel de agarose (1,2%) dos produtos da clivagem enzimática dos possíveis clones recombinantes pFastBac™ Dual+HBM-VP1 com as endonucleases *Xba*I e *Hind*III. Linha 1- marcador 1kb DNA Ladder™ (Life Technologies); linha 2- clone 1 digerido; linha 3- clone 1 não digerido; linha 4- clone 2 digerido; linha 5- clone 2 não digerido; linha 6- clone 3 digerido; linha 7- clone 3 não digerido; linha 8- clone 4 digerido; linha 9- clone 4 não digerido.

Células DH10Bac™ foram transformadas com a construção pFastBac™ Dual+HBM-VP1 clone 1. Para confirmar a transposição do cassete de expressão, o bacmídeo recombinante foi submetido à PCR. Foram observados *amplicons* de 3583 pb, 2647 pb e 1243 pb, confirmando a transposição do gene *HBM-VP1* para o bacmídeo (Figura 5.7). O *amplicon* obtido com os oligonucleotídeos pUC/M13 Fw e pUC/M13 R foi sequenciado e analisado (Anexo 9). A sequência do gene *HBM-VP1* estava de acordo com a sequência esperada para o gene sintético.

Células de inseto Sf9 foram utilizadas para gerar o baculovírus-HBM-VP1. O estoque P2 desse vírus foi sequenciado e analisado. O resultado do sequenciamento mostrou que a sequência do gene *HBM-VP1* do baculovírus estava de acordo com a sequência do gene sintético (Anexo 9).

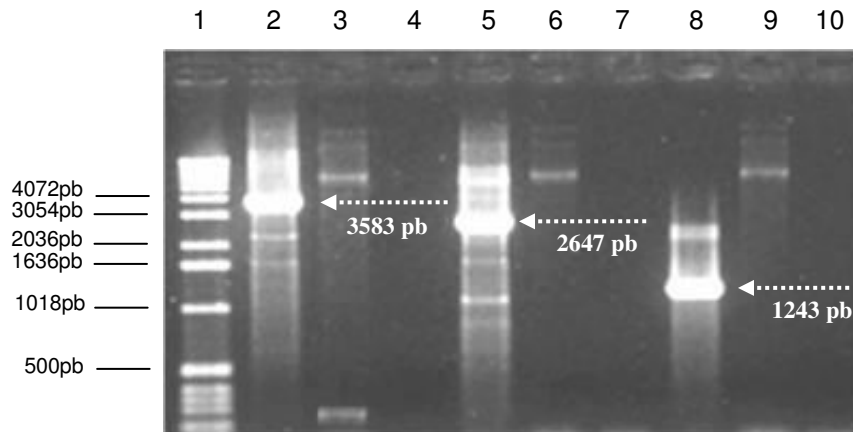


Figura 5.7: Eletroforese em gel de agarose (1,2%) dos *amplicons* obtidos pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) do bacmídeo+HBM-VP1. Linha 1- marcador 1kb DNA Ladder™ (Life Technologies); linha 2- bacmídeo+HBM-VP1 (pUC/M13 Fw e pUC/M13 R); linha 3- bacmídeo vazio (pUC/M13 Fw e pUC/M13 R); linha 4- controle de mix (pUC/M13 Fw e pUC/M13 R); linha 5- bacmídeo+HBM-VP1 (pUC/M13 Fw e VP1 368 R); linha 6- bacmídeo vazio (pUC/M13 Fw e VP1 368 R); linha 7- controle de mix (pUC/M13 Fw e VP1 368 R); linha 8- bacmídeo+HBM-VP1 (VP1 368 Fw e pUC/M13 R); linha 9- bacmídeo vazio (VP1 368 Fw e pUC/M13 R); linha 10- controle de mix (VP1 368 Fw e pUC/M13 R).

Para avaliar a funcionalidade da construção baculovírus+HBM-VP1, foi realizado o ensaio de expressão em células Sf9. Bandas específicas foram detectadas apenas no extrato celular, indicando que a VP1r não foi secretada (Figura 5.8). Duas bandas foram observadas no extrato celular, entre 30 kDa e 40 kDa, as quais podem corresponder a proteína HBM-VP1 (38 kDa) e a proteína VP1 após a clivagem do peptídeo sinal (35 kDa).

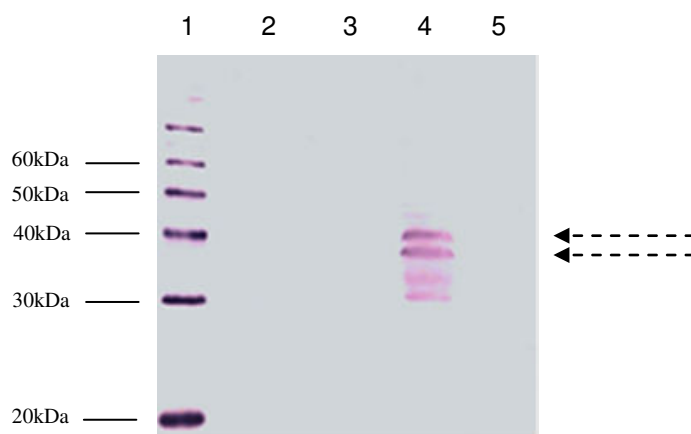


Figura 5.8: *Western blotting* dos extratos e dos sobrenadantes das células Sf9 infectadas com baculovírus-HBM-VP1 e baculovírus vazio, após 72 horas de infecção. Linha 1- marcador MagicMark™ XP Western Protein Standard (Life Technologies); linha 2- sobrenadante baculovírus+HBM-VP1; linha 3- sobrenadante baculovírus vazio; linha 4- extrato baculovírus-HBM-VP1; linha 5- extrato baculovírus vazio. As setas indicam bandas que correspondem à proteína VP1. Anticorpo primário: anticorpo policlonal de cabra anti-HAV.

Com o objetivo de verificar o perfil de distribuição intracelular da construção HBM-VP1, células Sf9 foram infectadas com baculovírus+HBM-VP1 e coletadas entre 24 e 96 horas p.i. Foi observado que a construção HBM-VP1 se distribuiu entre as frações solúvel e insolúvel, com grande acúmulo na fração insolúvel, principalmente, a partir de 72 horas p.i (Figura 5.9). A baixa solubilidade apresentada pela proteína HBM-VP1 pode ter afetado o correto direcionamento da molécula para a via de secreção da célula.

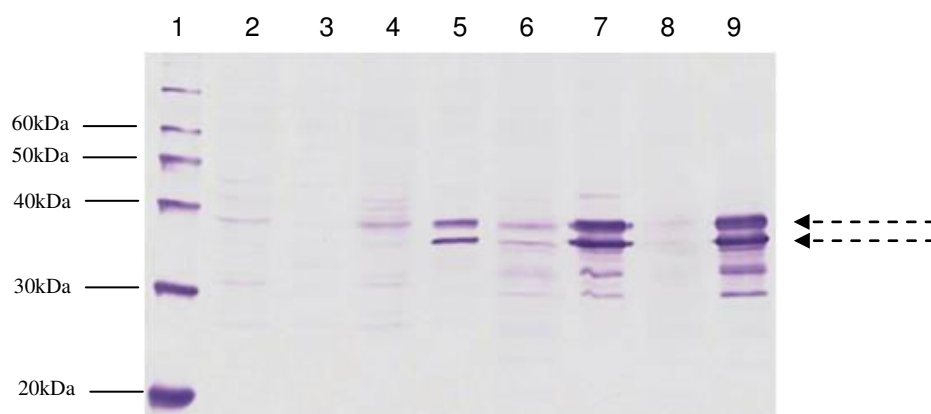


Figura 5.9: *Western blotting* das frações solúveis e insolúveis das células Sf9 infectadas com baculovírus+HBMVP1, coletadas entre 24h e 96h pós-infecção. Linha 1- marcador MagicMark™ XP Western Protein Standard (Life Technologies); linha 2- fração solúvel 24h; linha 3- fração insolúvel 24h; linha 4- fração solúvel 48h; linha 5- fração insolúvel 48h; linha 6- fração solúvel 72h; linha 7- fração insolúvel 72h; linha 8- fração solúvel 96h; linha 9- fração insolúvel 96h. As setas pontilhadas indicam bandas que correspondem à proteína VP1. Anticorpo primário: anticorpo policlonal de cabra anti-HAV.

5.2. Obtenção da proteína VP1 recombinante (VP1r) a partir de *Escherichia coli*

O gene *VP1* foi amplificado através da PCR. Foi observada uma banda de aproximadamente 900 pb, correspondente ao tamanho esperado para o gene *VP1* (Figura 5.10). Em seguida, o produto da PCR foi clonado no vetor de expressão pET100/D-TOPO®. Para confirmar a clonagem, os plasmídeos extraídos a partir dos possíveis clones recombinantes foram analisados pela PCR (Figura 5.11). Todos os plasmídeos analisados apresentaram uma banda de aproximadamente 900 pb, indicando a presença do gene *VP1*. Os plasmídeos foram sequenciados e analisados. O resultado do sequenciamento mostrou que a sequência do gene *VP1* da construção pET100/D-TOPO®+VP1 clone 24 estava de acordo com a sequência molde (Anexo 10). Portanto, essa construção foi selecionada e utilizada para transformar células de *E. coli*, cepa BL-21 Star™ (DE3).

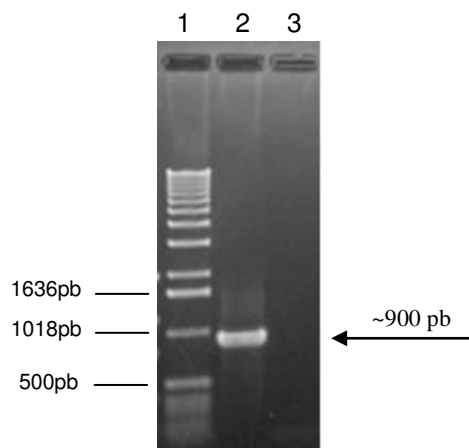


Figura 5.10: Eletroforese em gel de agarose (1,2%) do gene *VP1* amplificado pela reação em cadeia pela polimerase (PCR). Linha 1- marcador 1kb DNA Ladder™ (Life Technologies); linha 2- gene *VP1* amplificado; linha 3- controle do mix.

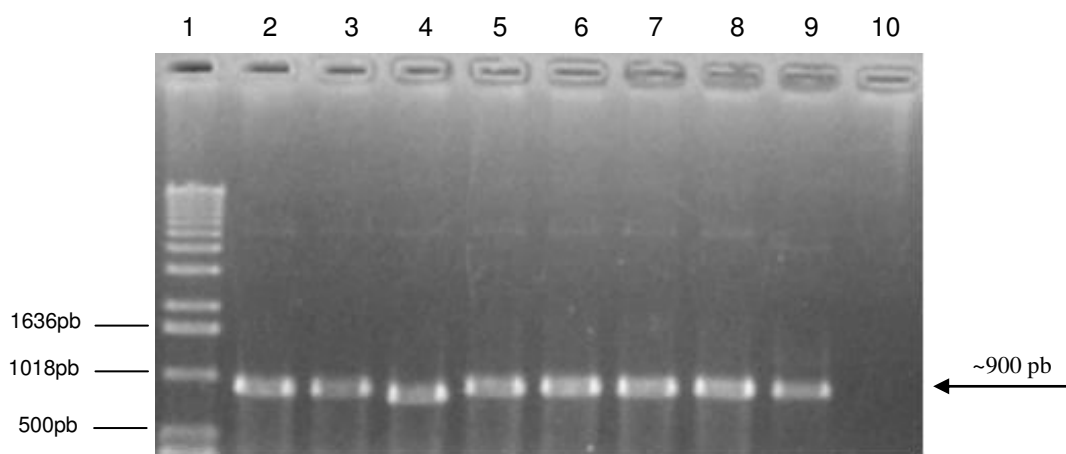


Figura 5.11: Eletroforese em gel de agarose (1,2%) dos *amplicons* obtidos pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) a partir dos possíveis clones recombinantes pET100/D-TOPO®+VP1. Linha 1- marcador 1kb DNA Ladder™ (Life Technologies); linha 2- clone 2; linha 3- clone 4; linha 4- clone 8; linha 5- clone 9; linha 6- clone 10; linha 7- clone 24; linha 8- clone 25; linha 9- clone 26; linha 10- controle do mix.

Para avaliar a expressão da VP1r em *E. coli*, os extratos das células induzidas e não induzidas foram analisados por *SDS-PAGE* (Figura 5.12). Foi detectada uma banda de aproximadamente 38 kDa nas células induzidas, correspondente ao tamanho previsto para a VP1r expressa no vetor pET100/D-TOPO[®]. A análise da solubilidade permitiu identificar que a VP1r se distribuiu entre a fração solúvel e insolúvel do extrato celular, com maior acúmulo na fração insolúvel (Figura 5.13).

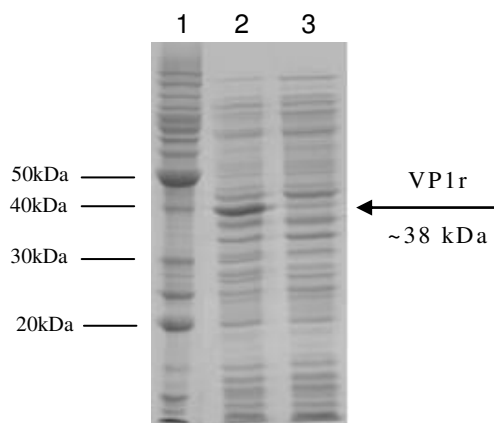


Figura 5.12: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (*SDS-PAGE*, 4%/12%) do extrato de células BL-21 Star[™] (DE3) induzidas e não induzidas para a expressão da proteína VP1 recombinante. Linha 1- marcador BenchMark[™] Protein Ladder (Life Technologies); linha 2- extrato de BL-21 induzida; linha 3- extrato de BL-21 não induzida.

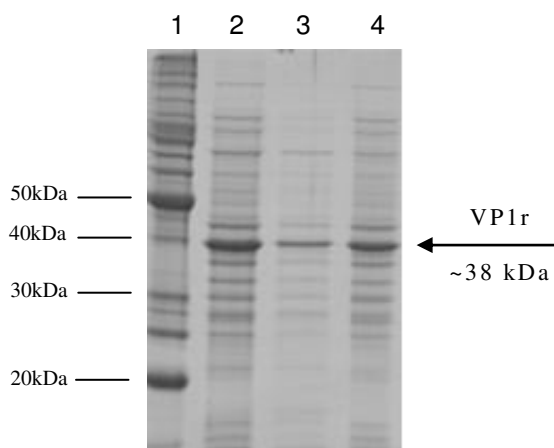


Figura 5.13: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (*SDS-PAGE*, 4%/12%) para avaliar a solubilidade da proteína VP1 recombinante em BL-21. Linha 1- marcador BenchMark[™] Protein Ladder (Life Technologies); linha 2- extrato total; linha 3- fração solúvel; linha 4- fração insolúvel.

A VP1r, produzida em *E. coli*, foi purificada por IMAC (Figura 5.14). Como a VP1r apresentou baixa interação com a resina, foi necessário acrescentar uréia a 3 M no tampão de ligação à resina e nos tampões utilizados durante a cromatografia. A VP1r foi eluída com tampão contendo 500 mM de imidazol e analisada por *SDS-PAGE* (Figura 5.15 A) e *Western blotting* (Figura 5.15 B). A VP1r foi obtida com grau de homogeneidade satisfatório e foi reconhecida pelo anticorpo policlonal de cabra anti-HAV. Após a etapa de purificação, a recuperação da VP1r foi de aproximadamente 50 mg/L. Ressalta-se que a concentração de LPS na amostra purificada ficou abaixo do limite de detecção do método utilizado, ou seja, menor do que 0,05 EU/mL.

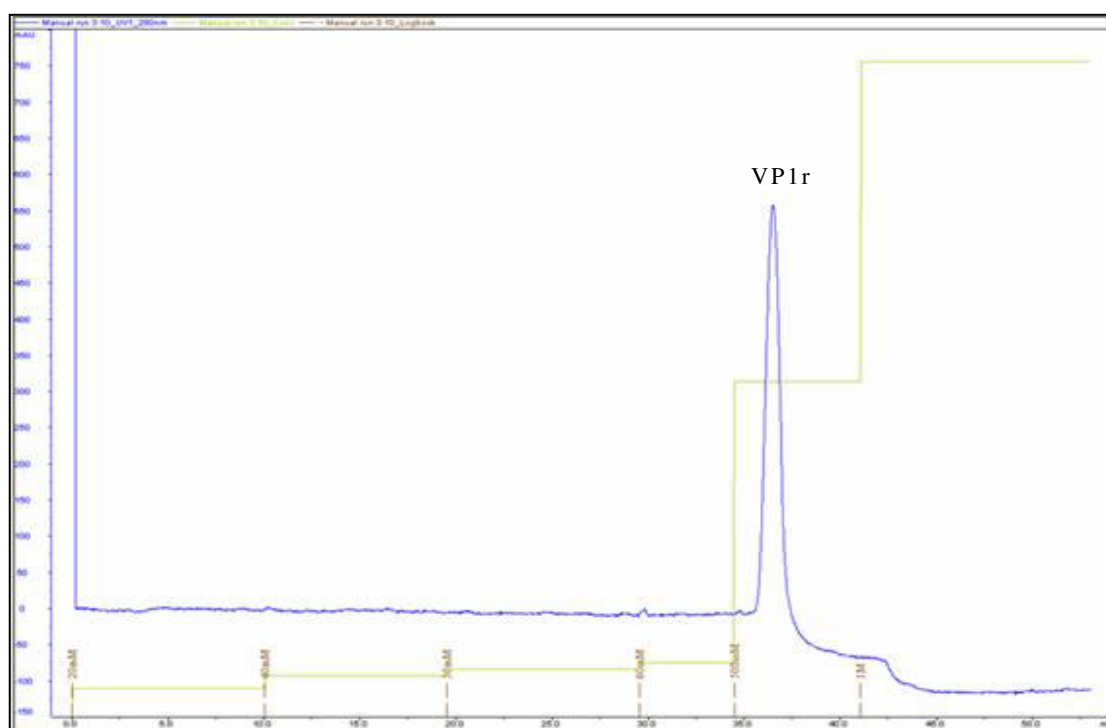


Figura 5.14: Cromatograma da purificação da VP1 recombinante (VP1r) através da afinidade por íons metálicos. No eixo vertical, estão representados os valores de absorbância em mAU ($\lambda = 280\text{nm}$). No eixo horizontal, estão representados os volumes em mililitros do tampão aplicado no sistema. O pico em azul indica a fração eluída com tampão 20 mM Tris-HCl + 3 M uréia + 0,5% triton X-100 + 500 mM de imidazol (pH 8,0).

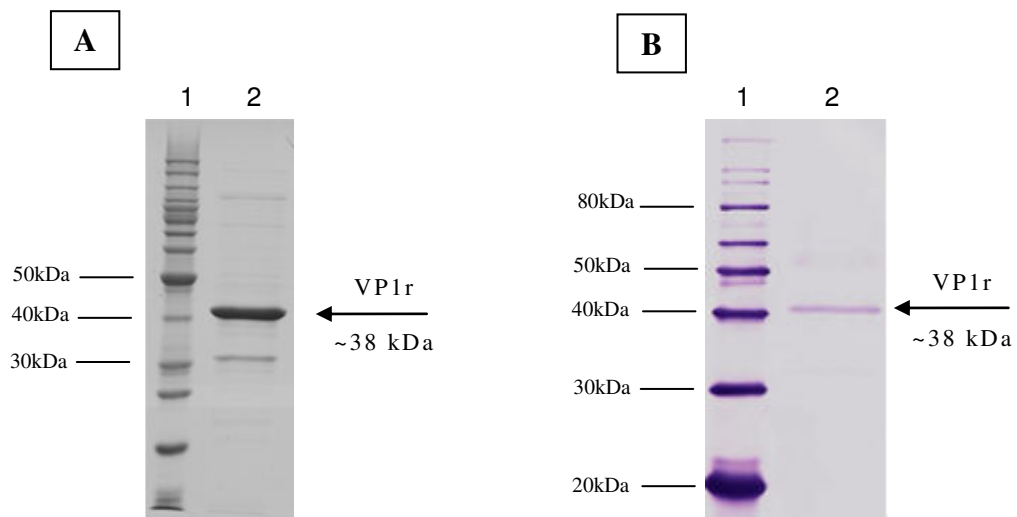


Figura 5.15: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (*SDS-PAGE*, 4%/12%) e *Western blotting* da proteína VP1 recombinante expressa em *Escherichia coli* e purificada por cromatografia de afinidade por íons metálicos. (A, *SDS-PAGE*) Linha 1- marcador BenchMark™ Protein Ladder (Life Technologies); linha 2- VP1 recombinante purificada. (B, *Western blotting*) Linha 1- marcador BenchMark™ Protein Ladder (Life Technologies); linha 2- VP1 recombinante purificada. Anticorpo primário: anticorpo policlonal de cabra anti-HAV.

A reatividade da VP1r frente ao *pool* dos soros de pacientes infectados com o HAV foi avaliada por ELISA *in house*. A VP1r mostrou ser antigênica, já que foi reconhecida de forma específica por anticorpos presentes no soro positivo (Figura 5.16). Como o anticorpo secundário utilizado foi o anti-Ig total, não foi possível atribuir quais classes de Igs eram capazes de reconhecer a VP1r em ELISA. Dessa forma, foram conduzidos testes adicionais, utilizando os anticorpos anti-IgM e anti-IgG. A VP1r foi reconhecida tanto por anticorpos da classe IgM quanto da classe IgG (Figura 5.17 e Figura 5.18).

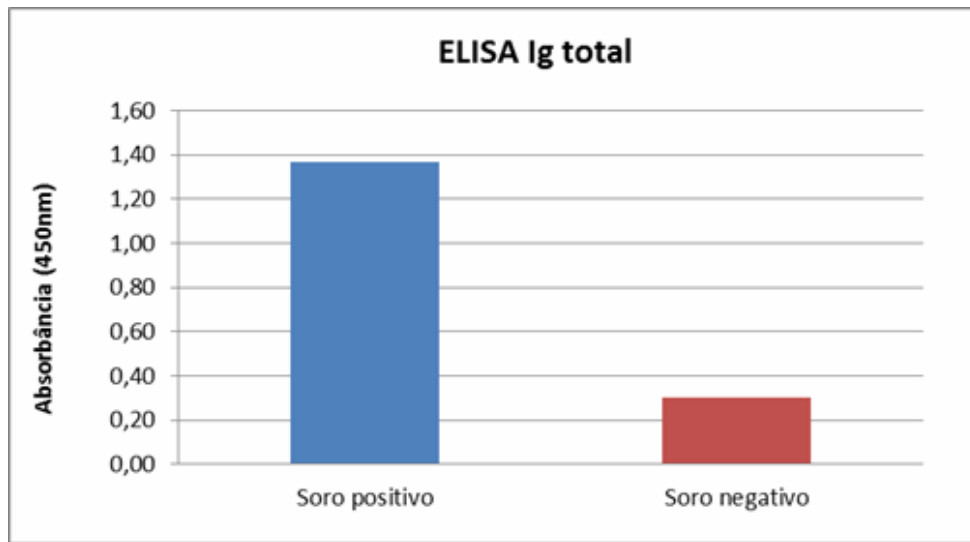


Figura 5.16: Ensaio imunoenzimático (ELISA) *in house* para avaliar a reatividade da VP1 recombinante com anticorpos totais presentes no *pool* dos soros de pacientes infectados com o vírus da hepatite A. No eixo vertical, encontram-se os valores de absorbância ($\lambda = 450\text{nm}$) e no eixo horizontal, as amostras testadas.

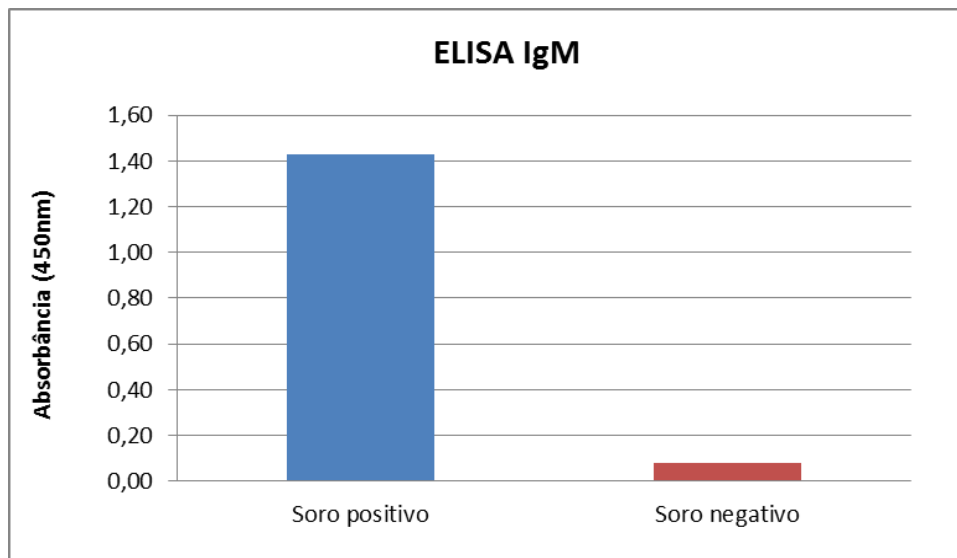


Figura 5.17: Ensaio imunoenzimático (ELISA) *in house* para avaliar a reatividade da VP1 recombinante com anticorpos da classe IgM presentes no *pool* dos soros de pacientes infectados com o vírus da hepatite A. No eixo vertical, encontram-se os valores de absorbância ($\lambda = 450\text{nm}$) e no eixo horizontal, as amostras testadas.

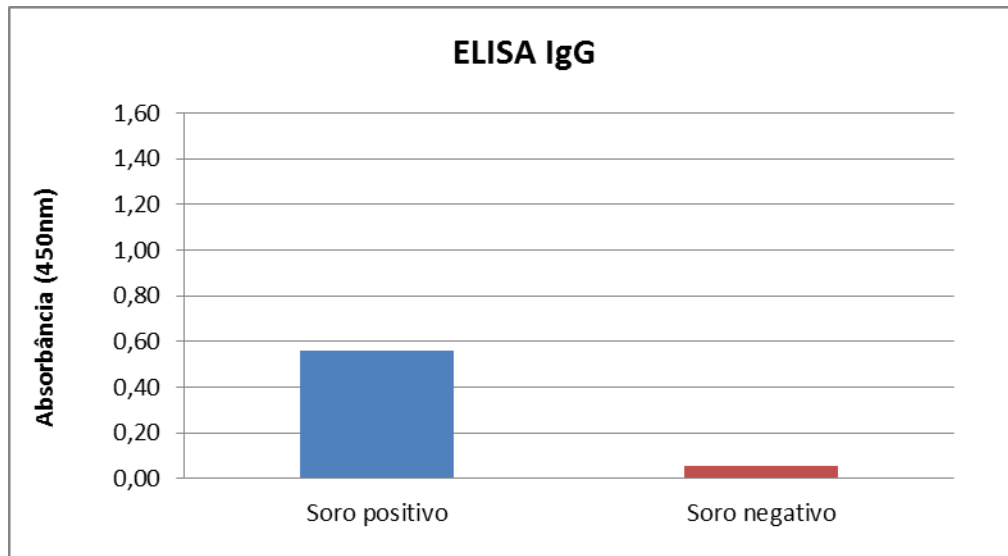


Figura 5.18: Ensaio imunoenzimático (ELISA) *in house* para avaliar a reatividade da VP1 recombinante com anticorpos da classe IgG presentes no *pool* dos soros de pacientes infectados com o vírus da hepatite A. No eixo vertical, encontram-se os valores de absorbância ($\lambda = 450\text{nm}$) e no eixo horizontal, as amostras testadas.

Para avaliar o potencial da VP1r como insumo para o diagnóstico da hepatite A, os soros de pacientes, infectados e não infectados com o HAV, foram analisados individualmente por ELISA *in house* para detecção de IgM. A curva ROC foi utilizada para determinar o valor ótimo do *cut-off* (0,650), no qual os valores de sensibilidade (93,7%) e especificidade (100%) foram mais equilibrados (Figura 5.19). O valor da área sob a curva (0,994) mostrou que o desempenho do método foi elevado (Tabela 5.1). Apesar do número limitado de amostras analisadas, esses dados indicam que a VP1r, produzida no presente trabalho, possui potencial para ser utilizada na detecção de IgM anti-HAV.

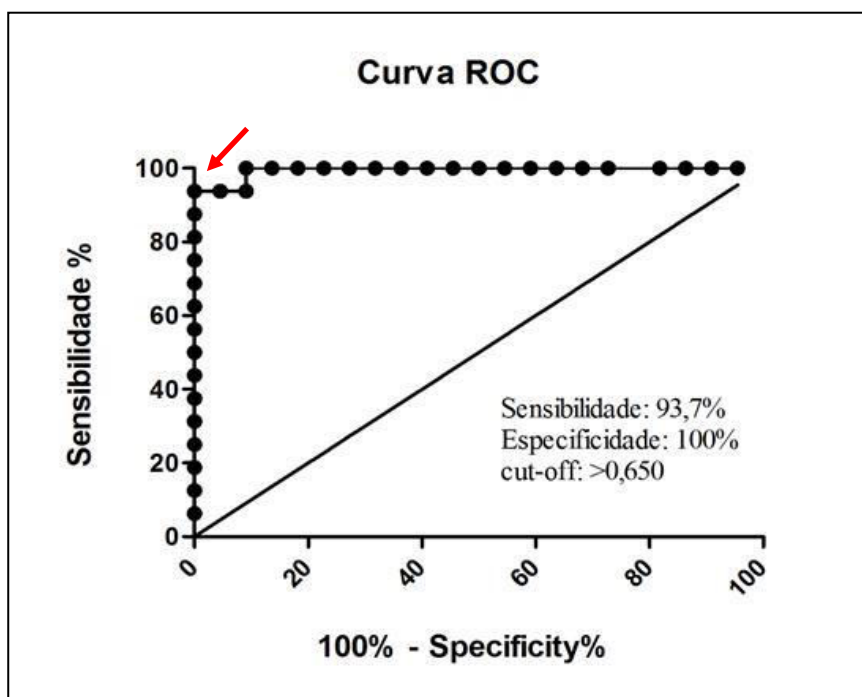


Figura 5.19: Curva ROC construída para avaliar o ensaio imunoenzimático (ELISA) *in house* (VP1r) para detecção de anticorpos da classe IgM nos soros de pacientes infectados com o vírus da hepatite A. No eixo vertical, encontram-se os valores de sensibilidade (%) e no eixo horizontal, os valores de 100 – especificidade (%). A seta indica o ponto de corte ótimo (*cut-off* = 0,650), que apresenta 93,7% de sensibilidade e 100% de especificidade.

Tabela 5.1: Análise da curva ROC construída para avaliar o desempenho do ensaio imunoenzimático (ELISA) *in house* (VP1r) para detecção de anticorpos da classe IgM nos soros de pacientes infectados com o vírus da hepatite A.

ELISA in house (VP1r) para detecção de IgM – curva ROC	
Área sob a curva	0,994
Sensibilidade (%)	93,7
Intervalo de confiança de 95% para a sensibilidade	69,8-99,8
Especificidade (%)	100,0
Intervalo de confiança de 95% para a especificidade	84,6-100,0
<i>Cut-off</i> ótimo	0,650

5.3. Obtenção das partículas virais destituídas de ácido nucleico (VLPs) a partir do sistema baculovírus/células de inseto

O gene *P1-2A* foi removido do vetor pUCIDT e clonado no vetor doador pFastBac™ Dual, de modo a ficar sob o controle do promotor da poliedrina. Para confirmar a clonagem, foram realizadas clivagens enzimáticas com as endonucleases de restrição *Xba*I e *Not*I (Figura 5.20). Foram observados fragmentos de aproximadamente 3000 pb, correspondentes a região *P1-2A*. A construção pFastBac™ Dual+*P1-2A* clone 8 foi selecionada e utilizada para a clonagem da região *P3*.

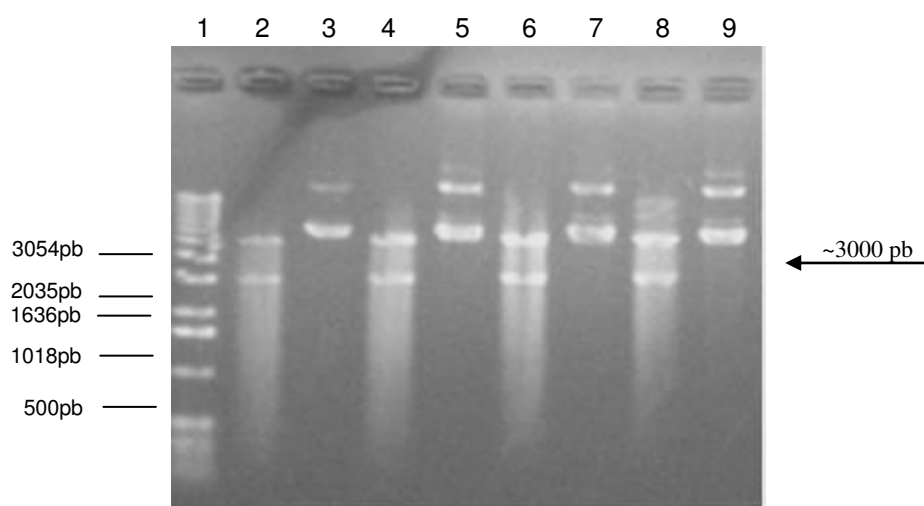


Figura 5.20: Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos produtos da clivagem enzimática da construção pFastBac™ Dual+*P1-2A* com as endonucleases de restrição *Xba*I e *Not*I. Linha 1- marcador 1kb DNA Ladder™ (Life Technologies); linha 2- clone 1 digerido; linha 3- clone 1 não digerido; linha 4- clone 2 digerido; linha 5- clone 2 não digerido; linha 6- clone 8 digerido; linha 7- clone 8 não digerido; linha 8- clone 12 digerido; linha 9- clone 12 não digerido.

O gene *P3* foi removido do vetor pUCIDT e clonado no vetor pFastBac™ Dual+*P1-2A*, de modo a ficar sob o controle do promotor p10. Para confirmar a clonagem da região *P3*, as construções obtidas foram clivadas com as endonucleases de restrição *Nhe*I e *Xho*I (Figura 5.21). Foram observados fragmentos de aproximadamente 2400 pb, correspondentes a região *P3*. Os clones selecionados tiveram as regiões *P1-2A* e *P3* sequenciadas e analisadas (Anexo 11).

A construção pFastBac™ Dual+P1-2A+P3 clone 14 foi selecionada para o ensaio de transposição.

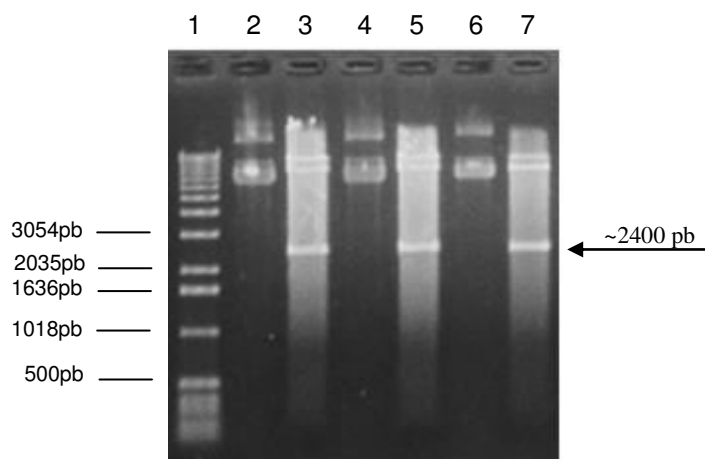


Figura 5.21: Eletroforese em gel de agarose (1,2%) dos produtos da clivagem enzimática das construções pFastBac™ Dual+P1-2A+P3 com as endonucleases de restrição *NheI* e *XhoI*. Linha 1- marcador 1kb DNA Ladder™ (Life Technologies); linha 2- clone 4 não digerido; linha 3- clone 4 digerido; linha 4- clone 12 não digerido; linha 5- clone 12 digerido; linha 6- clone 14 não digerido; linha 7- clone 14 digerido.

A construção pFastBac™ Dual+P1-2A+P3 clone 14 foi utilizada para transformar células competentes DH10Bac™. Para confirmar a ocorrência da transposição do cassete de expressão, o bacmídeo extraído foi submetido à PCR (Figura 5.22). Foram observados *amplicons* de 7947 pb, 3027 pb e 4625 pb, confirmando a transposição dos genes *P1-2A* e *P3* para o bacmídeo. O *amplicon* obtido com os oligonucleotídeos pUC/M13 Fw e pUC/M13 R foi sequenciado e analisado. As sequências das regiões *P1-2A* e *P3* estavam de acordo com as sequências dos genes sintetizados (Anexo 11).

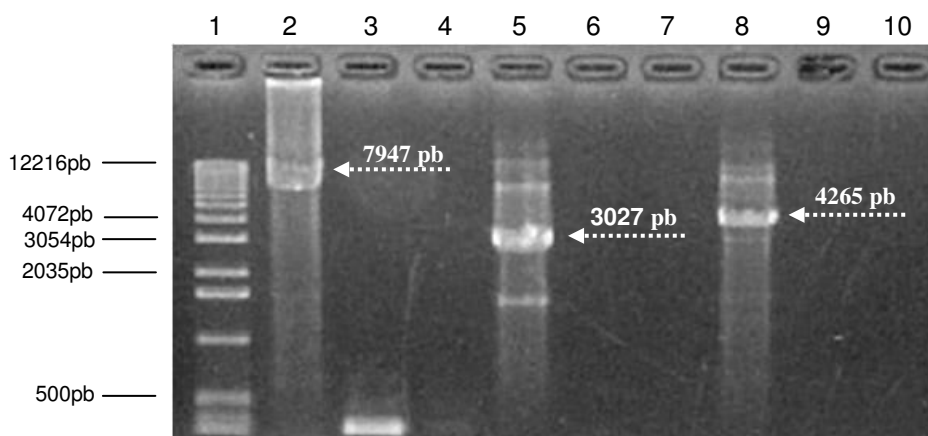


Figura 5.22: Eletroforese em gel de agarose (1,2%) dos *amplicons* obtidos pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) do bacmídeo-P1-2A+P3. Linha 1- marcador 1kb DNA Ladder™ (Life Technologies); linha 2- bacmídeo-P1-2A+P3 (pUC/M13 Fw e pUC/M13 R); linha 3- bacmídeo vazio (pUC/M13 Fw e pUC/M13 R); linha 4- controle de mix (pUC/M13 Fw e pUC/M13 R); linha 5- bacmídeo-P1-2A+P3 (P1-2A 480 Fw e pUC/M13 R); linha 6- bacmídeo vazio (P1-2A 480 Fw e pUC/M13 R); linha 7- controle de mix (P1-2A 480 Fw e pUC/M13 R); linha 8- bacmídeo-P1-2A+P3 (pUC/M13 Fw e P3 42 Fw); linha 9- bacmídeo vazio (pUC/M13 Fw e P3 42 Fw); linha 10- controle de mix (pUC/M13 Fw e P3 42 Fw).

Células Sf9 foram transfectadas com o bacmídeo-P1-2A+P3 e o baculovírus recombinante foi gerado. O estoque P2 do baculovírus-P1-2A+P3 foi sequenciado e analisado. O resultado do sequenciamento mostrou que as sequências dos genes *P1-2A* e *P3* estavam de acordo com as sequências dos genes sintetizados (Anexo 11). Ressalta-se que o baculovírus-P1-2A, o qual não contém a região *P3*, também foi gerado (dados não apresentados). Essa construção foi utilizada como controle, para facilitar a análise da clivagem da poliproteína P1-2A.

Para avaliar a expressão e clivagem da poliproteína P1-2A, células Sf9 foram infectadas com as construções baculovírus-P1-2A+P3, baculovírus-P1-2A e baculovírus-vazio. Os extratos celulares foram analisados por *Western blotting*, utilizando o anticorpo policlonal de cabra anti-HAV como anticorpo primário (Figura 5.23). Foi possível observar uma banda de aproximadamente 110 kDa no extrato de células infectadas com a construção baculovírus-P1-2A, a qual correspondente à massa molecular esperada para a região P1-2A não processada. No extrato de células infectadas com a construção baculovírus-P1-2A+P3, que possui a protease viral, não foi possível visualizar a banda de 110 kDa. Em contraste, foram observadas bandas com massas moleculares inferiores a 110 kDa e que estavam

ausentes nas células infectadas com o baculovírus vazio (controle negativo). Essas bandas podem corresponder às proteínas estruturais do HAV e a fragmentos intermediários de clivagem. Dessa forma, esse resultado sugere que a poliproteína precursora P1-2A foi expressa e clivada quando células Sf9 foram infectadas com a construção baculovírus-P1-2A+P3. Ressalta-se que os sobrenadantes das células infectadas também foram analisados por *Western blotting*, mas não foram detectadas bandas específicas para as proteínas do HAV (dados não mostrados).

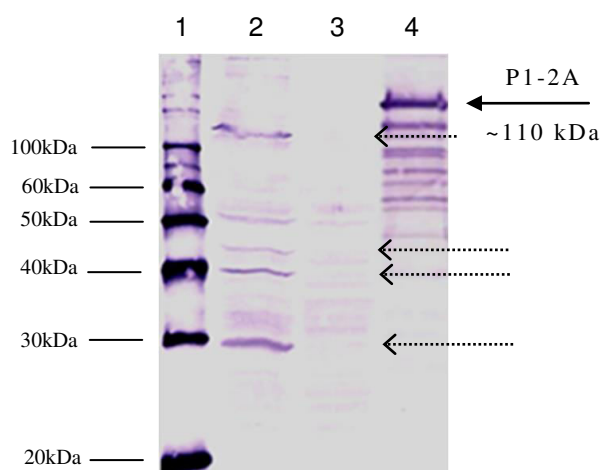


Figura 5.23: *Western blotting* dos extratos de células Sf9 infectadas com as construções baculovírus-P1-2A+P3, baculovírus vazio e baculovírus-P1-2A, após 72 horas de infecção. Linha 1- MagicMark™ XP Western Protein Standard (Life Technologies); linha 2- extrato baculovírus-P1-2A+P3; linha 3- extrato baculovírus vazio; linha 4- extrato baculovírus-P1-2A. As setas pontilhadas indicam as bandas presentes na construção P1-2A+P3, mas ausentes no controle negativo. Anticorpo primário: anticorpo policlonal de cabra anti-HAV.

Com o intuito de detectar a VP1 liberada pela clivagem da poliproteína P1-2A, os extratos de células Sf9 infectadas com as construções citadas anteriormente foram analisados por *Western blotting* (Figura 5.24). Nesses ensaios, o soro de camundongo hiperimune anti-VP1, produzido pelo nosso grupo de trabalho (item 4.2.7), foi utilizado como anticorpo primário. Foram observadas duas bandas com massa molecular entre 30 kDa e 40 kDa, uma das quais pode corresponder à proteína VP1 do HAV (~34 kDa). As bandas observadas com massa molecular acima de 40 kDa, provavelmente, correspondem a intermediários de clivagem da poliproteína P1-2A, os quais contêm a VP1 na sua estrutura.

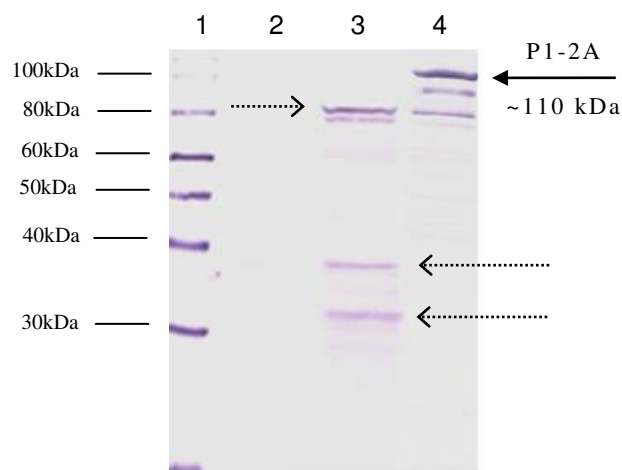


Figura 5.24: *Western blotting* dos extratos de células Sf9 infectadas com as construções baculovírus-P1-2A+P3, baculovírus-P12A e baculovírus vazio, após 72 horas de infecção. Linha 1- MagicMark™ XP Western Protein Standard (Life Technologies); linha 2- extrato baculovírus vazio; linha 3- extrato baculovírus-P1-2A+P3; linha 4- extrato baculovírus-P1-2A. As setas pontilhadas indicam as bandas presentes na construção baculovírus-P1-2A+P3, mas ausentes no controle negativo. Anticorpo primário: soro de camundongo hiperimune anti-VP1.

Para avaliar se as proteínas estruturais apresentavam algum grau de organização após a clivagem, o extrato total de células infectadas com baculovírus-P1-2A+P3 foi analisado por ELISA comercial (HAV antigen, Mediagnost). Como controles, foram utilizados os extratos de células infectadas com baculovírus vazio, baculovírus-VP1 e baculovírus-P12A. Das amostras analisadas, somente a construção baculovírus-P1-2A+P3 foi positiva (Figura 5.25). Além disso, observou-se redução da absorbância da amostra P1-2A+P3, quando a mesma foi incubada com soro neutralizante anti-HAV. Dessa forma, os resultados indicam que as proteínas liberadas após a clivagem da poliproteína P1-2A, provavelmente, se organizam em estruturas que apresentam epítomos conformacionais de neutralização.

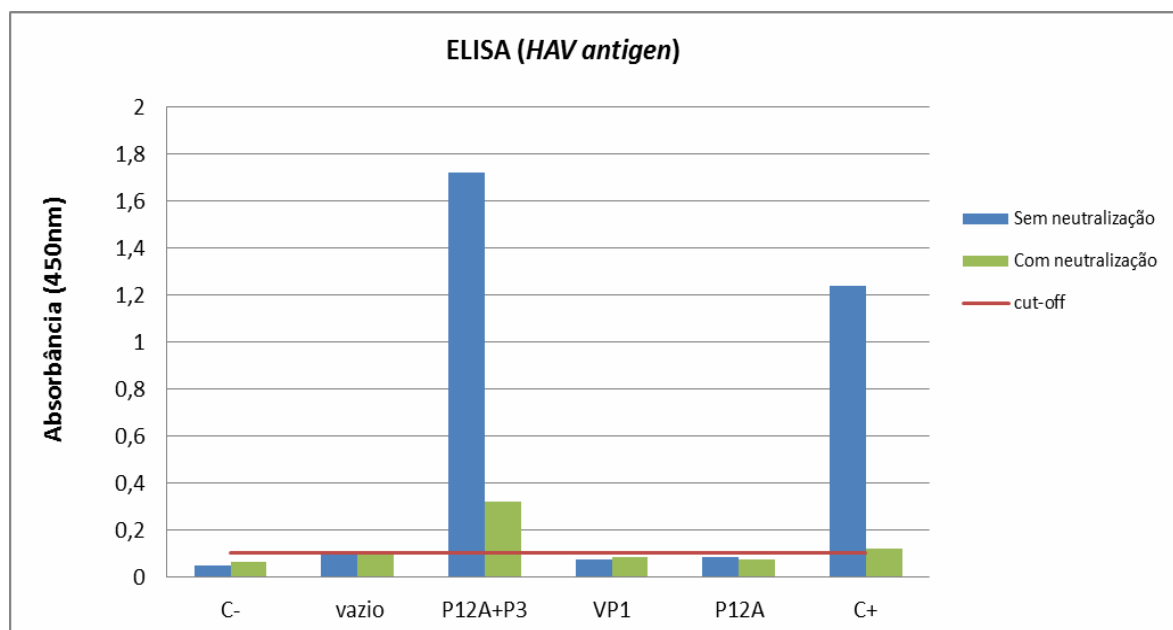


Figura 5.25: Ensaio imunoenzimático (ELISA) realizado com os extratos totais de células Sf9 infectadas com as construções baculovírus vazio, baculovírus-P1-2A+P3, baculovírus-VP1 e baculovírus-P1-2A, após 72 horas de infecção. No eixo vertical, encontram-se os valores de absorbância ($\lambda = 450\text{nm}$) e no eixo horizontal, as amostras testadas. Em azul, estão representados os testes sem a presença de soro neutralizante. Em verde, as amostras foram analisadas na presença do soro neutralizante. Esse ensaio foi realizado com o *kit* comercial HAV antigen (Mediagnost). Valor do *cut-off* = 0,101.

Com o intuito de avaliar a montagem das proteínas estruturais em VLPs, o extrato de células infectadas com baculovírus-P1-2A+P3 foi analisado por MET (Figura 5.26). Nesse ensaio, foram observadas partículas com cerca de 30 nm de diâmetro e simetria icosaédrica, que podem corresponder às VLPs do HAV.

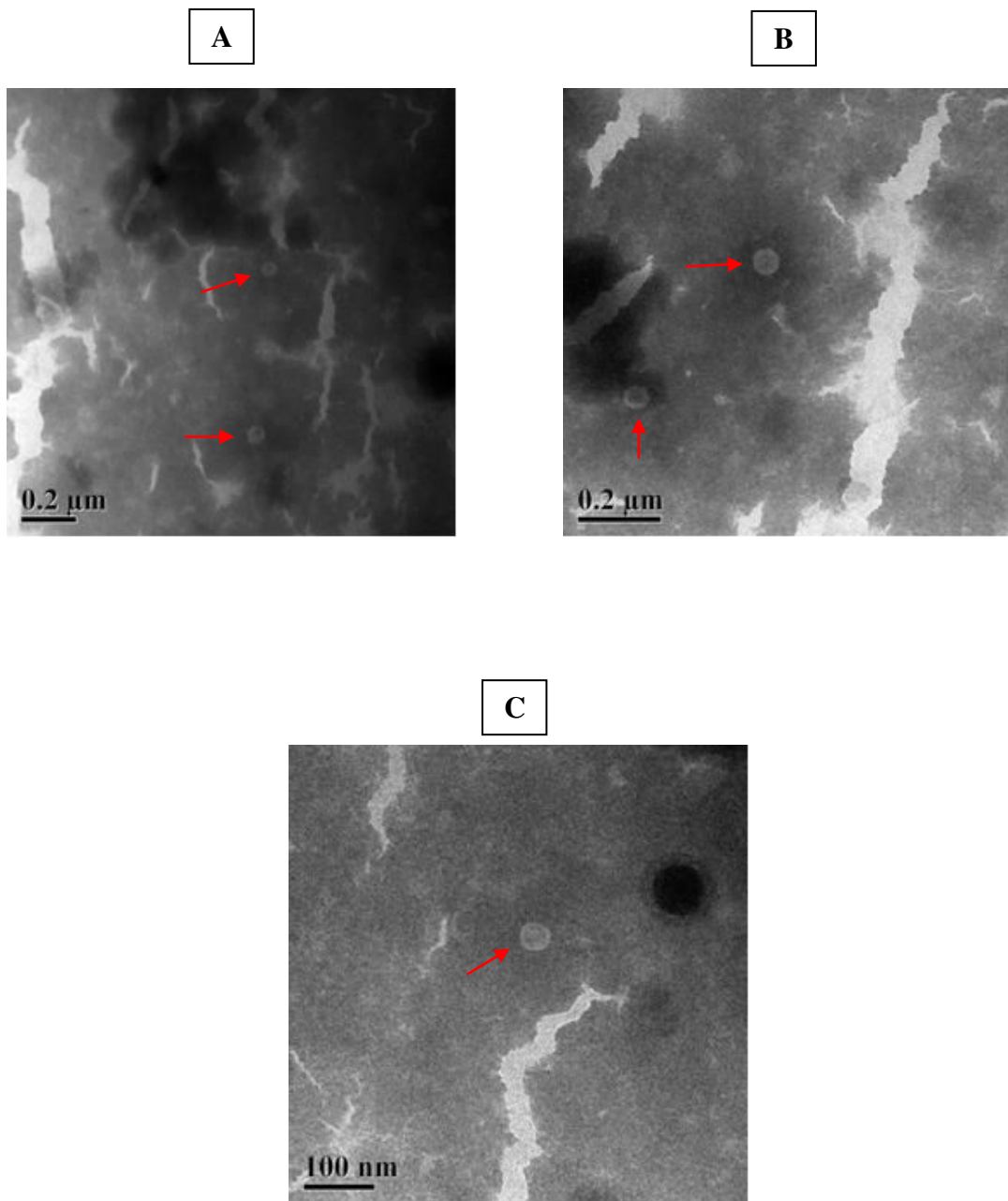


Figura 5.26: Microscopia eletrônica de transmissão realizada com o extrato de células Sf9 infectadas com baculovírus-P1-2A+P3 (contrastação negativa). (A) aumento de 80.000x (B) aumento de 120.000x, (C) aumento de 200.000x. As setas vermelhas indicam as partículas que podem corresponder às VLPs.

Para realizar a purificação das VLPs por gradiente de sacarose, células Sf9 foram infectadas com a construção baculovírus-P1-2A+P3. As células foram coletadas 96 horas p.i., já que neste tempo observou-se maior produção de proteínas recombinantes (dados não mostrados). As frações coletadas após a realização do gradiente foram analisadas por *Western blotting* (Figura 5.27) e ELISA comercial (dados não mostrados), mas os resultados foram negativos. Durante a etapa do colchão de sacarose, que precede a realização do gradiente, foi observado um precipitado insolúvel no tampão de ressuspensão. Esse precipitado foi ressuspensão em tampão de amostra e analisado por *Western blotting* (Figura 5.27). Foram observadas duas bandas, que apresentavam massa molecular de aproximadamente 30 kDa e 40 kDa. Ressalta-se que bandas similares a estas foram observadas no extrato de células infectadas com a construção baculovírus-P1-2A+P3 (Figura 5.23).

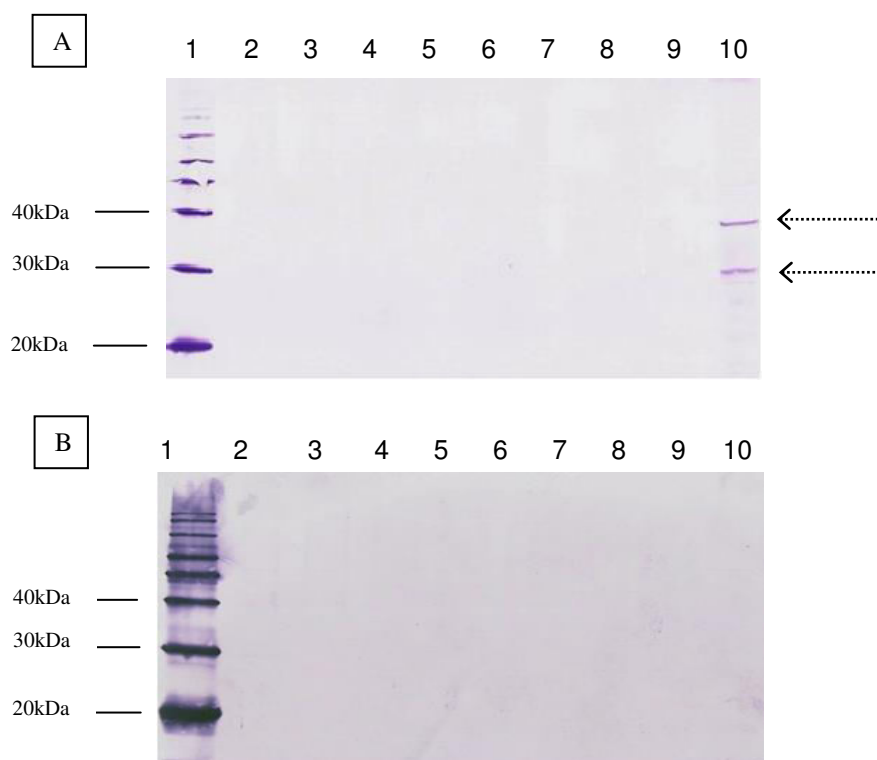


Figura 5.27: *Western blotting* das frações coletadas a partir do gradiente de sacarose. (A) Linha 1- marcador MagicMark™ XP Western Protein Standard (Life Technologies); linha 2- fração 1; linha 3- fração 2; linha 4- fração 3; linha 5- fração 4; linha 6- fração 5; linha 7- fração 6; linha 8- fração 7; linha 9- fração 8; linha 10- material insolúvel obtido após a etapa de ressuspensão do precipitado gerado no colchão de sacarose. (B) Linha 1- marcador MagicMark™ XP Western Protein Standard (Life Technologies); linha 2- fração 9; linha 3- fração 10; linha 4- sobrenadante do colchão de sacarose; linha 5 a linha 10- vazio. As setas pontilhadas indicam as bandas que podem representar proteínas estruturais do HAV. Anticorpo primário: anticorpo policlonal de cabra anti-HAV.

Como foram detectadas bandas na fração insolúvel, formada após a etapa do colchão de sacarose, optou-se por avaliar a solubilidade das possíveis VLPs por ELISA comercial (HAV antigen). Nesse ensaio, a maior parte das VLPs foi detectada na fração insolúvel (Figura 5.28). Os níveis relativamente baixos de expressão associados às perdas devido à baixa solubilização, podem explicar a dificuldade encontrada para a purificação dessas partículas.

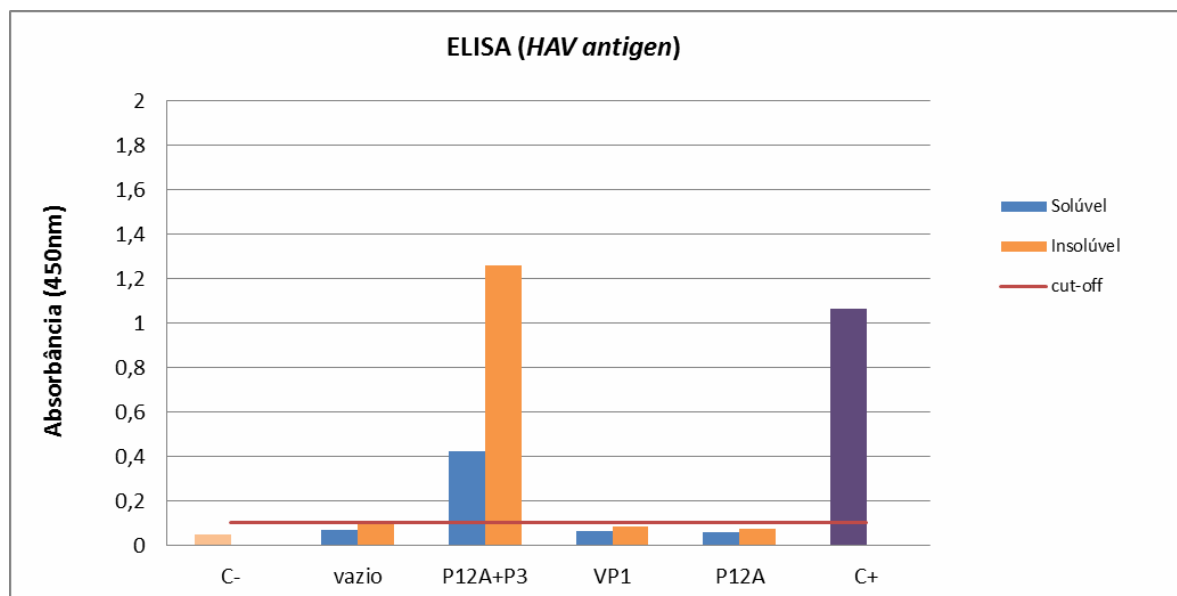


Figura 5.28: Ensaio imunoenzimático (ELISA) realizado com as frações solúveis e insolúveis das células Sf9 infectadas com as construções baculovírus vazio, baculovírus-P1-2A+P3, baculovírus-VP1 e baculovírus-P1-2A, após 96 horas de infecção. No eixo vertical, encontram-se os valores de absorbância ($\lambda = 450\text{nm}$) e no eixo horizontal, as amostras testadas. Em azul, estão representadas as frações solúveis. Em laranja, encontram-se as frações insolúveis. O teste foi conduzido na ausência de soro neutralizante. O *kit* comercial HAV antigen (Mediagnost) foi utilizado para esse ensaio. Valor do *cut-off* = 0,106.

Com o objetivo de otimizar a extração das supostas VLPs, diferentes detergentes foram adicionados ao tampão base (10 mM tris-HCl + 0,1 mM EDTA + 1 mM PMSF, pH 8,0) (Quadro 5.1). As frações solúveis de cada condição foram analisadas por ELISA comercial (Figura 5.29) e a condição que apresentou o maior poder de solubilização (tampão base + 1% (v/v) triton X-100 + 0,1% SDS) foi comparada com a condição inicial de extração (Figura 5.30). De acordo com o resultado, a condição otimizada foi capaz de aumentar a solubilização das VLPs

($p < 0,001$). Ressalta-se que esse resultado cria novas perspectivas para a purificação dessas partículas.

Quadro 5.1: Detergentes adicionados ao tampão base e suas respectivas concentrações. Tampão base: 10 mM tris-HCl + 0,1 mM EDTA + 1 mM PMSF (pH 8,0).

Detergente	Concentração (v/v)
Triton X-100	1%
Deoxicolato de sódio (DOC)	1%
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	1%
Triton X-100 + SDS	1% + 0,1%
DOC + SDS	1% + 0,1%

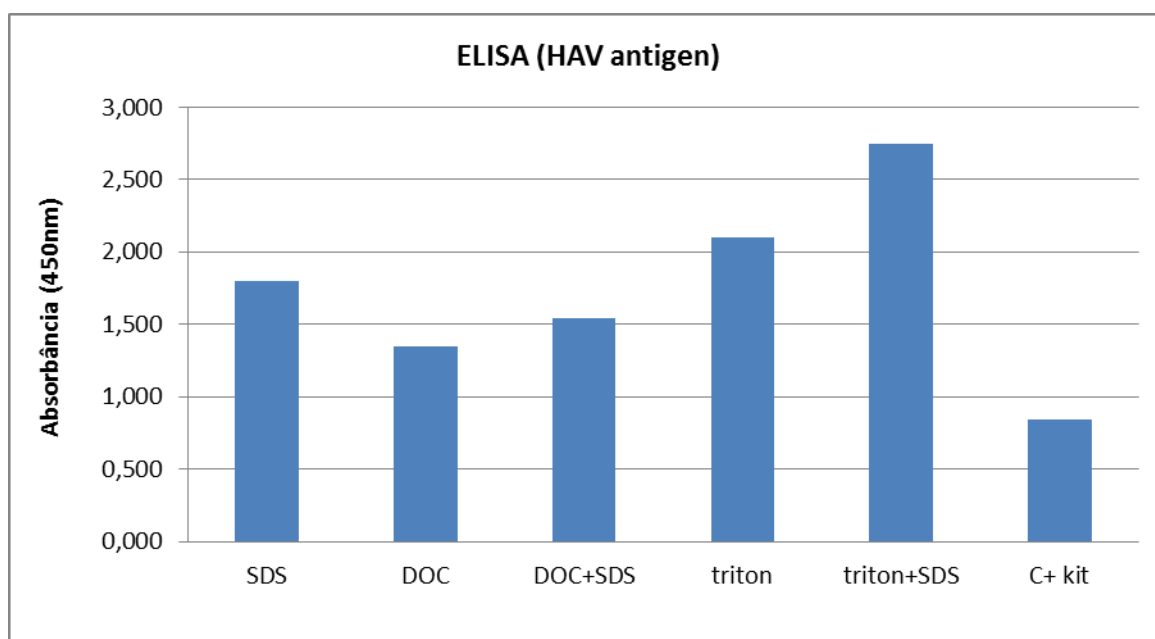


Figura 5.29: Ensaio imunoenzimático (ELISA) realizado para avaliar a diferença de solubilidade das VLPs no tampão base (10 mM tris-HCl + 0,1 M EDTA + 1 mM PMSF, pH 8,0) associado a diferentes detergentes. No eixo vertical, encontram-se os valores de absorbância ($\lambda = 450\text{nm}$) e no eixo horizontal, as amostras testadas. O teste foi conduzido na ausência de soro neutralizante. O *kit* comercial HAV antigen (Mediagnost) foi utilizado para esse ensaio.

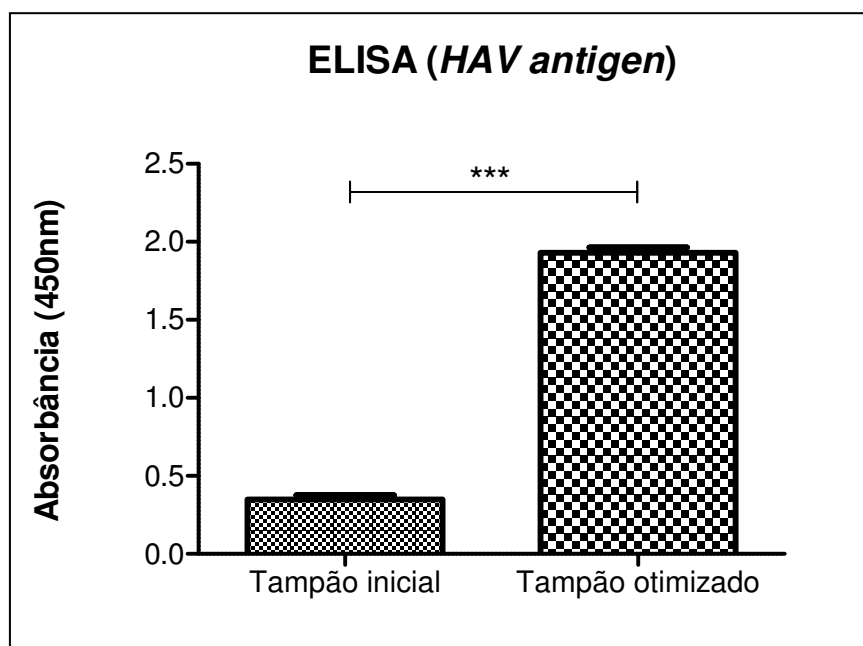


Figura 5.30: Ensaio imunoenzimático (ELISA) realizado para avaliar a diferença de solubilidade das VLPs no tampão inicial (50 mM tris-HCl + 1% (v/v) Triton X-100 + 150 mM NaCl + 1 mM PMSF, pH 8,0) e no tampão otimizado (10 mM tris-HCl + 0,1 mM EDTA + 1% (v/v) triton X-100 + 0,1% (v/v) SDS + 1 mM PMSF, pH 8,0). No eixo vertical, encontram-se os valores de absorbância ($\lambda = 450\text{nm}$) e no eixo horizontal, as amostras testadas. O teste foi conduzido na ausência de soro neutralizante ($n=3$). O *kit* comercial HAV antigen (Mediagnost) foi utilizado para esse ensaio. *** Absorbância no tampão otimizado é diferente da absorbância no tampão inicial, com $p<0,001$ (teste t de Student bicaudal).

Para verificar se a formação de agregados insolúveis também se estendia à poliproteína precursora P1-2A não clivada, foi realizado um ensaio de cinética de distribuição intracelular. Observou-se que a poliproteína P1-2A permaneceu totalmente insolúvel no extrato celular, durante todos os tempos analisados (Figura 5.31). Esse resultado, quando analisado em conjunto com os resultados de solubilidade das VLPs e da VP1r, pode ser indicativo de que a baixa solubilidade é uma característica das proteínas do HAV.



Figura 5.31: *Western blotting* das frações solúveis e insolúveis das células Sf9 infectadas com baculovírus-P1-2A, coletadas entre 24h e 96h. Linha 1- marcador MagicMark™ XP Western Protein Standard (Life Technologies); linha 2- fração solúvel 24h; linha 3- fração insolúvel 24h; linha 4- fração solúvel 48h; linha 5- fração insolúvel 48h; linha 6- fração solúvel 72h; linha 7- fração insolúvel 72h; linha 8- fração solúvel 96h; linha 9- fração insolúvel 96h. Anticorpo primário: anticorpo policlonal de cabra anti-HAV.

Para avaliar a solubilidade das proteínas que constituem a poliproteína P1-2A, a ferramenta ESPRESSO foi utilizada. A estimativa de solubilidade foi realizada com o modelo de predição baseado em propriedades estruturais de proteínas expressas em sistema livre de células - germe de trigo. De acordo com os resultados gerados, as proteínas VP3, VP4 e 2A apresentam solubilidade maior do que as proteínas VP1 e VP2, as quais seriam expressas na forma insolúvel (Tabela 5.2).

A predição da solubilidade das proteínas estruturais do poliovírus humano também foi realizada, já que esse vírus é o membro protótipo dos picornavírus. Ao contrário do que foi observado para o HAV, todas as proteínas avaliadas seriam solúveis (Tabela 5.2).

Tabela 5.2: Predição da solubilidade das proteínas do vírus da hepatite A e do poliovírus humano.

Proteína	Vírus da hepatite A	Poliovírus humano
VP4	Solúvel (0.911)	Solúvel (0.602)
VP2	Insolúvel (0.610)	Solúvel (0.604)
VP3	Solúvel (0.548)	Solúvel (0.602)
VP1	Insolúvel (0.650)	Solúvel (0.531)
2A	Solúvel (0.780)	Solúvel (0.781)

Nota: O valor entre parênteses mostra a confiabilidade da predição. Valores mais próximo de 1 indicam maior confiabilidade.

5.4. Caracterização da resposta imune induzida pela proteína VP1 recombinante (VP1r) em camundongos

Camundongos da linhagem BALB/c foram imunizados com diferentes formulações vacinais: (i) 20 µg VP1r + Al(OH)₃, (ii) 2 µg VP1r + Al(OH)₃, (iii) Al(OH)₃, (iv) 20 µg VP1r + saponina, (v) 2 µg VP1r + saponina, (vi) saponina e (vii) 40 UE HAVRIX®. Em seguida, a cinética de produção de anticorpos anti-VP1, da classe IgG, foi analisada por ELISA *in house*.

As formulações contendo Al(OH)₃ foram capazes induzir um pico máximo de anticorpos IgG após 29 dias do início do esquema de imunização, que corresponde a 14 dias após a 2ª inoculação. Os títulos desses anticorpos se mantiveram estáveis durante toda a duração do experimento (Tabela 5.3 e Figura 5.32). Foi possível observar que a redução da quantidade de antígeno administrada levou a diminuição dos títulos de anticorpos em aproximadamente 10 vezes, de 102.400 (20 µg VP1r) para 12.800 (2 µg VP1r). Para avaliar se a diferença entre os títulos de anticorpos observada com o *pool* de soros apresentava significância estatística, as amostras de cada grupo (n=4) foram analisadas individualmente, na diluição de 1:10.000. As

diferenças entre os títulos observados foram estatisticamente significativas, com $p < 0,01$ (Figura 5.33).

As formulações que continham o adjuvante a base de saponina também induziram um pico máximo de anticorpos IgG após 29 dias do início do esquema de imunização (Tabela 5.4 e Figura 5.34). Apesar do título máximo de anticorpos induzido pela formulação 20 μg VP1r + saponina (819.200) ter sido numericamente superior ao título obtido com 2 μg VP1r + saponina (419.600), não foi observada diferença significativa (Figura 5.35). Ambas as formulações não foram capazes de induzir títulos estáveis de anticorpos IgG, com os mesmos declinando até o título de 204.800 ao final do experimento.

Quando os resultados gerados para os dois adjuvantes foram analisados em conjunto (Tabela 5.5 e Figura 5.36), observou-se que as formulações de VP1r+saponina foram capazes de induzir títulos duas vezes maiores do que aqueles observados com 20 μg VP1+Al(OH)₃, ao final do experimento (Figura 5.37). Entretanto, não é possível afirmar que esses títulos se manteriam superiores caso fosse realizado um experimento de maior duração. Ressalta-se que os anticorpos induzidos por 40UE da HAVRIX® não apresentaram reatividade no ELISA *in house* para detecção de anticorpos anti-VP1.

Tabela 5.3: Títulos de anticorpos IgG anti-VP1 induzidos nos camundongos (*pool*) imunizados com 20 μg e 2 μg da proteína VP1 recombinante, utilizando o hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) como adjuvante.

Títulos de anticorpos IgG anti-VP1			
Dias após a 1ª inoculação	20 μg VP1r + Al(OH) ₃	2 μg VP1r + Al(OH) ₃	Al(OH) ₃
0	0	0	0
14	1600	200	0
29	102.400	12.800	0
45	102.400	12.800	0
60	102.400	12.800	0

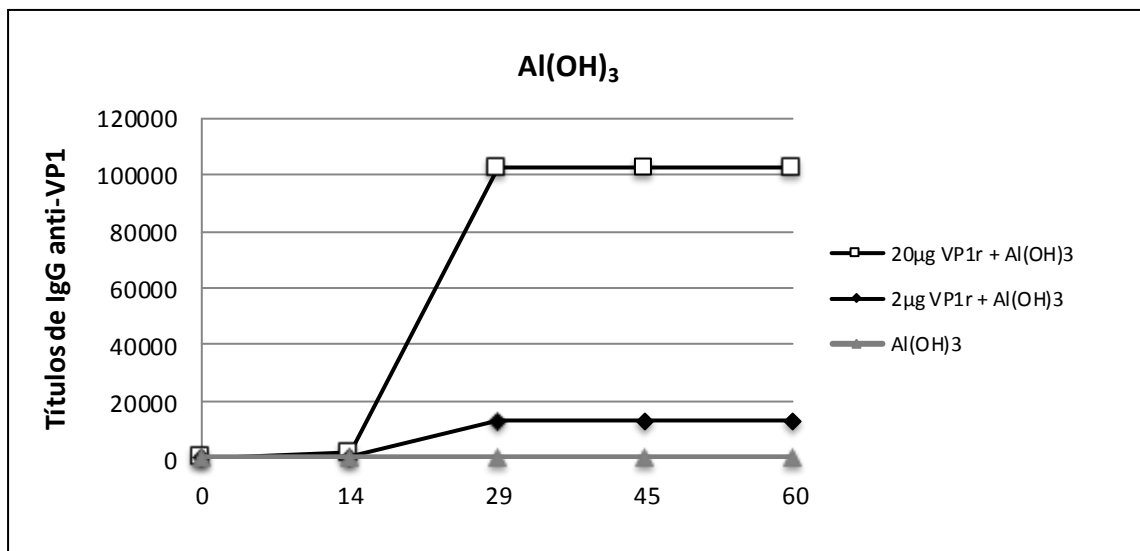


Figura 5.32: Ensaio imunoenzimático (ELISA) *in house* para avaliar o título de anticorpos IgG anti-VP1 induzidos nos camundongos (*pool*) imunizados com 20 µg e 2 µg da proteína VP1 recombinante adsorvida em hidróxido de alumínio (Al(OH)₃). No eixo vertical, encontram-se os títulos de anticorpos e no eixo horizontal, o número de dias transcorridos após o início do experimento.

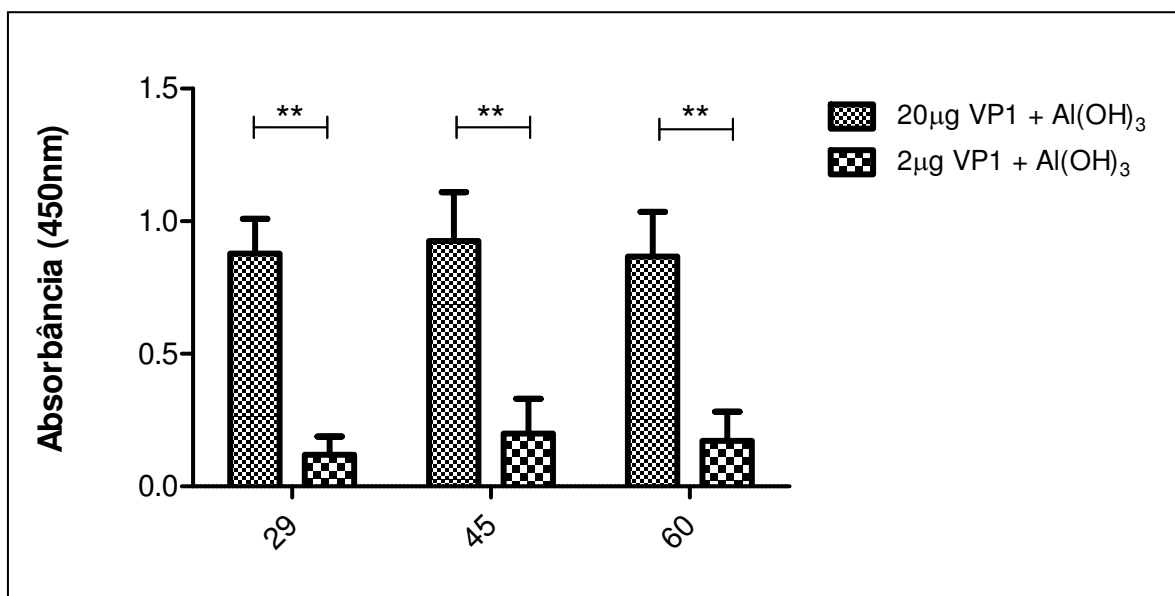


Figura 5.33: Análise individual dos soros dos camundongos imunizados (n=4) com a proteína VP1 recombinante adsorvida em hidróxido de alumínio (Al(OH)₃), utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA) *in house*. Ensaio realizado para avaliar se as diferenças observadas com o *pool* de anticorpos eram estatisticamente significativas (diluição 1:10.000). No eixo vertical, encontram-se os valores de absorbância e no eixo horizontal, o número de dias transcorridos após o início do experimento. ** indica diferença significativa entre os grupos, com p<0,01 (ANOVA two-way).

Tabela 5.4: Títulos de anticorpos IgG anti-VP1 induzidos nos camundongos (*pool*) imunizados com 20 µg e 2 µg da proteína VP1 recombinante, utilizando adjuvante a base de saponina.

Títulos de anticorpos IgG anti-VP1			
Dias após a 1ª inoculação	20µg VP1r + saponina	2µg VP1r + saponina	saponina
0	0	0	0
14	3200	1600	0
29	819.200	409.600	0
45	409.600	409.600	0
60	204.800	204.800	0

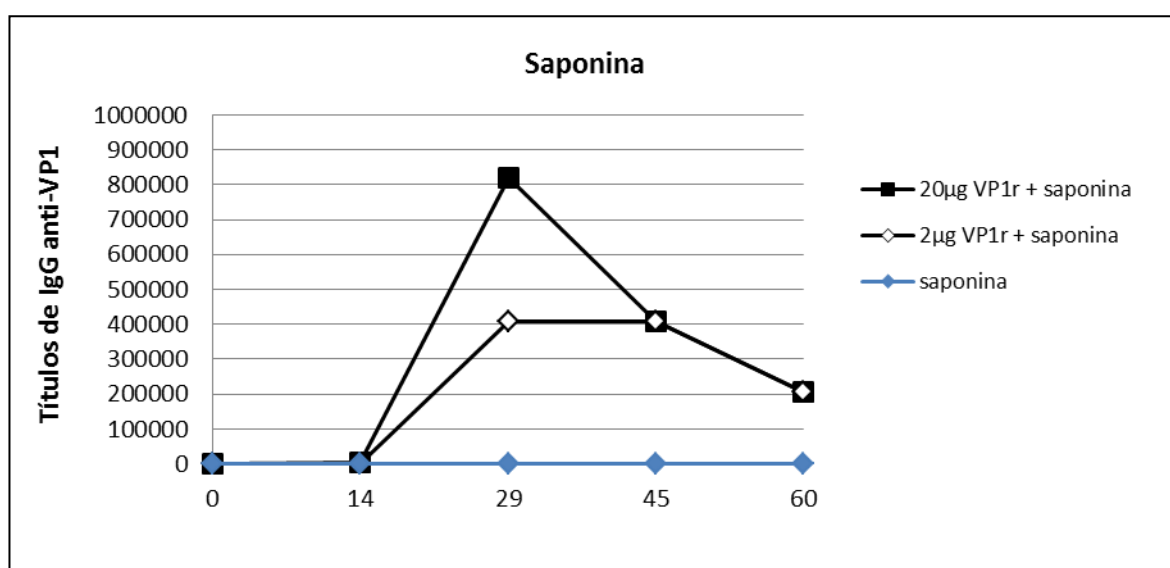


Figura 5.34: Ensaio imunoenzimático (ELISA) *in house* para avaliar o título de anticorpos IgG anti-VP1 induzidos nos camundongos (*pool*) imunizados com 20 µg e 2 µg da proteína VP1 recombinante combinada ao adjuvante a base de saponina. No eixo vertical, encontram-se os títulos de anticorpos e no eixo horizontal, o número de dias transcorridos após o início do experimento.

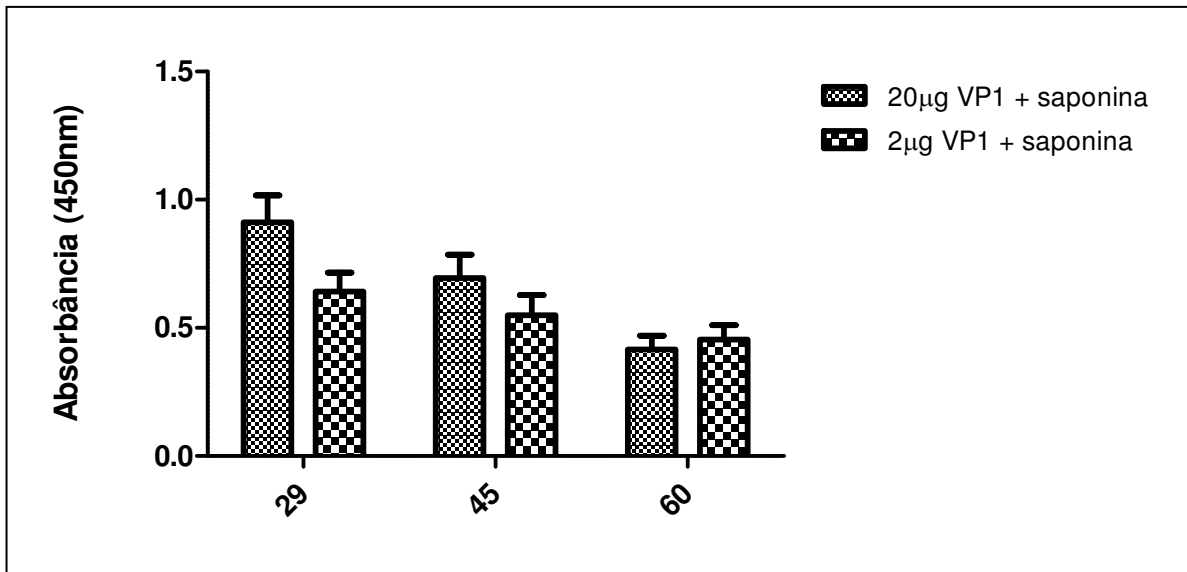


Figura 5.35: Análise individual dos soros dos camundongos imunizados (n=4) com a proteína VP1 recombinante combinada ao adjuvante a base de saponina, utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA) *in house*. Ensaio realizado para avaliar se as diferenças observadas com o *pool* de anticorpos eram estatisticamente significativas (diluição 1:100.000). No eixo vertical, encontram-se os valores de absorbância e no eixo horizontal, o número de dias transcorridos após o início do experimento. $p > 0,05$ para todos os tempos analisados (ANOVA two-way).

Tabela 5.5: Títulos de anticorpos IgG anti-VP1 induzidos nos camundongos (*pool*) imunizados com 20 µg e 2 µg da proteína VP1 recombinante, utilizando hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) e saponina como adjuvantes.

Títulos de anticorpos IgG anti-VP1				
Dias após a 1ª inoculação	20µgVP1r+Al(OH) ₃	2µg VP1r+Al(OH) ₃	20µgVP1r+saponina	2µgVP1r+saponina
0	0	0	0	0
14	1600	200	3200	1600
29	102.400	12.800	819.200	409.600
45	102.400	12.800	409.600	409.600
60	102.400	12.800	204.800	204.800

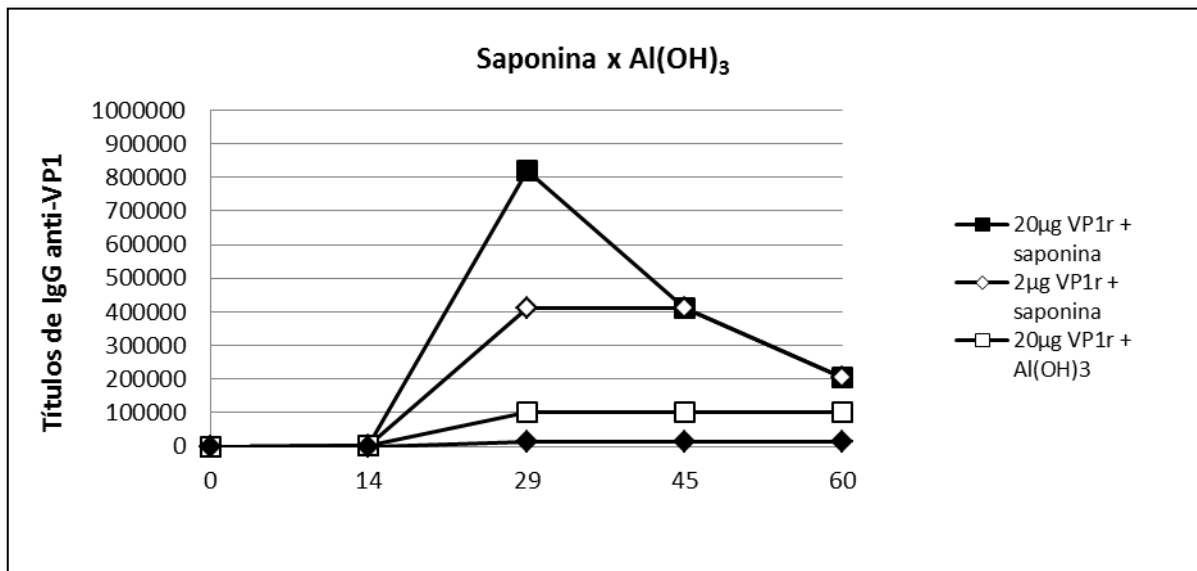


Figura 5.36: Ensaio imunoenzimático (ELISA) *in house* para avaliar o título de anticorpos IgG anti-VP1 induzidos nos camundongos (*pool*) imunizados com 20 µg e 2 µg da proteína VP1 recombinante combinada ao hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) e à saponina. No eixo vertical, encontram-se os valores de absorbância e no eixo horizontal, o número de dias transcorridos após o início do experimento. Os títulos induzidos pelas quatro formulações vacinais foram agrupados nesse gráfico para facilitar a visualização dos resultados.

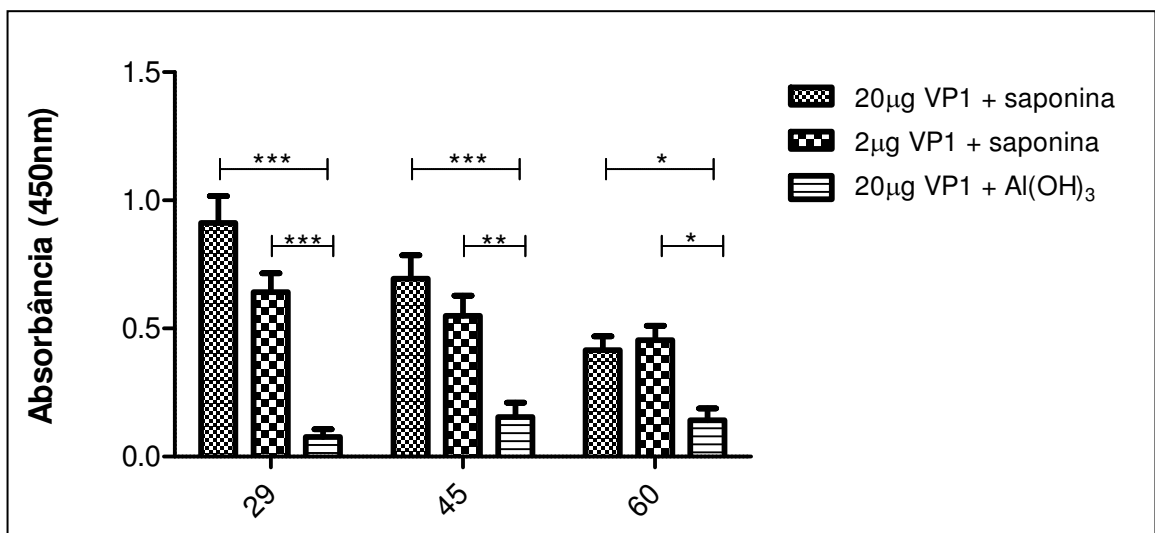


Figura 5.37: Análise individual dos soros dos camundongos imunizados (n=4) com a proteína VP1 recombinante combinada à saponina e ao hidróxido de alumínio (Al(OH)₃), utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA) *in house* para detecção de anticorpos IgG anti-VP1. Ensaio realizado para avaliar se as diferenças observadas com o *pool* de anticorpos eram estatisticamente significativas (diluição 1:100.000). No eixo vertical, encontram-se os valores de absorbância e no eixo horizontal, o número de dias transcorridos após o início do experimento. * indica diferença significativa entre os grupos, com p<0,05 (ANOVA two-way). ** indica diferença significativa entre os grupos, com p<0,01 (ANOVA two-way). *** indica diferença significativa entre os grupos, com p<0,01 (ANOVA two-way).

As subclasses de IgG induzidas pelas formulações vacinais também foram avaliadas. De forma geral, a distribuição das subclasses para as formulações de VP1r com Al(OH)₃ e saponina foi a seguinte: IgG1>IgG2a>IgG2b>IgG3. A única exceção foi a formulação 2µg VP1r + Al(OH)₃, na qual os títulos de IgG2a e IgG2b foram iguais em quase todos os tempos analisados (Tabela 5.6 – Tabela 5.9, Figura 5.38 – Figura 5.41). A VP1r, quando administrada com o Al(OH)₃, foi capaz de induzir títulos muito maiores de IgG1 do que aqueles observados para as demais subclasses. Em contrapartida, o adjuvante a base de saponina foi capaz de induzir uma distribuição mais homogênea entre as subclasses de IgG.

Tabela 5.6: Títulos das subclasses de IgG induzidas nos camundongos (*pool*) imunizados com 20 µg da proteína VP1 recombinante adsorvida em hidróxido de alumínio (Al(OH)₃).

20 µg VP1r + Al(OH) ₃				
Dias após a 1ª inoculação	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
0	0	0	0	0
14	3200	100	<100	100
29	204.800	6400	6400	3200
45	204.800	12.800	6400	3200
60	204.800	12.800	6400	3200

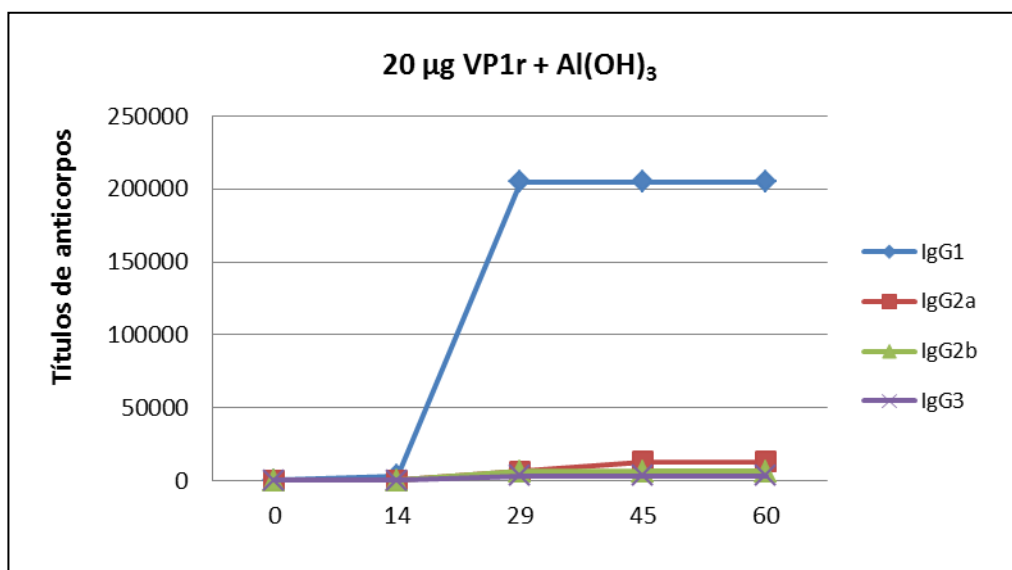


Figura 5.38: Ensaio imunoenzimático (ELISA) *in house* para determinação dos títulos das subclasses de IgG anti-VP1 induzidas nos camundongos (*pool*) imunizados com 20 µg da proteína VP1 recombinante adsorvida em hidróxido de alumínio (Al(OH)₃). No eixo vertical, encontram-se os títulos de anticorpos e no eixo horizontal, o número de dias transcorridos após o início do experimento.

Tabela 5.7: Títulos das subclasses de IgG induzidas nos camundongos (*pool*) imunizados com 2 µg da proteína VP1 recombinante adsorvida em hidróxido de alumínio (Al(OH)₃).

2 µg VP1r + Al(OH) ₃				
Dias após a 1 ^a inoculação	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
0	0	0	0	0
14	400	<100	<100	<100
29	12.800	3200	3200	800
45	25.600	1600	3200	800
60	25.600	3200	3200	800

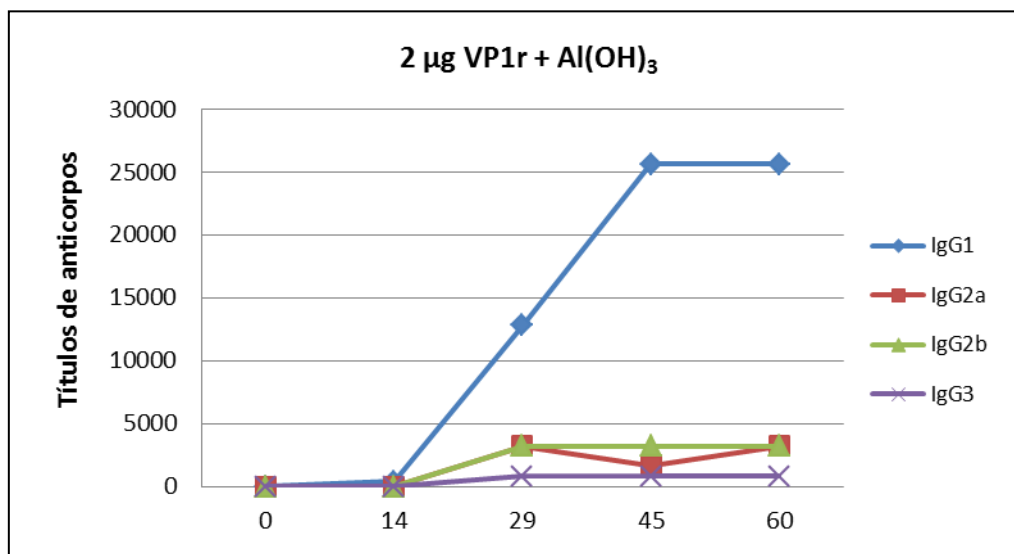


Figura 5.39: Ensaio imunoenzimático (ELISA) *in house* para determinação dos títulos das subclasses de IgG anti-VP1 induzidas nos camundongos (*pool*) imunizados com 2 µg da proteína VP1 recombinante adsorvida em hidróxido de alumínio (Al(OH)₃). No eixo vertical, encontram-se os títulos de anticorpos e no eixo horizontal, o número de dias transcorridos após o início do experimento.

Tabela 5.8: Títulos das subclasses de IgG induzidas nos camundongos (*pool*) imunizados com 20 µg da proteína VP1 recombinante combinada com o adjuvante a base de saponina.

20 µg VP1r + saponina				
Dias após a 1ª inoculação	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
0	0	0	0	0
14	6400	3200	800	400
29	819.200	409.600	204.800	51.200
45	409.600	204.800	102.400	25.600
60	409.600	204.800	51.200	25.600

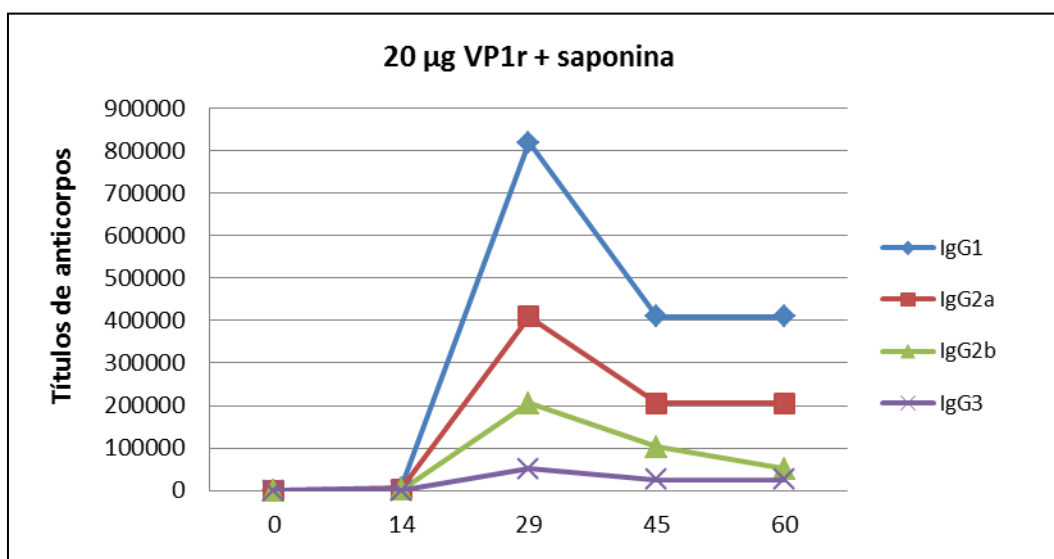


Figura 5.40: Ensaio imunoenzimático (ELISA) *in house* para determinação dos títulos das subclasses de IgG anti-VP1 induzidas nos camundongos (*pool*) imunizados com 20 µg da proteína VP1 recombinante combinada com o adjuvante a base de saponina. No eixo vertical, encontram-se os títulos de anticorpos e no eixo horizontal, o número de dias transcorridos após o início do experimento.

Tabela 5.9: Títulos das subclasses de IgG induzidas nos camundongos (*pool*) imunizados com 2 µg da proteína VP1 recombinante combinada com o adjuvante a base de saponina.

2 µg VP1r + saponina				
Dias após a 1ª inoculação	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
0	0	0	0	0
14	1600	1600	1600	100
29	819.200	409.600	204.800	51.200
45	409.600	204.800	102.400	25.600
60	204.800	204.800	51.200	25.600

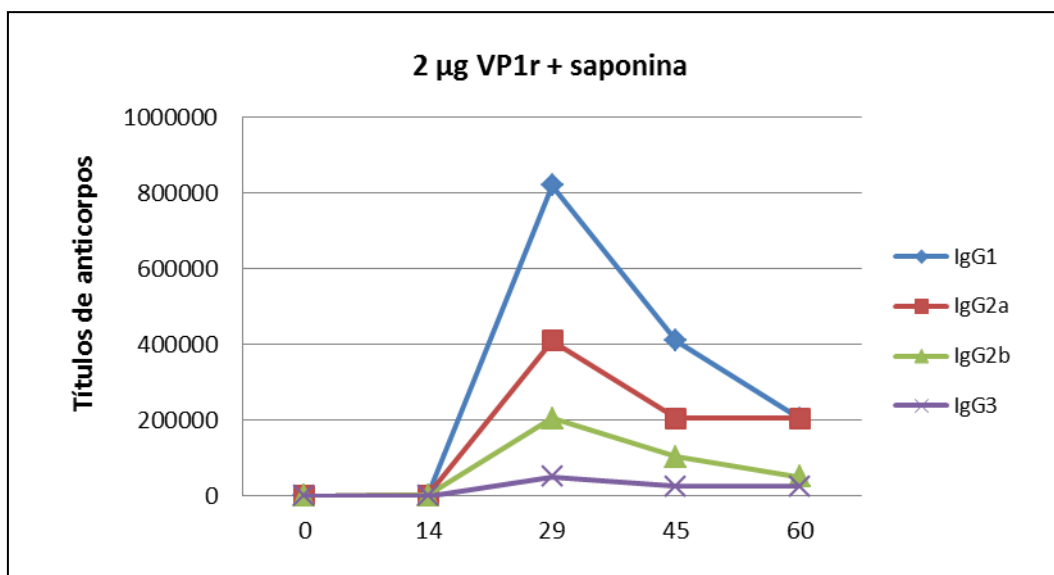


Figura 5.41: Ensaio imunoenzimático (ELISA) *in house* para determinação dos títulos das subclasses de IgG anti-VP1 induzidas nos camundongos (*pool*) imunizados com 2 µg da proteína VP1 recombinante combinada com o adjuvante a base de saponina. No eixo vertical, encontram-se os títulos de anticorpos e no eixo horizontal, o número de dias transcorridos após o início do experimento.

Para avaliar a qualidade dos anticorpos induzidos pelas formulações vacinais, o índice de avidéz (IA) foi determinado ao final do experimento. Os soros dos camundongos foram analisados por ELISA, utilizando eluição com uma única concentração do agente caotrópico (Figura 5.42). A formulação 20 µg VP1r + Al(OH)₃ foi capaz de induzir anticorpos anti-VP1 com IA maior (80%) do que as demais formulações vacinais (40% - 50%). Ressalta-se que não foram observadas diferenças significativas entre as formulações a base de saponina e a formulação 2 µg VP1r + Al(OH)₃. Os anticorpos analisados foram da classe IgG.

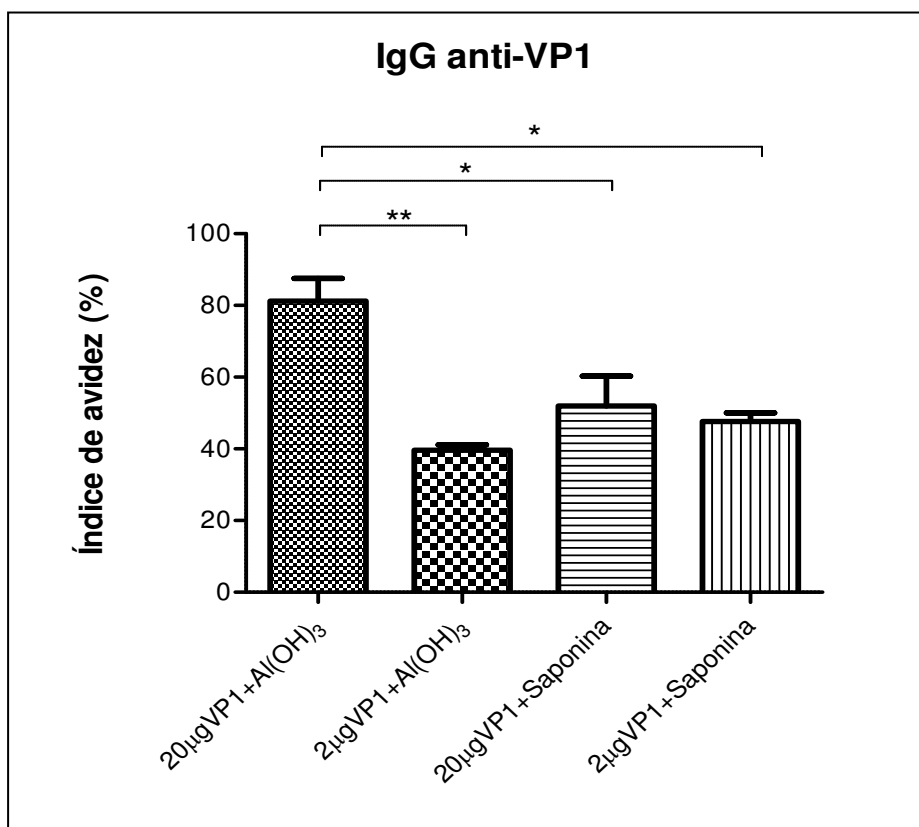


Figura 5.42: Ensaio imunoenzimático (ELISA) *in house* para determinação do índice de avides dos anticorpos IgG anti-VP1 induzidos nos camundongos (n=4) imunizados com as diferentes formulações vacinais. No eixo vertical, encontram-se os valores para o índice de avides (%) e no eixo horizontal, as formulações vacinais analisadas. * indica diferença significativa entre os grupos, com $p < 0,05$ (ANOVA one-way, Bonferroni). ** indica diferença significativa entre os grupos, com $p < 0,01$ (ANOVA one-way, Bonferroni).

Para avaliar se os anticorpos anti-VP1 eram capazes de reconhecer o HAV, os soros dos camundongos foram analisados por ELISA comercial. O *kit* Bioelisa HAV foi utilizado, já que o mesmo fornece a placa do teste sensibilizada com o HAV inativado. Nenhum dos grupos avaliados apresentou resultado positivo, com exceção do grupo imunizado com 40UE da vacina comercial HAVRIX® (Figura 5.43).

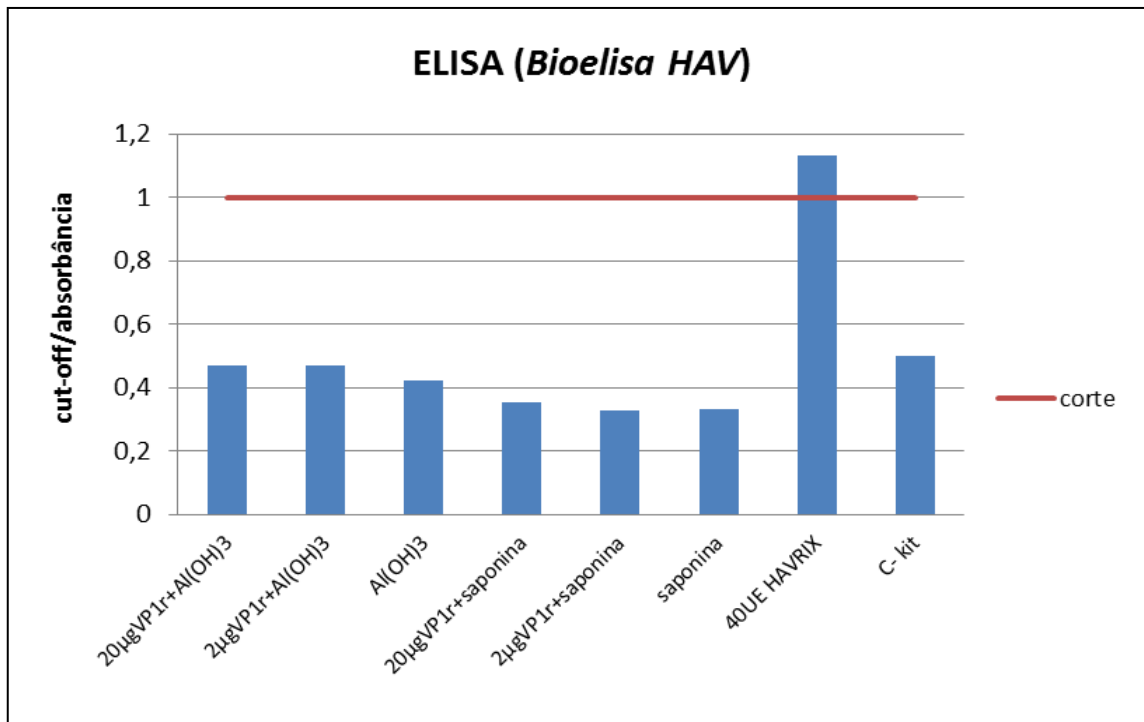


Figura 5.43: Ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizado para avaliar a ligação cruzada entre os anticorpos anti-VP1, induzidos com as formulações vacinais, e o vírus da hepatite A. Os soros foram analisados em *pool*. O *kit* Bioelisa HAV (Biokit) foi utilizado para essa análise. As amostras foram consideradas positivas quando a razão entre o valor do *cut-off* e da absorbância foi maior ou igual a 1 (*corte*, linha vermelha).

Para verificar se os animais imunizados com a VP1r seriam capazes de gerar resposta de anticorpos anti-HAV após a administração de uma dose subimunogênica da vacina comercial, o experimento de imunogenicidade foi realizado novamente. Neste experimento, as formulações vacinais utilizadas foram as mesmas do ensaio inicial. Contudo, os animais receberam uma dose de reforço contendo 10UE da vacina HAVRIX[®]. Os soros dos animais foram analisados por ELISA comercial (Bioelisa HAV, Biokit), mas os resultados foram negativos para todas as formulações contendo a VP1r (Figura 5.44).

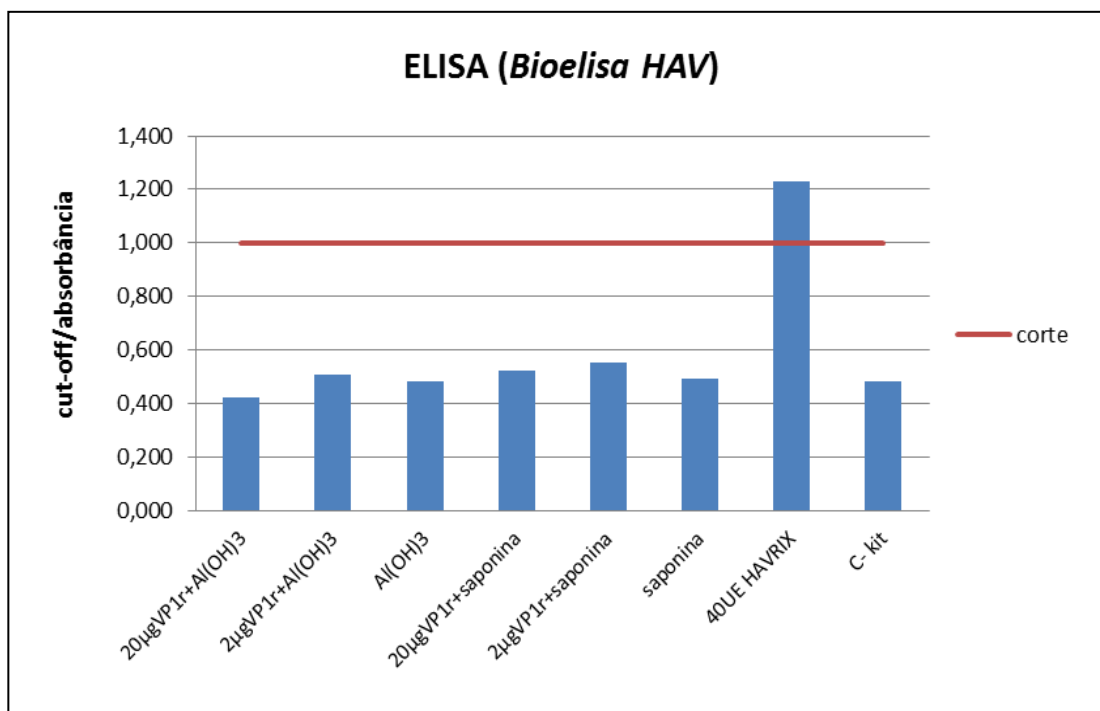


Figura 5.44: Ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizado para avaliar a produção de anticorpos anti-HAV induzidos por diferentes formulações vacinais após a administração de uma dose subimunogênica da vacina comercial HAVRIX[®]. Os soros foram analisados em *pool*. O *kit* Bioelisa HAV (Biokit) foi utilizado para essa análise. As amostras foram consideradas positivas quando a razão entre o valor do *cut-off* e da absorbância foi maior ou igual a 1 (*corte*, linha vermelha).

Como o teste Bioelisa HAV é baseado em um ensaio competitivo e, por isso, poderia apresentar limite de detecção elevado, optou-se por modificar o formato do teste. Assim, os soros dos camundongos foram analisados por ELISA indireto, estabelecido através de alterações no teste Bioelisa HAV. Para esta análise, foram utilizados os soros dos camundongos imunizados com 20 µg VP1r + adjuvante, em duas condições distintas: com e sem dose subimunogênica da vacina HAVRIX[®].

O *pool* dos soros dos camundongos que receberam 20 µg VP1r + Al(OH)₃, sem a dose subimunogênica, apresentou valor de absorbância inferior ao grupo controle (Al(OH)₃). Quando a subdose da HAVRIX[®] foi administrada, observou-se aumento do valor da absorbância. Este valor foi numericamente maior do que os grupos controles (Al(OH)₃ e Al(OH)₃+subdose) (Figura 5.45). Contudo, não foram realizados testes estatísticos para avaliar se a diferença observada foi significativa.

Em contraste, a formulação 20 µg VP1r + saponina, mesmo sem a administração da subdose, apresentou valor de absorbância numericamente superior ao controle negativo (saponina). Quando a subdose da HAVRIX[®] foi administrada, observou-se um incremento no valor da absorbância (Figura 5.46). Embora não tenham sido realizados testes estatísticos, estes resultados demonstram que existe uma tendência da VP1r induzir resposta anamnésica. Entretanto, ensaios adicionais são necessários para permitir o tratamento estatístico dos dados.

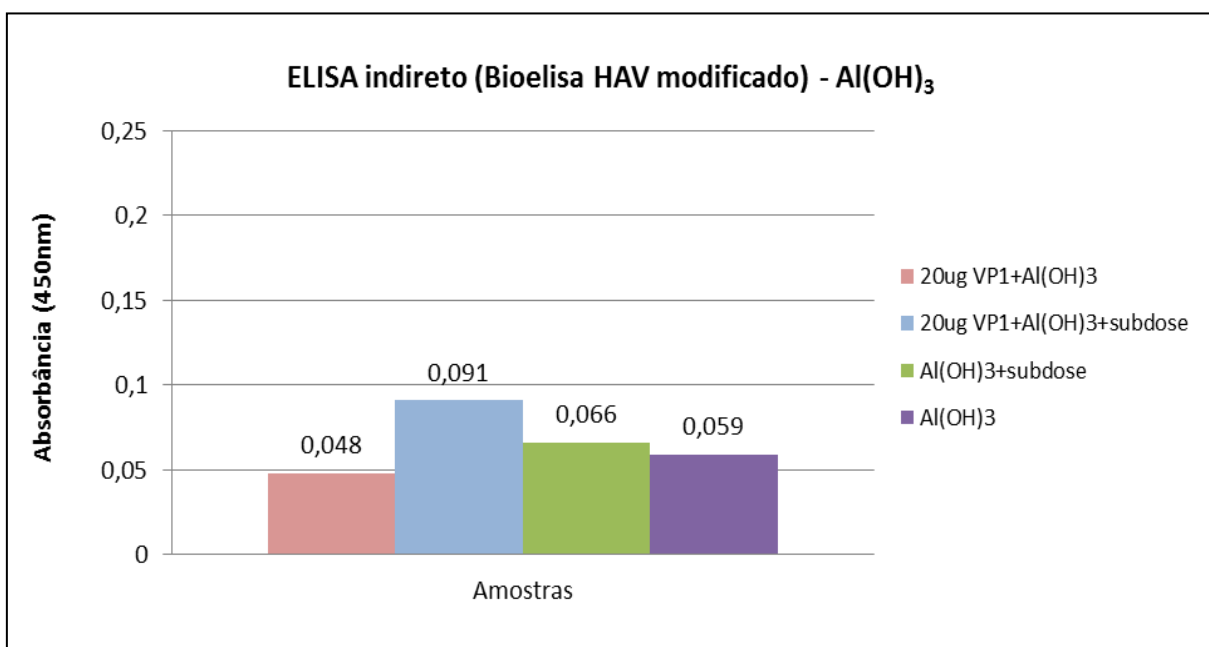


Figura 5.45: Ensaio imunoenzimático (ELISA) para avaliar a ligação dos anticorpos, induzidos pela formulação 20µg VP1r+Al(OH)₃, ao vírus da hepatite A. Os grupos com e sem dose subimunogênica da HAVRIX[®] foram avaliados. Os soros foram analisados em *pool*. O *kit* Bioelisa HAV (Biokit) foi adaptado para o formato de ELISA indireto.

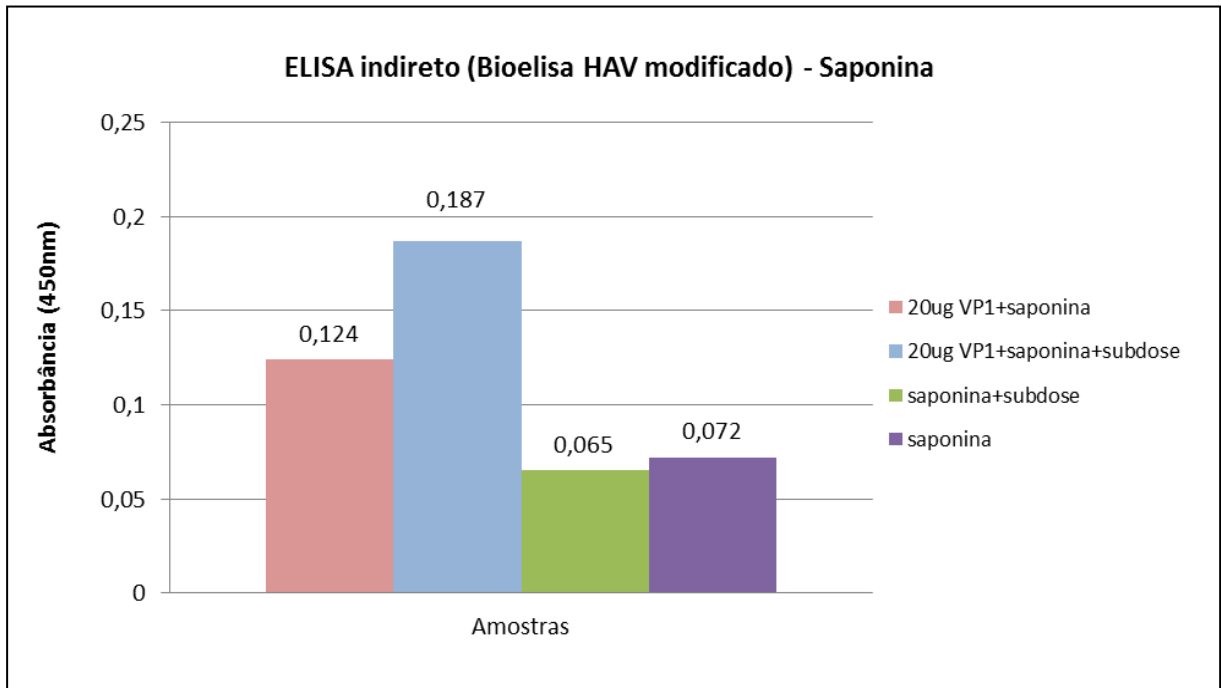


Figura 5.46: Ensaio imunoenzimático (ELISA) para avaliar a ligação dos anticorpos, induzidos pela formulação 20µg VP1+saponina, ao vírus da hepatite A. Os grupos com e sem dose subimunogênica da HAVRIX[®] foram avaliados. Os soros foram analisados em *pool*. O *kit* Bioelisa HAV (Biokit) foi adaptado para o formato de ELISA indireto.

6. Discussão

6.1. Obtenção da proteína VP1 recombinante (VP1r) a partir do sistema baculovírus/células de inseto

Os epítomos de neutralização do HAV parecem ser dependentes da conformação que as proteínas assumem na partícula viral e, portanto, peptídeos sintéticos e proteínas recombinantes parecem ser pouco efetivos na indução de anticorpos neutralizantes (Khudyakov *et al.*, 1999). Contudo, foi demonstrado que a imunização com proteínas estruturais isoladas, produzidas em *E. coli*, foi capaz de induzir anticorpos neutralizantes em coelhos após desafio com dose subimunogênica do HAV (Johnston *et al.*, 1988; Gauss-Müller *et al.*, 1990; Powdrill & Johnston, 1991). Além disso, foi demonstrado que a imunização com o vírus vaccinia recombinante, contendo a região que codifica a poliproteína P1, foi capaz de proteger macacos após desafio com uma cepa virulenta do HAV, mesmo na ausência de evidências de clivagem da poliproteína P1 e montagem de VLPs (Karayiannis *et al.*, 1991). Dessa forma, esses estudos criam perspectivas para avaliar o potencial das proteínas estruturais em fornecer proteção ou atenuar a infecção causada pelo HAV.

A maioria dos estudos que relataram a expressão de proteínas estruturais do HAV utilizou o sistema procarioto *E. coli* (Ostermayr *et al.*, 1987; Johnston *et al.*, 1988; Gauss-Müller *et al.*, 1990; Powdrill & Johnston, 1991; Baptista *et al.*, 2006). Apesar dos níveis elevados de expressão obtidos nesse sistema, as proteínas do HAV foram produzidas, predominantemente, como agregados insolúveis. Além disso, proteínas profiláticas ou terapêuticas, quando produzidas nesse sistema, requerem um passo adicional de purificação para a remoção de lipopolissacarídeos (LPS) (Petsch & Anspach 2000). Nesse contexto, o sistema baculovírus/células de inseto representa uma opção para a expressão de proteínas livres de LPS e na forma solúvel, uma vez que proporciona um ambiente eucariótico, que contribui para o correto enovelamento das proteínas recombinantes (Hu, 2005).

Apesar das vantagens apresentadas pelo sistema baculovírus/células de inseto, a expressão de proteínas do HAV tem sido pouco estudada nessa plataforma (Harmon *et al.*, 1988; Rosen *et al.* 1993). Diante disso, estudos adicionais são

necessários para melhor avaliar e caracterizar a expressão dessas proteínas em células de inseto, visando à utilização como vacina.

De acordo com a literatura, existem pelo menos três sítios de neutralização descritos para o HAV, os quais foram determinados por mutantes de escape de neutralização. Um desses sítios é composto por um *cluster* de resíduos de aminoácidos presentes nas proteínas VP3 (resíduos 70 e 74) e VP1 (resíduos 102, 171 e 176). O segundo sítio é formado apenas pelo resíduo 221 da VP1 (Ping & Lemon, 1992), enquanto que a localização do terceiro sítio permanece indeterminada (Lemon & Robertson, 1993). Como a proteína VP1 possui resíduos de aminoácidos envolvidos na formação de pelo menos dois epítomos de neutralização, a mesma foi escolhida para ser estudada.

Harmon e colaboradores (1998) descreveram a expressão da proteína VP1 do HAV no sistema baculovírus/células de inseto. Contudo, essa proteína foi expressa fusionada a porções das proteínas VP3 e P2. Diante disso, a expressão da VP1 isoladamente, conforme proposto neste trabalho, pode fornecer informações mais acuradas sobre as características dessa proteína.

No presente trabalho, a VP1r foi expressa com sucesso no sistema baculovírus/células de inseto. A proteína recombinante foi detectada no ensaio de *Western blotting*, no qual o anticorpo policlonal de cabra anti-HAV foi utilizado. Como esse anticorpo foi produzido a partir da inoculação de cabras com partículas infecciosas do HAV, o resultado do *Western blotting* indica que, pelo menos, alguns epítomos presentes na partícula viral foram preservados na proteína recombinante.

A VP1r foi purificada com sucesso, mas a recuperação obtida foi relativamente baixa (0,5 mg/L). Além dos níveis relativamente baixos de expressão, parte da VP1r formou agregados insolúveis, que não foram submetidos à IMAC. Esses fatores, quando analisados em conjunto, podem explicar a baixa taxa de recuperação observada.

Hu e colaboradores (2002) obtiveram taxas variáveis de recuperação para as proteínas N (27 mg/L) e E (3 mg/L) de coronavírus-SARS, quando estas foram expressas no sistema baculovírus/células de inseto. Essa diferença foi atribuída aos perfis de solubilidade das proteínas em questão, já que a proteína N foi expressa na forma solúvel, enquanto que a proteína E permaneceu majoritariamente na fração insolúvel. Nesse contexto, a utilização de estratégias para evitar ou minimizar a formação de agregados poderia ser importante para aumentar a taxa de recuperação de proteínas que apresentam baixa solubilidade.

Lee e colaboradores (2009) obtiveram sucesso em realizar a expressão extracelular da VP1r do HAV, utilizando células de *Drosophila melanogaster* S2 estavelmente transformadas. A VP1r foi glicosilada, não foram observados sinais de precipitação e a produção máxima foi de 6,24 mg/L de cultura. Diante dos resultados positivos em células S2, optou-se por realizar a expressão extracelular da VP1r no sistema baculovírus/células de inseto. Esperava-se que essa estratégia fosse capaz de evitar a formação de agregados insolúveis e, com isso, contribuísse para a obtenção de níveis mais elevados da VP1r.

Com o objetivo de direcionar a expressão da VP1r para o meio extracelular, o peptídeo sinal da proteína melitina (HBM, *Honeybee mellitin*) foi utilizado. Esse peptídeo sinal tem sido utilizado com sucesso para realizar a expressão extracelular de diversas proteínas no sistema baculovírus/células de inseto (Tessier *et al.*, 1991; Van der Geld *et al.*, 2002; Kaba *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2009). Além disso, o peptídeo HBM está presente no vetor comercial pFastBac™ HBM TOPO® (Life Technologies), o qual é recomendado para a expressão extracelular de proteínas recombinantes.

A proteína HBM-VP1 foi expressa no sistema baculovírus/células de inseto, mas ao contrário do esperado ficou retida no ambiente intracelular. Embora o peptídeo sinal HBM tenha permitido a expressão extracelular de outras proteínas no sistema baculovírus/células de inseto, a característica hidrofóbica da proteína HBM-VP1 pode ter comprometido o endereçamento para o meio extracelular.

6.2. Obtenção da proteína VP1 recombinante (VP1r) a partir de *Escherichia coli*

Em função das limitações encontradas para a obtenção da VP1r em quantidades moderadas no sistema baculovírus/células de inseto, optou-se por utilizar o sistema procarioto *E. coli*. Apesar das desvantagens já mencionadas, esse sistema é capaz de produzir níveis elevados de expressão a um custo reduzido, justificando sua escolha como alternativa às células de inseto.

Os níveis de expressão da VP1r em *E. coli* foram maiores do que àqueles observados nas células de inseto. A VP1r expressa em *E. coli* foi detectada através da coloração com *Coomassie*® *Blue*, ao contrário da proteína expressa em células de inseto. Ressalta-se que o limite de detecção dessa técnica de coloração é de

aproximadamente 30 ng (Gauci *et al.*, 2011). Assim como observado nas células de inseto, a VP1r foi expressa de forma parcialmente solúvel em *E. coli*.

Após a purificação, a VP1r apresentou nível satisfatório de homogeneidade e foi capaz de reagir com o anticorpo policlonal de cabra anti-HAV. Embora a recuperação da VP1r não tenha sido alta (~50 mg/L), ela foi 100 vezes maior do que a recuperação obtida em células de inseto.

A proteína VP1r foi reconhecida pelo *pool* de soros de pacientes infectados com o HAV (ELISA *in house*). Diante dos resultados positivos, optou-se por avaliar o desempenho do teste ELISA *in house* para a detecção de anticorpos da classe IgM no soro de pacientes infectados com o HAV. Embora o número de soros testados tenha sido pequeno (n= 37), o teste apresentou sensibilidade de 93,7% e especificidade de 100%. Esses dados indicam que a VP1r, produzida neste trabalho, apresenta potencial para ser utilizada como um marcador para o diagnóstico da hepatite A.

6.3. Obtenção das partículas virais destituídas de ácido nucleico (VLPs) a partir do sistema baculovírus/células de inseto

Além da VP1r, o presente trabalho teve como proposta expressar VLPs do HAV. De um modo geral, as VLPs constituem um tipo efetivo de vacina recombinante, já que são capazes de mimetizar a conformação autêntica das proteínas do capsídeo viral sem os riscos associados às vacinas atenuadas e inativadas. As preparações de VLPs são todas baseadas na observação de que a expressão das proteínas do capsídeo de diversos vírus leva a montagem espontânea de partículas estruturalmente semelhantes ao vírus autêntico (Roy & Noad, 2008). Essas partículas são capazes de induzir forte resposta humoral e têm demonstrado alta efetividade em estimular a resposta de linfócitos T proliferativos e citotóxicos (Schirmbeck *et al.*, 1996; Paliard *et al.*, 2000; Murata *et al.*, 2003).

Atualmente, uma grande variedade de sistemas de expressão está disponível para produzir VLPs. Nesse contexto, o sistema baculovírus/células de inseto apresenta diversas vantagens, tais como: (i) produção de grandes quantidades de proteínas recombinantes corretamente enoveladas; (ii) cultivo de células em alta densidade; (iii) expressão de múltiplos genes heterólogos a partir de um único vírus recombinante; (iv) possibilidade de cultivo de células na ausência de suplementos de

origem animal, minimizando os riscos de co-cultivo de patógenos oportunistas; (v) possibilidade de escalonamento para a produção de vacinas em larga escala; (vi) e biossegurança (Roy & Noad, 2008).

No início da década de 1990, foi divulgado um estudo mostrando a produção das VLPs do HAV no sistema baculovírus/células de inseto (Rosen *et al.* 1993). Tais partículas foram capazes de induzir anticorpos neutralizantes em camundongos. A estratégia utilizada para a produção dessas VLPs consistiu na clonagem de toda a fase aberta de leitura do HAV, das regiões 5' NTR e 3' NTR, e da cauda poli-A. Apesar de praticamente todo o genoma do HAV ter sido clonado, os baculovírus recombinantes não continham uma determinada porção da região 5' NTR, que, teoricamente, seria importante para a replicação do vírus. Para confirmar a ausência de partículas infecciosas, as VLPs purificadas foram aplicadas em células permissivas e nenhuma replicação foi detectada durante 4 semanas. Apesar desse resultado, preocupações a respeito da possibilidade de replicação e formação de partículas infecciosas ainda permanecem.

Com o objetivo de eliminar possíveis preocupações a respeito da segurança das VLPs geradas no sistema baculovírus/células de inseto, optou-se por utilizar uma nova abordagem para a produção dessas partículas. Assim, somente as regiões *P1-2A* e *P3* do genoma do HAV foram utilizadas para gerar as VLPs no presente trabalho.

A proteína 2A, como parte da poliproteína *P1-2A*, fornece sinal importante para a montagem das proteínas do HAV em capsídeos vazios (Probst *et al.*, 1999) e, por isso, foi utilizada na construção das VLPs. A clivagem do precursor *P1-2A* é catalisada pela protease 3C, a qual está presente na região *P3* da poliproteína viral. Como as proteínas do segmento *P3* foram capazes de aumentar a eficiência da formação das VLPs do HAV em células de mamífero COS-7 (Probst *et al.*, 1998), optou-se por utilizar todo esse segmento.

A estratégia escolhida para produzir as VLPs consistiu em gerar uma única construção de baculovírus, que pudesse expressar tanto a região das proteínas estruturais quanto a protease do HAV. Essa estratégia evita a necessidade de gerar e manter duas construções de baculovírus. Ademais, elimina a necessidade de realizar co-infecção das células de inseto para a produção das VLPs. Desse modo, as regiões *P1-2A* e *P3* do HAV foram clonadas no vetor pFastBac™ Dual, sob o controle dos promotores da poliedrina e p10, respectivamente. O vetor pFastBac™

Dual+P1-2A+P3 foi utilizado para gerar o baculovírus+P1-2A+P3, utilizado nos ensaios de expressão.

A poliproteína P1-2A foi expressa e clivada, quando as células Sf9 foram infectadas com a construção baculovírus+P1-2A+P3. Embora as massas moleculares das proteínas estruturais do HAV sejam conhecidas, não foi possível apontar quais bandas representavam essas proteínas no ensaio por *Western blotting*. Essa dificuldade pode ser atribuída a possível presença de intermediários de clivagem e produtos de degradação.

Para avaliar se as proteínas estruturais do HAV apresentavam algum grau de organização após a clivagem, o ELISA comercial HAV antigen (Mediagnost) foi utilizado. Esse *kit* fornece placas sensibilizadas com anticorpos capazes de reconhecer o HAV em amostras fecais ou em amostras provenientes de cultura de células. Além disso, o conjugado fornecido no *kit* é um anticorpo monoclonal anti-HAV. Os resultados mostraram que tais anticorpos não foram capazes de reconhecer a proteína VP1 isolada nem o precursor P1-2A não clivado. Em contraste, o extrato de células infectadas com a construção baculovírus-P1-2A+P3 apresentou resultado positivo no teste. Esses resultados indicam que as proteínas liberadas após a clivagem se organizaram em estruturas mais complexas, as quais apresentavam epítomos conformacionais. Tais epítomos estariam ausentes em proteínas isoladas e no precursor P1-2A.

O *kit* ELISA HAV antigen (Mediagnost) também fornece anticorpos capazes de neutralizar o HAV. Esses anticorpos são incubados com as amostras e devem reduzir em 25% os valores de absorvância para que os resultados sejam considerados positivos. Em condições neutralizantes, a absorvância do extrato de células infectadas com baculovírus-P1-2A+P3 foi reduzida em mais de 75%, indicando que esta construção foi capaz de gerar estruturas que apresentavam epítomos de neutralização.

Durante a morfogênese, as proteínas estruturais do HAV se organizam em pentâmeros 14 S, que, posteriormente, interagem entre si para formar os capsídeos virais. De acordo com a literatura, essas estruturas podem ser reconhecidas por alguns anticorpos neutralizantes (Stapleton *et al.*, 1993; Probst *et al.*, 1999). Dessa forma, somente a identificação de epítomos neutralizantes não foi suficiente para afirmar que a construção baculovírus-P1-2A+P3 produziu VLPs do HAV. Nesse contexto, a técnica de microscopia eletrônica apresenta grande valor, já que possibilita a visualização de imagens formadas por VLPs. A utilização dessa técnica

permitiu a identificação de partículas que apresentavam características similares ao HAV no que diz respeito ao diâmetro e a simetria.

Como a técnica de imunomicroscopia eletrônica não foi realizada, os resultados da microscopia eletrônica por contrastação negativa, quando analisados isoladamente, não permitem inferir que as partículas observadas eram realmente VLPs do HAV. Entretanto, quando essas imagens são analisadas em conjunto com os resultados da clivagem da poliproteína P1-2A e com os resultados de detecção de epítomos conformacionais de neutralização, criam-se subsídios para propor que a estratégia utilizada para gerar as VLPs foi eficiente.

A técnica de ultracentrifugação em gradiente descontínuo de sacarose tem sido amplamente utilizada para a purificação de VLPs de vírus não envelopados (Crawford *et al.*, 1994; Zeng *et al.*, 1994; Lin & Wu, 2005; Chung *et al.*, 2006). Apesar disso, não foi possível purificar as VLPs do HAV utilizando essa metodologia. Provavelmente, os níveis relativamente baixos de expressão associados às perdas devido à baixa solubilização das VLPs podem explicar a dificuldade encontrada para realizar a purificação dessas partículas.

Labbé e colaboradores (1991) demonstraram que a combinação de detergentes iônicos e não iônicos era capaz de aumentar a solubilização das VLPs de rotavírus produzidas em células de inseto. Diante disso, o efeito de alguns detergentes sobre a solubilidade das VLPs do HAV foi investigado. A utilização de SDS (0,1%, m/v), associado a um segundo detergente mais brando, foi capaz de aumentar a solubilização das VLPs em relação à condição de extração inicial. Como a baixa solubilização foi um dos fatores que prejudicou a obtenção das VLPs purificadas, esse resultado criou novas perspectivas para o presente trabalho. Espera-se que o aumento da eficiência de extração das VLPs possa facilitar o processo de purificação e, com isso, permitir a avaliação da imunogenicidade dessas partículas.

Visto que as células de inseto fornecem um ambiente eucariótico para a expressão de proteínas heterólogas, acreditava-se que a utilização desse sistema permitiria a expressão das proteínas do HAV na forma solúvel. Entretanto, problemas relacionados à solubilidade foram observados com todas as proteínas expressas nesse sistema (VP1, P1-2A e VLPs). Dessa forma, acredita-se que a formação de agregados possa estar relacionada às características bioquímicas das proteínas do HAV.

A presença de códons raros, IRES ineficiente e a incapacidade de inibir a síntese proteica celular são fatores que podem contribuir para a baixa taxa de

replicação apresentada pelo HAV. Essa característica parece ser importante para o vírus superar a resposta imune do hospedeiro, já que evita a síntese de IFN assim como a apoptose (Brack *et al.*, 2002; Pintó *et al.*, 2007). No entanto, os resultados aqui apresentados nos permitem especular que a baixa taxa de replicação também poderia estar relacionada às características hidrofóbicas das proteínas do capsídeo. Nesse contexto, a replicação lenta seria importante para evitar a agregação das partículas virais.

Visto que o HAV apresenta características distintas da maioria dos picornavírus, optou-se por avaliar se tais diferenças se estenderiam a solubilidade das proteínas estruturais desses vírus. Devido à dificuldade de expressar um número grande de proteínas, as avaliações de solubilidade foram realizadas *in silico*, utilizando a ferramenta ESPRESSO (Hirose & Noguchi, 2013). Ao contrário do que foi observado para o HAV, as características hidrofóbicas parecem não estar presentes nas proteínas do poliovírus humano, que é o membro protótipo da família *Picornaviridae*.

A ferramenta ESPRESSO foi escolhida para tais avaliações, pois a predição realizada pela maioria dos métodos disponíveis é baseada em proteínas expressas em *E. coli* (Wikinson & Harrison, 1991; Idicula-Thomas *et al.*, 2006; Diaz *et al.*, 2010). Alternativamente, a ferramenta ESPRESSO possibilita que a predição seja baseada em propriedades estruturais de proteínas expressas no sistema livre de células – germe de trigo, que é um sistema eucarioto tal como as células de inseto.

Como as características moleculares que contribuem para a baixa replicação do HAV não estão presentes na maioria dos picornavírus, é possível especular que forças evolucionárias distintas tenham atuado sobre esses vírus. Nesse contexto, a diferença de solubilidade entre as proteínas estruturais pode ter apresentado papel importante no direcionamento da evolução dos picornavírus.

6.4. Caracterização da resposta imune induzida pela proteína VP1 recombinante (VP1r) em camundongos

O objetivo inicial do trabalho consistia em avaliar a imunogenicidade das VLPs e da VP1r em modelo animal. Entretanto, as dificuldades referentes à solubilização e purificação das VLPs impediram que, neste primeiro momento, tal análise fosse realizada. As mesmas dificuldades foram encontradas para a VP1r expressa em células de inseto e, por isso, a imunogenicidade foi avaliada a partir da proteína produzida em *E. coli*.

Para os ensaios de imunogenicidade, é importante que a proteína a ser avaliada apresente níveis reduzidos de endotoxinas para não gerar interferência na resposta imune e eventos adversos no hospedeiro. Nesse contexto, a expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* pode ser desvantajosa devido à presença de LPS. Entretanto, é importante destacar que o protocolo de purificação da VP1r, desenvolvido neste trabalho, possibilitou a redução do LPS a níveis indetectáveis pelo método do lisado do amebócito do *Limulus*. Diante disso, não houve a necessidade de realizar uma etapa adicional para a remoção de endotoxinas.

Os primatas não humanos são os modelos experimentais ideais para o estudo da infecção pelo HAV, já que desenvolvem a doença com características semelhante à dos humanos. Entretanto, o custo elevado e as dificuldades referentes à obtenção e manejo desses animais são fatores que podem restringir a realização de estudos nesse modelo (Araujo, 2007).

Elbert e colaboradores (1992) avaliaram a resposta imune de roedores (cobaios, camundongos BALB/c e ratos brancos) frente à imunização com uma vacina inativada para hepatite A. Os camundongos apresentaram títulos de anticorpos elevados e foram capazes de reagir a concentrações menores de imunógeno. Contudo, as variações individuais na resposta imune foram mais pronunciadas. Os cobaios produziram anticorpos em níveis intermediários, mas os títulos foram mais homogêneos. Em contrapartida, os ratos foram os animais menos susceptíveis à vacina, demonstrando baixa produção de anticorpos.

Diante das dificuldades em realizar trabalhos com primatas não humanos e da possibilidade de utilizar roedores para avaliar a produção de anticorpos anti-HAV, optou-se por avaliar a imunogenicidade das formulações vacinais em camundongos da linhagem BALB/c.

As vacinas que utilizam proteínas recombinantes, frequentemente, são pouco imunogênicas e, por isso, requerem a adição de adjuvantes para potencializar a resposta de anticorpos e as funções efetoras das células T (Coffman *et al.*, 2010). Diante disso, a VP1r foi combinada a dois adjuvantes com características distintas, o hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) e o adjuvante a base de saponina.

O Al(OH)₃ é o adjuvante mais comumente utilizado nas vacinas licenciadas para humanos (Mbow *et al.*, 2011). Acredita-se que este adjuvante seja capaz de aumentar a captação de antígenos pelas células dendríticas, o que melhoraria a apresentação dos antígenos para as células do sistema imune adaptativo (Hem & Hogenesch, 2007). Outro mecanismo estaria associado com a ativação do complexo inflamassoma NLRP3. A ativação desta via pode induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1β e IL-18 (Marrack *et al.*, 2009). Ressalta-se que o Al(OH)₃ induz preferencialmente células Th2, as quais medeiam a diferenciação de células B. A ação desse adjuvante sobre a resposta Th1 é pouco pronunciada (Powell *et al.* 2015).

O adjuvante a base de saponina, utilizado no presente projeto, foi desenvolvido a partir da tecnologia de complexo imunoestimulatório (ISCOM). Esse adjuvante possui em sua constituição saponina, colesterol e fosfolipídios. De acordo com o fabricante, esse adjuvante é capaz de promover uma resposta imune vigorosa, com produção de anticorpos e ativação de células Th1 e Th2. Além disso, ele também é capaz de induzir resposta de células T citotóxicas. Em virtude do contrato de sigilo estabelecido entre Bio-Manguinhos e a empresa produtora, o nome do adjuvante não poderá ser divulgado neste trabalho.

Embora existam estudos mostrando a imunização de camundongos com o antígeno VP1 do HAV, ainda não existe consenso sobre a capacidade dessa proteína induzir anticorpos neutralizantes (Bosch *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2011; Berlec *et al.*, 2013; Jang *et al.*, 2014). Alguns trabalhos mostraram que a imunização com VP1 induziu anticorpos capazes de bloquear a infecção pelo HAV nos ensaios *in vitro* (Bosch *et al.*, 1998; Jang *et al.*, 2014). Em outros trabalhos, os testes de neutralização não foram realizados e os resultados relatados mostraram apenas a ligação dos anticorpos com a partícula do HAV (Lee *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2014). Além disso, o trabalho realizado por Berlec e colaboradores (2013), mostrou que os anticorpos induzidos pela VP1 falharam em neutralizar a infecção pelo HAV em cultura de células.

Nesse contexto, o estudo de imunogenicidade, proposto no presente projeto, poderia contribuir para o melhor entendimento da resposta imune induzida pelo antígeno VP1. Além disso, é importante destacar que não existem dados na literatura sobre a caracterização da resposta imune de camundongos frente ao antígeno VP1, quando esse é combinado a adjuvantes baseados em saponina e ao $Al(OH)_3$.

De acordo com o fabricante, o adjuvante a base de saponina permite a redução da massa de antígeno administrada, sem a perda da intensidade da resposta. Diante disso, o estudo de imunogenicidade foi conduzido utilizando duas doses distintas da proteína recombinante, 20 μg e 2 μg . Para a formulação com $Al(OH)_3$, a redução da massa de VP1r implicou na obtenção de títulos de IgG total quase 10 vezes menores. Em contraste, não foram observadas diferenças significativas entre os títulos de IgG total induzidos com 20 μg e 2 μg de VP1r, quando o adjuvante a base de saponina foi utilizado. Esses dados são particularmente interessantes, já que a redução da massa de proteína utilizada pode ser importante sob o ponto vista econômico.

Os títulos de anticorpos IgG anti-VP1 induzidos pelo $Al(OH)_3$ também atingiram níveis máximos após a segunda inoculação. Ao contrário do observado com o adjuvante a base de saponina, os títulos desses anticorpos se mantiveram estáveis até o final do experimento. Essa estabilidade pode ser atribuída ao efeito de depósito associado ao $Al(OH)_3$, o qual permite a liberação lenta do antígeno vacinal para as células do sistema imune (Brito & O'Hagan, 2014).

Os camundongos apresentam quatro subclasses de IgG, as quais são chamadas de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. Essas imunoglobulinas correspondem funcionalmente às subclasses humanas IgG1, IgG2, IgG4 e IgG3, respectivamente (Visciano *et al.*, 2012). Em geral, é possível afirmar que tanto em camundongos quanto em humanos a subclasse IgG1 está associada ao perfil Th2 de resposta, enquanto que as demais subclasses estão, principalmente, associadas ao perfil Th1 (Banerjee *et al.*, 2010).

Os adjuvantes podem induzir mudanças no balanço Th1-Th2 e, com isso, influenciar a subclasse de anticorpo produzida. Por essa razão, optou-se por avaliar o perfil das subclasses de IgG induzidas pelos adjuvantes $Al(OH)_3$ e saponina, em associação com a VP1r. De modo geral, a distribuição das subclasses para ambos os adjuvantes foi IgG1>IgG2a>IgG2b>IgG3. Entretanto, quando a VP1r foi combinada ao adjuvante a base de saponina, observou-se distribuição mais

homogênea entre as subclasses de IgG do que àquela observada com o $\text{Al}(\text{OH})_3$. Provavelmente, o adjuvante a base de saponina foi capaz de induzir maior balanço entre as respostas Th1 e Th2, enquanto que o $\text{Al}(\text{OH})_3$ induziu uma polarização da resposta Th2.

A resposta Th1 leva a ativação de células T citotóxicas, o que contribui para a eliminação do vírus das células hospedeiras. Por outro lado, a resposta Th2 resulta na ativação de células B, as quais produzem anticorpos que podem atuar na neutralização do vírus. Assim, a obtenção de um balanço entre as duas respostas pode ser importante para a prevenção e o controle de infecções virais. Ressalta-se que a vacina comercial Vaqta[®] é capaz de induzir os dois braços da resposta imune em humanos (Hayney *et al.*, 2003).

Embora as formulações contendo o adjuvante a base de saponina tenham permitido um maior balanço entre as respostas Th1 e Th2, o índice de avidéz dos anticorpos induzidos por essas formulações foi inferior ao induzido pela formulação 20 μg VP1r + $\text{Al}(\text{OH})_3$. O efeito de depósito, associado ao $\text{Al}(\text{OH})_3$, pode ter contribuído para a maturação da afinidade dos anticorpos VP1. Como esse efeito não é observado com o adjuvante a base de saponina, a maturação pode ter sido menor.

Apesar dos adjuvantes terem gerado perfis distintos de resposta imune, os soros anti-VP1 não foram capazes de reagir com o HAV, quando analisados por ELISA competitivo (Bioelisa HAV, Biokit). Os testes comercialmente disponíveis para a detecção de anticorpos totais anti-HAV apresentam baixa sensibilidade (Lemon, 1997), o que pode explicar os resultados negativos observados.

Com o objetivo de aumentar a sensibilidade do método de detecção de anticorpos anti-HAV, o formato do *kit* comercial foi alterado de ELISA competitivo para ELISA indireto. Nesse formato de teste, os anticorpos induzidos pela formulação 20 μg VP1r + $\text{Al}(\text{OH})_3$ não apresentaram reação cruzada com o HAV. Em contraste, os anticorpos induzidos pela formulação 20 μg VP1r + saponina apresentaram valor de absorvância (0,124) numericamente superior ao do controle negativo (0,065). Não foi possível apontar se essa diferença foi estatisticamente significativa, pois as amostras foram analisadas em *pool*. A escassez do reagente (*kit*) impossibilitou que as amostras fossem analisadas individualmente.

Estudos realizados em coelhos (Johnston *et al.*, 1988; Gauss-Müller *et al.*, 1990; Powdrill & Johnston, 1991) mostraram que a imunização com proteínas recombinantes do HAV poderia induzir a produção de anticorpos neutralizantes após

a administração de uma dose subimunogênica do HAV inativado. Com base nestes estudos, optou-se por avaliar se as formulações vacinais, utilizadas no presente estudo, também seriam capazes de gerar uma resposta anamnésica contra o HAV, após desafio com uma subdose da vacina comercial HAVRIX[®]. Embora não tenham sido realizados testes estatísticos, os valores de absorvância dos grupos que receberam a subdose foram numericamente superiores aos valores observados para aqueles que não receberam a subdose, quando as amostras foram analisadas por ELISA indireto. Esse dado foi observado tanto para o grupo de animais que recebeu a VP1r+Al(OH)₃ quanto para aquele que recebeu a VP1r+saponina, e sugere que a VP1r seja capaz de gerar resposta anamnésica contra o HAV.

Um dos problemas enfrentados para adaptar o ensaio de ELISA competitivo para indireto foi o alto *background* observado. Esse problema foi contornado com a utilização do conjugado em uma diluição elevada, 1:70.000. Essa condição pode ter levado a diminuição da sensibilidade do teste, dificultando a detecção de anticorpos com capacidade de ligação ao HAV. Nesse contexto, seria importante avaliar se a modificação de algumas condições como o tampão de bloqueio, o tempo ou a temperatura de incubação poderiam aumentar a capacidade de detecção de anticorpos murinos anti-HAV.

A otimização do ELISA indireto e a análise dos soros individualmente permitirão melhor entendimento sobre a capacidade das formulações vacinais em induzir anticorpos anti-VP1 com ligação cruzada ao HAV e resposta anamnésica.

O presente trabalho mostrou que o sistema baculovírus/células de inseto representa uma ferramenta útil para expressar proteínas do HAV, especialmente quando níveis maiores de complexidade são exigidos, como é o caso das VLPs. Entretanto, os baixos níveis de expressão e solubilidade dificultaram a purificação e, por conseguinte, a avaliação da imunogenicidade da VP1r e das VLPs expressas nesse sistema. Diante disso, esforços direcionados para a otimização das condições de expressão, extração e purificação dessas proteínas são necessários. O sistema *E. coli* foi utilizado como alternativa para a produção da VP1r, já que permite níveis mais elevados de expressão. Dessa forma, foi possível purificar e avaliar a imunogenicidade da VP1r. Além disso, a VP1r foi reconhecida por soros de pacientes infectados pelo HAV, o que demonstra seu potencial como um marcador para diagnóstico. Nos ensaios de imunogenicidade em camundongos, a VP1r foi combinada a dois adjuvantes, que apresentavam características distintas. A combinação VP1r+Al(OH)₃ causou uma polarização da resposta Th2, conforme o

esperado. Em contrapartida, a combinação VP1r+saponina permitiu um maior balanço entre as respostas Th1 e Th2. Os resultados indicaram que o adjuvante a base de saponina permitiu a redução da massa de VP1r administrada sem afetar a intensidade da resposta, ao contrário do que foi observado com o Al(OH)₃. Resultados preliminares sugerem que os anticorpos anti-VP1 induzidos pelo adjuvante a base de saponina apresentaram reatividade cruzada com o HAV, ainda que de baixa intensidade. Além disso, testes iniciais indicam que os camundongos imunizados com a VP1r foram capazes de gerar resposta anamnésica contra o HAV. Os resultados aqui apresentados sugerem que a VP1r e as VLPs podem ser úteis para o desenvolvimento de novas vacinas e para o diagnóstico da hepatite A.

7. Conclusões

- A estratégia adotada para a produção das VLPs do HAV no sistema baculovírus/células de inseto foi considerada eficiente;
- A VP1r foi expressa e purificada a partir dos sistemas baculovírus/células de inseto e *Escherichia coli*. Níveis mais elevados de expressão foram obtidos em *E. coli*, o que conseqüentemente aumentou a taxa de recuperação da VP1r purificada;
- A VP1r (*E. coli*) mostrou reatividade frente aos soros de pacientes infectados com o HAV, o que indica seu potencial como marcador para diagnóstico;
- A formulação VP1r (*E. coli*) + Al(OH)₃ induziu polarização da resposta Th2, enquanto que a formulação VP1r (*E. coli*) + saponina gerou um balanço maior entre as respostas Th1 e Th2. A formulação com o adjuvante baseado em saponina induziu títulos maiores de anticorpos e permitiu a utilização de uma dose menor da VP1 sem afetar a intensidade da resposta;
- Resultados preliminares sugerem que os anticorpos anti-VP1 induzidos pelo adjuvante baseado em saponina apresentaram reatividade cruzada com o HAV, apesar da baixa intensidade;
- Testes iniciais indicam que a imunização de camundongos com a VP1r (*E. coli*) em associação com ambos os adjuvantes foi capaz de induzir resposta anamnésica contra o HAV.

8. Referências bibliográficas

Amado LA, Villar LM, de Paula VS, Gaspar AM. Comparison between serum and saliva for the detection of hepatitis A virus RNA. *J Virol Methods* 2008; 148: 74-80.

Amado LA, Marchevsky RS, de Paula VS, Hooper C, Freire Mda S, Gaspar AM, Pinto AM. Experimental hepatitis A virus (HAV) infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*): evidence of active extrahepatic site of HAV replication. *Int J Exp Pathol* 2010a; 91: 87-97.

Amado LA. Saliva como espécime clínico para o estudo da hepatite A: aplicações no diagnóstico, na epidemiologia e na patogênese. [Tese de Doutorado]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2010b.

Amado LA, Villar LM, de Paula VS, Pinto MA, Gaspar AM. Exposure to multiple subgenotypes of hepatitis A virus during an outbreak using matched serum and saliva specimens. *J Med Virol* 2011; 83: 768-75.

Anderson DL, Boham K, Isaksson LA, Kurland CG. Translation rates misreading characteristics of rpsD mutants in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 1982; 187: 467-72.

Araujo FRC. Avaliação da susceptibilidade de *Cavia porcellus* ao vírus da hepatite A. [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2007.

Araujo FRC, Marchevsky RS, de Lima SMB, Martins LM, Hooper C, de Paula VS, *et al.* Guinea pig (*Cavia porcellus*) can be or not used as an experimental model to study hepatitis a virus infection? *Virus Reviews and Research* 2010; 15: 12-23.

Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expression System: an efficient site-specific transposition system to generate baculovirus for high-level expression of recombinant proteins. Life Technologies, Revision A.0. 2013.

Baldwin RL. How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophys J* 1996; 71: 2056-63.

Ballesteros J, Dal-Ré R, González A, del Romero J. Are homosexual males a risk group of hepatitis A infection in intermediate endemic areas? *Epidemiol Infect Dis* 1996; 117: 145-8.

Banerjee K, Klasse PJ, Sanders RW, Pereyra F, Michael E, Lu M, *et al.* IgG subclass profiles in infected HIV type 1 controllers and chronic progressors and in uninfected of Env vaccines. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2010; 26: 445-58.

Baptista ML, Marchevsky RS, Oliveira AV, Yoshida CF, Schatzmayr HG. Histopathological and immunohistochemical studies of hepatitis A virus infection in marmoset *Callithrix jacchus*. *Exp Toxicol Pathol* 1993; 45: 7-13.

Baptista ML, Silva M, Lima MA, Yoshida CF, Gaspar AM, Galler R. Genetic variability of hepatitis A virus strain HAF 203 isolated in Brazil and expression of the VP1 gene in *Escherichia coli*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101: 759-66.

Baroudy BM, Ticehurst JR, Miele TA, Maizel JV Jr, Purcell RH, Feinstone SM. Sequence analysis of hepatitis A virus cDNA coding for capsid proteins and RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 2143-7.

Bell BP, Anderson DA, Feinston SM. Virus de la hepatitis A. In: Madell GL, Bennett JE, Dolin R. *Enfermedades Infecciosas, Principios y Práctica*. Madrid: Elsevier; 2006; 2: 2163-71.

Berelowitz GJ, Burgess AP, Thanabalasingham T, Murray-Lyon IM, Wright DJ. Post-hepatitis syndrome revisited. *J Viral Hepatol* 1995; 2:133-8.

Berlec A, Malovrh T, Zadavec P, Steyer A, Ravnikar M, Sabotic J. Expression of a hepatitis A virus antigen in *Lactococcus lactis* and *Escherichia coli* and evaluation of its immunogenicity. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013; 97: 4333-42.

Binn LN, Bancroft WH, Lemon SM, Marchwicki RH, LeDuc JW, Trahan CJ, *et al.* Preparation of a prototype inactivated hepatitis A virus vaccine from infected cell cultures. *J Infect Dis* 1986; 153: 749-56.

Bishop NE, Anderson DA. RNA-dependent cleavage of VP0 capsid protein in provirions of hepatitis A virus. *Virology* 1993; 2: 616-23.

Black FL, Jacobson DL. Hepatitis A antibody in an isolated Amerindian tribe fifty years after exposure. *J Med Virol* 1986; 19: 19-21.

Bondos SE, Bicknell A. Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification. *Anal Biochem* 2003; 316: 223-31.

Borman AM, Kichweger R, Ziegler E, Rhoads RE, Skern T, Kean KM. eIF4G and its proteolytic cleavage products: effect on initiation of protein synthesis from capped, uncapped, and IRES-containing mRNAs. *RNA* 1997; 3: 186-96.

Borovec SV, Anderson DA. Synthesis and assembly of hepatitis A virus-specific proteins in BS-C-1 cells. *J Virol* 1993; 67:3095-3102.

Bosch A, González-Dankaart JF, Haro I, Gajardo R, Pérez JÁ, Pintó RM. A new continuous epitope of hepatitis A virus. *J Med Virol* 1998; 54: 95-102.

Brack K, Berkl I, Magulski T, Lederer J, Dotzauer A, Vallbracht A. Hepatitis A virus inhibits cellular antiviral defense mechanisms induced by double-stranded RNA. *J Virol* 2002; 76: 11920-30.

Brito LA, O'Hagan DT. Designing and building the next generation of improved vaccine adjuvants. *J Control Release* 2014; 190: 563-79.

Broman M, Jokinen S, Kuusi M, Lappalainen M, Roivainen M, Liitsola K, *et al.* Epidemiology of hepatitis A in Finland in 1990-2007. *J Med Virol* 2010; 82: 934-41.

Brondyk WH. Selecting an Appropriate Method for Expressing a Recombinant Protein. In: Richard BR, Deutscher MP. *Methods in Enzymology*. Burlington: Academic Press; 2009, p. 131-47.

Brown EA, Zajac AJ, Lemon SM. In vitro characterization of an internal ribosomal entry site (IRES) present within the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA: comparison with the IRES of encephalomyocarditis virus. *J Virol* 1994; 68: 1066-74.

CDC. Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 1999; 48: 1-37.

CDC. Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 2006; 55: 1-23.

Champion™ pET Directional TOPO® Expression: Five-minute, directional TOPO® Cloning of blunt-end PCR products into vectors for high-level, inducible expression in *E. coli*. Life Technologies, Rev Date 7 June 2010.

Chung HY, Lee HH, Kim KI, Chung HY, Hwang-Bo J, Park JH, *et al.* Expression of a recombinant chimeric protein of hepatitis A virus VP1-Fc using a replicating vector based on Beet curly top virus in tobacco leaves and its immunogenicity in mice. *Plant Cell Rep* 2011; 30: 1513-21.

Chung YC, Huang JH, Lai CW, Sheng HC, Shih SR, Ho MS, *et al.* Expression, purification and characterization of enterovirus-71 virus-like particles. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 921-7.

Ciocca, M. Clinical course and consequences of hepatitis A infection. *Vaccine* 2000; 18: S71-4.

Clemens SA, da Fonseca JC, Azevedo T, Cavalcanti A, Silveira TR, Castilho MC, *et al.* Hepatitis A and hepatitis B seroprevalence in 4 centers in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000; 33: 1-10.

Cockayne EA. Catarrhal jaundice, sporadic and epidemic, and its relation to acute yellow atrophy of the liver. *Q J Med* 1912; 6: 1-29.

Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* 2010; 33: 492-503.

Cohen JI, Ticehurst JR, Purcell RH, Buckler-White A, Baroudy BM. Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus: comparison with different strains of hepatitis A virus and other picornaviruses. *J Virol* 1987; 61: 50-9.

Cohen JI, Feinstone S, Purcell RH. Hepatitis A virus infection in a chimpanzee: duration of viremia and detection of virus in saliva and throat swabs. *J Infect Dis* 1989; 160: 887-90.

Cohen L, Bénichou D, Martin A. Analysis of deletion mutants indicates that the 2A polypeptide of hepatitis A virus participates in virion morphogenesis. *J Virol* 2002; 76: 7495-7505.

Coulepis AG, Anderson BN, Gust ID. Hepatitis A. *Adv Virus Res* 1987; 32: 129-69.

Crawford SE, Labbé M, Cohen J, Burroughs MH, Zhou YJ, Estes MK. Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J Virol* 1994; 68: 5945-52.

Cuthbert JA. Hepatitis A: old and new. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 38-58.

Daemer RJ, Feinstone SM, Gust ID, Purcell RH. Propagation of human hepatitis A virus in African green monkey kidney cell culture: primary isolation and serial passage. *Infect Immun* 1981; 32: 388-93.

de Castro MEB, de Souza ML, Sihler W, Rodrigues JCM, Ribeiro BM. Biologia molecular de baculovirus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil. *Pesq agropec bras* 1999; 34: 1733-61.

de Paula VS. Laboratory diagnosis of hepatitis A. *Future Virol* 2012; 7: 461-72.

Diaz AA, Tomba E, Lennarson R, Richard R, Bagajewicz MJ, Harrison RG. Prediction of protein solubility in Escherichia coli using logistic regression. *Biotechnol Bioeng* 2010; 105: 374-83.

Dotzauer A, Kraemer L. Innate and adaptive immune responses against picornaviruses and their counteractions: an overview. *World J Virol* 2012; 12: 91-107.

Duval B, De Serres G, Ochnio J, Scheifele D, Gîlca V. Nationwide Canadian study of hepatitis A antibody prevalence among children eight to thirteen years old. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24: 514-9.

Elbert LB, Lisitzina EA, Kusov YY, Balayan MS. Immunogenicity of inactivated purified tissue culture vaccine against hepatitis A (HepAvac) assessed in laboratory rodents. *Vaccine* 1992; 10: 828-32.

Engelhard EK, Kam-Morgan LN, Washburn JO, Volkman LE. The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3224-7.

Espul C, Benedetti L, Linares M, Cuello H, Rasuli A. Five-year follow-up of immune response after one or two doses of inactivated hepatitis A vaccine given at 1 year of age in the Mendoza province of Argentina. *J Viral Hepat* 2015; 22: 453-8.

Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. Hepatitis A: Detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science*. 1973; 182: 1026-8.

Flehming B, Haage A, Pfisterer M. Immunogenicity of a hepatitis A virus vaccine. *J Med Virol* 1987; 22: 7-16.

Fleischer B, Fleischer S, Maier K, Wiedmann KH, Sacher M, Thaler H, *et al.* Clonal analysis of infiltrating T lymphocytes in liver tissue in viral hepatitis A. *Immunology* 1990; 69: 14-19.

Friesen PD. Insect viruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, et al. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p.707-37.

Gabriel P, Vallbracht A, Flehmig B. Lack of complementdependent cytolytic antibodies in hepatitis A virus infection. *J Med Virol* 1986; 20: 23-31.

Gauci VJ, Wright EP, Coorsen JR. Quantitative proteomics: assessing the spectrum of in-gel protein detection methods. *J Chem Biol* 2011; 4: 3-29.

Gauss-Müller V, Deinhardt F. Effect of hepatitis A virus infection on cell metabolism in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* 1984; 175: 10-5.

Gauss-Müller V, Zhou MQ, von der Helm K, Deinhardt F. Recombinant proteins VP1 and VP3 of hepatitis A virus prime for neutralizing response. *J Med Virol* 1990; 31: 277-83.

Gellis SS, Stokes Jr J, Brother GM, Hall WM, Gilmore HR, Beyer E, *et al.* The use of human immune serum globulin (gamma globulin) in infectious (epidemic) hepatitis in the Mediterranean theater of operations. I. Studies on prophylaxis in two epidemics of infectious hepatitis. *JAMA* 1945; 128:1062-3.

Gosert R, Egger D, Bienz K. A cytopathic and a cell culture adapted hepatitis A virus strain differ in cell killing but not in intracellular membrane rearrangements. *Virology* 2000; 266: 157-69.

Grabow WO, Gauss-Müller V, Prozesky OW, Deinhardt F. Inactivation of hepatitis A virus and indicator organisms in water by free chlorine residuals. *Appl Environ Microbiol* 1983; 46: 619-24.

Gust ID, Coulepis AG, Feinstone SM, Locarnini SA, Moritsugu Y, Najera R, *et al.* Taxonomic classification of hepatitis A virus. *Intervirology* 1983; 20: 1-7.

Hadler SC, Webster HM, Erben JJ, Swanson JE, Maynard JE. Hepatitis A in day-care centers: a community-wide assessment. *N Engl J Med* 1980; 302: 1222-7.

Harmon SA, Johnston JM, Ziegelhoffer T, Richards OC, Summers DF, Ehrenfeld E. Expression of hepatitis A virus capsid sequences in insect cells. *Virus Res* 1988; 10: 273-80.

Havens Jr WP. Infectious hepatitis in middle-east: a clinical review of 200 cases seen in a military hospital. *J Am Med Assoc* 1944; 126: 17-23.

Havens Jr WP, Paul JR. Prevention of infectious hepatitis with gamma globulin. *JAMA* 1945; 129: 270-2.

Havens Jr WP. The etiology of infectious hepatitis. *JAMA* 1947; 134: 653-5.

Hayney MS, Buck JM, Muller D. Production of interferon-gamma and interleukin-10 after inactivated hepatitis A immunization. *Pharmacotherapy* 2003; 23: 431-5.

Hem SL, Hogenesch H. Relationship between physical and chemical properties of aluminum-containing adjuvants and immunopotentiality. *Expert Rev Vaccines* 2007; 6: 685-98.

Hirose S, Noguchi T. ESPRESSO: a system for estimating protein expression and solubility in protein expression systems. *Proteomics* 2013; 13: 1444-56.

Hollinger FB, Emerson SU. Hepatitis A virus. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 911-47.

Hornei B, Kämmerer R, Moubayed P, Frings W, Gauss-Müller V, Dotzauer A. Experimental hepatitis A virus infection in guinea pigs. *J Med Virol* 2001; 64: 402-9.

Hu YC, Liu HJ, Chung YC. High level expression of the key antigenic protein, σ C, from avian reovirus into insect cells and its purification by immobilized metal affinity chromatography. *Biotechnol Lett* 2002; 24: 1017-22.

Hu YC. Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26: 405-16.

Huang CJ, Lin H, Yang X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2012; 39: 383-99.

Idicula-Thomas S, Kulkarni AJ, Kulkarni BD, Jayaraman VK, Balaji PV. A support vector machine-based method for predicting the propensity of a protein to be soluble or to form inclusion body on over expression in *Escherichia coli*. *Bioinformatics* 2006; 22: 278-84.

Innis BL, Snitbhan R, Kunasol P, Laorakpongse T, Poopatanakool W, Kozik CA, *et al.* Protection against hepatitis A by an inactivated vaccine. *JAMA* 1994; 271: 1328-34.

Ishak KG. Light microscopic morphology of viral hepatites. *Am J Clin Pathol* 1976; 65: S787-827.

Jacobsen KH, Koopman JS. The effects of socioeconomic development on worldwide hepatitis A virus seroprevalence patterns. *Int J Epidemiol* 2005; 34: 600-9.

Jacobsen KH, Wiersma ST. Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. *Vaccine* 2010; 28: 6653-7.

Jana S, Deb JK. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005; 67: 289-98.

Jang KO, Park JH, Lee HH, Chung DK, Kim W, Chung IS. Expression and immunogenic analysis of recombinant polypeptides derived from capsid protein VP1 for developing subunit vaccine material against hepatitis A virus. *Protein Expr Purif* 2014; 100: 1-9.

Johnston JM, Harmon SA, Binn LN, Richards OC, Ehrenfeld E, Summers DF. Antigenic and Immunogenic Properties of a Hepatitis A Virus Capsid Protein Expressed in *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1988; 157: 1203-11.

Kaba SA, Salcedo AM, Wafula PO, Vlak JM, van Oers MM. Development of a chitinase and v-cathepsin negative bacmid for improved integrity of secreted recombinant proteins. *J Virol Methods* 2004; 122: 113-8.

Kang JH, Lee KY, Kim CH, Sim D. Changing hepatitis A epidemiology and the need for vaccination in Korea. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2004; 22: 237-42.

Karayiannis P, O'Rourke S, McGarvey MJ, Luther S, Waters J, Godin R, *et al.* Recombinant vaccinia virus expressing hepatitis A virus structural polypeptides: characterization and demonstration of protective immunogenicity. *J Gen Virol* 1991; 72: 2167-72.

Kemmer NM, Miskovsky EP. Hepatitis A. *Infect Dis Clin North Am* 2000; 14: 605-15.

Khudyakov YE, Lopareva EN, Jue DL, Fang S, Spelbring J, Krawczynski K, *et al.* Antigenic epitopes of the hepatitis A virus polyprotein. *Virology* 1999; 260: 260-72.

Kim MJ, Park HS, Seo KH, Yang HJ, Kim SK, Choi JH. Complete solubilization and purification of recombinant human growth hormone produced in *Escherichia coli*. *Plos One* 2013; 8: e56168.

King LA, Possee RD. *The baculovirus expression system: a laboratory guide.* London: Chapman & Hall; 1992. p.1-36.

Koff RS. Clinical manifestations and diagnosis of hepatitis A virus infection. *Vaccine* 1992; 10: S15-7.

Koff RS. Hepatitis A. *Lancet* 1998; 341: 1643-9.

Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 567-75.

Kreuz W, Klarmann D, Auerswald G, Auberger K, Gurtler L, Rabenau H, *et al.* Absence of hepatitis A after treatment with pasteurised factor VIII concentrates in children with haemophilia A and von Willebrand disease. *Lancet* 1993; 341: 446.

Kusov Y, Gauss-Müller V, Morace G. Immunogenic epitopes on the surface of hepatitis A virus capsid: Impact of secondary structure and/or isoelectric point on chimeric virus assembly. *Virus Res* 2007; 130: 296-302.

Labbé M, Charpilienne A, Crawford SE, Estes MK, Cohen J. Expression of rotavirus VP2 produces empty corelike particles. *J Virol* 1991; 65: 2946-52.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.

Lapin BA, Shevtsova ZV. Persistence of spontaneous and experimental hepatitis A in rhesus macaques. *Exp Pathol* 1990; 39: 59-60.

Lednar WM, Lemon SM, Kirkpatrick JW, Redfield RR, Fields ML, Kelley PW. Frequency of illness associated with epidemic hepatitis A virus infections in adults. *Am J Epidemiol* 1985; 122: 226-33.

Lee JM, Lee HH, Hwang-Bo J, Shon DH, Kim W, Chung IS. Expression and immunogenicity of recombinant polypeptide VP1 of human hepatitis A virus in stably transformed fruitfly (*Drosophila melanogaster*) Schneider 2 cells. *Biotechnol Appl Biochem* 2009; 53:101-9.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Princípios de bioquímica*. 3^a ed. São Paulo: Sarvier; 2007.

Lemon SM, Jansen RW, Newbold JE. Infectious hepatitis A virus particles produced in cell culture consist of three distinct types with different buoyant densities in CsCl. *J Virol* 1985; 54: 78-85.

Lemon SM, Murphy PC, Shields PA, Ping LH, Feinstone SM, Cromeans T, *et al.* Antigenic and genetic variation in cytopathic hepatitis A virus variants arising during persistent infection: evidence for genetic recombination. *J Virol* 1991; 65: 2056-65.

Lemon SM, Robertson BH. Current perspectives in the virology and molecular biology of hepatitis A virus. *Semin Virol* 1993; 4: 285-95.

Lemon SM. Type A viral hepatitis: epidemiology, diagnosis, and prevention. *Clin Chem* 1997; 43: 1494-9.

Lin YJ, Wu SC. Histidine at residue 99 and the transmembrane region of the precursor membrane prM protein are important for the prM-E heterodimeric complex formation of Japanese encephalitis virus. *J Virol* 2005; 79: 8535-44.

Liu F, Wu X, Li L, Liu Z, Wang Z. Use of baculovirus expression system for generation of virus-like particles: successes and challenges. *Protein Expr Purif* 2013; 90: 104-16.

MacCallum FO, Bauer DJ. Homologous serum jaundice transmission experiments with human volunteers. *Lancet* 1944; 243: 622-7.

MacCallum FO, Bradley WH. Transmission of infective hepatitis to human volunteers. *Lancet* 1944; 2: 228-32.

MacCallum FO. Homologous serum jaundice. *Lancet* 1947; 2: 691-2.

Mackiewicz V, Dussaix E, Le Petitcorps MF, Roque-Afonso AM. Detection of hepatitis A virus RNA in saliva. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4329-31.

Maier K, Gabriel P, Koscielniak E, Stierhof YD, Wiedmann KH, Flehmig B, *et al.* Human gamma interferon production by cytotoxic T lymphocytes sensitized during hepatitis A virus infection. *J Virol* 1988; 62: 3756-63.

Manangeeswaran M, Jacques J, Tami C, Konduru K, Amharref N, Perrella O, *et al.* Binding of hepatitis a virus to its cellular receptor 1 inhibits T-regulatory cell functions in humans. *Gastroenterology* 2012; 142: 1516-25.

Mao JS, Guo XY, Huang HY, Yu PH, Huang BZ, Ding ZC, *et al.* Studies on transmission of human hepatitis A virus to stump-tail monkey. *Sci Sin* 1981; 24: 1590-6.

Marrack P, McKee AS, Munks MW. Towards and understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 287-93

Martin A, Lemon SM. Hepatitis A virus: from discovery to vaccines. *Hepatology* 2006; 43: S164-72.

Mbow ML, De Gregorio E, Ulmer JB. Alum's adjuvant action: grease is the world. *Nat Med* 2011; 17: 415-6.

McCaustland KA, Bond WW, Bradley DW, Ebert JW, Maynard JE. Survival of hepatitis A virus in feces after drying and storage for 1 month. *J Clin Microbiol* 1982; 16: 957-8.

McDonald S. Acute yellow atrophy of the liver. *Edinburgh Medical Journal* 1908; 1: 83-8.

Minor PD. Picornaviridae. In: Francki RIB, Fauquet, CM, Knudson DL, Brown F. *Classification and Nomenclature of Viruses: Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Wien: Springer-Verlag; 1991. p. 320-6.

Morais LM, de Paula VS, Arantes MR, Oliveira ML, Gaspar AM. Early infection and asymptomatic spread of hepatitis A virus in a public child care center in Rio de Janeiro, Brazil: should attending children under two years of age be vaccinated? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101: 401-5.

Murata K, Lechmann M, Qiao M, Gunji T, Alter HJ, Liang TJ. Immunization with hepatitis C virus-like particles protects mice from recombinant hepatitis C virus vaccinia infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 6753-8.

Nainan OV, Xia G, Vaughan G, Margolis HS. Diagnosis of hepatitis a virus infection: a molecular approach. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 63-79.

Nalin DR, Kuter BJ, Brown L, Patterson C, Calandra GB, Werzberger A, *et al.* Worldwide experience with the CR326F-derived inactivated hepatitis A virus vaccine in pediatric and adult populations: an overview. *J Hepatol* 1993; 18: S51-5.

O'Grady JG, Schalm SW, Williams R. Acute liver failure: redefining the syndromes. *Lancet* 1993; 342: 273-5.

Oliveira LHS, Yoshida CFT, Monteiro SS, Câmara FP. Seroepidemiologic survey for hepatitis A and B markers in health care students from a public university of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Microbiol São Paulo* 1991; 23: 226-31.

Ostermayr R, von der Helm K, Gauss-Müller V, Winnacker EL, Deinhardt F. Expression of hepatitis A virus cDNA in *Escherichia coli*: antigenic VP1 recombinant protein. *J Virol* 1987; 61: 3645-7.

Ott JJ, Wiersma ST. Single-dose administration of inactivated hepatitis A vaccination in the context of hepatitis A vaccine recommendations. *Int J Infect Dis* 2013; 17: 939-44.

Paliard X, Liu Y, Wagner R, Wolf H, Baenziger J, Walker CM. Priming of strong, broad and long-lived HIV type 1 p55gag-specific CD8⁺ cytotoxic T cells after administration of a virus-like particle vaccine in rhesus macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; 16: 273-82.

Palmenberg AC. Proteolytic processing of picornaviral polyprotein. *Annu Rev Microbiol* 1990; 44: 603-23.

Parry JV, Mortimer PP. The heat sensitivity of hepatitis A virus determined by a simple tissue culture method. *J Med Virol* 1984; 14: 277-83.

Pereira FEL, Gonçalves CS. Hepatitis A. *Ver Soc Bras Med Trop* 2003; 36: 387-400.

Petsch D, Anspach FB. Endotoxin removal from protein solutions. *J Biotechnol* 2000; 76: 97-119.

Pham B, Duval B, de Serres G, Gilca V, Tricco AC, Ochnio J, *et al.* Seroprevalence of hepatitis A infection in a low endemicity country: a systematic review. *BMC Infect Dis* 2005; 5: 56.

Ping LH, Lemon SM. Antigenic structure of human hepatitis A virus defined by analysis of escape mutants selected against murine monoclonal antibodies. *J Virol* 1992; 66: 2208-16.

Pintó RM, Aragonès L, Costafreda MI, Ribes E, Bosch A. Codon usage and replicative strategies of hepatitis A virus. *Virus Res* 2007; 127: 158-63.

Poovorawan Y, Theamboonlers A, Chumdermpadetsuk S, Glück R, Cryz SJ Jr. Safety, immunogenicity, and kinetics of the immune response to a single dose of virosome-formulated hepatitis A vaccine in Thais. *Vaccine* 1995; 13: 891-3.

Portal Brasil. Vacina contra hepatite A passa a ser oferecida pelo SUS. 2014. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2014/07/vacina-contr-hepatite-a-passa-a-ser-oferecida-pelo-sus>. Acesso: 26 mar 2015.

Powdrill TF, Johnston JM. Immunologic priming with recombinant hepatitis A virus capsid proteins produced in *Escherichia coli*. *J Virol* 1991; 65: 2686-90.

Powell BS, Andrianov AK, Fusco PC. Polyionic vaccine adjuvants: another look at aluminum salts and polyelectrolytes. *Clin Exp Vaccine Res* 2015; 4: 23-45.

Probst C, Jecht M, Gauss-Müller V. Processing of proteinase precursors and their effect on hepatitis A virus particle formation. *J Virol* 1998; 72: 8013-20.

Probst C, Jecht M, Gauss-Müller V. Intrinsic signals for the assembly of hepatitis A particles. Role of structural proteins VP4 and 2A. *J Biol Chem* 1999; 274: 4527-31.

Provost PJ, Wolanski BS, Miller WJ, Ittensohn OL, McAleer WJ, Hilleman MR. Physical, chemical and morphologic dimensions of human hepatitis A virus strain CR326 (38578). *Proc Soc Exp Biol Med* 1975; 148: 523-9.

Provost PJ, Hilleman MR. Propagation of human hepatitis A in cell culture in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* 1979; 160: 213-21.

Provost PJ, Hughes JV, Miller WJ, Giesa PA, Banker FS, Emini EA. An inactivated hepatitis A viral vaccine of cell culture origin. *J Med Virol* 1986; 19: 23-31.

Rosen E, Stapleton JT, McLinden J. Synthesis of immunogenic hepatitis A virus particles by recombinant baculoviruses. *Vaccine* 1993; 11: 706-12.

Roy P, Noad R. Virus-like particles as a vaccine delivery system: myths and facts. *Human Vaccin* 2008; 4: 5-12.

Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press; 2001.

Sánchez G, Bosch A, Pintó RM. Genome variability and capsid structural constraints of hepatitis A virus. *J Virol* 2003; 77: 452-9.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74: 5463-7.

Schirmbeck R, Böhm W, Reimann J. Virus-like particles induce MHC class I-restricted T-cell responses. Lessons learned from the hepatitis B small surface antigen. *Intervirology* 1996; 39: 111-9.

Scholz E, Heinrich U, Flehmig B. Acid stability of hepatitis A virus. *J Gen Virol* 1989; 70: 2481-5.

Schulte I, Hitziger T, Giugliano S, Timm J, Gold H, Heinemann FM, *et al.* Characterization of CD8⁺ T-cell response in acute and resolved hepatitis A virus infection. *J Hepatol* 2011; 54: 201-8.

Siegl G, Frösner GG, Gauss-Müller V, Trateschin JD, Deinhardt F. The physicochemical properties of infectious hepatitis A virions. *J Gen Virol* 1981; 57: 331-41.

Siegl G. The biochemistry of hepatitis A virus. In: Gerety RJ. *Hepatitis A*. New York: Academic Press; 1984. p.9-32.

Silberstein E, Konduru K, Kaplan GG. The interaction of hepatitis A virus (HAV) with soluble forms of its cellular receptor 1 (HAVCR1) share the physiological requirements of infectivity in cell culture. *Virology* 2009; 6: 175.

Silva MM. Expressão recombinante da canacistina em células de inseto. [Dissertação de Mestrado]. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos; 2007. 74p.

Silva-Junior JG. Eletroforese de proteínas: guia teórico-prático. Rio de Janeiro: Interciência; 2000.

Sobsey MD, Shields PA, Hauchman FS, Davis AL, Rullman VA, Bosch A. Survival and persistence of hepatitis A virus in environmental samples. In: Zuckerman AJ. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. New York: Alan R. Liss; 1988: 121-4.

Sørensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 2005; 115: 113-28.

Soucie JM, Robertson BH, Bell BP, McCaustland KA, Evatt BL. Hepatitis A virus infections associated with clotting factor concentrate in the USA. *Transfusion* 1998; 38: 573-9.

Stapleton JT, Lange DK, LeDuc JW, Binn LN, Jansen RW, Lemon SM. The role of secretory immunity in hepatitis A virus infection. *J Infect Dis* 1991; 163: 7-11.

Stapleton JT, Raina V, Winokur PL, Walters K, Klinzman D, Rosen E, *et al.* Antigenic and Immunogenic Properties of Recombinant Hepatitis A Virus 14S and 70S Subviral Particles. *J Virol* 1993; 1080-5.

Stapleton, JT. Host immune response to hepatitis A virus. *J Infect Dis* 1995; 171: S9-14.

Stokes Jr J, Neefe J. The prevention and attenuation of infectious hepatitis by gamma globulin. *JAMA* 1945; 127: 144-5.

Tanaka J. Hepatitis A shifting epidemiology in Latin America. *Vaccine* 2000; 18: S57-60.

Tapia-Conyer R, Santos JI, Cavalcanti AM, Urdaneta E, Rivera L, Manterola A, *et al.* Hepatitis A in Latin America: a changing epidemiologic pattern. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61: 825-9.

Tessier DC, Thomas DY, Khouri HE, Laliberté F, Vernet T. Enhanced secretion from insect cells of a foreign protein fused to the honeybee melittin signal peptide. *Gene* 1991; 98:177-83.

Totsuka A, Moritsugu Y. Hepatitis A virus proteins. *Intervirology* 1999; 42: 63-68.

Vallbracht A, Hofmann L, Wurster KG, Flehmig B. Persistent infection of human fibroblasts by hepatitis a virus. *J Gen Virol* 1984; 65: 609-15.

Vallbracht A, Maier K, Stierhof YD, Wiedmann KH, Flehmig B, Fleischer B. Liver-derived cytotoxic T cells in hepatitis A virus infection. *J Infect Dis* 1989; 160: 209-217.

Van der Geld YM, Smook ML, Huitema MG, Harmsen MC, Limburg PC, Kallenberg CG. Expression of recombinant proteinase 3, the autoantigen in Wegener's granulomatosis, in insect cells. *J Immunol Methods* 2002; 264:195-205.

Vaughan G, Goncalves Rossi LM, Forbi JC, de Paula VS, Purdy MA, Xia G, *et al.* Hepatitis A virus: host interactions, molecular epidemiology and evolution. *Infect Genet Evol* 2014; 21: 227-43.

Vianna COA, Mouta SSJ, Martins MGT, Batoreu NM, Queiroz JL, Gomes SA, *et al.* Evaluation of murine monoclonal antibodies targeting different epitopes of the hepatitis B virus surface antigen by using immunological as well as molecular biology and biochemical approaches. *J Immunol Methods* 2006; 313: 38-47.

Visciano ML, Tagliamonte M, Tornesello ML, Buonaguro FM, Buonaguro L. Effects of adjuvants on IgG subclasses elicited by virus-like particles. *J Transl Med* 2012; 10: 4.

Vitral CL, Marchevsky RS, Yoshida CF, Coelho JM, Gaspar AM, Schatzmayr HG. Intra-gastric infection induced in marmosets (*Callitrix jacchus*) by a Brazilian hepatitis A virus (HAF-203). *Braz J Med Biol Res* 1995; 28: 313-21.

Vitral CL, Yoshida CF, Gaspar AM. The use of non-human primates as animal models for the study of hepatitis viruses. *Braz J Med Biol Res* 1998a; 31: 1035-48

Vitral CL, Yoshida CFT, Lemos ER, Teixeira CS, Gaspar AMC. Age-specific prevalence of antibodies to hepatitis A in children and adolescents from Rio de Janeiro, Brazil, 1978 and 1995. Relationship of prevalence to environmental factors. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998b; 93: 1-5.

Vitral CL, Yoshida CFT, Teixeira CS, Gaspar AMC. Seroprevalence of hepatitis A in health care students from a public university of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Microbiol* 1998c; 29: 149-51.

Vitral CL, Gaspar AM, Souto FJ. Epidemiological pattern and mortality rates for hepatitis A in Brazil, 1980-2002 -- a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101: 119-27.

Vitral CL, Souto FJ, Gaspar AM. Changing epidemiology of hepatitis A in Brazil: reassessing immunization policy. *J Viral Hepat* 2008; 15: S22-5.

Wang YB, Wang ZY, Chen HY, Cui BA, Wang YB, Zhang HY, *et al.* Secretory expression of porcine interferon-gamma in baculovirus using HBM signal peptide and its inhibition activity on the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol* 2009; 132: 314-7.

Wasley A, Fiore A, Bell BP. Hepatitis A in the era of vaccination. *Epidemiol Rev* 2006; 28: 101-11.

Weitz M, Baroudy BM, Maloy WL, Ticehurst JR, Purcell RH. Detection of a genome-linked protein (VPg) of hepatitis A virus and its comparison with other picornaviral VPgs. *J Virol* 1986; 60: 124-30.

Whetter LE, Day SP, Elroy-Stein O, Brown EA, Lemon SM. Low efficiency of the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA in directing cap-independent translation in permissive monkey kidney cells. *J Virol* 1994; 68: 5253-63.

WHO. Weekly epidemiological record. 2000a. Disponível em: <http://www.who.int/docstore/wer/pdf/2000/wer7505.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2015.

WHO. Hepatitis A. 2000b. Disponível em: http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisA_who.cdscs.recdc2000_7.pdf. Acesso em: 25 mar. 2015.

Wikinson DL, Harrison RG. Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology* 1991; 9: 443-8.

Yokosuka O. Molecular biology of hepatitis A virus: significance of various substitutions in the hepatitis A virus genome. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15 Suppl: D91-7.

Yousef GE, Brown IN, Mowbray JF. Derivation and biochemical characterization of an enterovirus group-specific monoclonal antibody. *Intervirology* 1987; 28: 163-70.

Zeng CQ, Labbé M, Cohen J, Prasad BV, Chen D, Ramig RF, *et al.* Characterization of rotavirus VP2 particles. *Virology* 1994; 201: 55-65

Zuckerman AJ. The clinical and laboratory features of acute hepatitis in the Royal Air Force. *Mon Bull Minist Health Public Health Lab Serv* 1965; 24: 340-6.

Zuckerman AJ. The history of viral hepatitis from antiquity to the present. In: Deinhardt F, Deinhardt J. *Viral hepatitis: Laboratory and Clinical Science*. New York: Marcel Dekker; 1983. p.3-32.

Anexo 1

Vetores plasmídeos

A.1.1. pIDTSmart Kan

O vetor pIDTSmart Kan foi utilizado pela empresa Integrated DNA Technologies para clonar os genes sintéticos *VP1* e *HBMVP1*. Esse vetor possui resistência à canamicina (Figura A.1.1).

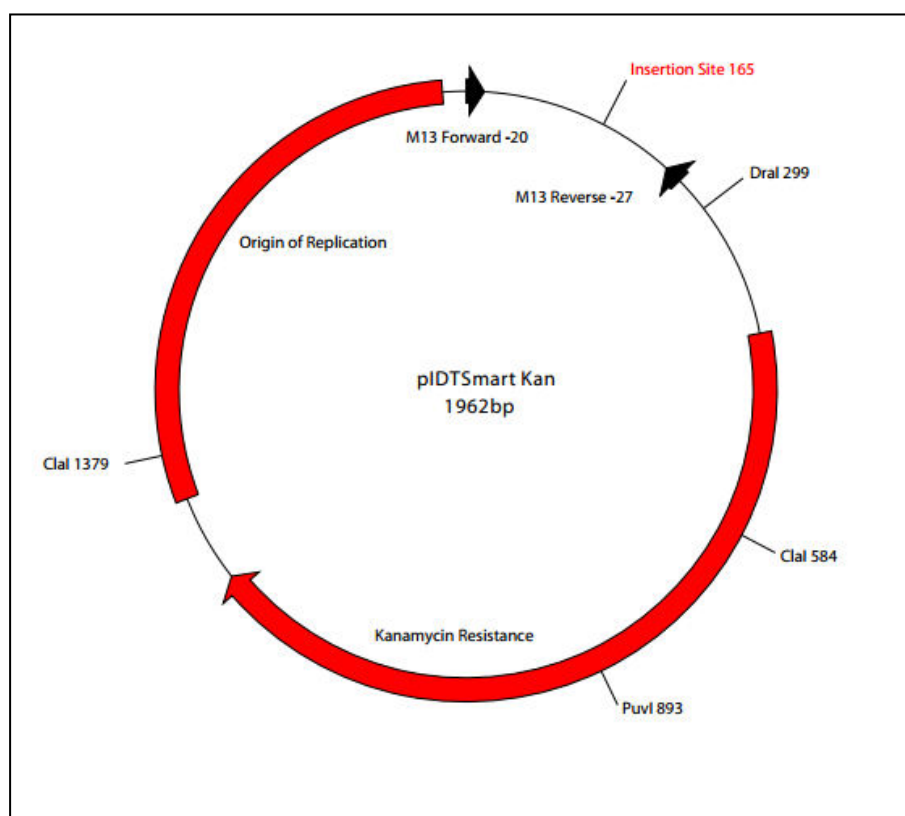


Figura A.1.1: Mapa do plasmídeo pIDTSmart Kan. Disponível em: <http://www.idtdna.com/pages/docs/synthetic-biology/pidtsmart-kan-gene-map.pdf>. Acesso em: 05 fev. 2015.

A.1.2. pFastBac™ Dual

O vetor comercial pFastBac™ Dual (Life Technologies) foi utilizado para clonagem e posterior transposição dos genes *VP1*, *HBM-VP1*, *P1-2A* e *P3*. Esse plasmídeo possui 5238 pb, origens de replicação f1 e pUC, genes de resistência à ampicilina e à gentamicina, dois promotores (poliedrina e p10) e um elemento mini-Tn7, que funciona como transposon (Figura A.1.2).

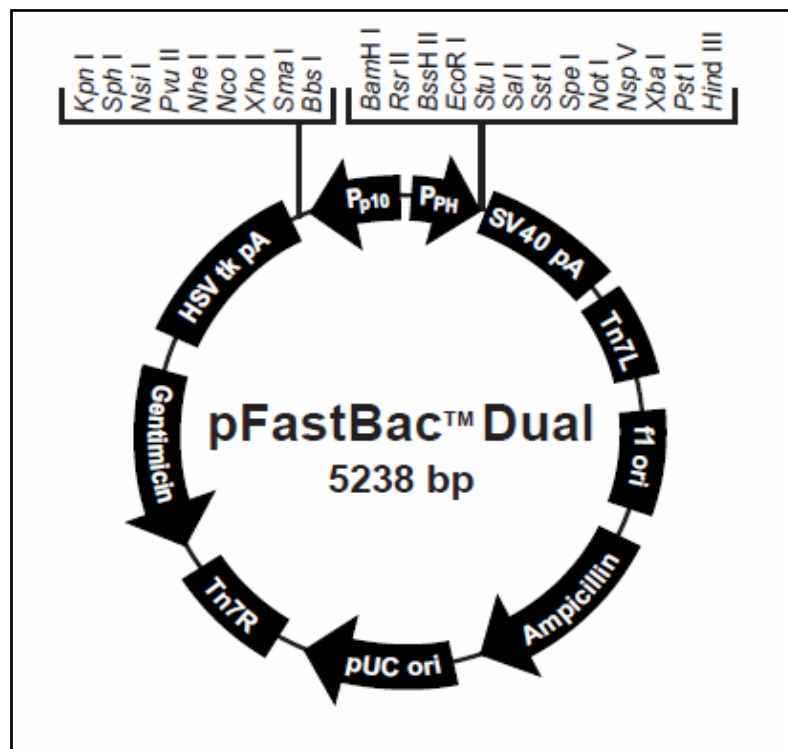


Figura A.1.2: Mapa do plasmídeo doador pFastBac™ Dual. Disponível em: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pfastbacdual_map.pdf. Acesso em: 29 jan. 2015.

A.1.3. pUCIDT

O vetor pUCIDT foi utilizado pela empresa Integrated DNA Technologies para clonar os genes sintéticos *P1-2A* e *P3*. Este vetor possui resistência à ampicilina (Figura A.1.3).

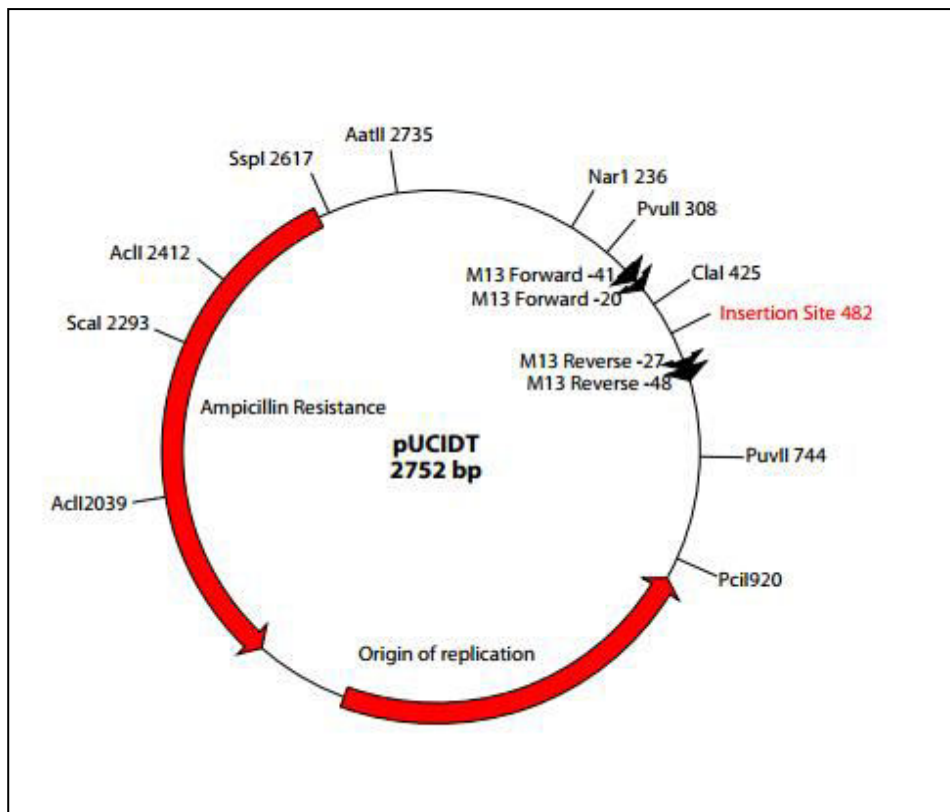


Figura A.1.3: Mapa do plasmídeo pUCIDT. Disponível em: <http://www.idtdna.com/pages/docs/synthetic-biology/pucidt-gene-map-.pdf>. Acesso em: 23 fev. 2015.

A.1.4. pET100/D-TOPO[®]

Para expressar a proteína VP1 em *E. coli*, foi utilizado o vetor comercial pET100/D-TOPO[®] (Life Technologies). Esse vetor possui 5764 pb, promotor do bacteriófago T7, origem de replicação do pBR322 e gene de resistência à ampicilina. As proteínas recombinantes produzidas com este vetor apresentam cauda de histidina na porção N-terminal. Além disso, estas proteínas são expressas fusionadas ao epítipo *Xpress*, que pode ser utilizado para a detecção da expressão (Figura A.1.4).

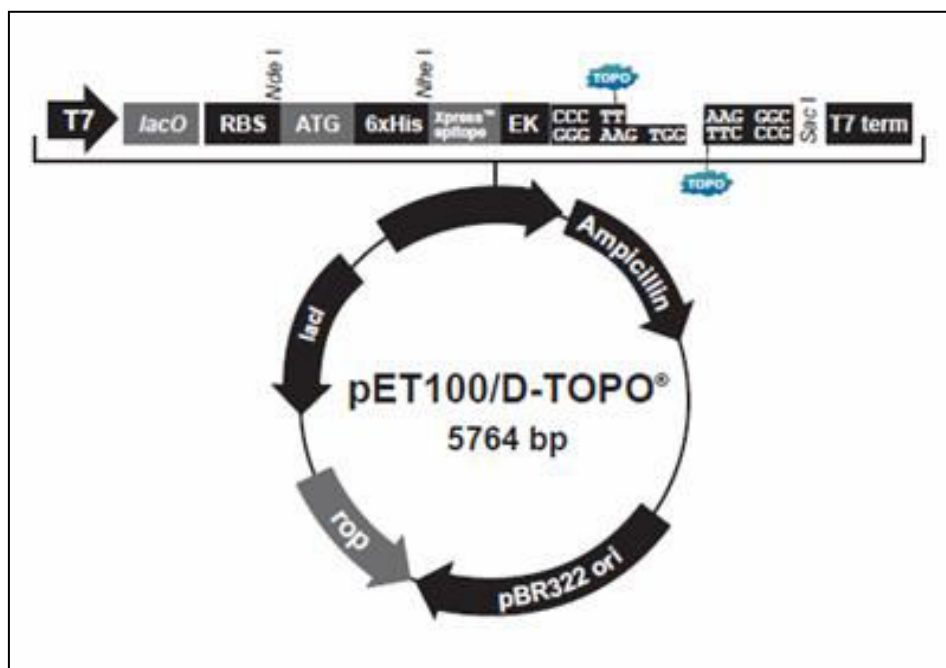


Figura A.1.4: Mapa do vetor de expressão pET100/D-TOPO[®]. Disponível em: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/vectors/pet100dtopo_map.pdf. Acesso em: 29 jan. 2015.

Anexo 2

Meios de cultura para bactérias

A.2.1. Meio Luria Bertani (LB)

Triptona (Sigma-Aldrich)	10,00 g
Extrato de levedura (Sigma-Aldrich)	5,00 g
Cloreto de sódio (Vetec)	5,00 g
Água destilada q.s.p.	1000,00 mL

Para esterilização, o meio foi autoclavado por 15 minutos a 121°C, 1 atm.

A.2.2. Meio LB Ágar

Triptona (Sigma-Aldrich)	10,00 g
Extrato de levedura (Sigma-Aldrich)	5,00 g
Cloreto de sódio (Vetec)	5,00 g
Ágar bacteriológico (Difco)	15,00 g
Água destilada q.s.p.	1000,00 mL

Para esterilização, o meio foi autoclavado por 15 minutos a 121°C, 1 atm.

A.2.3. Meio Terrific Broth (TB)

Solução A

Triptona (Sigma-Aldrich)	12,00 g
Extrato de levedura (Sigma-Aldrich)	24,00 g
Glicerol (Merck)	4,00 mL
Água destilada q.s.p.	900,00 mL

Solução B

Fosfato de potássio monobásico (Merck)	12,00 g
Fosfato de potássio dibásico (Merck)	24,00 g
Água destilada q.s.p.	100,00 mL

As soluções A e B foram esterilizadas separadamente por autoclavação e, em seguida, foram misturadas.

Anexo 3

Antibióticos

A.3.1. Ampicilina

A solução de ampicilina foi preparada na concentração de 50 mg/mL.

Ampicilina (Sigma-Aldrich)	0,50 g
Água destilada q.s.p.	10,00 mL

A.3.2. Canamicina

A solução de canamicina foi preparada na concentração de 25 mg/mL.

Canamicina (Sigma-Aldrich)	0,25 g
Água destilada q.s.p.	10,00 mL

A.3.3. Gentamicina

A solução de gentamicina (Life Technologies) foi adquirida pronta para o uso, na concentração de 50 mg/mL.

A.3.4. Tetraciclina

A solução de tetraciclina foi preparada na concentração de 5 mg/mL.

Tetraciclina (Sigma-Aldrich)	0,02 g
Etanol (Vetec) q.s.p.	4,00 mL

Para esterilização, os antibióticos foram filtrados em membrana de 0,22 μ m (Millipore) e alíquotas de 1 mL foram armazenadas a -20°C, protegidas da luz. Esses antibióticos foram utilizados para a seleção e manutenção de células de *E. coli* transformadas com plasmídeos, de acordo com os genes de resistência.

Anexo 4

Anticorpos comerciais

- Anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich, cat. A3562);
- Anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, cat. A9044);
- Anticorpo anti-IgG1 de camundongo conjugado com peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, SC-2060);
- Anticorpo anti-IgG2a de camundongo conjugado com peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, SC-2061);
- Anticorpo anti-IgG2b de camundongo conjugado com peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, SC-2062);
- Anticorpo anti-IgG3 de camundongo conjugado com peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, SC-2063);
- Anticorpo anti-IgM de humano conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, cat. A6907);
- Anticorpo Anti-IgG de humano conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, cat. A-0170);
- Anticorpo anti-IgA, IgG e IgM de humano conjugado com peroxidase (Pierce, cat. 31418);
- Anticorpo policlonal de cabra anti-HAV (Abcam, cat. ab68579);
- Anticorpo anti-IgG de cabra conjugado com fosfatase alcalina (Abcam, cat. ab97097).

Anexo 5

Oligonucleotídeos iniciadores

As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores (Integrated DNA Technologies) utilizados nas reações em cadeia pela polimerase (PCRs) e no sequenciamento nucleotídico estão listadas no quadro A.5.1.

Quadro A.5.1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações em cadeia pela polimerase (PCRs) e no sequenciamento dos genes *VP1*, *P1-2A* e *P3*.

(continua)

Gene	oligonucleotídeo	Seqüência sentido 5' - 3'	Posição no gene (pb)
<i>VP1</i>	VP1ins Fw _(P/S)	ATG GTT GGA GAT GAT TCT GG	1-20
<i>VP1</i>	VP1ins R _(P/S)	TCA ATG ATG ATG ATG ATG ATG CTC AAA T	924-897
<i>VP1</i>	VP1 368 Fw _(S)	GTT TGC CAT CAA CAC TGA GG	365-384
<i>VP1</i>	VP1 368 R _(S)	CCT CAG TGT TGA TGG CAA AC	384-365
<i>VP1</i>	VP1coli Fw _(P/S)	CAC CAT GGT TGG AGA TGA TTC TGG AG	1-22
<i>P1-2A</i>	P12A 6 Fw _(S)	CAT GTC AAG GCA GGG AAT ATT TC	6-28
<i>P1-2A</i>	P1-2A 480 Fw _(P/S)	CAT AGC ATC CTT GAC CGT ATA CC	480-502
<i>P1-2A</i>	P1-2A 973 Fw _(S)	CCA GTG GAC CCT TAC TTC TTC C	973-994
<i>P1-2A</i>	P1-2A 1516 Fw _(S)	CAG AAT GTG CCC GAT CCC CAA GTG	1516-1539
<i>P1-2A</i>	P1-2A 1992 Fw _(S)	GGA ATC CGC TTT GTC TAT CGA TTA C	1992-2016
<i>P1-2A</i>	P1-2A 2434 Fw _(S)	CTT AAA TAC GCC CAG GAA GAG C	2434-2455
<i>P1-2A</i>	P1-2A 2915 Fw _(S)	CGA TAG AAT GCT CGG ACT CTC	2915-2935
<i>P1-2A</i>	P1-2A 570 R _(S)	GCG CGT GTA TAT GAA AGG TAC	570-550
<i>P1-2A</i>	P1-2A 1029 R _(S)	GAT GCA CTT TTG ATC TGG GTT TG	1029-1007
<i>P1-2A</i>	P1-2A 1494 R _(S)	GCC TCC TGA ATC GTC TCC TAC CTG	1494-1471

Quadro A.5.1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações em cadeia pela polimerase (PCRs) e no sequenciamento dos genes *VP1*, *P1-2A* e *P3*.

(conclusão)

<i>P1-2A</i>	P1-2A 2109 R _(S)	GGA AAC CGC GTA CAG ATA AGA G	2109-2088
<i>P-12A</i>	P1-2A 2526 R _(S)	GAA GAG AGA AAT ATT TGC CTG GCT G	2526-2502
<i>P1-2A</i>	P1-2A 2915 R _(S)	GAG AGT CCG AGC ATT CTA TCG	2915-2895
<i>P3</i>	P3 42 Fw _(P/S)	CTT CCA GTC TTT TCC TTC AGG C	42-63
<i>P3</i>	P3 482 Fw _(S)	CCT ACT ACT CGA TTT CCG CTG G	482-503
<i>P3</i>	P3 1043 Fw _(S)	CCA TGA TCA ACT TCC CCG CTG C	1043-1064
<i>P3</i>	P3 1549 Fw _(S)	CCA GCT ATC TCA TAC TTC CAC C	1549-1570
<i>P3</i>	P3 2094 Fw _(S)	CAA GAA TGT ACC ACA ACT TAA GCC	2094-2117
<i>P3</i>	P3 588 R _(S)	GAT ATC GCG GAA TTT GGG GAT CG	588-566
<i>P3</i>	P3 1064 R _(S)	GCA GCG GGG AAG TTG ATC ATG G	1064-1043
<i>P3</i>	P3 1497 R _(S)	GGC ACG GGT TTT ACT CTC CAG G	1497-1476
<i>P3</i>	P3 2004 R _(S)	CGA AAA GAC GAT GAG CAC G	2004-1985
<i>P3</i>	P3 2414 R _(S)	GAG AGG TCG CAG ATG AAG CAT TG	2414-2392
---	pUC/M13 Fw _(P/S)	CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG	---
---	pUC/M13 R _(P/S)	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG	---

Fw - Forward

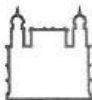


R - Reverse

_(P/S) Iniciador utilizado na etapa da PCR e do seqüenciamento

_(S) Iniciador utilizado somente na etapa do sequenciamento



Anexo 6

Licença emitida pela CEUA FIOCRUZ/RJ autorizando a realização de experimentos com camundongos e coelhos.

 <p>Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência</p>	 <p>CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais</p>
LICENÇA	
LW-50/12	
<p>Certificamos que o protocolo (P-6/12-2), intitulado "Desenvolvimento de uma vacina recombinante contra o vírus da hepatite A (HAV)", sob a responsabilidade de MARCO ALBERTO MEDEIROS, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.</p> <p>Esta licença tem validade até 14/05/2016 e inclui o uso total de :</p>	
<p><i>Mus musculus</i> - 1470 Fêmeas de BALB/c An, Idade: 6 Semana(s), Peso: 30,0000 Grama(s).</p>	
<p><i>Oryctolagus cuniculus</i> - 30 Machos de Nova Zelândia, Peso: 2,0000 Kilo(s).</p>	
<p>Rio de Janeiro, 14 de maio de 2012</p>	
 <p>Octavio Augusto França Presgrave Coordenador da CEUA</p>	
<p>Octavio A. F. Presgrave Coordenador CEUA/FIOCRUZ SIAPE 04626550</p>	

Anexo 7

Parecer emitido pelo CEP FIOCRUZ/IOC autorizando a utilização de soros de pacientes para a avaliação do potencial da proteína VP1 como marcador para o diagnóstico da hepatite A.

	FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ/IOC	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: Aplicabilidade do teste rápido para hepatite A e Avaliação do potencial da proteína VP1 recombinante para o diagnóstico da hepatite A		
Pesquisador: LIA LAURA LEWIS-XIMENEZ		
Área Temática:		
Versão: 2		
CAAE: 30350614.5.0000.5248		
Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ		
Patrocinador Principal: FUNDACAO OSWALDO CRUZ		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 1.033.845		
Recomendações: Apresentar relatórios parciais (anuais) e relatório final do projeto de pesquisa é responsabilidade indesejável do pesquisador principal.		
Qualquer modificação ou emenda ao projeto de pesquisa em pauta deve ser submetida à apreciação do CEP Fiocruz/IOC.		
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), em sua 203ª Reunião Ordinária, realizada em 14.04.2015, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.		
Situação do Parecer: Aprovado		
Necessita Apreciação da CONEP: Não		
Considerações Finais a critério do CEP: Apresentar relatórios parciais (anuais) e relatório final do projeto de pesquisa é responsabilidade indelegável do pesquisador principal.		

Anexo 8

Alinhamento da seqüência do gene *VP1* com a seqüência do gene sintetizado pela empresa Integrated DNA Technologies. Optou-se por mostrar somente um alinhamento, já que não foram observadas alterações ao longo das etapas necessárias para a geração dos baculovírus recombinantes. *Query* – gene VP1 sequenciado. *Sbjct* – seqüência do gene *VP1* sintetizado pela Integrated DNA Technologies.

Identities = 924/924 (100%), Gaps = 0/924 (0%)

```
Query 1 ATGGTTGGAGATGATTCTGGAGGTTTTTCAACAACAGTTTCTACAGAACAGAATGTTCCA 60
      |
Sbjct 1 ATGGTTGGAGATGATTCTGGAGGTTTTTCAACAACAGTTTCTACAGAACAGAATGTTCCA 60

Query 61 GATCCCCAAGTTGGTATAACAACCATGAAAGATTTGAAAGGAAAAGCTAACAGAGGGAAA 120
      |
Sbjct 61 GATCCCCAAGTTGGTATAACAACCATGAAAGATTTGAAAGGAAAAGCTAACAGAGGGAAA 120

Query 121 ATGGATGTTTCAGGAGTACAAGCACCTGTGGGAGCTATCACAACAATTGAGGATCCAGTT 180
      |
Sbjct 121 ATGGATGTTTCAGGAGTACAAGCACCTGTGGGAGCTATCACAACAATTGAGGATCCAGTT 180

Query 181 TTAGCAAAGAAAGTACCTGAGACATTTCTGAATTGAAACCTGGAGAATCCAGACATACA 240
      |
Sbjct 181 TTAGCAAAGAAAGTACCTGAGACATTTCTGAATTGAAACCTGGAGAATCCAGACATACA 240

Query 241 TCAGATCATATGTCCATCTACAAGTTTATGGGAAGGTCTCATTTCTTGTGCACTTTTACA 300
      |
Sbjct 241 TCAGATCATATGTCCATCTACAAGTTTATGGGAAGGTCTCATTTCTTGTGCACTTTTACA 300

Query 301 TTCAATTCAAATAATAAAGAGTACACATTTCTATAACCTTGTCTTCAACCTCTAATCCT 360
      |
Sbjct 301 TTCAATTCAAATAATAAAGAGTACACATTTCTATAACCTTGTCTTCAACCTCTAATCCT 360

Query 361 CCTCATGGTTTGCCATCAACACTGAGGTGGTTTTTCAACTTGTTTCAGTTGTATAGAGGG 420
      |
Sbjct 361 CCTCATGGTTTGCCATCAACACTGAGGTGGTTTTTCAACTTGTTTCAGTTGTATAGAGGG 420

Query 421 CCTTTAGATCTGACAATTATTATTACAGGAGCAACTGATGTAGATGGCATGGCCTGGTTC 480
      |
Sbjct 421 CCTTTAGATCTGACAATTATTATTACAGGAGCAACTGATGTAGATGGCATGGCCTGGTTC 480
```

```

Query  481  ACTCCAGTAGGTCTTGCCGTTGATACTCCTTGGGTAGAGAAGGAGTCAGCTTTGTCTATT  540
      |||
Sbjct  481  ACTCCAGTAGGTCTTGCCGTTGATACTCCTTGGGTAGAGAAGGAGTCAGCTTTGTCTATT  540

Query  541  GACTACAAAACCTGCTCTTGGAGCTGTCAGATTTAACACAAGGAGAACAGGGAACATTTCAG  600
      |||
Sbjct  541  GACTACAAAACCTGCTCTTGGAGCTGTCAGATTTAACACAAGGAGAACAGGGAACATTTCAG  600

Query  601  ATTAGATTACCATGGTATTCTTATTTATATGCTGTGTCTGGAGCACTGGATGGTTTGGGT  660
      |||
Sbjct  601  ATTAGATTACCATGGTATTCTTATTTATATGCTGTGTCTGGAGCACTGGATGGTTTGGGT  660

Query  661  GACAAGACAGATTCTACATTTGGATTGGTTTCTATTTCAGATTGCAAATTACAATCATTCT  720
      |||
Sbjct  661  GACAAGACAGATTCTACATTTGGATTGGTTTCTATTTCAGATTGCAAATTACAATCATTCT  720

Query  721  GATGAATACTTGTCTTTTAGTTGTTATTTGTCTGTCCACAGAACAATCAGAGTTTTATTTT  780
      |||
Sbjct  721  GATGAATACTTGTCTTTTAGTTGTTATTTGTCTGTCCACAGAACAATCAGAGTTTTATTTT  780

Query  781  CCCAGAGCTCCATTGAACTCAAATGCCATGTTATCCACTGAATCAATGATGAGCAGAATT  840
      |||
Sbjct  781  CCCAGAGCTCCATTGAACTCAAATGCCATGTTATCCACTGAATCAATGATGAGCAGAATT  840

Query  841  GCAGCTGGAGACTTGGAGTCATCAGTGGATGATCCTAGATCAGAGGAAGATAAAAAGATTT  900
      |||
Sbjct  841  GCAGCTGGAGACTTGGAGTCATCAGTGGATGATCCTAGATCAGAGGAAGATAAAAAGATTT  900

Query  901  GAGCATCATCATCATCATCATTGA  924
      |||
Sbjct  901  GAGCATCATCATCATCATCATTGA  924

```


Anexo 9

Alinhamento da sequência do gene *HBM-VP1* com a sequência do gene sintetizado pela empresa Integrated DNA Technologies. Optou-se por mostrar somente um alinhamento, já que não foram observadas alterações ao longo das etapas necessárias para a geração dos baculovírus recombinantes. *Query* – gene *HBM-VP1* sequenciado. *Sbjct* – sequência do gene *HBM-VP1* sintetizado pela Integrated DNA Technologies.

Identities = 1023/1023 (100%), Gaps = 0/1023 (0%)

```
Query 1 ATGAAATTCCTTAGTCAACGTTGCCCTTGTTTTATGGTCGTATAACATTTCTTACATCTAT 60
      |
Sbjct 1 ATGAAATTCCTTAGTCAACGTTGCCCTTGTTTTATGGTCGTATAACATTTCTTACATCTAT 60

Query 61 GCGGATCGATCCCTTGTTGGAGATGATTCTGGAGGTTTTCAACAACAGTTTCTACAGAA 120
      |
Sbjct 61 GCGGATCGATCCCTTGTTGGAGATGATTCTGGAGGTTTTCAACAACAGTTTCTACAGAA 120

Query 121 CAGAATGTTCCAGATCCCAAGTTGGTATAACAACCATGAAAGATTGAAAGGAAAAGCT 180
      |
Sbjct 121 CAGAATGTTCCAGATCCCAAGTTGGTATAACAACCATGAAAGATTGAAAGGAAAAGCT 180

Query 181 AACAGAGGGAAAATGGATGTTTCAGGAGTACAAGCACCTGTGGGAGCTATCACAACAATT 240
      |
Sbjct 181 AACAGAGGGAAAATGGATGTTTCAGGAGTACAAGCACCTGTGGGAGCTATCACAACAATT 240

Query 241 GAGGATCCAGTTTTAGCAAAGAAAGTACCTGAGACATTTCTGAATTGAAACCTGGAGAA 300
      |
Sbjct 241 GAGGATCCAGTTTTAGCAAAGAAAGTACCTGAGACATTTCTGAATTGAAACCTGGAGAA 300

Query 301 TCCAGACATACATCAGATCATATGTCCATCTACAAGTTTATGGGAAGGTCTCATTTCTTG 360
      |
Sbjct 301 TCCAGACATACATCAGATCATATGTCCATCTACAAGTTTATGGGAAGGTCTCATTTCTTG 360

Query 361 TGCACITTTACATTCAATTCAAATAATAAAGAGTACACATTTCTATAACCTTGTCTTCA 420
      |
Sbjct 361 TGCACITTTACATTCAATTCAAATAATAAAGAGTACACATTTCTATAACCTTGTCTTCA 420
```

```

Query 421 ACCTCTAATCCTCCTCATGGTTTGCCATCAACACTGAGGTGGTTTTTCAACTTGTTTCAG 480
          |||
Sbjct 421 ACCTCTAATCCTCCTCATGGTTTGCCATCAACACTGAGGTGGTTTTTCAACTTGTTTCAG 480

Query 481 TTGTATAGAGGGCCTTTAGATCTGACAATTATTATTACAGGAGCAACTGATGTAGATGGC 540
          |||
Sbjct 481 TTGTATAGAGGGCCTTTAGATCTGACAATTATTATTACAGGAGCAACTGATGTAGATGGC 540

Query 541 ATGGCCTGGTTCACCTCAGTAGGTCTTGCCGTTGATACTCCTTGGGTAGAGAAGGAGTCA 600
          |||
Sbjct 541 ATGGCCTGGTTCACCTCAGTAGGTCTTGCCGTTGATACTCCTTGGGTAGAGAAGGAGTCA 600

Query 601 GCTTTGTCTATTGACTACAAAAGTCTCTTGAGCTGTCAGATTTAACACAAGGAGAACA 660
          |||
Sbjct 601 GCTTTGTCTATTGACTACAAAAGTCTCTTGAGCTGTCAGATTTAACACAAGGAGAACA 660

Query 661 GGAACATTCAGATTAGATTACCATGGTATTCTTATTTATATGCTGTGTCTGGAGCACTG 720
          |||
Sbjct 661 GGAACATTCAGATTAGATTACCATGGTATTCTTATTTATATGCTGTGTCTGGAGCACTG 720

Query 721 GATGGTTTGGGTGACAAGACAGATTCTACATTTGGATTGGTTTCTATTGAGATTGCAAAT 780
          |||
Sbjct 721 GATGGTTTGGGTGACAAGACAGATTCTACATTTGGATTGGTTTCTATTGAGATTGCAAAT 780

Query 781 TACAATCATTCTGATGAATACTTGTCTTTTAGTTGTTATTTGTCTGTCACAGAACAATCA 840
          |||
Sbjct 781 TACAATCATTCTGATGAATACTTGTCTTTTAGTTGTTATTTGTCTGTCACAGAACAATCA 840

Query 841 GAGTTTTATTTTCCCAGAGCTCCATTGAACTCAAATGCCATGTTATCCACTGAATCAATG 900
          |||
Sbjct 841 GAGTTTTATTTTCCCAGAGCTCCATTGAACTCAAATGCCATGTTATCCACTGAATCAATG 900

Query 901 ATGAGCAGAATTGCAGCTGGAGACTTGGAGTCATCAGTGGATGATCCTAGATCAGAGGAA 960
          |||
Sbjct 901 ATGAGCAGAATTGCAGCTGGAGACTTGGAGTCATCAGTGGATGATCCTAGATCAGAGGAA 960

Query 961 GATAAAAGATTTGAGAAGGGCGAAAAGTGTACTTTCAAGGCCATCACCATCACCATCAC 1020
          |||
Sbjct 961 GATAAAAGATTTGAGAAGGGCGAAAAGTGTACTTTCAAGGCCATCACCATCACCATCAC 1020

Query 1021 TAG 1023
          |||
Sbjct 1021 TAG 1023

```

Anexo 10

Alinhamento da seqüência do gene *VP1*, clonado no vetor pET100/D-TOPO[®], com a seqüência do gene sintetizado pela empresa Integrated DNA Technologies. Ressalta-se que a região *upstream* ao sítio de clonagem do vetor pET100/D-TOPO[®] (cauda de histidina, epítipo *Xpress* e sítio de clivagem para enteroquinase), a qual é expressa fusionada a porção N-terminal da VP1r, também foi incluída no alinhamento. *Query* – gene *VP1* sequenciado. *Sbjct* – seqüência do gene *VP1* sintético.

Identities = 1014/1014 (100%), Gaps = 0/1014 (0%)

```
Query 1 ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAA 60
|
Sbjct 1 ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAA 60

Query 61 ATGGGTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCATCCCTTCACCATGGTTGGAGAT 120
|
Sbjct 61 ATGGGTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCATCCCTTCACCATGGTTGGAGAT 120

Query 121 GATTCTGGAGGTTTTTCAACAACAGTTTCTACAGAACAGAATGTTCCAGATCCCCAAGTT 180
|
Sbjct 121 GATTCTGGAGGTTTTTCAACAACAGTTTCTACAGAACAGAATGTTCCAGATCCCCAAGTT 180

Query 181 GGTATAACAACCATGAAAGATTTGAAAGGAAAAGCTAACAGAGGGAAAATGGATGTTTCA 240
|
Sbjct 181 GGTATAACAACCATGAAAGATTTGAAAGGAAAAGCTAACAGAGGGAAAATGGATGTTTCA 240

Query 241 GGAGTACAAGCACCTGTGGGAGCTATCACAACAATTGAGGATCCAGTTTTAGCAAAGAAA 300
|
Sbjct 241 GGAGTACAAGCACCTGTGGGAGCTATCACAACAATTGAGGATCCAGTTTTAGCAAAGAAA 300

Query 301 GTACCTGAGACATTTCTGAATTGAAACCTGGAGAATCCAGACATACATCAGATCATATG 360
|
Sbjct 301 GTACCTGAGACATTTCTGAATTGAAACCTGGAGAATCCAGACATACATCAGATCATATG 360

Query 361 TCCATCTACAAGTTTATGGGAAGGTCTCATTTCTTGTGCACTTTTACATTCAATTCAAAT 420
|
Sbjct 361 TCCATCTACAAGTTTATGGGAAGGTCTCATTTCTTGTGCACTTTTACATTCAATTCAAAT 420
```

```

Query 421 AATAAAGAGTACACATTTCCCTATAACCTTGTCTTCAACCTCTAATCCTCCTCATGGTTTG 480
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 421 AATAAAGAGTACACATTTCCCTATAACCTTGTCTTCAACCTCTAATCCTCCTCATGGTTTG 480

Query 481 CCATCAACACTGAGGTGGTTTTTCAACTTGTTTTAGTTGTATAGAGGGCCTTTAGATCTG 540
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 481 CCATCAACACTGAGGTGGTTTTTCAACTTGTTTTAGTTGTATAGAGGGCCTTTAGATCTG 540

Query 541 ACAATTATTATTACAGGAGCAACTGATGTAGATGGCATGGCCTGGTTCACTCCAGTAGGT 600
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 541 ACAATTATTATTACAGGAGCAACTGATGTAGATGGCATGGCCTGGTTCACTCCAGTAGGT 600

Query 601 CTTGCCGTTGATACTCCTTGGGTAGAGAAGGAGTCAGCTTTGTCTATTGACTACAAAAC 660
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 601 CTTGCCGTTGATACTCCTTGGGTAGAGAAGGAGTCAGCTTTGTCTATTGACTACAAAAC 660

Query 661 GCTCTTGAGCTGTCAGATTTAACACAAGGAGAACAGGGAACATTCAGATTAGATTACCA 720
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 661 GCTCTTGAGCTGTCAGATTTAACACAAGGAGAACAGGGAACATTCAGATTAGATTACCA 720

Query 721 TGGTATTCTTATTTATATGCTGTGTCTGGAGCACTGGATGGTTTGGGTGACAAGACAGAT 780
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 721 TGGTATTCTTATTTATATGCTGTGTCTGGAGCACTGGATGGTTTGGGTGACAAGACAGAT 780

Query 781 TCTACATTTGGATTGGTTTCTATTTCAGATTGCAAATTACAATCATTCTGATGAATACTTG 840
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 781 TCTACATTTGGATTGGTTTCTATTTCAGATTGCAAATTACAATCATTCTGATGAATACTTG 840

Query 841 TCTTTTAGTTGTTATTTGTCTGTACAGAACAAATCAGAGTTTTATTTTCCCAGAGCTCCA 900
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 841 TCTTTTAGTTGTTATTTGTCTGTACAGAACAAATCAGAGTTTTATTTTCCCAGAGCTCCA 900

Query 901 TTGAACTCAAATGCCATGTTATCCACTGAATCAATGATGAGCAGAATTGCAGCTGGAGAC 960
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 901 TTGAACTCAAATGCCATGTTATCCACTGAATCAATGATGAGCAGAATTGCAGCTGGAGAC 960

Query 961 TTGGAGTCATCAGTGGATGATCCTAGATCAGAGGAAGATAAAAAGATTTGAGTGA 1014
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 961 TTGGAGTCATCAGTGGATGATCCTAGATCAGAGGAAGATAAAAAGATTTGAGTGA 1014

```

Anexo 11

Alinhamento da sequência do gene *P1-2A* com a sequência do gene sintetizado pela empresa Integrated DNA Technologies. Optou-se por mostrar somente um alinhamento, já que não foram observadas alterações ao longo das etapas necessárias para a geração do baculovírus recombinante. *Query* – gene *P1-2A* sequenciado. *Sbjct* – sequência do gene *P1-2A* sintético.

Identities = 2943/2943 (100%) , Gaps = 0/2943 (0%)

```
Query 1 ATGAACATGTCAAGGCAGGGAATATTTCAAACCGTGGGCAGCGGATTGGATCATATCCTC 60
      |
Sbjct 1 ATGAACATGTCAAGGCAGGGAATATTTCAAACCGTGGGCAGCGGATTGGATCATATCCTC 60

Query 61 TCGCTTGCTGACATCGAGGAGGAGCAGATGATCCAGAGCGTCGACAGAACTGCCGTGACT 120
      |
Sbjct 61 TCGCTTGCTGACATCGAGGAGGAGCAGATGATCCAGAGCGTCGACAGAACTGCCGTGACT 120

Query 121 GGTGCGTCTTACTTTACATCAGTAGACCAGTCCCTCCGTGCACACCGCAGAAGTGGGCTCT 180
      |
Sbjct 121 GGTGCGTCTTACTTTACATCAGTAGACCAGTCCCTCCGTGCACACCGCAGAAGTGGGCTCT 180

Query 181 CATCAAGTCGAACCGCTCCGCACCTCGGTGGATAAGCCAGGAAGCAAGAGGACTCAGGGA 240
      |
Sbjct 181 CATCAAGTCGAACCGCTCCGCACCTCGGTGGATAAGCCAGGAAGCAAGAGGACTCAGGGA 240

Query 241 GAGAAGTTCTTTTTGATCCATTCAGCAGACTGGTTGACAACACACGCTCTTTTCCACGAG 300
      |
Sbjct 241 GAGAAGTTCTTTTTGATCCATTCAGCAGACTGGTTGACAACACACGCTCTTTTCCACGAG 300

Query 301 GTTGCTAAGCTCGACGTGGTCAAGCTGCTTTACAATGAGCAGTTTGCAGTGCAAGGACTG 360
      |
Sbjct 301 GTTGCTAAGCTCGACGTGGTCAAGCTGCTTTACAATGAGCAGTTTGCAGTGCAAGGACTG 360

Query 361 CTGCGCTACCACACATATGCTCGTTTTGGCATAGAGATCCAAGTTCAAATAAATCCTACG 420
      |
Sbjct 361 CTGCGCTACCACACATATGCTCGTTTTGGCATAGAGATCCAAGTTCAAATAAATCCTACG 420

Query 421 CCGTTCCAACAGGGCGGTCTTATTTGCGCCATGGTTCCAGGCGACCAATCCTATGGCAGC 480
      |
Sbjct 421 CCGTTCCAACAGGGCGGTCTTATTTGCGCCATGGTTCCAGGCGACCAATCCTATGGCAGC 480
```


Query	1201	CCTTGCCTGTGCATGGACATCACCGGAGTTCAGAGTACTCTGAGATTCCGTGTACCATGG	1260
Sbjct	1201	CCTTGCCTGTGCATGGACATCACCGGAGTTCAGAGTACTCTGAGATTCCGTGTACCATGG	1260
Query	1261	ATCTCCGACACACCTTACAGAGTTAATCGCTATACAAAGTCTGCTCACCAGAAGGGTGAG	1320
Sbjct	1261	ATCTCCGACACACCTTACAGAGTTAATCGCTATACAAAGTCTGCTCACCAGAAGGGTGAG	1320
Query	1321	TACACCGCAATCGGAAAACCTCATAGTGTACTGCTACAATCGTTTGACCTCACCTTCCAAT	1380
Sbjct	1321	TACACCGCAATCGGAAAACCTCATAGTGTACTGCTACAATCGTTTGACCTCACCTTCCAAT	1380
Query	1381	GTCGCGAGCCATGTCAGGGTGAACGTGTATCTGAGCGCCATTAACCTGGAGTGCTTCGCC	1440
Sbjct	1381	GTCGCGAGCCATGTCAGGGTGAACGTGTATCTGAGCGCCATTAACCTGGAGTGCTTCGCC	1440
Query	1441	CCTTTGTACCACGCCATGGACGTCCTACTACCAGGTAGGAGACGATTCCAGGAGGCTTCTCC	1500
Sbjct	1441	CCTTTGTACCACGCCATGGACGTCCTACTACCAGGTAGGAGACGATTCCAGGAGGCTTCTCC	1500
Query	1501	ACTACAGTGTCAACTGAGCAGAATGTGCCGATCCCCAAGTGGGCATCACTACCATGAAG	1560
Sbjct	1501	ACTACAGTGTCAACTGAGCAGAATGTGCCGATCCCCAAGTGGGCATCACTACCATGAAG	1560
Query	1561	GACCTCAAGGGTAAAGCTAACAGGGGAAAAATGGATGTCAGCGGTGTTCAAGCACCCGTA	1620
Sbjct	1561	GACCTCAAGGGTAAAGCTAACAGGGGAAAAATGGATGTCAGCGGTGTTCAAGCACCCGTA	1620
Query	1621	GGAGCCATCACAACAATTGAGGATCCGGTCTGGCTAAGAAGGTACCAGAGACGTTCCCG	1680
Sbjct	1621	GGAGCCATCACAACAATTGAGGATCCGGTCTGGCTAAGAAGGTACCAGAGACGTTCCCG	1680
Query	1681	GAATTGAAACCCGGAGAAAGCAGGCATACTAGCGATCACATGTCAATATATAAATTCATG	1740
Sbjct	1681	GAATTGAAACCCGGAGAAAGCAGGCATACTAGCGATCACATGTCAATATATAAATTCATG	1740
Query	1741	GGACGCTCCCATTTCCCTGTGCACATTCACGTTCAACAGCAATAACAAAGAGTACACATTT	1800
Sbjct	1741	GGACGCTCCCATTTCCCTGTGCACATTCACGTTCAACAGCAATAACAAAGAGTACACATTT	1800
Query	1801	CCAATAACTTTGAGCTCAACCTCAAACCCACCCCATGGACTTCCGAGTACTCTGCCTGG	1860
Sbjct	1801	CCAATAACTTTGAGCTCAACCTCAAACCCACCCCATGGACTTCCGAGTACTCTGCCTGG	1860
Query	1861	TTCTTCAACTTGTTCAGCTTTACAGGGGCCGCTTGATTTGACTATTATAATCACCGGT	1920
Sbjct	1861	TTCTTCAACTTGTTCAGCTTTACAGGGGCCGCTTGATTTGACTATTATAATCACCGGT	1920

Query	1921	GCGACAGACGTCGATGGTATGGCATGGTTCACACCAGTGGGTCTCGCAGTTGACACTCCC	1980
Sbjct	1921	GCGACAGACGTCGATGGTATGGCATGGTTCACACCAGTGGGTCTCGCAGTTGACACTCCC	1980
Query	1981	TGGGTGGAGAAGGAATCCGCTTTGTCTATCGATTACAAAACAGCACTGGGAGCTGTGCGC	2040
Sbjct	1981	TGGGTGGAGAAGGAATCCGCTTTGTCTATCGATTACAAAACAGCACTGGGAGCTGTGCGC	2040
Query	2041	TTCAACACTCGCCGCACAGGAAGCATCCAGATCCGTTTGCCTGGTACTCTTATCTGTAC	2100
Sbjct	2041	TTCAACACTCGCCGCACAGGAAGCATCCAGATCCGTTTGCCTGGTACTCTTATCTGTAC	2100
Query	2101	GCGGTTTCCGGAGCTCTCGATGGTTTGGGTGACAAGACCGATTCTACGTTTGGCCTGGTG	2160
Sbjct	2101	GCGGTTTCCGGAGCTCTCGATGGTTTGGGTGACAAGACCGATTCTACGTTTGGCCTGGTG	2160
Query	2161	TCAATCCAAATTGCGAACTACAACCCTCTGATGAATACTTGTCTTTCAGTTGTTACCTC	2220
Sbjct	2161	TCAATCCAAATTGCGAACTACAACCCTCTGATGAATACTTGTCTTTCAGTTGTTACCTC	2220
Query	2221	TCCGTGACAGAGCAAAGTGAGTTTTACTTCCCGAGAGCTCCTCTGAACTCAAACGCCATG	2280
Sbjct	2221	TCCGTGACAGAGCAAAGTGAGTTTTACTTCCCGAGAGCTCCTCTGAACTCAAACGCCATG	2280
Query	2281	TTGAGCACCGAGTCAATGGTTTCGCGCATCGCCGCCGGCGACCTGGAGTCGTCTGTGCGAC	2340
Sbjct	2281	TTGAGCACCGAGTCAATGGTTTCGCGCATCGCCGCCGGCGACCTGGAGTCGTCTGTGCGAC	2340
Query	2341	GACCCTAGATCCGAGGAGGATAAGAGATTTGAGTCACACATTGAGTGTGCGAAGCCGTAT	2400
Sbjct	2341	GACCCTAGATCCGAGGAGGATAAGAGATTTGAGTCACACATTGAGTGTGCGAAGCCGTAT	2400
Query	2401	AAGGAGCTCCGTCTGGAGGTTGGTAAGCAAAGACTTAAATACGCCCAGGAAGAGCTCAGC	2460
Sbjct	2401	AAGGAGCTCCGTCTGGAGGTTGGTAAGCAAAGACTTAAATACGCCCAGGAAGAGCTCAGC	2460
Query	2461	AATGAAGTGCTCCCCCTCCTAGGAAGATGAAGGGTTTGTTCAGCCAGGCAAATATTTCT	2520
Sbjct	2461	AATGAAGTGCTCCCCCTCCTAGGAAGATGAAGGGTTTGTTCAGCCAGGCAAATATTTCT	2520
Query	2521	CTCTTCTACACCGAAGAACACGAGATGATGAAGTTTTCTGGAGAGGCGTAACAGCGGAC	2580
Sbjct	2521	CTCTTCTACACCGAAGAACACGAGATGATGAAGTTTTCTGGAGAGGCGTAACAGCGGAC	2580


```

Query  2581  ACTCGCGCATTGCGCAGATTTCGGTTTCAGTCTCGCTGCAGGTCGTAGCGTCTGGACTTTG  2640
          |||
Sbjct  2581  ACTCGCGCATTGCGCAGATTTCGGTTTCAGTCTCGCTGCAGGTCGTAGCGTCTGGACTTTG  2640

Query  2641  GAGATGGACGCCGGAGTGTGACTGGTCGTCTTATCCGTCTGAACGACGAGAAGTGGACC  2700
          |||
Sbjct  2641  GAGATGGACGCCGGAGTGTGACTGGTCGTCTTATCCGTCTGAACGACGAGAAGTGGACC  2700

Query  2701  GAGATGAAGGACGATAAGATCGTATCACTGATTGAGAAATTCACCAGTAACAAATACTGG  2760
          |||
Sbjct  2701  GAGATGAAGGACGATAAGATCGTATCACTGATTGAGAAATTCACCAGTAACAAATACTGG  2760

Query  2761  TCTAAGGTAAACTTCCCGCACGGAATGCTGGATCTCGAAGAGATAGCGGCAAATTCAAAG  2820
          |||
Sbjct  2761  TCTAAGGTAAACTTCCCGCACGGAATGCTGGATCTCGAAGAGATAGCGGCAAATTCAAAG  2820

Query  2821  GACTTCCCGAACATGTCTGAAACTGACCTCTGTTTCCTCCTCCACTGGCTTAATCCTAAG  2880
          |||
Sbjct  2821  GACTTCCCGAACATGTCTGAAACTGACCTCTGTTTCCTCCTCCACTGGCTTAATCCTAAG  2880

Query  2881  AAGATTAACCTTGGCCGATAGAATGCTCGGACTCTCTGGTGTGCAGGAAATAAAAGAGCAA  2940
          |||
Sbjct  2881  AAGATTAACCTTGGCCGATAGAATGCTCGGACTCTCTGGTGTGCAGGAAATAAAAGAGCAA  2940

Query  2941  TAA  2943
          |||
Sbjct  2941  TAA  2943

```

Alinhamento da sequência do gene *P3* com a sequência do gene sintetizado pela empresa Integrated DNA Technologies. Optou-se por mostrar somente um alinhamento, já que não foram observadas alterações ao longo das etapas necessárias para a geração dos baculovírus recombinantes. *Query* – gene *P3* sequenciado. *Sbjct* – sequência do gene *P3* sintético.

Identities = 2418/2418 (100%), Gaps = 0/2418 (0%)

```

Query 1      ATGGGTATAAGCGACGATAACGACTCGGCTGTCGCGGAATTCTTCCAGTCTTTTCCTTCA 60
          |
Sbjct 1      ATGGGTATAAGCGACGATAACGACTCGGCTGTCGCGGAATTCTTCCAGTCTTTTCCTTCA 60

Query 61     GGCGAACCGAGCAACTCCAAGCTCAGCGGATTCTTCCAATCAGTCACTAACCACAAATGG 120
          |
Sbjct 61     GGCGAACCGAGCAACTCCAAGCTCAGCGGATTCTTCCAATCAGTCACTAACCACAAATGG 120

Query 121    GTTGCCGTTGGCGCAGCTGTGGGAATCCTTGGTGTTCGTCGGCGGATGGGTGCGTATAC 180
          |
Sbjct 121    GTTGCCGTTGGCGCAGCTGTGGGAATCCTTGGTGTTCGTCGGCGGATGGGTGCGTATAC 180

Query 181    AAGCACTTTTCTCATAAGGAGGAAGAGCCTATTCCAGCTGAAGGAGTCTACCATGGCGTG 240
          |
Sbjct 181    AAGCACTTTTCTCATAAGGAGGAAGAGCCTATTCCAGCTGAAGGAGTCTACCATGGCGTG 240

Query 241    ACCAAGCCCAAGCACGTTATCAAGTTGGACGCTGATCCAGTGGAGTCTCAGTCAACCCTG 300
          |
Sbjct 241    ACCAAGCCCAAGCACGTTATCAAGTTGGACGCTGATCCAGTGGAGTCTCAGTCAACCCTG 300

Query 301    GAAGTGGCAGGCCTGGTTAGGAAAACCTCGTGCAATTTGGAGTCGGCGAGAAGAACGGA 360
          |
Sbjct 301    GAAGTGGCAGGCCTGGTTAGGAAAACCTCGTGCAATTTGGAGTCGGCGAGAAGAACGGA 360

Query 361    TCGTCCGTTGGGTCATGAATGCGCTCGGCGTCAAGGACGACTGGCTTCTTGTTCCCAGT 420
          |
Sbjct 361    TCGTCCGTTGGGTCATGAATGCGCTCGGCGTCAAGGACGACTGGCTTCTTGTTCCCAGT 420

Query 421    CACGCTTATAAATTCGAGAAGGATTACGAGATGATGGAATTCTACTTTAACCGTGGCGGC 480
          |
Sbjct 421    CACGCTTATAAATTCGAGAAGGATTACGAGATGATGGAATTCTACTTTAACCGTGGCGGC 480

Query 481    ACCTACTACTCGATTTCCGCTGGTAACGTAGTAATCCAGTCTTTGGATGTGGGTTTCCAA 540
          |
Sbjct 481    ACCTACTACTCGATTTCCGCTGGTAACGTAGTAATCCAGTCTTTGGATGTGGGTTTCCAA 540

```

Query	541	GATGTGGTCCTCATGAAAGTGCCGACGATCCCCAAATCCGCGATATCACACAGCATTTT	600
Sbjct	541	GATGTGGTCCTCATGAAAGTGCCGACGATCCCCAAATCCGCGATATCACACAGCATTTT	600
Query	601	ATCAAGAAGGGTGACGTACCGAGGGCTTTGAACCGTTTGGCGACCTCGTTACAACCGTG	660
Sbjct	601	ATCAAGAAGGGTGACGTACCGAGGGCTTTGAACCGTTTGGCGACCTCGTTACAACCGTG	660
Query	661	AACGGCACTCCCATGCTCATAAGCGAGGGTCCACTGAAGATGGAGGAGAAAGCAACATAC	720
Sbjct	661	AACGGCACTCCCATGCTCATAAGCGAGGGTCCACTGAAGATGGAGGAGAAAGCAACATAC	720
Query	721	GTACACAAGAAAAATGACGGCACAACGGTAGACCTCGCCGTCGACCAAGCTTGGCGTGA	780
Sbjct	721	GTACACAAGAAAAATGACGGCACAACGGTAGACCTCGCCGTCGACCAAGCTTGGCGTGA	780
Query	781	AAAGGAGAGGGACTGCCTGGAATGTGCGGCGGTGCTTTGGTGAGCTCCAACCAGTCGATA	840
Sbjct	781	AAAGGAGAGGGACTGCCTGGAATGTGCGGCGGTGCTTTGGTGAGCTCCAACCAGTCGATA	840
Query	841	CAGAACGCAATTCTTGGCATTTCATGTAGCCGAGGAAACTCCATTCTTGTGCGTAAGCTG	900
Sbjct	841	CAGAACGCAATTCTTGGCATTTCATGTAGCCGAGGAAACTCCATTCTTGTGCGTAAGCTG	900
Query	901	GTAACGCAAGAGATGTTCCAGAACATCGACAAAAAGATAGAATCCCAACGCATCATGAAG	960
Sbjct	901	GTAACGCAAGAGATGTTCCAGAACATCGACAAAAAGATAGAATCCCAACGCATCATGAAG	960
Query	961	GTAGAATTCACTCAGTGTTCATGAACGTCGTGTCCAAGACGCTTTTCAGGAAGTCGCCT	1020
Sbjct	961	GTAGAATTCACTCAGTGTTCATGAACGTCGTGTCCAAGACGCTTTTCAGGAAGTCGCCT	1020
Query	1021	ATCTACCATCATATTGACAAGACCATGATCAACTTCCCCTGCTATGCCGTTTTCAAAG	1080
Sbjct	1021	ATCTACCATCATATTGACAAGACCATGATCAACTTCCCCTGCTATGCCGTTTTCAAAG	1080
Query	1081	GCTGAGATCGATCCTATGGCCGTAATGTTGAGTAAGTATTCACTTCCGATAGTGGAGGAG	1140
Sbjct	1081	GCTGAGATCGATCCTATGGCCGTAATGTTGAGTAAGTATTCACTTCCGATAGTGGAGGAG	1140
Query	1141	CCCGAAGGCTACAAGGAGGCTTCCATCTTCTATCAGAACAAGATTGTTGGAAAGACTCAA	1200
Sbjct	1141	CCCGAAGGCTACAAGGAGGCTTCCATCTTCTATCAGAACAAGATTGTTGGAAAGACTCAA	1200
Query	1201	CTGGTAGATGATTTCTTGGACCTGGACATGGCCATCACCCTGCTCCTGGCATTGATGCC	1260
Sbjct	1201	CTGGTAGATGATTTCTTGGACCTGGACATGGCCATCACCCTGCTCCTGGCATTGATGCC	1260

Query	1261	ATAAATATGGACAGCAGCCCCGGATTCCCTTACGTTCAAGAAAAGCTGACCAAGCGCGAT	1320
Sbjct	1261	ATAAATATGGACAGCAGCCCCGGATTCCCTTACGTTCAAGAAAAGCTGACCAAGCGCGAT	1320
Query	1321	CTCATTTGGCTCGACGAGAACGGCCTCCTCTTGGGTGTTACCCCTCGCCTGGCTCAGCGT	1380
Sbjct	1321	CTCATTTGGCTCGACGAGAACGGCCTCCTCTTGGGTGTTACCCCTCGCCTGGCTCAGCGT	1380
Query	1381	ATTTTGTTC AATACCGTAATGATGGAAAATTGTTCCGACCTGGACGTCGTCTTCACCACG	1440
Sbjct	1381	ATTTTGTTC AATACCGTAATGATGGAAAATTGTTCCGACCTGGACGTCGTCTTCACCACG	1440
Query	1441	TGCCCTAAAGACGAACTGCGCCCGCTGGAGAAGGTCTGGAGAGTAAAACCCGTGCCATC	1500
Sbjct	1441	TGCCCTAAAGACGAACTGCGCCCGCTGGAGAAGGTCTGGAGAGTAAAACCCGTGCCATC	1500
Query	1501	GACGCGTGTCCACTCGACTACACTATATTTGTGTGCGCATGTACTGGGGCCCAGCTATCTCA	1560
Sbjct	1501	GACGCGTGTCCACTCGACTACACTATATTTGTGTGCGCATGTACTGGGGCCCAGCTATCTCA	1560
Query	1561	TACTTCCACCTGAACCCTGGCTTCCATACCGGAGTCGCCATAGGTATCGACCCAGACAAG	1620
Sbjct	1561	TACTTCCACCTGAACCCTGGCTTCCATACCGGAGTCGCCATAGGTATCGACCCAGACAAG	1620
Query	1621	CAGTGGGATGAGCTGTTCAAGACCATGATCCGCTTCGGAGACGTAGGTCTTGATTTGGAC	1680
Sbjct	1621	CAGTGGGATGAGCTGTTCAAGACCATGATCCGCTTCGGAGACGTAGGTCTTGATTTGGAC	1680
Query	1681	TTTTCAGCTTTTGACGCAAGTCTCTCACCGTTCATGATCAGGGAAGCTGGTAGAATTATG	1740
Sbjct	1681	TTTTCAGCTTTTGACGCAAGTCTCTCACCGTTCATGATCAGGGAAGCTGGTAGAATTATG	1740
Query	1741	AGCGAACTGTCTGGTACCCCAAGTCACCTTGAACCGCTCTGATAAACACGATCATTTAT	1800
Sbjct	1741	AGCGAACTGTCTGGTACCCCAAGTCACCTTGAACCGCTCTGATAAACACGATCATTTAT	1800
Query	1801	TCAAAGCACTTGCTCTATAACTGTTGTTATCATGTTTGC GGCAGTATGCCAAGTGGTAGC	1860
Sbjct	1801	TCAAAGCACTTGCTCTATAACTGTTGTTATCATGTTTGC GGCAGTATGCCAAGTGGTAGC	1860
Query	1861	CCGTGCACCGCTTTGCTGAACTCCATCATTAACAACGTAAACTTGTATTACGTATTCTCT	1920
Sbjct	1861	CCGTGCACCGCTTTGCTGAACTCCATCATTAACAACGTAAACTTGTATTACGTATTCTCT	1920

```

Query  1921  AAGATCTTTGGCAAGTCGCCAGTGTCTTTTGTCAAGCCCTGAAGATTCTCTGTTACGGT  1980
          |||
Sbjct  1921  AAGATCTTTGGCAAGTCGCCAGTGTCTTTTGTCAAGCCCTGAAGATTCTCTGTTACGGT  1980

Query  1981  GATGACGTGCTCATCGTCTTTTCGAGAGACGTGCAGATCGACAATCTGGATCTCATCGGA  2040
          |||
Sbjct  1981  GATGACGTGCTCATCGTCTTTTCGAGAGACGTGCAGATCGACAATCTGGATCTCATCGGA  2040

Query  2041  CAAAAGATAGTTGACGAGTTCAAGAAGTTGGGTATGACGGCTACAAGCGGGACAAGAAT  2100
          |||
Sbjct  2041  CAAAAGATAGTTGACGAGTTCAAGAAGTTGGGTATGACGGCTACAAGCGGGACAAGAAT  2100

Query  2101  GTACCACAACCTTAAGCCTGTGAGTGAACCTCACTTTCTTGAAGAGGTCTTCAACCTCGTG  2160
          |||
Sbjct  2101  GTACCACAACCTTAAGCCTGTGAGTGAACCTCACTTTCTTGAAGAGGTCTTCAACCTCGTG  2160

Query  2161  GAAGATCGCATACGTCCAGCAATTTCTGAGAAGACCATTTGGTCTCTTATCGCATGGCAG  2220
          |||
Sbjct  2161  GAAGATCGCATACGTCCAGCAATTTCTGAGAAGACCATTTGGTCTCTTATCGCATGGCAG  2220

Query  2221  AGATCCAACGCCGAGTTCGAGCAAAACCTGGAGAACGCTCAATGGTTCGCTTTCATGCAC  2280
          |||
Sbjct  2221  AGATCCAACGCCGAGTTCGAGCAAAACCTGGAGAACGCTCAATGGTTCGCTTTCATGCAC  2280

Query  2281  GGATACGAATTCTACCAAAAATTCTACTACTTTGTTTCAGTCATGCTTGGAGAAGGAGATG  2340
          |||
Sbjct  2281  GGATACGAATTCTACCAAAAATTCTACTACTTTGTTTCAGTCATGCTTGGAGAAGGAGATG  2340

Query  2341  ATAGAGTATAGACTCAAGAGCTACGATTGGTGGAGGATGAGGTTCTACGACCAATGCTTC  2400
          |||
Sbjct  2341  ATAGAGTATAGACTCAAGAGCTACGATTGGTGGAGGATGAGGTTCTACGACCAATGCTTC  2400

Query  2401  ATCTGCGACCTCTCTTAA  2418
          |||
Sbjct  2401  ATCTGCGACCTCTCTTAA  2418

```