



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**Nova abordagem para expressão
da partícula sSHbsAg do antígeno
HBsAg do vírus da Hepatite B em
células de inseto**

Ana Carolina Oliveira de Araujo

Brasília, Julho de 2011.



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

Nova abordagem para expressão da partícula sSHbsAg do antígeno HBsAg do vírus da Hepatite B em células de inseto

Ana Carolina Oliveira de Araujo

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Patologia Molecular da Universidade de Brasília,
como parte dos requisitos necessários à obtenção do
título de Mestre em Patologia Molecular**

Orientador: Dr. Bergmann Morais Ribeiro

Brasília

Julho 2011

Dedico este trabalho a minha família que é a base da minha vida e o segredo das minhas vitórias.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado o dom da vida e plantado no meu coração a semente do amor.

Agradeço a minha mãe das águas por me ensinar a cultivar essa semente.

Agradeço ao meu pai maior por me ensinar a podar os galhos e sempre crescer em direção a caridade e ao amor.

Agradeço a todas baculoviretes pelo apoio, alimento, alegrias e carinho. Vou guardar todos esses momentos na parte mais doce do meu coração.

Agradeço a todos os amigos do laboratório que sempre me ajudaram com muito carinho e paciência.

Agradeço em especial ao Daniel que me ensinou, além de Biologia Molecular, a ser sempre forte, perseverante e nunca perder a fé. Você amigo, é o que de mais precioso existe em mim. Obrigada por tudo.

Agradeço ao Dr Bergmann Morais Ribeiro e ao CNPq pela oportunidade.

Resumo

As Hepatites virais são doenças causadas por diferentes agentes etiológicos, que possuem distribuição universal e têm em comum o hepatotropismo. Em todo mundo, as hepatites A e B continuam a ser um grande problema de saúde pública. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 170 milhões de pessoas estejam infectadas com o vírus da hepatite C (HCV) e que 300 milhões vivam com o vírus da hepatite B (HBV). O vírus da hepatite B está classificado na família Hepadnavirus, contém características como o tropismo pelas células hepáticas e material genético constituído por uma molécula de DNA com fita parcialmente dupla. O diagnóstico de qualquer uma das formas clínicas da Hepatite B realiza-se através de técnicas sorológicas. Tais técnicas revelam-se fundamentais não apenas para o diagnóstico, mas também mostram-se muito úteis no acompanhamento da infecção viral, na avaliação do estado clínico do paciente e na utilização de terapêutica específica. As importantes descobertas realizadas nas áreas da virologia e da biologia molecular desses vírus, nos últimos anos, foram progressivamente sendo incorporados à rotina diária dos laboratórios de patologia clínica, permitindo aos profissionais da área de saúde acesso às modernas técnicas capazes de avaliar a carga viral presente no indivíduo, o índice de replicação do agente infeccioso e a eficácia de novas medicações utilizadas no tratamento dessa virose. O HBsAg é uma glicoproteína antigênica exposta na superfície do envelope do HBV cuja presença no soro do paciente indica uma infecção ativa. Capaz de ativar uma resposta imunológica, o HBsAg é utilizado na confecção de vacinas e Kits diagnósticos. Este trabalho descreve a construção de um baculovírus recombinante contendo o gene do antígeno HBsAg de HBV fusionado ao gene da poliedrina do *Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV). O vírus recombinate foi usado para infectar células de insetos e insetos e sua expressão analisada por SDS-PAGE. A

proteína recombinante foi expressa em grande quantidade, purificada por centrifugação em gradiente de sacarose e usada como antígeno em um teste de diagnóstico comumente utilizado em laboratórios clínicos. A proteína recombinante foi reconhecida pelo soro de pacientes infectados pelo HBV e desta forma, possui potencial para ser usada em testes de diagnóstico dessa importante doença viral humana. Palavras Chaves: Hepatite B, HBsAg, Sistema de Expressão em Baculovírus.

Abstract

Viral hepatitis are diseases caused by different etiologic agents, that have worldwide distribution and have in common hepatotropism. Worldwide, hepatitis A and B remains a major public health problem . The World Health Organization (WHO) estimates that 170 million people are infected with hepatitis C virus (HCV) and 300 million are living with hepatitis B virus (HBV). Hepatitis B is classified in the Hepadnavirus family, contains common features such as tropism for liver cells and its genetic material consists of a partial double stranded DNA molecule. The diagnosis of a clinical form of hepatitis B is carried out by serological techniques. These techniques are not only important for diagnosis but are also very useful in monitoring viral infection, in assessing the patient's clinical status and in the use of specific therapy. Important developments derived from research in virology and molecular biology of these viruses in recent years, have gradually been incorporated into the daily routine of clinical pathology laboratories, allowing healthcare professionals to access modern techniques to evaluate the viral load present in the individual, the replication of the infectious agent and effectiveness of new medications used to treat this viral infection. HBsAg is a glycoprotein antigen exposed on the surface of the envelope of HBV, whose presence in the serum of the patient indicates an active infection. HBsAg is able to activate a human immune response and is used in the production of vaccines and diagnostic kits. This work shows the construction of a recombinant baculovirus containing the HBsAg gene (from HBV) fused to the polyhedrin gene of the *Autographa californica multicausid Nucleopolyhedrovirus* virus (AcMNPV). The recombinant virus was used to infect insect cells and insects and the expression of the recombinant protein was analysed by SDS-PAGE. The recombinant protein was highly expressed, purified by sucrose gradient centrifugation, and used as antigen in a

diagnostic test commonly used in clinical laboratories (ELISA). The recombinant protein was shown to be recognized by serum of HBV-infected patients and therefore, have the potential to be used in diagnosis of this important human viral disease.

Keywords: Hepatitis B, HBsAg, Baculovirus Expression System.

Índice de figuras

Figura 1- Distribuição geográfica da infecção crônica pela HBV.....	16
Figura 2- Micrografia Eletrônica do HBV.....	17
Figura 3- Representação esquemática da organização do genoma do vírus da Hepatite B.....	19
Figura 4- Representação do vírus da Hepatite B.....	21
Figura 5- Genoma do HBV.....	21
Figura 6- Fenótipo do Baculovírus.....	26
Figura 7- Relação filogenética dos quatro gêneros atuais em que se divide a família <i>Baculoviridae</i>	30
Figura 8- Esquema mostrando a infecção <i>in vivo</i> do baculovírus.....	31
Figura 9- Esquema mostrando a infecção viral <i>in vitro</i>	32
Figura 10- Vetor de transferência pFastBac TM 1.....	34
Figura 11- Esquema mostrando o sistema Bac-to-Bac da Invitrogen.....	36
Figura 12- Esquema das duas regiões usadas para fusão da porção ‘small s’ do antígeno HBsAg à poliedrina.....	42
Figura 13- Larva de <i>Spodoptera frugiperda</i> no quinto íntar.....	42
Figura 14- Sequenciamento do gene HbsAg amplificado.....	49
Figura 15- Figura mostrando a sequência de produção do vetor pGem-HBsAg(TAA).....	50

Figura 16- Construção do vetor de transferência pFastAcPH3sSHBsAg (carboxi terminal).....	51
Figura 17- Construção do vírus vAcPH3sSHBsAg. o gene HBsAg foi inserido no bacmídeo por estar flanqueado por regiões de transposição TN7L e TN7R.....	52
Figura 18- Figura mostrando a sequência de produção do vetor pGem-HBsAg (sem TAA).....	53
Figura 19- Construção do vetor de transferência pFB1-6xHIS-sSHBsAgAcPH.....	54
Figura 20- Construção do vírus vAcHISsSHBsAgAcPH. O gene HBsAg foi inserido no bacmídeo por estar flanqueado por regiões de transposição TN7L e TN7R.....	55
Figura 21- Efeito citopático da infecção de células BTI-TN5B1-4 com diferentes baculovírus a 72h.p.i.....	56
Figura 22- figura mostrando as várias fases do Gradiente de sacarose após centrifugação.....	58
Figura 23- Análise da expressão da proteína recombinante sSHBsAg em células de inseto infectadas com o baculovírus recombinante vAc-6x-HIS-sSHBsAg-AcPH.....	59
Figura 24- Imunoensaio (ELISA) para detecção de anticorpos anti-HBSAg em soro de pacientes infectados pelo HBV. Extrato de células.....	60
Figura 25- Imunoensaio (ELISA) para detecção de anticorpos anti-HBSAg em soro de pacientes infectados pelo HBV. Corpos de oclusão.....	61

Figura 26- Gráfico com os resultados do ELISA nas 3 concentrações (300, 400 e 500ng) dos corpos de oclusão purificados de lagartas *Spodoptera frugiperda* infectadas com o vírus recombinante vAc-6x-HISsSHBsAg-AcPH.....62

Índice de Tabelas

Tabela 1- Programa utilizado nas duas estratégias para obtenção do fragmento contendo a porção ‘small s’ do antígeno HBsAg.....	41
Tabela 2- Sequência de Primers utilizados para todas as construções.....	42

Abreviaturas e Símbolos

Amp	ampicilina
BSA	albumina sérica bovina
dNTP	deoxinucleotídeos
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
G	grama
h	hora
h.p.i.	horas pós infecção
HCL	ácido clorídrico
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
kDa	Quilodaltons
L	litro
M	molar: mol/L
MW	peso molecular
mg	miligrama = 10^{-6} grama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
NaCL	cloreto de sódio
NBT	Nitro blue tetrazolium chloride
ng	nano grama
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
Pfu	unidade formadora de placa
pH	potencial de hidrogênio
RNA	ácido ribonucléico
r.p.m.	rotação por minuto
s	segundo
SDS	dodecilsulfato de sódio
Tris	tris (hidroximetil) aminometano

U unidade enzimática

X-Gal 5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactopiranosídeo

μg micrograma

μL microlítro

μM micromolar (micromol por litro)

°C grau Celsius

Sumário

1 Introdução.....	17
1.1 Hepatites.....	17
1.2 HBV.....	20
1.3 HBsAg.....	28
1.4 Baculovírus.....	31
1.4.1 replicação dos baculovírus.....	34
1.4.2 Infecção dos Baculovírus <i>in vitro</i>	36
1.5 Baculovírus como sistema de expressão.....	37
2. justificativa.....	42
3. Objetivos do trabalho.....	43
4. Materiais e Métodos.....	43
4.1 Vírus e Células.....	43
4.2 Obtenção e clonagem da parte ‘small s’ do antígeno HBsAg.....	43
4.3 Clonagem da porção ‘small s’ do antígeno HBsAg na porção 5’ e 3’ da poliedrina.....	45
4.4 Obtenção do baculovírus recombinante para expressão da porção ‘small s’ do antígeno HBsAg fusionada à poliedrina.....	47
4.5 Produção <i>in vitro</i> da proteína químera sSHBsAg.....	48
4.6 Análise da expressão da proteína sSHBsAg produzida nas células de inseto.....	49

4.7 Análise da expressão da proteína sSHBsAg produzida nas células de inseto.....	50
4.8 Imunoensaio.....	50
5. Resultados.....	51
5.1 Construção do vetor de clonagem pGem sSHBsAg com TAA.....	52
5.2. Construção do vetor de transferência pFastAcPH3sSHBsAg (carboxi terminal).....	55
5.3 Construção do vírus vAcPH3sSHBsAg.....	56
5.4 Construção do vetor de clonagem pGemsSHbsAg (sem TAA).....	57
5.5 Construção do vetor de transferência pFB1-6xHIS- sSHBsAgAcPH.....	58
5.6 Construção do Vírus recombinante vAchISsSHBsAgAcPH.....	59
5.7 Infecção de células de inseto TN5B com o vírus recombinante vAchISsSHBsAgAcPH.....	60
5.8 Infecção de lagartas <i>Spodoptera frugiperda</i> com o vírus recombinante vAchISsSHBsAgAcPH.....	61
5.9 Análise da expressão da proteína fusionada a poliedrina na infecção do vírus recombinante em células de insetos (TN5B) por SDS-PAGE.....	62
5.10 Imunoensaio com Kit comercial automatizado e manual Anti HBsAg.....	63
6. Discussão e Conclusão.....	66

7. Referências Bibliográficas.....72

1. Introdução

1.1 Hepatites

As Hepatites virais são doenças causadas por diferentes agentes etiológicos, que possuem distribuição universal e têm em comum o hepatotropismo. Possuem semelhanças do ponto de vista clínico-laboratorial, mas apresentam importantes diferenças epidemiológicas evolutivas (Ferreira & Silveira, 2004). Em todo mundo, as hepatites A e B continuam a ser um grande problema de saúde pública. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 170 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas com o vírus da hepatite C (HCV) e que 300 milhões vivam hoje com o vírus da hepatite B (HBV). No Brasil, há registros da prevalência de hepatites B e C por regiões, porém, ainda não existem estudos indicando a prevalência nacional dessas infecções (Marchesini, 2009).

Não há dúvidas de que a infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) continua sendo um problema de saúde pública mundial. Estima-se que mais de 2 bilhões de pessoas já foram infectadas pelo HBV somando-se todos os registros da doença até os dias atuais em alguma época de suas vidas, seja na infância ou na vida adulta. Ocorrem, por ano, cerca de 1 milhão de óbitos relacionados com as complicações da hepatite crônica (cirrose e hepatocarcinoma). Em regiões de alta prevalência do HBV (África, Ásia e algumas regiões do Pacífico), o hepatocarcinoma decorrente desta infecção está entre as três causas mais frequentes de morte por câncer. Soma-se a isso o fato de que os portadores do HBV funcionam como reservatórios da infecção, com potencial perpetuador da hepatite viral B (HVB) através de várias gerações (Ferreira, 2000; Gonçales, 1996).

A divisão do mundo em áreas de baixa, intermediária e alta endemicidade para o HBV baseia-se na prevalência de marcadores da infecção e nas vias de transmissão primárias encontradas nas mais diversas regiões. Trata-se de divisão didática e fundamental para a eficiente adoção de medidas de controle, todavia, não se deve reduzir a compreensão epidemiológica da HBV apenas pela endemicidade em macroregiões (Figura 1). Áreas de alta endemicidade são aquelas aonde grande parte da população se infecta pelo HBV com especial ênfase para a infecção adquirida no período perinatal e durante a infância. Considera-se que o limite inferior de prevalência de portadores do HBV nestas áreas seja de 5% a 10% e que o limite superior de portadores do vírus atinja cerca de 20%. A maior parte dos países nesta categoria apresenta uma prevalência de portadores entre 10% e 15%, com cerca de 50% a 95% da população apresentando evidência sorológica de infecção prévia pelo HBV. As áreas de alta endemicidade incluem África, Ásia a leste do sub-continentes Indiano, região do Pacífico, região Amazônica, anel ártico, regiões do Oriente Médio, Ásia menor e Caribe (Silveira, *et al.*, 1999). Partes do leste da Europa, como Bulgária, Romênia, Albânia e Moldávia, apresentam uma prevalência de portadores do HBV entre 5% e 10% da população geral. Países como a Bulgária apresentam tendência à queda na prevalência e incidência da infecção em função do adequado funcionamento dos programas de controle e vacinação, sendo atualmente considerados como países com endemicidade intermediária (Focaccia, 2007).

As áreas de endemicidade intermediária geralmente apresentam prevalência de portadores do HBV entre 2% e 5% com cerca de 30% a 50% da população com evidência sorológica de infecção prévia pelo HBV. Algumas partes do leste e sul da Europa, regiões do Oriente Médio, Ásia ocidental incluindo a Índia e partes da América Central e do sul são consideradas de categoria intermediária. Nestas áreas, ocorre um

misto de transmissão na infância e entre adultos. Hepatite viral aguda com icterícia ocorre com frequência nestas regiões, uma vez que a doença sintomática é mais comum em adolescentes e adultos e que este grupo é particularmente acometido em áreas de endemicidade intermediária (Focaccia *et al.*, 1998). América do norte, Europa, Austrália e partes da América do sul são consideradas áreas de baixa endemicidade. Nestas regiões, a transmissão perinatal e na infância é relativamente incomum. A maioria das infecções ocorre entre adultos por via de transmissão sexual, uso de drogas injetáveis ou exposição ocupacional a sangue e a material contaminado. A HBV aguda é uma causa freqüente de morbidade em alguns dos países citados desta categoria (Silveira *et al.*, 1999).

Todavia, vale ressaltar que existe uma grande diversidade dentro da maioria destas regiões. A divisão das áreas de prevalência global deve ser interpretada como somatória aos achados regionais. Os dados regionais são, contudo, muito importantes na definição de estratégias de saúde pública e devem ser sempre levados em consideração. A heterogeneidade pode ser caracterizada através de áreas com diferentes níveis endêmicos dentro de uma mesma região ou de um país, ou através de comportamento epidemiológico diferente do esperado para determinado nível endêmico (Gonçales, 1996, Ferreira, 2000).

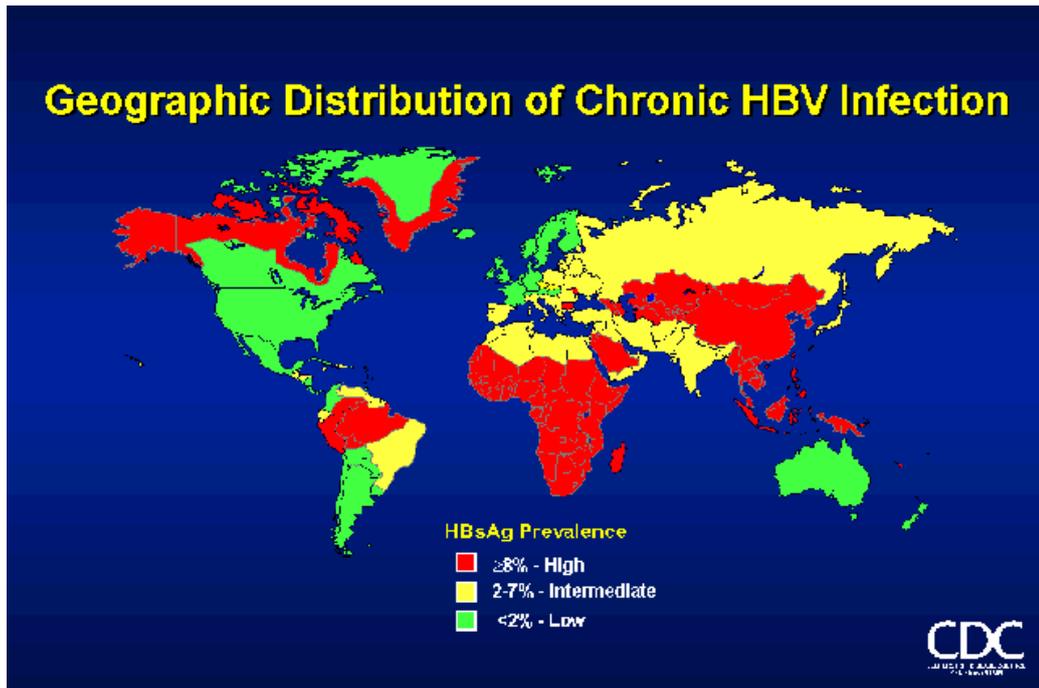


Figura 1: Distribuição geográfica da infecção crônica pela HBV. Mapa mostrando em vermelho a alta prevalência de infecção crônica pelo vírus da hepatite B, em amarelo intermediária e em verde baixa prevalência de Hepatite B no mundo. Adaptado CDC. http://www.dshs.state.tx.us/idcu/disease/hepatitis/hepatitis_b/faqs/.

1.2 HBV

O vírus da hepatite B é um vírus humana da família *Hepadnaviridae*, contém características como o tropismo pelas células hepáticas e material genético constituído por uma molécula de DNA com fita parcialmente dupla. O homem é o reservatório natural do HBV que apresenta, durante a infecção, uma característica exclusiva diferente de todos os vírus patogênicos ao homem: a produção de diferentes partículas virais. Partículas completas infecciosas, partículas incompletas esféricas e partículas incompletas filamentosas podem ser observadas através da preparação de soro de pacientes infectados para microscopia eletrônica (Figura 2) (Ferreira & Silveira, 2004).

Os vírions ou partículas virais infecciosas são estruturas esféricas com diâmetro de aproximadamente 42nm compostas por um envelope repleto de proteínas que constituem o antígeno de superfície do HBV, o HBsAg. O nucleocapsídeo possui simetria icosaédrica e é constituído pela proteína do core (núcleo, cerne) (HBcAg) e pelo genoma viral (Tiollais *et al.*, 1985). O soro de pacientes que estão sendo acometidos pelo HBV possui uma concentração de vírions ou partícula viral completa (Dane) de mais de 10^9 por mL, sendo que sua densidade em gradiente de equilíbrio de cloreto de cério é 1,22g/mL. Partículas não infecciosas, por outro lado, são compostas exclusivamente de HBsAg e são encontradas com titulação de aproximadamente 10^{13} partículas/ml de soro e possuem diâmetro de 22nm, já as filamentosas apresenta comprimento variável. Estas partículas possuem densidade de 1,18g/mL em gradiente de equilíbrio de cloreto de cério (Figura 2).

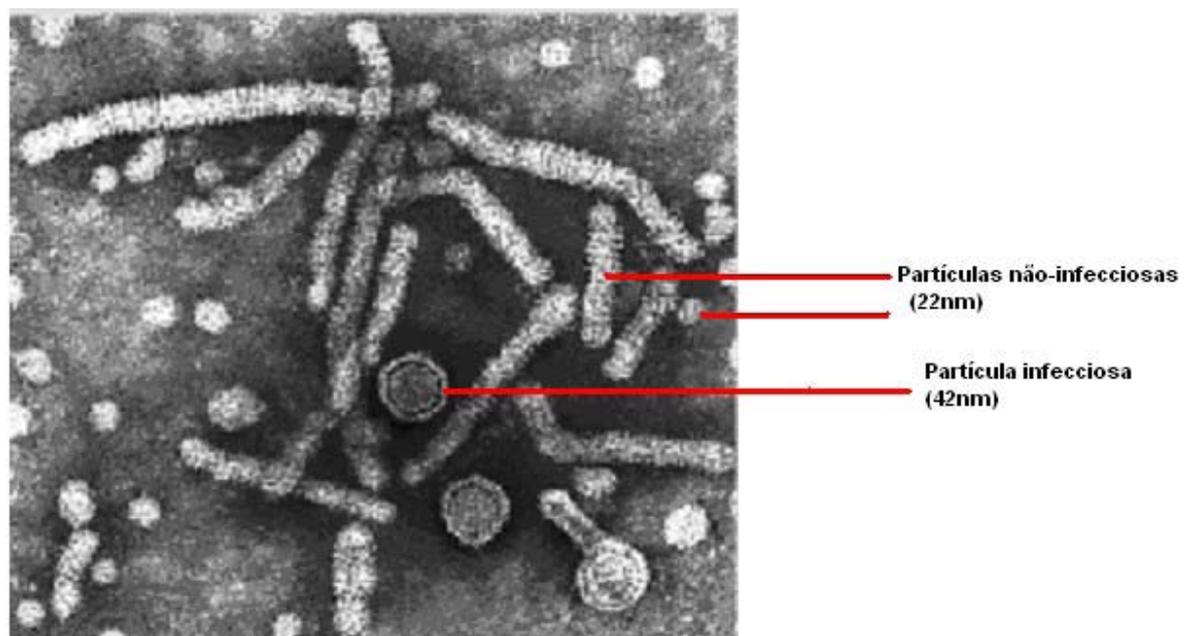


Figura 2: Micrografia Eletrônica do HBV. Víron (partícula infecciosa de 42nm) indicado por linha vermelha e partículas subvirais filamentosas e esféricas não infecciosas de 22nm. Fonte: <http://www.ictvdb.rothamsted.ac.uk/Images/Safrica/hbv3b.jpg>

O pequeno genoma do HBV é constituído por DNA (HBV-DNA), contendo 3.200 nucleotídeos, sendo assim um dos menores entre os genomas dos vírus que infectam o homem. O HBV é composto por uma molécula de DNA circular de fita parcialmente dupla (Gerlich & Robinson, 1980). A fita mais longa do DNA é complementar aos RNAs virais e por convenção são de polaridade negativa, sendo que essa fita não é um círculo fechado, apresenta uma única e pequena região aberta em um sítio aproximadamente a 224pb da extremidade 5' da fita positiva. A fita negativa possui na sua porção terminal aproximadamente nove nucleotídeos que são importantes na circularização da molécula de DNA, e essa circularização é mantida por extremidades coesivas de 224 pb situadas na porção 5' de ambas as fitas (Sattler & Robinson, 1979). A fita considerada positiva (possui uma região de fita simples) contém uma região fixa na extremidade 5' terminal e na extremidade 3' terminal uma região variável, ou seja o comprimento da fita positiva é variável correspondendo de 50%-90% do comprimento da fita complementar. Dentro do genoma do HBV existe uma proteína covalentemente ligada à extremidade 5' da fita de polaridade negativa, e um oligorribonucleotídeo ligado na extremidade 5' da fita de polaridade positiva. Próxima das extremidades 5' de ambas as fitas observa-se uma pequena sequência de 11 nucleotídeos, que são diretamente repetidas e por isso chamadas de 'direct repeats' (DR1 e DR2). DR1 e DR2 são sequências importantes para a iniciação da replicação viral. Segundo Ganem e Varmus (1987) a totalidade do genoma do vírus da hepatite B é codificante, apresentando 4 fases de leitura aberta que são: pré - S/S, pré - C/C, P e X. Todos os genes são codificados pela fita longa e possuem pelo menos uma região de sobreposição a outro gene. O gene pré - S/S codifica as proteínas que formam o HBsAg, e o pré C/C é responsável pela síntese do HBcAg e do antígeno e (HbeAg). O gene P codifica a polimerase viral e a região X é responsável pela síntese de uma

proteína regulatória, chamada proteína X. A sobreposição das 4 fases de leitura aberta aumenta a capacidade de síntese proteica em aproximadamente 50% do esperado para a totalidade do genoma do HBV(figura 3).

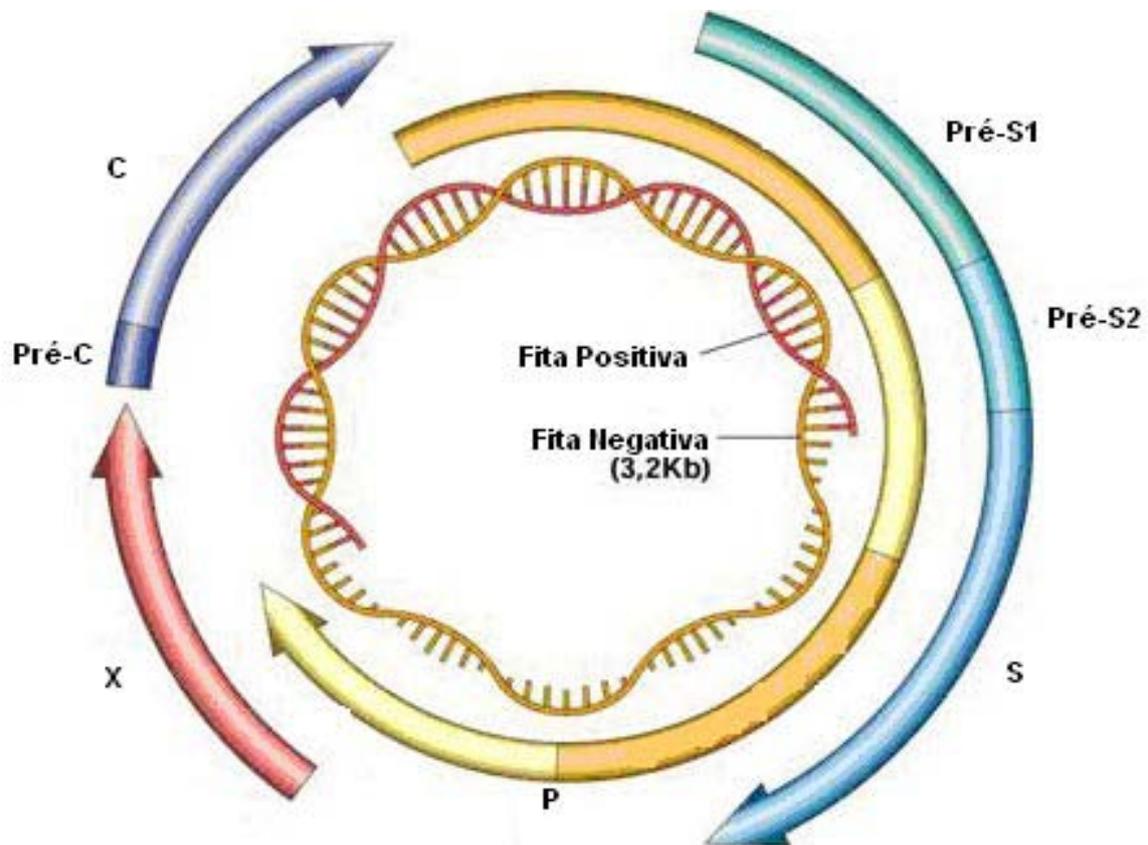


Figura 3: Representação esquemática da organização do genoma do vírus da Hepatite B. O círculo interno representa o DNA viral, indicado por duas fitas, uma contínua (amarela) de polaridade negativa e de tamanho 3,2Kb, e uma descontínua (vermelha) de polaridade positiva. Pode ser observado também as regiões de leitura aberta (ORF): pré-S/S (contém as regiões pré S1, S2 e S), pré-C/C, P e X. Fonte: <http://www.drthuthuy.com/images/genotype02.jpg> (modificado).

A replicação do HBV se inicia com a adsorção, penetração e perda do envoltório proteico dos vírus nos hepatócitos. A multiplicação do genoma do HBV ocorre no núcleo da célula infectada onde o DNA viral é convertido na forma circular dupla covalentemente fechada (cccDNA). Para que isso aconteça a fita positiva é complementada pela DNA polimerase e as estruturas (proteína terminal e oligorribonucleotídeo/Cap) das extremidades 5' de ambas as fitas são removidas. A RNA polimerase II transcreve o genoma do HBV a partir da forma cccDNA em RNAs maiores do que uma unidade do genoma (RNAs genômicos de aproximadamente 3,5 Kb). Entre esses RNAs genômicos, alguns servem de mensageiros e irão ao citoplasma, onde serão traduzidos para gerar, a DNA polimerase do HBV, o HBcAg e o HBeAg (Ganem, 1996).

O HBV circula primariamente no sangue e replica-se nos hepatócitos, sendo capaz de produzir 100.000.000.000 cópias por dia, enquanto o HCV e o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), próximo de 1.000.000.000 cópias por dia.

O HBV é infectivo até uma semana fora do corpo humano. No plasma, a viabilidade média do HBV varia de um dia a três dias, enquanto nos hepatócitos, a estabilidade média varia de 10-100 dias (Fonseca, 2007). O vírus é altamente infectivo e sabe-se que uma só partícula viral é capaz de infectar o ser humano. Quatro antígenos são produzidos pelo genoma do HBV: a) antígeno de superfície (HBsAg), b) antígeno *e* (HBeAg), c) antígeno central (core) (HBcAg), d) antígeno *x* (HBxAg).

A exata função do HBxAg durante a replicação do HBV e sua influência associada a carcinogênese hepática, ainda não está bem definida. Contudo, estudos experimentais sugerem que a expressão contínua do HBxAg nos hepatócitos pode influenciar a transformação celular. O HBeAg é derivado do produto da tradução das

regiões core e pré-core. Indivíduos portadores do HBeAg apresentam altos títulos (10^8 - 10^{11}) de partículas virais/mL (sangue), ao passo que o número de partículas virais é bem menor entre indivíduos HBeAg negativos, 10^5 - 10^7 cópias (Fonseca 2007).

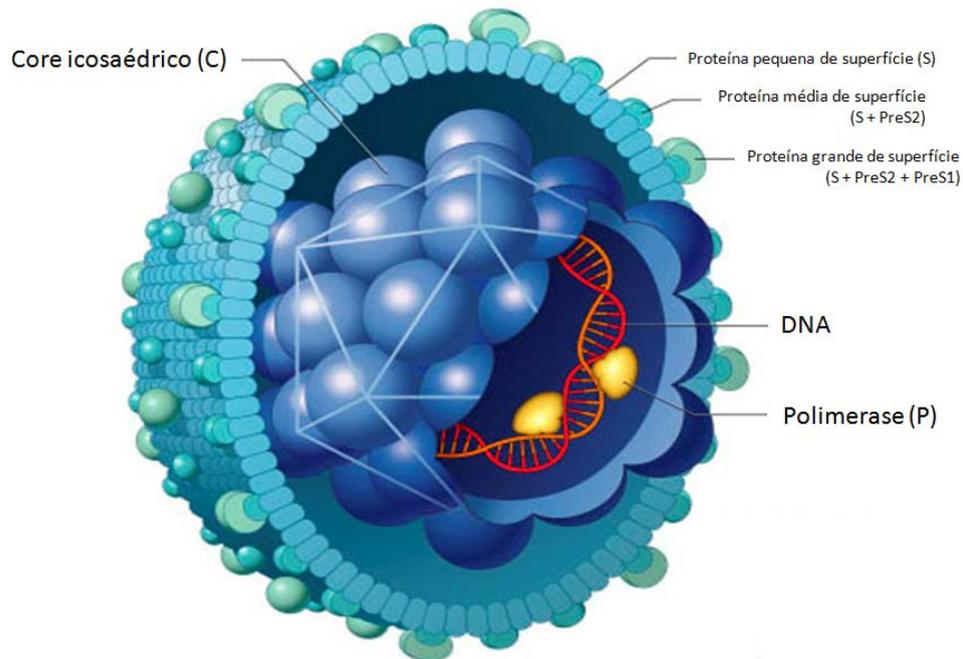


Figura 4: Representação do vírus da Hepatite B. No esquema estão sendo mostrados o nucleocapsídeo icosaédrico constituído por proteínas do core (C). O vírus é revestido por um envelope que contém três tipos de proteínas relacionadas entre si, as glicoproteínas S, Pré S1 e S2 de membrana que formam o antígeno de superfície mais imunogênico do HBV, o HBsAg. Fonte: <http://www.hepcentro.com.br/images/HBV.gif>

A transmissão do HBV se faz por via parenteral, e sexual, sendo considerada uma doença sexualmente transmissível. A transmissão vertical (materno-infantil) também é causa freqüente de disseminação do HBV, geralmente a transmissão ocorre no momento do parto, por meio do contato com sangue, líquido amniótico ou secreções maternas, sendo rara a transmissão via transplacentária, leite materno ou após o

nascimento (Carvalho & Araujo, 2008). O uso de drogas intravenosas, transplantes de órgãos ou tecidos, lesões de pele ou acidentes com agulhas, principalmente entre profissionais da área da saúde, também podem ser consideradas vias de transmissão. A saliva pode ser veículo de transmissão em caso de mordidas, porém não foram documentados casos de transmissão por beijos ou outros tipos de exposição à saliva. Outros fluidos corporais, incluindo lágrimas, suor, urina, fezes, leite materno, líquido e líquido sinovial, podem apresentar o HBsAg, porém não o vírion intacto, razão pela qual não tem sido associados à transmissão (Foccacia *et al.*, 1998). A transmissão por sangue e derivados ou por material médico-odontológico não esterilizado também pode ocorrer, ganhando maior importância relativa em locais de baixa e média endemicidade, porém, o risco de infecção por transfusão reduziu drasticamente após a inclusão de métodos sorológicos de pesquisa do HBV em todo sangue doado. Os estudos mais recentes nos casos de contágio pós-transplante se relacionam com transplante renal e cardíaco. De acordo com Lunel *et al.* (2000), os vírus podem advir de sangue residual contaminado presente no pedículo vascular.

O tratamento para HBV atualmente, consiste em dois tipos de agentes terapêuticos: Interferon e os análogos de nucleosídeos ou de nucleotídeos (AN). Os interferons compreendem o interferon convencional, de difícil emprego no tratamento da HBV devido à necessidade de altas dosagens diárias, e o interferon peguilado. Os AN compreendem a lamivudina (LVD), o adefovir (ADV) e o entecavir (ETV) cujo o uso em longo prazo é limitado pela seleção de cepas resistentes do HBV. Desenvolvidos recentemente, não existem ainda suficientes estudos longitudinais randomizados controlados que comparem todas essas drogas entre si. Ambos os tipos de drogas são capazes de eliminar a replicação do HBV em cerca de 30% dos pacientes tratados, sendo isso o objetivo central do tratamento. A maioria dos pacientes

permanece com a doença em remissão, havendo normalização da Alanina Transaminase (Enzima presente nos hepatócitos) e redução da carga viral; pode haver melhora histológica, porém raramente apresenta perda persistente do HBsAg. O benefício do tratamento fica evidenciado pelo seu impacto na evolução da doença, e observam-se nos pacientes capazes de responder menor risco de evolução para carcinoma hepatocelular e menor mortalidade.

Um dos grandes empecilhos para os avanços nas pesquisas moleculares do HBV é a sua incapacidade de infectar e se propagar em linhagens celulares convencionais, sendo que ela só se dá em células primárias de origem humana. Essas células possuem uma disponibilidade pequena não possibilitando passagens seriadas desse vírus (Galle & Hagelsen, 1994). O estudo do HBV através da infecção experimental em modelos animais é também de difícil execução, uma vez que o vírus apenas infecta primatas não humanos (Focaccia, 2007). Algumas linhagens de hepatócitos humanos embora não suportem a infecção viral suportam a replicação do HBV quando transfectados com o genoma viral clonado (Ganem, 1996).

Os últimos 50 anos foram de notáveis conquistas no que se refere à prevenção e ao controle das hepatites virais. Os mais significativos progressos foram a identificação dos agentes virais, o desenvolvimento de testes laboratoriais específicos, o rastreamento dos indivíduos infectados e o surgimento de vacinas protetoras (Ferreira & Silveira, 2004).

A vacina contra o HBV é a forma mais eficaz para a prevenção da hepatite B e tem proporcionado grande avanço no controle desta enfermidade. Assim, desde 1998, o PNI (Programa Nacional de Imunização) recomenda a vacinação universal das crianças contra hepatite B e mais de uma centena de países já incluíram esta vacina em

seus programas de imunização. No Brasil, a mesma tem sido oferecida gratuitamente a grupos de risco desde o início da década de 90 e, mais recentemente, a partir de 2001 foi estendida a indivíduos com idade até 19 anos em todas as regiões (Carvalho & Araujo, 2008).

Vacinas seguras e eficazes contra HBV estão disponíveis em todo o mundo. A primeira vacina disponível para prevenir hepatite viral foi contra o HBV, desenvolvida no início dos anos 1980 e feita com plasma humano. Posteriormente, foi substituída por vacinas produzidas através da técnica do DNA recombinante. Em termos globais, estima-se que mais de 1 bilhão de pessoas já tenham recebido vacina contra hepatite B, nos EUA, os cálculos apontam mais de 40 milhões de crianças e de 30 milhões de adultos já vacinados. O antígeno utilizado nas vacinas disponíveis atualmente é um HBsAg recombinante, produzido pela inserção de um plasmídeo, contendo o gene do antígeno de superfície, em células de um fungo. O HBsAg, após purificação, é adsorvido a hidróxido de alumínio, sendo que o produto final contém mais de 95% de proteína HBsAg, menos de 5% de proteínas derivadas do fungo e nenhum DNA do fungo detectável na vacina (Ferreira & Silveira, 2004).

1.3 HBsAg

O HBsAg é uma glicoproteína antigênica exposta na superfície do envelope do HBV cuja presença no soro do paciente indica uma infecção ativa. Capaz de ativar uma resposta imunológica, o HBsAg é utilizado na confecção de vacinas e Kits diagnósticos. A proteína é traduzida a partir do gene pré-S/S que inclui as regiões pré-S1, pré-S2 e S, com três códon de iniciação na mesma fase de leitura (figura 3). A maior proteína que compõe o HBsAg, 'large S', cujo códon de iniciação está localizado no início da região pré-S1, é codificada pelas regiões pré-S1, pré-S2 e S do gene pré-

S/S. A proteína de tamanho intermediário, designada 'middle S', é codificada pelas regiões pré-S2 e S. A partir do códon de iniciação localizado no início da região S, a menor proteína, 'small S', é sintetizada. Todas essas proteínas possuem o mesmo códon de terminação localizado no final da região S.

As proteínas do HBsAg podem se apresentar nas formas glicosiladas e não glicosiladas, sendo que a proteína 'middle S' pode se apresentar diglicosilada (Ganem, 1996). Desta forma, a 'large S', composta de aproximadamente 400 aminoácidos, possui a forma não glicosilada, p39, e a forma glicosilada, gp42. A proteína 'middle S', com 281 aminoácidos possui as formas glicosiladas, gp33 e a diglicosilada, gp36, e a 'small S', com 226 aminoácidos, possui a forma não glicosilada, p24 e a forma glicosilada gp27. A análise das partículas esféricas de 22nm purificadas mostrou que elas contêm quase exclusivamente as duas formas da menor proteína, os polipeptídeos codificados por pré-S2 e S, gp33 e gp36. O vírion contém quantidades quase que equimolares de todas as três proteínas (Heermann *et al.*, 1984).

O HBsAg como já comentado anteriormente faz uso extensivo de fases de leitura aberta sobrepostas e dentro da mesma fase, podem empregar múltiplos códons de iniciação para gerar proteínas estruturalmente relacionadas. Os ribossomos do hospedeiro podem não traduzir eficientemente proteínas a partir de códons de iniciação (AUG) localizados internamente na estrutura do RNA. Para garantir o acesso dos ribossomos do hospedeiro a estes códons AUG internos, o programa transcripcional do vírus evoluiu no sentido de uma mesma classe de mRNAs possuir extremidades 5' distintas justapostas aos códons de iniciação encontrados. No caso das proteínas de envelope que compõem o HBsAg são conhecidos dois promotores, promotor pré-S1 e promotor pré S2/S. O promotor pré-S1 controla a transcrição de um único RNA

subgenômico de 2,4 Kb. O RNA de 2,4 Kb perfaz toda a região pré-S/S e é o único RNA mensageiro para a proteína ‘large S’. O promotor pré-S2/S controla a transcrição de uma família de RNAs de 2,1 Kb, possuindo micro-heterogeneidade da extremidade 5’, de modo que um desses transcritos se inicia imediatamente antes do AUG da região pré-S2 e os demais após este códon de iniciação. Desta forma um dos transcritos de 2,1 Kb origina a proteína ‘middle S’, enquanto os demais RNAs mensageiros de 2,1 Kb originam a proteína ‘small S’. O promotor pré-S2/S é mais forte do que o promotor pré-S1 o que resulta em uma maior síntese de proteínas ‘middle S’ e ‘small S’ comparada com a produção da proteína ‘large S’ (Schaller & Fischer, 1991). A proteína ‘large S’ possui papel regulatório para a secreção do HBsAg, dessa forma, a superexpressão da proteína ‘large S’ resulta na retenção das proteínas de superfície no retículo endoplasmático (Cheng & Smith, 1986). O promotor X controla a transcrição de um RNA de 0,9 Kb que é traduzido em uma proteína com função de regulação e que não é controlada nos vírus de aves.

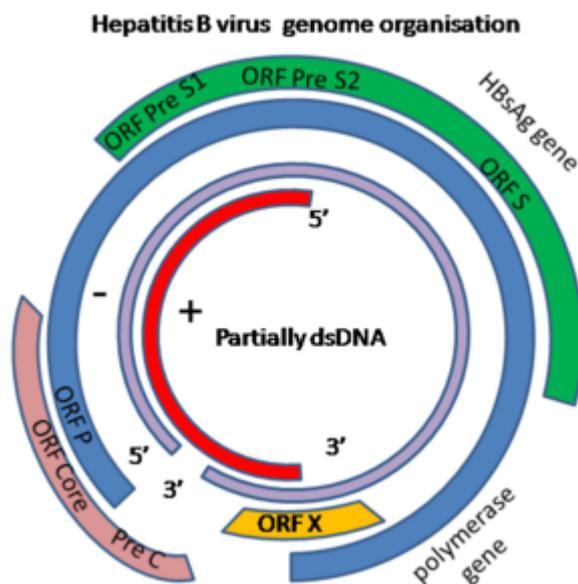


Figura 5: Genoma do HBV onde se evidencia o Gene HBsAg formado pelas ORFs pré-S1, pré-S2 e S, o gene da polimerase com sua ORF P, o gene X com sua ORF X, o

gene core e pré-core que codificam e o antígeno HBeAg. Além disso são mostradas as duas fitas de DNA, uma contínua e uma descontínua. A fita a contínua (em roxo) é considerada de polaridade negativa e a descontínua (em vermelho) polaridade positiva.

Fonte: http://www.trouble-nutritionnel.wikibis.com/hepatite_b.php

A aplicação de técnicas de biologia molecular permitiu também notáveis avanços no conhecimento do próprio HBV e na demonstração da sua importância como fator etiológico de hepatopatias crônicas e do hepatocarcinoma. O diagnóstico de qualquer das formas clínicas da Hepatite B realiza-se através de técnicas sorológicas. Tais técnicas revelam-se fundamentais não apenas para o diagnóstico, mas também mostram-se muito úteis no acompanhamento da infecção viral, na avaliação do estado clínico do paciente e na utilização de terapêutica específica. As importantes descobertas realizadas nas áreas da virologia e da biologia molecular desses vírus, nos últimos anos, foram progressivamente sendo incorporados à rotina diária dos laboratórios de patologia clínica, permitindo aos profissionais da área de saúde acesso às modernas técnicas capazes de avaliar a carga viral presente no indivíduo, o índice de replicação do agente infeccioso e a eficácia de novas medicações utilizadas no tratamento dessa virose (Ferreira, 2000).

1.4 Baculovírus

Os baculovírus são vírus de insetos capazes de infectar diversos hospedeiros artrópodes, principalmente os pertencentes às ordens Lepidóptera, Díptera e Himenóptera. Eles são vírus de DNA dupla fita, circular, supercoiled, pertencentes à família *Baculoviridae*, possuindo um vírion com envelope em formato de bastão (báculo), contendo no seu genoma entre 80 e 200 Kilobases (Kb) (Arif, 1986). Possuem uma característica diferenciada dos outros vírus, por apresentarem dois fenótipos

distintos durante um único ciclo de infecção (Figura 6): o BV (do inglês 'budded virus') ou vírus extracelular, responsável pela transmissão do vírus de célula a célula, e o ODV (do inglês 'occlusion derived virus') presente em uma oclusão cristalina de origem protéica denominada de corpos de oclusão (OB, do inglês, 'occlusion body') ou poliedros, responsável pela transmissão horizontal do vírus de inseto a inseto (Smith *et al.*, 1983).

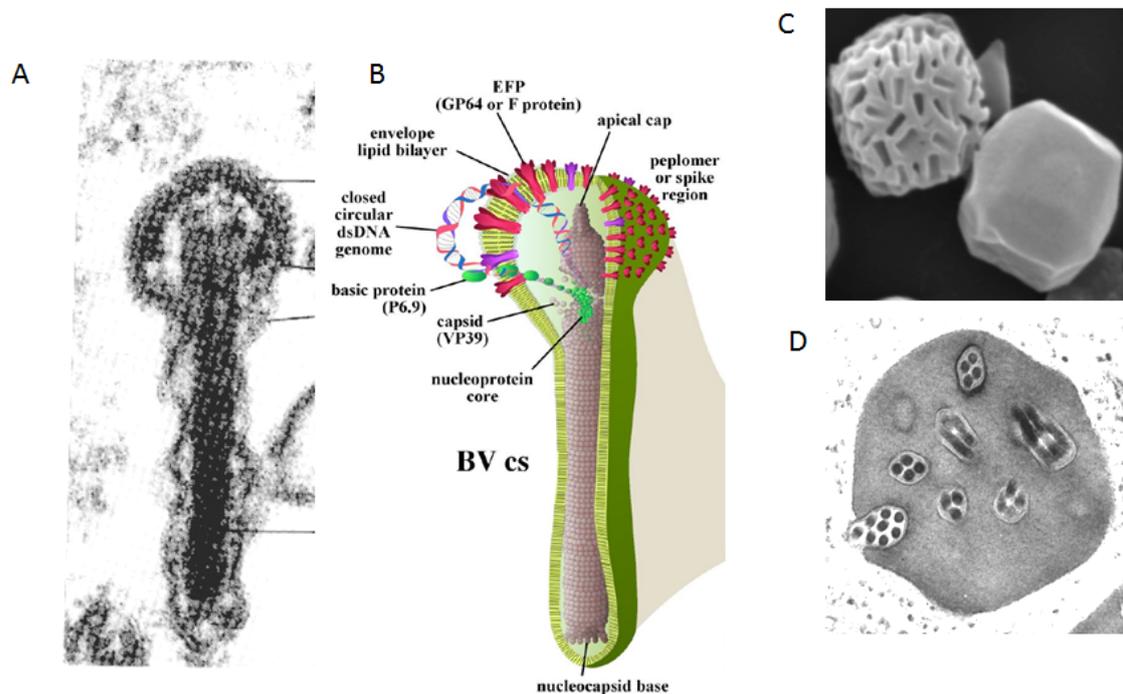


Figura 6: Fenótipo produzido durante a infecção secundária, responsável pelo espalhamento da doença pelo sistema do inseto. (A) Micrografia eletrônica de transmissão mostrando o vírus que brota da célula ou extra celular (modificado de Luckow *et al.*, 1992) e (B) um esquema evidenciando as principais proteínas que compõem o vírion (Slack e Arif, 2007). O Fenótipo viral responsável pela infecção primária também está sendo mostrado (C e D). Os poliedros podem ser vistos em micrografia eletrônica de varredura (C – um parcialmente montado, mostrando os espaços onde seriam ocluídos os ODVs e outro totalmente montado) e de transmissão (D – mostrando os nucleocapsídeos múltiplos por envelope) (Ribeiro *et al.*, 1998).

Esses vírus são utilizados como agentes de controle biológico devido a sua alta especificidade com relação ao inseto alvo, sendo seguro para as pessoas que se alimentam das plantas contendo o baculovírus ou dos trabalhadores que fazem a aplicação do baculovírus nas plantações. O Brasil implementou o maior programa de biopesticida viral, utilizando o baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyedrovirus* (AgMNPV), que culminou, na safra de 2002/2003, na aplicação desse vírus em mais de 2 milhões de hectares contra a praga da soja (Flavio Moscardi, comunicação pessoal). A família Baculoviridae antigamente era dividida taxonomicamente em dois gêneros: *Nucleopolyedrovirus*, denominados de NPV, e *Granulovirus*, denominados de GV (Murphy *et al.*, 1995; Van Regenmortel *et al.*, 2000). Com o sequenciamento de vários genomas de baculovírus e a partir de análises filogenéticas baseadas na comparação desses genomas, uma nova nomenclatura foi proposta, onde baculovírus foram subdivididos em 4 gêneros, os Alphabaculovirus (NPVs que infectam Lepidópteros com 456 membros), Betabaculovirus (GVs que infectam Lepidópteros com 148 membros), Gammabaculovirus (NPVs que infectam Himenópteros com 30 membros) e os Deltabaculovirus (NPVs que infectam Dípteros com 27 membros) (Jehle *et al.*, 2006)(Figura 7).

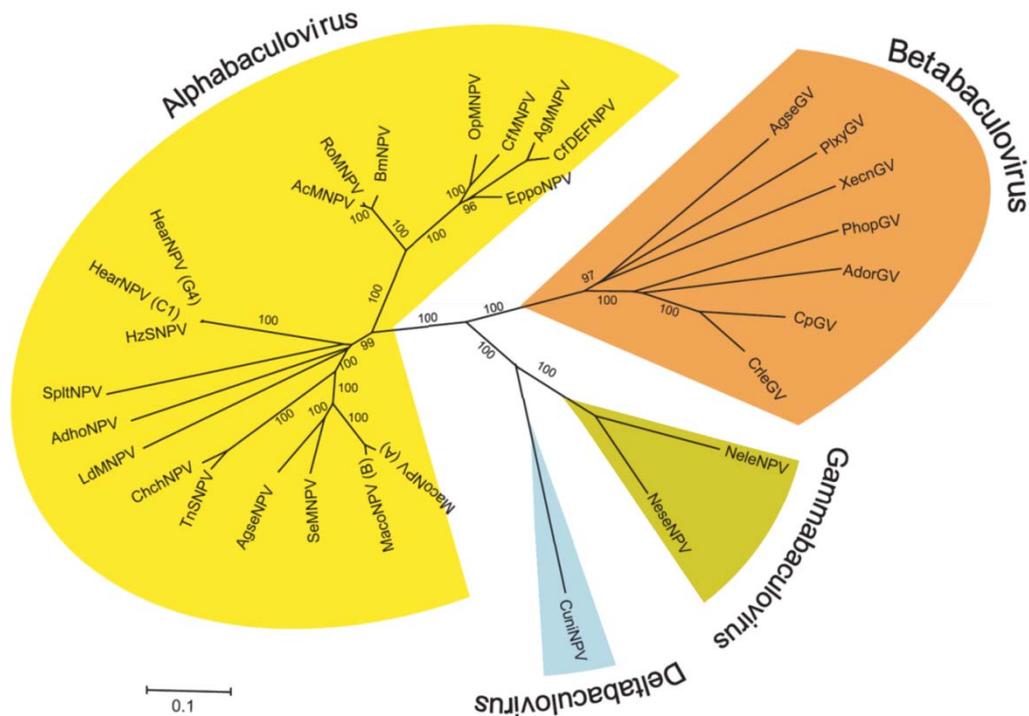
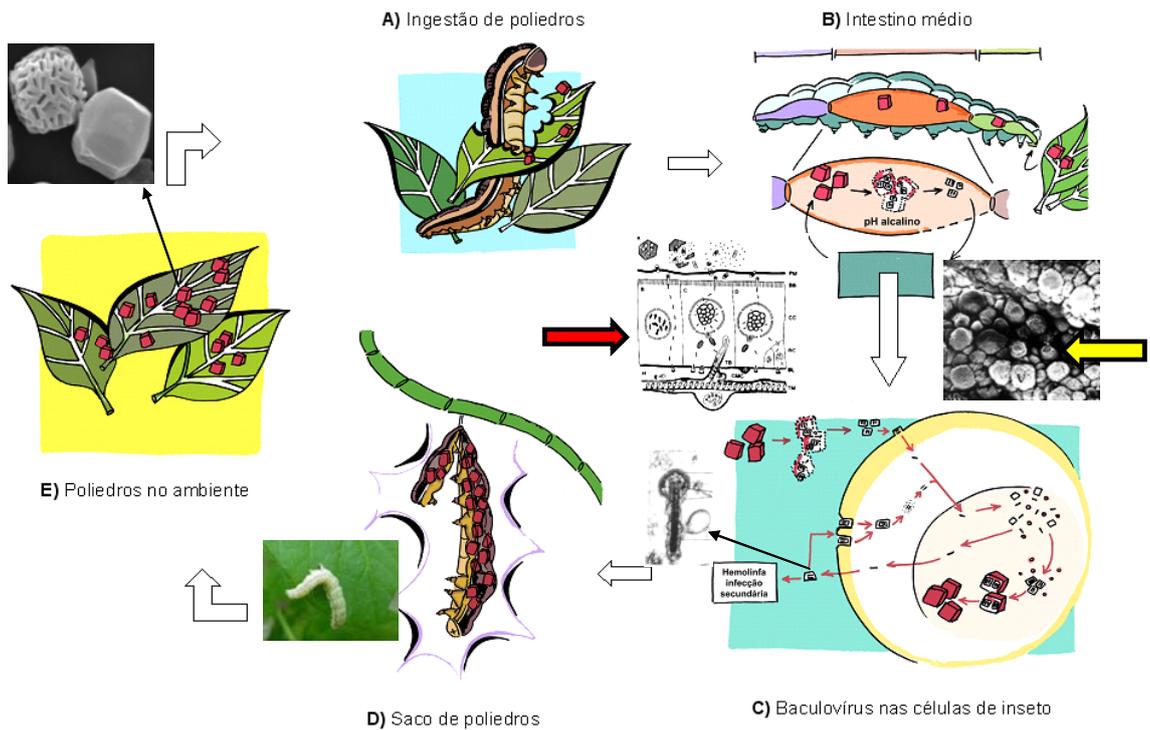


Figura 7: Relação filogenética dos quatro gêneros atuais em que se divide a família *Baculoviridae*. Árvore mostrando a relação de proximidade filogenética com base em sequências gênicas ou aminoacídicas e conseqüente agrupamento nos quatro gêneros atualmente aceitos. A árvore foi modificada de Jehle *et al.* (2006).

1.4.1 Replicação do Baculovírus

A replicação dos Baculovírus *in vivo* começa com a lagarta se alimentando de folhas que contêm poliedros. Quando os poliedros chegam ao intestino médio da lagarta o pH alcalino dissolve os poliedros liberando os ODVs. Os ODVs por fusão de membrana entram nas células colunares da lagarta e se encaminham para o núcleo da célula onde se inicia a replicação viral, produzindo os BVs (Horton & Burand, 1993). Parte dos BVs produzidos saem da célula e dão início a infecção secundária, ou seja, a

infecção célula a célula(Volkman *et al.*, 2000). Na fase tardia da infecção começa a ser produzido em larga escala a proteína viral responsável pela oclusão dos vírus, dando origem a criação de novos poliedros. Em torno de 4 dias a lagarta morre e seu tegumento se desfaz liberando no ambiente os poliedros que dão início a um novo ciclo (Figura 8).



Fonte: Maria Creuza do Espírito Santo Barros – Laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia UnB

Figura 8: Esquema mostrando a infecção *in vivo* do baculovírus. A) ingestão dos poliedros que estão presentes na superfície das folhas pelas lagartas. B) Chegada dos poliedros ao intestino médio da lagarta onde o pH alcalino promove a dissolução dos poliedros e liberação dos BVs. Após o esquema duas figuras mostrando a esquerda (representado pela seta de cor vermelha) o intestino médio da lagarta dissolvendo os poliedros por causa do seu pH alcalino e a entrada nas células do intestino pelos BVs, e a direita (representado pela seta amarela) microscopia eletrônica de varedura dos poliedros. C) Detalhe da entrada dos OVs e BVs nas células da lagarta. Os poliedros depois de dissolvidos, liberam os OVs que entram nas células colunares por fusão de

membrana e são encaminhados para o núcleo celular e dão início a replicação viral, alguns BVs saem da célula para dar início a infecção secundária, célula a célula. D e E) Na fase tardia da infecção viral, começa a produção de uma proteína viral responsável pela oclusão dos vírus para formação dos poliedros. A lagarta morre após alguns dias contendo bilhões de poliedros, liberando os poliedros no ambiente. Fonte: Maria Creuza do Espírito Santo Barros-Laboratório de Virologia (Universidade de Brasília)

1.4.2 Infecção dos Baculovírus *in vitro*

BVs são adicionados a placas ou garrafas de células de inseto contendo meio de cultura específico, entram nas células por endocitose e se encaminham para o núcleo da célula dando início a replicação viral. Com a formação de novos BVs se dá início a infecção secundária (célula a célula), e como na infecção *in vivo*, na fase tardia da infecção começa a produção dos poliedros (Lu & Miller, 1997). Em torno de 48 h.p.i. as células estouram liberando no meio os poliedros (Figura 9).

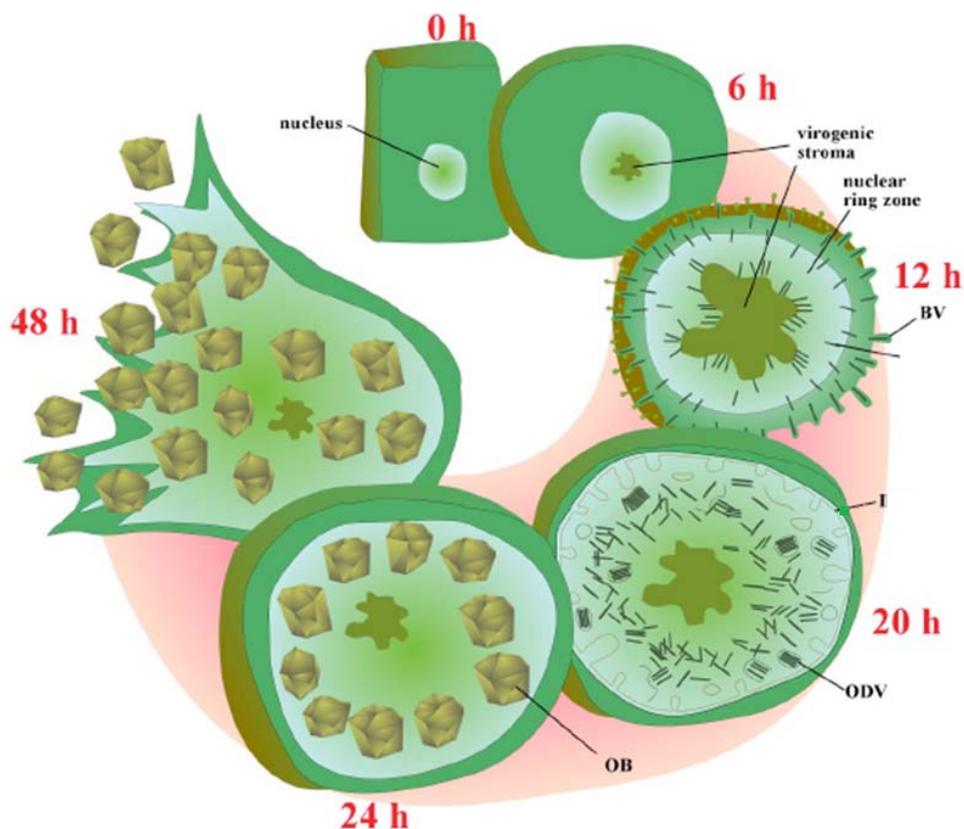


Figura 09: Esquema mostrando a infecção de um baculovírus em cultura de células de inseto (*in vitro*). Em 0 h, a célula de inseto está íntegra com núcleo central e de tamanho pequeno; A 6 h.p.i., já se nota uma mudança na morfologia da célula que se torna mais oval e há um aumento do volume do núcleo. A 12 h.p.i., há uma expansão do núcleo e do estroma virogênico, onde ocorre intensa replicação viral. Nesse momento, BVs saem da célula para dar início a infecção secundária. A 20 h.p.i., a célula está com o núcleo altamente hipertrofiado e se inicia a oclusão dos vírus na periferia nuclear. A 24 h.p.i., se inicia a produção em larga escala de OBs e a 48 h.p.i., a célula se rompe, liberando OBs no meio de cultura. Fonte: Arif, 1986.

1.5 Baculovírus como sistema de expressão

Os Baculovírus têm sido largamente usados como vetores de expressão, onde proteínas heterólogas são produzidas, proporcionando um amplo uso na medicina como agentes terapêuticos, profiláticos (vacinas) e para diagnose. Esse sistema de expressão baseia-se na inserção de genes de interesse no genoma do baculovírus sob o comando de um promotor forte. No modelo mais comumente utilizado o gene de interesse é inserido sob o controle do promotor do gene da poliedrina, a proteína mais abundante dos corpos de oclusão dos baculovírus. Esses corpos de oclusão são formados nos estágios finais da infecção de células de inseto e constituem mais de 50% da proteína total de uma célula infectada a 96 h pós infecção (p.i.) (figura 9) O'Reilly *et al.*, 1992; Richardson, 1995; Jarvis *et al.*, 1996 e Ribeiro *et al.*, 1998). Segundo Ji *et al.* (2010), em seu trabalho, o poliedro é uma estrutura cristalina simétrica e robusta, sua proteína mais abundante, a poliedrina, é quem faz a montagem do cristal deixando a porção amino terminal livre, sendo por tanto essa região a mais indicada para fusão com genes heterólogos.

Uma grande variedade de proteínas foi expressa em células de inseto desde os primeiros relatos das expressões do β -interferon (Smith *et al.*, 1983) e da β -galactosidase (Pennock *et al.*, 1984) em células de *Spodoptera frugiperda*, utilizando baculovírus recombinantes. Hoje em dia, os baculovírus são considerados excelentes vetores de expressão e estão entre os mais utilizados instrumentos disponíveis atualmente para a expressão, em altos níveis, de genes recombinantes em hospedeiros eucarióticos.

Para expressar genes heterólogos utilizando o sistema de expressão baseado em Baculovírus é necessário primeiramente, inserir seu gene de interesse em um vetor de transferência que possui um promotor viral forte (poliedrina ou p10). Um exemplo de vetor de transferência é o plasmídeo comercial criado pela Invitrogen pFastBacTM 1 (Figura 10).

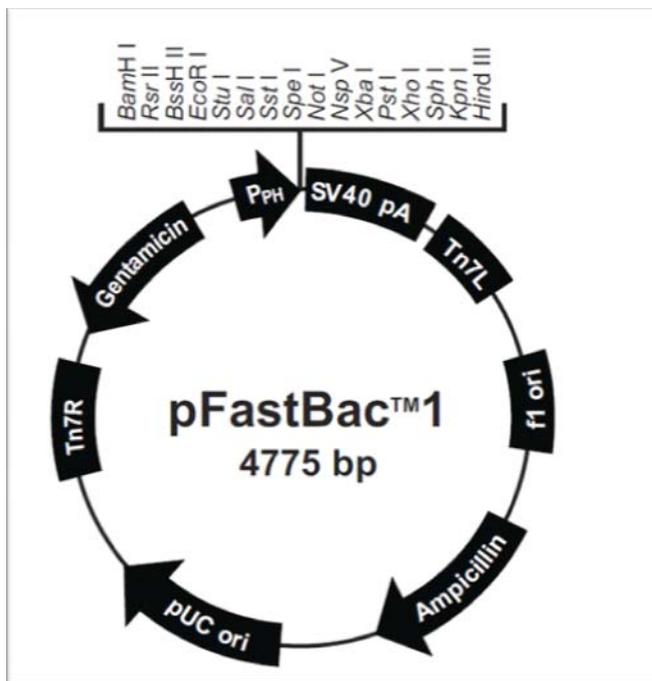


Figura 10: Esquema do vetor de transferência pFastBacTM1. Plasmídeo contendo 4.775 pares de bases com um gene de resistência a Gentamicina, regiões de transposição TN7(L e R), 2 origens de replicação (pUC ori e flori), um gene de resistência a

ampicilina, promotor da poliedrina seguido de um sítio de multiclonagem e um sinal de poliadenilação (SV 40 pA). Fonte: Manual Invitrogen

O seu gene de interesse fica sob o comando do promotor forte da poliedrina, podendo ser utilizado diversas enzimas de restrição contidas no sítio de multiclonagem para essa inserção (Je *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2003). Existem várias maneiras para a construção de baculovírus recombinante, sendo as mais utilizadas a recombinação homóloga e a transposição. A recombinação homóloga é a técnica original, com o plasmídeo de transferência contendo as regiões que flanqueiam o gene de interesse que se pretende introduzir no genoma viral, o promotor e um sítio de clonagem é co-transfectado na célula de inseto em conjunto com o DNA do vírus parenteral. Durante o processo de recombinação homóloga, o gene original do vírus é substituído pelo gene de interesse contido no plasmídeo recombinante (Miller *et al.*, 1983; Castro *et al.*, 1999).

A transposição se dá através de um sistema criado pela Invitrogen chamado Bac-to-bac. Os plasmídeos são transformados em bactérias da linhagem DH10Bac quimiocompetentes. Esta bactéria apresenta dois plasmídeos importantes para o processo de obtenção do baculovírus recombinante. O primeiro é um plasmídeo gigante denominado bacmídeo (bac, do inglês ‘bacterial artificial chromosome’) que contém o genoma do baculovírus AcMNPV modificado portando uma origem de replicação, uma marca de seleção para canamicina e o peptídeo lacZ- α com a sequência alvo de transposição do transposon bacteriano Tn7. O segundo plasmídeo, o ‘Helper’ expressa constitutivamente uma transposase que fornecerá a atividade de transposição ao sistema. Durante a transformação em DH10Bac, os vetores de transferência pFastBac modificados que apresentam marcas do transposon Tn7 (Tn7R e L) serão substratos para ação transposase. Parte do plasmídeo é transposta para dentro do bacmídeo, interrompendo o peptídeo lacZ- α e evitando a α -complementação da enzima β -

galactosidase. A ausência de complementação impossibilita a atividade da enzima, fazendo com que mesmo na presença de indutor (IPTG) e substrato cromogênico (X-gal) a colônia bacteriana fique branca. Caso não haja transposição a colônia fica azul. Depois de uma lise alcalina em pequena escala, para obtenção do DNA, é realizada uma reação de PCR para confirmação da transposição. O DNA do clone confirmado é utilizado na transfecção de células de inseto e geração dos vírus recombinantes (Figura 11) (Kost *et al.*, 2005).

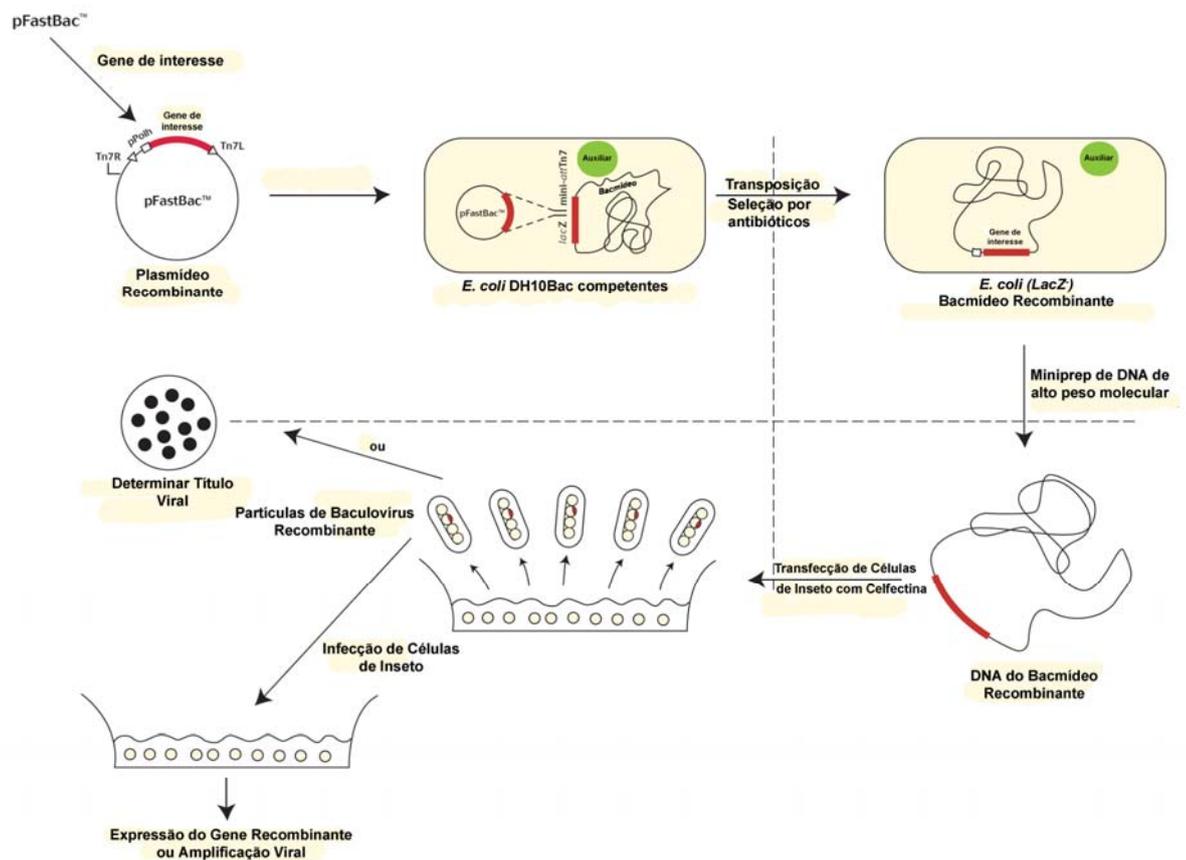


Figura 11: Esquema mostrando o sistema Bac-to-Bac da Invitrogen. O gene de interesse clonado no vetor de transferência é transformado em células de *E. coli* (DH10Bac, Invitrogen) que possui o genoma do vírus AcMNPV na forma de um grande plasmídeo (denominado de bacmideo). O gene de interesse está flanqueado por regiões de transposição do transposon TN7 (regiões TN7L e TN7R). O bacmideo possui o sítio alvo de inserção do transposon TN7, onde será inserido o gene de interesse sob o

comando do promotor da poliedrina e o gene do antibiótico gentamicina. Essa transposição é feita com a ajuda de um outro plasmídeo ('helper'), presente nas células DH10Bac que codifica para a enzima transposase. A transposição é confirmada através da seleção por antibióticos e a α complementação da β galactosidade (ver texto). Depois de uma lise alcalina em pequena escala (miniprep) para obtenção do DNA, é realizado a transfecção de células de inseto com a ajuda de lipossomos (membranas artificiais), onde o DNA do baculovírus por si só infecta as células de inseto. O sobrenadante da transfecção contendo os vírus no fenótipo BV é utilizado para amplificação viral através da infecção de células de inseto ou para determinação do título viral. Fonte: Manual Bac-to-bac.

De posse dos vírus recombinantes, novas placas de células podem ser infectadas ou lagartas susceptíveis a infecção podem ser usadas para produção da proteína recombinante. Um exemplo de insetos utilizados são larvas de *Spodoptera frugiperda*. As larvas são infectadas *per os* ou por injeção do sobrenadante da placa de células infectadas com o vírus recombinante. A melhor fase larval para a infecção por injeção nos insetos é o 5º íntar, gerando uma boa concentração da proteína alvo (Figura 13).

A expressão de proteínas heterólogas utilizando o sistema de expressão em baculovírus é amplamente utilizado hoje no mundo. Várias proteínas já foram expressadas e demonstraram a grande utilidade desse sistema. Centenas de proteínas de interesse na medicina, como proteínas estruturais e não estruturais de diferentes vírus e as proteínas recombinantes expressas se mostraram biologicamente similares às proteínas autênticas.

A expressão do HBsAg utilizando o sistema baculoviral já foi utilizado para diversas finalidades. Delaney & Isom (1998) utilizaram o sistema de expressão em baculovírus para produzir um novo sistema de análise da expressão e replicação do HBV em células

HepG2. Para isso, um pedaço do genoma do HBV foi inserido em um vetor de transferência utilizado para geração dos vírus recombinantes. Células HepG2 foram transduzidas por esse Baculovírus recombinante, e o genoma do HBV replicado. Kang *et al.* (1987) sintetizou uma parte do antígeno HBsAg em células de inseto utilizando o sistema de expressão em baculovírus. O antígeno produzido foi expresso em grandes quantidades e secretado na forma de uma partícula de 22nm, que contém predominantemente uma proteína de 22.000 Da exibindo uma morfologia e atigenicidade muito parecida com as partículas de 22 nm isoladas do soro ou plasma de pacientes com Hepatite crônica ativa.

2. Justificativa

Nas últimas décadas, o uso de baculovírus como vetor de expressão de genes heterólogos começou a ser usado de forma extensiva pela comunidade biomédica. Assim, diversas proteínas de importância médica e econômica foram expressas em níveis elevados utilizando-se esse sistema (Miller, 1997).

A produção do antígeno de superfície HBsAg fusionada à proteína poliedrina poderia se revelar um modelo muito interessante, tanto para se conhecer melhor esse sistema, quanto para a futura produção estável e purificação em larga escala de antígenos para fins biomédicos. A fácil produção e isolamento de poliedros recombinantes, que expressam boas quantidades de proteínas de interesse, a natureza estável dos poliedros, sugerem que essa abordagem poderá ser uma ferramenta alternativa para vacinação de vertebrados e uso em diagnóstico (Olszewski *et al.*, 2005).

No Brasil, não existe um indústria farmacêutica privada, que produza o antígeno HBsAg para fins vacinais e/ou diagnóstico. Apenas a Fiocruz e o Instituto Butantan produzem a vacina para Hepatite B. O setor de kits de diagnóstico no país apresenta uma forte dependência tecnológica, pois a maioria dos insumos, reagentes e

equipamentos para diagnóstico são importados. Os ministérios da ciência e tecnologia, saúde e FINEP vem incentivando o desenvolvimento tecnológico e inovação para produtos terapêuticos e para diagnóstico de várias doenças e entre esses produtos, insumos para o diagnóstico da hepatite B é uma prioridade (Ação transversal-Cooperação ICTs Empresas: Inovação em produtos terapêuticos e diagnósticos, Carta-conviteMCT/MS/FINEP,

(<http://www.bio.fiocruz.br/simposio/pdf/Moises%20Goldbaun.pdf>). Desta forma, a expressão do antígeno HBsAg em células de inseto e insetos proposto por este projeto poderá ajudar a reduzir o custo de produção de kits diagnósticos para a Hepatite B, e uma alternativa para produção de antígeno vacinal.

3. Objetivos do trabalho

Construir um baculovírus recombinante contendo o gene da porção 'Small S' do antígeno HBsAg de HBV fusionado ao gene da poliedrina do baculovírus AcMNPV e analisar a expressão da proteína recombinante em células de inseto infectadas. Além disso, testar o antígeno produzido em testes diagnósticos comumente utilizados nos laboratórios de análises clínicas, que consistem nos testes imunoenzimáticos (ELISA).

4. Materiais e Métodos

4.1 Vírus e Células

Os vírus *Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) e baculovírus derivados de bacmídeo bMON14272 (Bac-to-Bac "Baculovirus Expression System", Invitrogen) foram utilizados nesse trabalho como controle.

Os vírus foram propagados em cultura de células *Trichoplusia ni* (BTI-Tn5B1-4 ou Tn5B) ou Células *S. Frugiperda* IPLB-Sf21-AE (Granados *et al.*, 1994). Essas

células foram mantidas em meio TC-100 (Gibco-BRL) com 10 % de soro fetal bovino a 27 °C.

4.2 Obtenção e clonagem da parte ‘small s’ do antígeno HBsAg

Duas estratégias foram propostas a fim de se obter o fragmento contendo a parte ‘small s’ antígeno HBsAg. Na primeira estratégia, foram inseridos, por meio dos primers HBsAg F BamHI/NcoI (F1) e HBsAg R NcoI (sem His) (R1) sítios para as enzimas de restrição *NcoI* e *BamHI* na extremidade 5’ do gene e na extremidade 3’, sítios apenas para *NcoI*, de modo a promover a fusão na porção carboxi-terminal da poliedrina modifica (Tabela 2). Na segunda estratégia, o códon de terminação do gene foi excluído por meio do iniciador reverso (HBsAg R NcoI com His – R2, Tabela 2), além de conter sítios para *BamHI* na extremidade 5’ e para *NcoI* em ambas as extremidades, a fim de promover a fusão na porção amino-terminal da poliedrina modificada. Cada uma das reações cotinha 10 ng do DNA molde pHep (gentilmente cedido pelo Dr. João Renato Pinho do Instituto Adolfo Lutz), 1X do tampão da enzima, 1 U da enzima GoTaq DNA polimerase (Promega), 300 µM de dNTP e 0,4 µM dos primers. A amplificação foi feita em termociclador de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1. Programa utilizado nas duas estratégias para obtenção do fragmento contendo a porção ‘small s’ do antígeno HBsAg.

	Etapa	Temperatura	Tempo
35 ciclos	Desnaturação inicial	95 °C	3 min
	Desnaturação	94 °C	15 s
	Anelamento	57 °C	20 s

Extensão	72 °C	37 s
Extensão final	72 °C	7 min
Estoque	12 °C	∞

As reações foram aplicadas em gel de agarose 0,8% contendo TBE 0,5 X (solução aquosa contendo 45 mM de Tris-borato e 1 mM de EDTA), coradas em brometo de etídio (0,5 µg/ml), analisadas em luz UV e fotografadas em transiluminador da marca Alfa Innotec. Os fragmentos observados foram cortados do gel com uma lâmina e purificados utilizando-se ‘GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit’ (GE Healthcare – este kit foi usado em todos os procedimentos para eluição de DNA citados).

Os fragmentos purificados foram clonados no vetor pGem®-T easy (Promega) de acordo com instruções do fabricante. A confirmação da clonagem foi feita por digestão enzimática usando a enzima *NcoI* (FastDigest®, Fermentas), conforme instruções do fabricante. Além disso, os plasmídeos obtidos foram seqüenciados (Macrogen Inc., Coreia do Sul) usando primers T7 e SP6 que se anelam em regiões presentes no plasmídeo comercial usado.

Tabela 2: Sequência de Primers utilizados para todas as construções

Primer	Sequência 5' - 3'	Localização/finalidad
HBsAg F BAMHI NCOI	GGGGATCCTGTGACGACCATGGAG	Posição 2 no gene sSHBsAg/aplicação do gene sSHBsAg com inclusão dos sítios de BAMHI e NCOI.

(F1)		
HBsAg R	CCATGGAGTTTAGGGAATAACCCC	Posição 740 do gene
NCOI		sSHBsAg/amplificação
Sem HIS		do gene sSHBsAg e
(R1)		inclusão do sítio de NCOI
HBsAg R		
NCOI	CCATGGAAATGTATACCCAGAGACAAA AG	Posição 698 do gene
com HIS		sSHBsAg/amplificação e retirada do sítio de
(R2)		terminação TAA
PpolAcA	GAAGACAGCTTCCCCATTGTAAACGA	Posição 310 do gene
g 310-348		da
F		poliedrina/confirmação da fusão correta com sSHBsAg
M13 R	CAGGAAACAGCTATGAC	Localizado a 145pb da região de transposição do bacmídeo (mini-att TN7)/confirmação de transposição
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenciamento do plasmídeo pGem
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	Sequenciamento do plasmídeo pGem

4.3 Clonagem da porção ‘small s’ do antígeno HBsAg na porção 5’ e 3’ da poliedrina

Dois plasmídeos doadores, previamente construídos, foram usados para clonagem da porção ‘small s’ do antígeno HBsAg. Ambos os plasmídeos foram derivados do vetor comercial pFastBac1® (Invitrogen) e permitem fusão de genes de interesse à porção carboxi e amino-terminal da poliedrina do AcMNPV. O plasmídeo pFastAcPH3 (Costa, 2008) apresenta o gene da poliedrina com o códon de terminação natural deletado, um sítio de restrição para *NcoI* e uma cauda de hexa-histidina em fase, ambos na porção carboxi-terminal da proteína (Figura 12A). O plasmídeo pFastBac1-6xHis-AcPH (Araujo, 2010) contém o gene da poliedrina com as mesmas modificações do plasmídeo anterior, entretanto presentes agora na porção amino-terminal da proteína (Figura 12B).



Figura 12: Esquema das duas regiões usadas para fusão da porção ‘small s’ do antígeno HBsAg à poliedrina. (A) Região de interesse do plasmídeo de fusão pFastBac1-6xHis-AcPH, mostrando o códon de início de tradução (ATG), a cauda de hexa histidina (6xHis – seta azul-claro), o sítio de restrição usado para clonagem do antígeno HBsAg, o gene da poliedrina (seta rosa) e o códon de parada de tradução (TAA). (B) Região de interesse do plasmídeo de fusão pFastAcPH3, mostrando códon de início da tradução, o gene da poliedrina sem o códon de parada de tradução, o sítio

para clonagem do antígeno, a cauda de hexa-histidina e o códon de terminação de tradução.

Os plasmídeos contendo as duas diferentes estratégias do antígeno HBsAg foram digeridos com *NcoI*, aplicados em gel de agarose a 0,8% e as bandas liberadas foram purificadas e utilizadas para clonagem nos plasmídeos doadores pFastAcPH3 e pFastBac1-6xHis-AcPH. Para confirmação da clonagem dos plasmídeos recombinantes obtidos, foi feita uma PCR para a estratégia carboxi-terminal (10 ng do plasmídeo recombinante, 1X do tampão da enzima, 1 U da enzima Taq DNA polimerase (Phoentria), 300 μ M de dNTP e 0,4 μ M dos primers pPolAcAg 310/348 F e R1 (Tabela 2) – programa semelhante ao da tabela 1, mudando apenas o tempo de extensão para 1 min). Posteriormente, ambos os plasmídeos foram seqüenciados (Macrogen Inc., Coreia do Sul) usando os primers pFastBac F e pFastBac R fornecidos pela empresa de seqüenciamento.

4.4 Obtenção do baculovírus recombinante para expressão da porção ‘small s’ do antígeno HBsAg fusionada à poliedrina

Os plasmídeos de fusão gerados contendo a porção ‘small s’ do antígeno HBsAg, contendo o gene quimera, foram utilizados para construção de baculovírus recombinantes via sistema Bac-to-bac (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Os plasmídeos foram transformados em bactérias da linhagem DH10Bac quimiocompetentes. Durante a transformação em DH10Bac, os vetores de transferência pFastBac modificados que apresentavam marcas do transposon Tn7 (Tn7R e L) foram substratos para ação transposase. Parte do plasmídeo foi transposta para dentro do bacmídeo, interrompendo o peptídeo lacZ- α e evitando a α -complementação da enzima β -galactosidase.

Colônias brancas foram selecionadas, incubadas em meio LB líquido (canamicina 50µg/ml e gentamicina 7 µg/ml). Para confirmar a transposição do plasmídeo contendo a proteína de interesse fusionada à porção carboxi-terminal da poliedrina, foram utilizados os primers M13 F e R1, a fim de gerar uma banda de aproximadamente 3.200 pb.

4.5 Produção *in vitro* da proteína quimera sSHBsAg

Um µg do DNA plasmidial dos bacmídeos recombinantes gerados, foram utilizado para transfectar 10^6 células de inseto BTI-TN5B1-4. Para isso 250µL de meio de cultura TC-100 sem soro foi adicionado ao DNA plasmidial de cada bacmídeo em duas placas de 35mm, a mesma concentração de meio sem soro foi misturado a 10µL de lipossomos (membranas artificiais utilizadas para incorporar material genético e em contato com a membrana das células se fundir a elas liberando o material genético dentro da célula alvo). A mistura contendo os lipossomos e a mistura contendo o DNA de cada bacmídeo foram misturados e incubados por 30 min à temperatura ambiente. O meio de cultura de duas placas de células BTI-TN5B-4 foi retirado e acrescentado após incubação o meio contendo a mistura DNA plasmidial, meio TC-100 sem soro e lipossomo. As células ficaram em contato com essa mistura por 4 h à temperatura ambiente. Um e meio mL de meio de cultura TC-100 contendo 10% de soro fetal bovino foi adicionado às células após incubação e a placa incubada a 27 °C por sete dias. As células de inseto que foram transfectadas com o DNA do baculovírus recombinante são capazes de produzir vírus, pois, o DNA é infectivo. Em uma nova placa de 100 mm, contendo 5×10^6 células de inseto BTI-TN5B1-4 foram adicionados 500 µL do sobrenadante da transfecção para amplificação dos vírus recombinantes vAcPH3sSHBsAg e vAcHISsSHBsAgAcPH. A purificação do DNA viral se deu como descrito por O'Reilly *et al.* (1992), sendo que a metodologia utilizada foi a purificação

de DNA de BV em pequena escala. O DNA extraído foi utilizado para confirmação através de uma reação de PCR (10 ng do DNA extraído dos dois vírus recombinantes, 1X do tampão da enzima, 1 U da enzima Taq DNA polimerase (Phoneutria), 300 μ M de dNTP e 0,4 μ M dos primers pPolAcAg 310/348 F e R1)

4.6 Análise da expressão da proteína sSHBsAg produzida nas células de inseto

O sobrenadante de células BTI-TN5B4-1 (96 h p.i.) infectadas com o vírus recombinante vAchISsSHBsAgPH foi injetado em larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) quinto instar, no segundo par de falsas patas através de uma agulha e seringa de 1mL (Figura 13). As larvas foram separadas individualmente para que não houvesse canibalismo e alimentadas com dieta artificial preparada segundo Hoffmann Campo *et al.* (1985). Por volta de 5 dias, as larvas já apresentavam estágio avançado de infecção com perda do apetite, clareamento da epiderme devido ao acúmulo de vírus nos núcleos das células epidermais e adiposas, parada no desenvolvimento larval e letargia (Federici, 1997). No sexto dia pós-infecção, as larvas estavam mortas ou em processo de morte. Após a morte das larvas, procedeu-se a purificação dos corpos de oclusão segundo Maruniak (1986), com a maceração das larvas em tampão de homogenização (ácido ascórbico 1%, SDS 2%, Tris 0,01 M pH8.0, EDTA 0,001 M), e o macerado filtrado com quatro camadas de gaze para posterior centrifugação a 14.000 r.p.m. a 4°C por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 20 mL de TE, para em seguida 4 mL ser usado para aplicação sobre gradiente de sacarose variando de 1,17 g/mL a 1,30 g/mL e centrifugados a 26.500 r.p.m. em uma ultracentrífuga Beckman L-70 (rotor SW28) a 4°C por 75 min. Uma banda contendo as proteínas quimeras foi coletada após centrifugação com a ajuda de uma pipeta Paster, foi diluída quatro vezes em TE, centrifugada a 14.000 r.p.m. na mesma ultracentrífuga citada anteriormente a 4°C por 15 min. O pellet gerado pela

centrifugação foi ressuspendido em água milli-Q e estocado á -20°C para posterior análise.



Figura 13: Larva de *Spodoptera frugiperda* no quinto íntar, tamanho ideal para infecção por injeção dos vírus recombinantes. Fonte: <http://www.dowagro.com/br/lorsban/pragas/lagartacartuchom.htm>

4.7 Análise da expressão da proteína sSHBsAg produzida nas células de inseto

Células BTI-TN5B4-1 foram infectadas com os vírus vAcOCC+, vAc-6x-HIS-sSHBsAg-ACPH, e a 96 h.p.i., foram coletadas das placas e lavadas três vezes com PBS (as células infectadas foram coletadas e centrifugadas a 5.000 r.p.m. por 5 min, o pellet foi ressuspendido em 1mL de PBS). O pellet foi ressuspendido em 100 µL de PBS e estocados a -20°C. O extrato das células infectadas lavadas foram analisadas em SDS-PGE 12 % (Laemmli, 1970) através do aparato para gel de poliacrilamida da Bio-Rad de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. O gel foi corado com o corante azul de comassie e fixado em solução de 40% de metanol e 10% de ácido acético por 4 h sob leve agitação.

4.8 Imunoensaio

Uma placa de 6 poços contendo células BT-TN5B1-4 foram infectadas com os seguintes vírus: AcMNPV, vAc-6x-HIS-sSHBsAg-AcPH e vAc-6x-HIS-AcPH. Um poço da placa não foi infectado e as células utilizadas como controle (Mock). Noventa e seis h.p.i., as células foram ressuspendidas da placa e lavadas com PBS e solubilizadas com carbonato de sódio 1M e Tris HCL 1M pH7,6, segundo protocolo de O'Reilly *et*

al. (1992). As proteínas presentes na amostra de células foram quantificadas utilizando o quantificador Nanodrop 3300 (Thermo Scientific) seguindo as instruções do fabricante e 300ng, 400ng e 500ng foram utilizadas no imunoensaio manual (método imunoenzimático para a determinação qualitativa de HBsAg. É um teste direto do tipo *sanduíche*, baseado na técnica de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay. A presença de HBsAg no soro ou plasma do paciente se liga ao anticorpo monoclonal de rato que está no fundo da placa de ELISA. Um conjugado enzimático (Anti HBs produzido em carneiro conjugado com peroxidase) é adicionado ao poço da placa de ELISA e se liga no antígeno formando um complexo anticorpo-antígeno-anticorpo conjugado. A atividade enzimática é medida pela adição de uma solução incolor de cromógeno/substrato. A ação da enzima no cromógeno/substrato produz uma coloração que é medida por um fotômetro).

Cada um dos 3 vírus recombinante citados acima foram utilizados para infectar um grupo de 200 lagartas cada. A infecção se deu como citado anteriormente no item 4.5. após processamento das lagartas e purificação em gradiente de sacarose os corpos de oclusão foram solubilizados segundo O'Reilly *et al.* (1992) e quantificados em aparelho quantificador Nanodrop 3300. As mesmas quantidades utilizadas nas células foram utilizadas dos corpos de oclusão para imunoensaio manual.

O imunoensaio foi realizado no Laboratório central do Distrito Federal (LACEN-DF) departamento de Virologia com o apoio do Diretor senhor João Suender Moreira, da Bióloga Larissa Costa Souza e da Farmacêutica Grasiela Araujo da Silva. O teste utilizado foi teste manual Anti HBsAg da Diasorin. As amostras foram testadas em triplicata seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

5. Resultados

5.1 Construção do vetor de clonagem pGem sSHBsAg com TAA

O fragmento contendo a região codante da proteína small S do antígeno HBSAg (Figura 14) foi amplificada por PCR, a partir do DNA do plasmídeo pHep, utilizando os pares de primers F1 e R1 (sequências sublinhadas na figura14) Esse fragmento foi ligado no vetor de clonagem pGem®-T easy gerando o pGemsSHBsAg(TAA) com 3.761 pb (Figura 15). O plasmídeo recombinante foi obtido e sua sua sequência confirmada.

```

                                     BamHI
                                     GGGGATCCTGTGACGACC
1                                     tggggatcctgtgacgacc
   NcoI
   ATGGAG
20 atggagaacatcacatcaggattcctaggaccctgctcgtgta
   M E N I T S G F L G P L L V L
65 caggcggggtttttcttggtgacaagaatcctcacaataaccgag
   Q A G F F L L T R I L T I P Q
110 agtctagactcgtgggtggacttctctcaattttctaggggatca
   S L D S W W T S L N F L G G S
155 cccgtgtgtcttggccaaaattcgcagtccccaacctccaatcac
   P V C L G Q N S Q S P T S N H
200 tcaccaacctcctgtcctccaatttgcctgggttatcgctggatg
   S P T S C P P I C P G Y R W M
245 tgtctgcggcggttttatcatattcctcttcatcctgctgctatgc
   C L R R F I I F L F I L L L C
290 ctcatcttcttatttggttcttctggattatcaaggtatggtgcc
   L I F L L V L L D Y Q G M L P
335 gtttgcctcctaattccaggatcaacaacaaccagtacgggacca
   V C P L I P G S T T T S T G P
380 tgcaaaacctgcacgactcctgctcaaggcaactctaagtttccc
   C K T C T T P A Q G N S K F P
425 tcatggtgctgtacaaaacctacggatggaaattgcacctgtatt
   S C C C T K P T D G N C T C I
470 cccatcccacgtcctgggctttcgcaaaatacctatgggagtggtg
   P I P S S W A F A K Y L W E W
515 gcctcagtcgggtttctcttggctcagtttactagtgccatttgtt
   A S V R F S W L S L L V P F V
560 cagtgggtcgtagggctttcccccaactgtttggctttcagctata
   Q W F V G L S P T V W L S A I
605 tggatgatgtggtattgggggccaagtctgtacagcatcgtgagt
```

W M M W Y W G P S L Y S I V S
 650 ccctttataccgctgttaccaatTTTTTGTCTCTGGGTATAC
 P F I P L L P I F F C L W V Y
 TAAAGGTACC
 695 atttaaaccctaacaaaacaaaagatggggttattccctaaact
 I * CCCCAATAAGGGATTGA
 NcoI
 740 ccatgga 746
 GGTACCT

Figura 14: Sequência do do gene sSHBsAg. O sítio de iniciação ATG está em azul, a sequência do primer F1 está destacado em vermelho e R1 nucleotídeos em amarelo. O sítio de terminação está indicado em rosa e com um asterisco abaixo da sequência de nucleotídeos A sequência de aminoácidos está indicada abaixo da sequência de nucleotídeos. A sequência destacada em verde corresponde ao primer R2. Os sítios de *NcoI* e *BamHI* estão destacados de cinza.

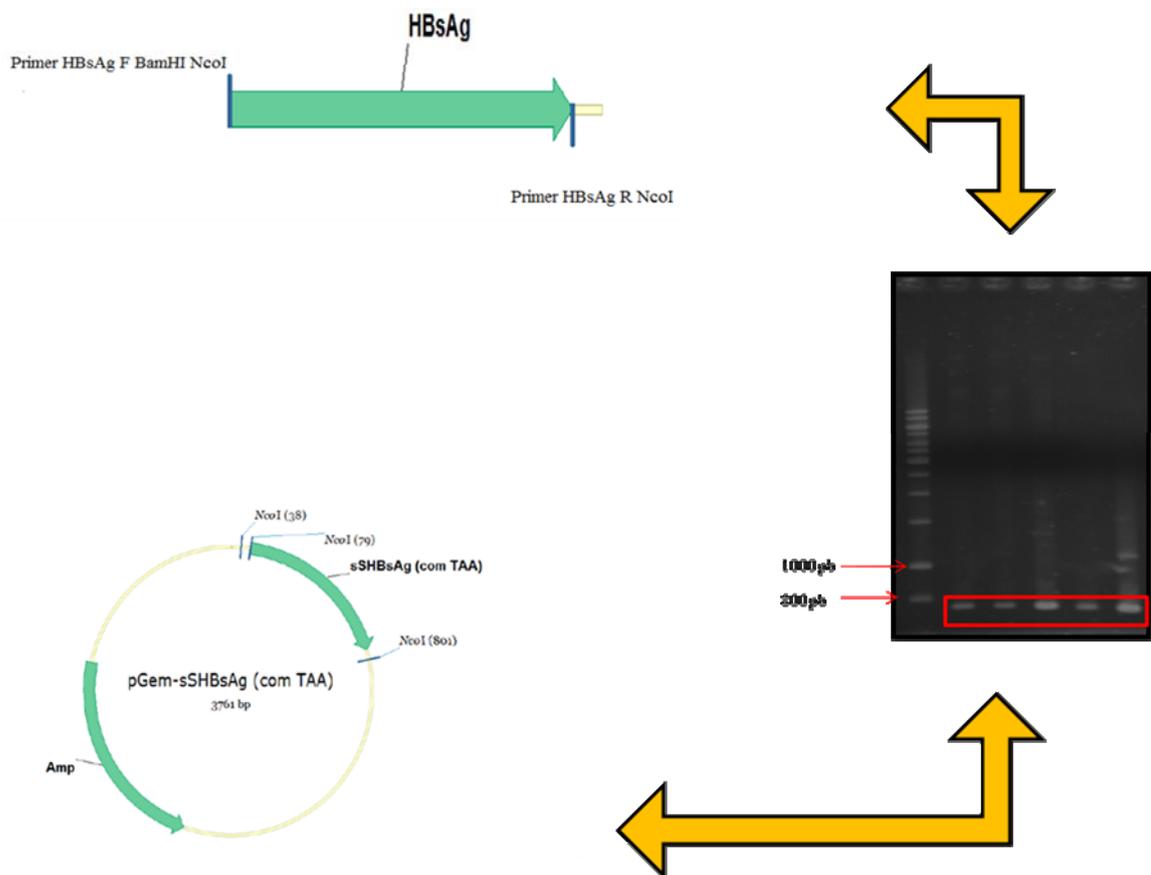


Figura 15: Esquema mostrando a sequência de produção do vetor pGem-HBsAg(TAA). Fragmento da reação de PCR com os Primers F1 e R1, gel de agarose 0,8% com o fragmento de PCR evidenciado por quadrado vermelho apresentando 746 pb e eluição e ligação do fragmento de PCR no vetor pGem®-T easy gerando o pGemsSHBsAg(TAA) com 3761 pb.

5.2 Construção do vetor de transferência pFastAcPH3sSHBsAg (carboxi terminal)

O vírus vacPH3sSHBsAg foi gerado utilizando o sistema de transposição em *E.coli* DH10 BacTM (Invitrogen). O pFastAcPH3sSHBsAg foi transformado em células DH10 BacTM e o gene de interesse foi inserido no genoma do vírus AcMNPV na forma de um grande plasmídeo (bacmídeo). A confirmação se deu por resistência a antibiótico (Canamicina e Gentamicina) e a α -complementação da enzima β -galactosidase. Após coleta das possíveis colônias transformantes, a presença do gene sSHBsAg foi confirmada por PCR utilizando os Primers: PpolAcAg 310-148 F e HBsAg R NCOI sem HIS gerando um fragmento de tamanho esperado de 1117pb (Figura 16).

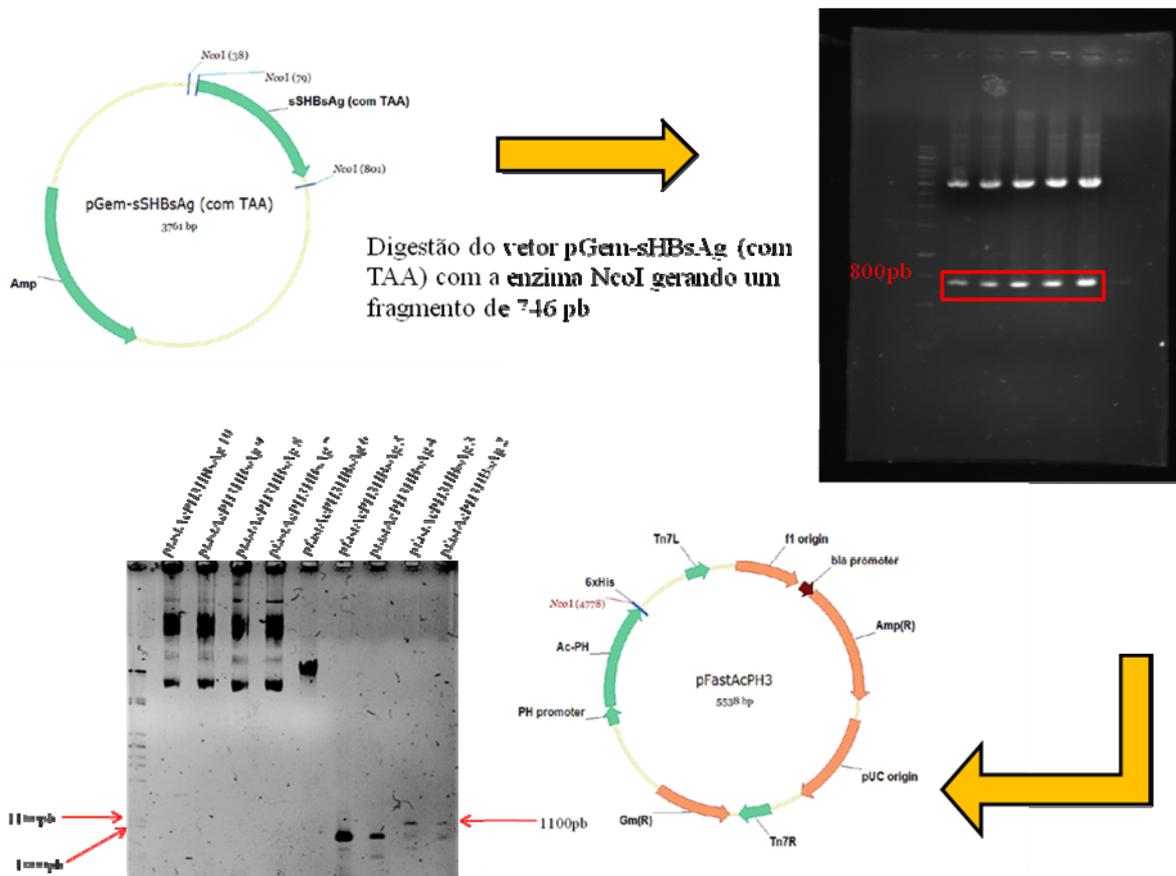


Figura 16: Esquema da construção do vetor de transferência pFastAcPH3sSHBsAg (carboxi terminal). Vetor pGemsSHBsAg(com TAA) foi digerido com a enzima *NcoI* para liberação do fragmento de 746pb que está circulado de vermelho no gel de agarose 0,8% . A banda foi eluida (ver texto) e inserida no sítio de *NcoI* do vetor pFastAcPH3 gerando o vetor pFastAcPH3sSHBsAg. Gel de agarose de 0,8% mostrando resultado da PCR utilizando os primers: PpolAcAg 310-148 F e R1 gerando um fragmento de tamanho 1.117pb.

5.3 Construção do vírus vAcPH3sSHBsAg

O vírus vacPH3sSHBsAg com TAA foi gerado utilizando o sistema de transposição em *E.coli* DH10 BacTM. Na transposição, o gene de interesse foi inserido no bacmídeo por estar flanqueado por regiões de transposição chamadas TN7L e TN7R.

A confirmação se deu por resistência aos antibióticos Gentamicina e Canamicina e a α complementação da β galactosidase. Após coleta das colônias a presença do gene sSHBsAg foi confirmada por PCR utilizando os Primers: PpolAcAg 310-148 F e HBsAg R NCOI sem HIS gerando um fragmento de tamanho esperado de 1117pb (Figura 17).

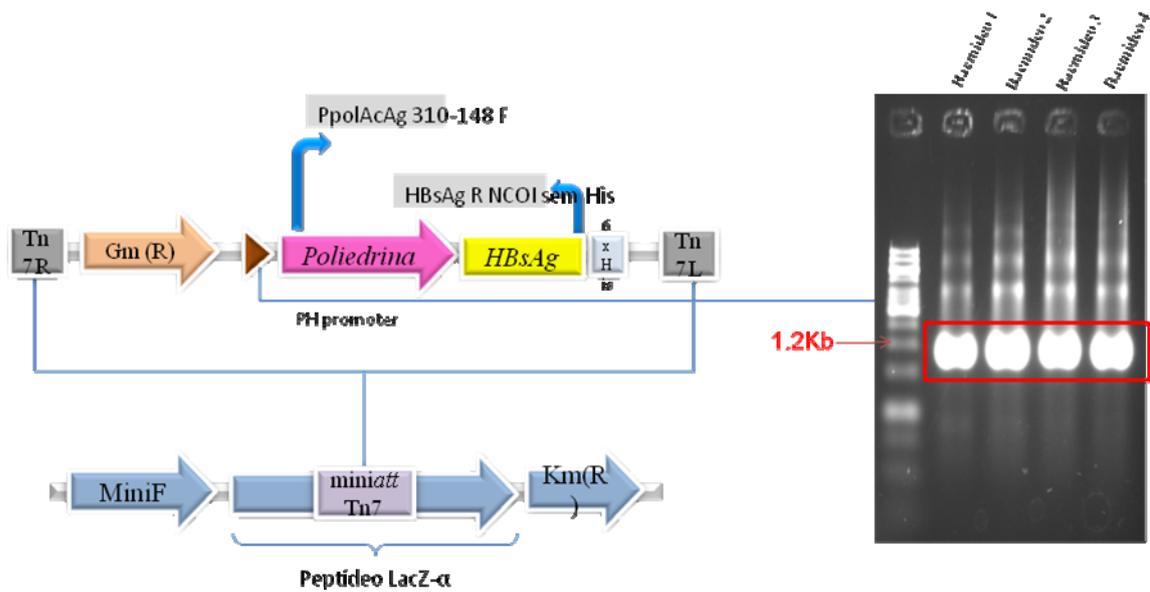


Figura 17: Esquema da construção do vírus vAcPH3sSHBsAg. O plasmídeo pFastAcPH3sSHBsAg contendo o gene HBsAg foi transformado em células DH10-Bac. Além do gene HBSAg, o cassete contém um gene de resistência a gentamicina, o promotor da poliedrina, o gene da poliedrina em fusão com o gene HBsAg e uma cauda de 6 histidinas. O cassete foi transposto para o bacmídeo interrompendo o peptídeo lacZ- α e evitando a α -complementação da enzima β -galactosidase. Após coleta das colônias a presença do gene sSHBsAg foi confirmada por PCR gerando um fragmento de tamanho de 1.117pb destacado no gel de agarose 0,8% em vermelho.

5.4 Construção do vetor de clonagem pGemsSHbsAg (sem TAA)

O fragmento gerado foi clonado no vetor pGem®-T easy a fim de gerar o recombinante pGemsSHBsAg (sem TAA). O recombinante foi sequenciado e sua sequência confirmada (Figura 18).

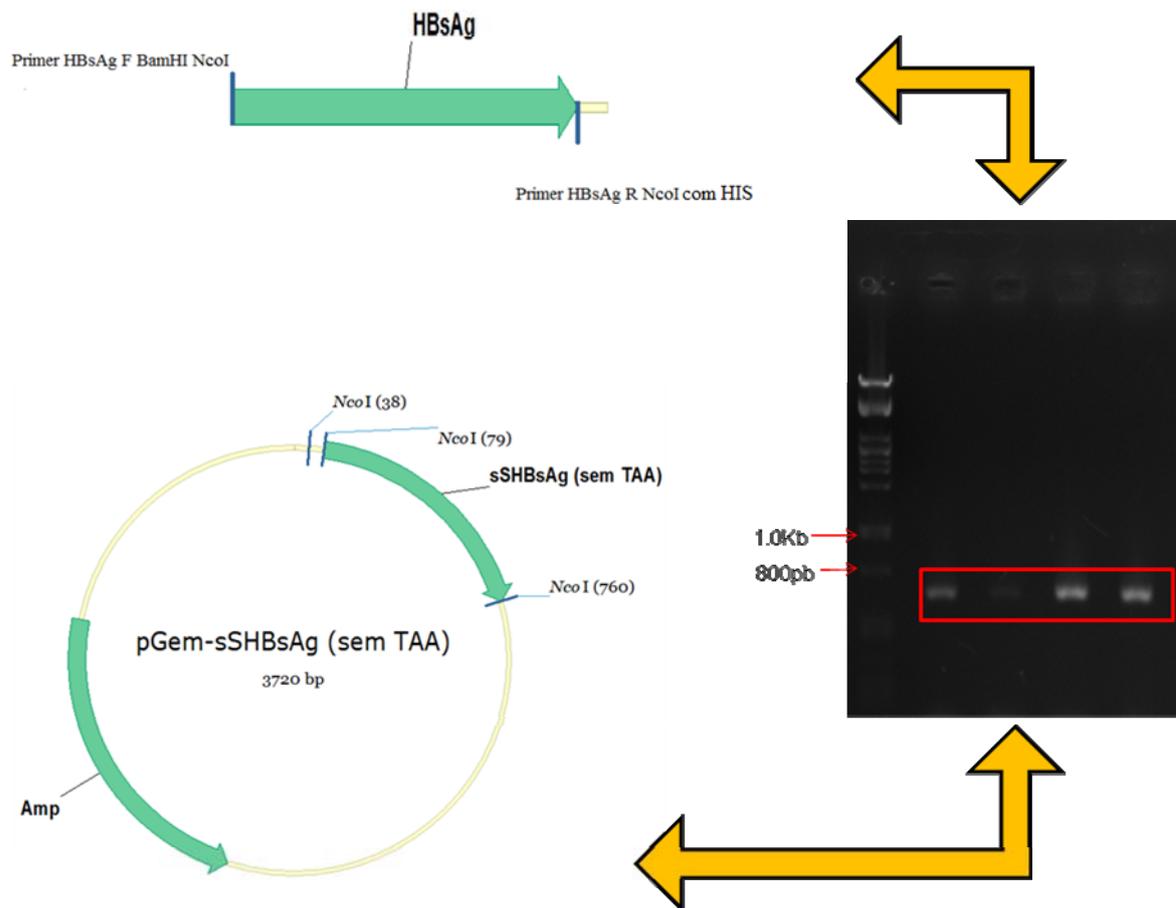


Figura 18: Esquema mostrando a sequência de produção do vetor pGem-HBsAg (sem TAA). Fragmento da reação de PCR com os primers F1 e R2, gel de agarose 0,8% com o fragmento de PCR evidenciado por quadrado vermelho apresentando 705 pb e eluição e ligação do fragmento de PCR no vetor pGem®-T easy gerando o pGemsSHBsAg(TAA) com 3.720 pb.

5.5 Construção do vetor de transferência pFB1-6xHIS- sSHBsAgAcPH

O pGemsSHBsAg (sem TAA) foi digerido com a enzima *NcoI*, liberando um fragmento de aproximadamente 700 pb que representa o gene sSHBsAg sem TAA. Após eluição dessa banda do gel de agarose 0,8%, ela foi ligada ao vetor pFB1-6xHIS-AcPH previamente digerido com *NcoI* e defosforilado dando origem ao plasmídeo pFB1-6xHIS-sSHBsAgAcPH (Figura 19), esse plasmídeo foi sequenciado e confirmado.

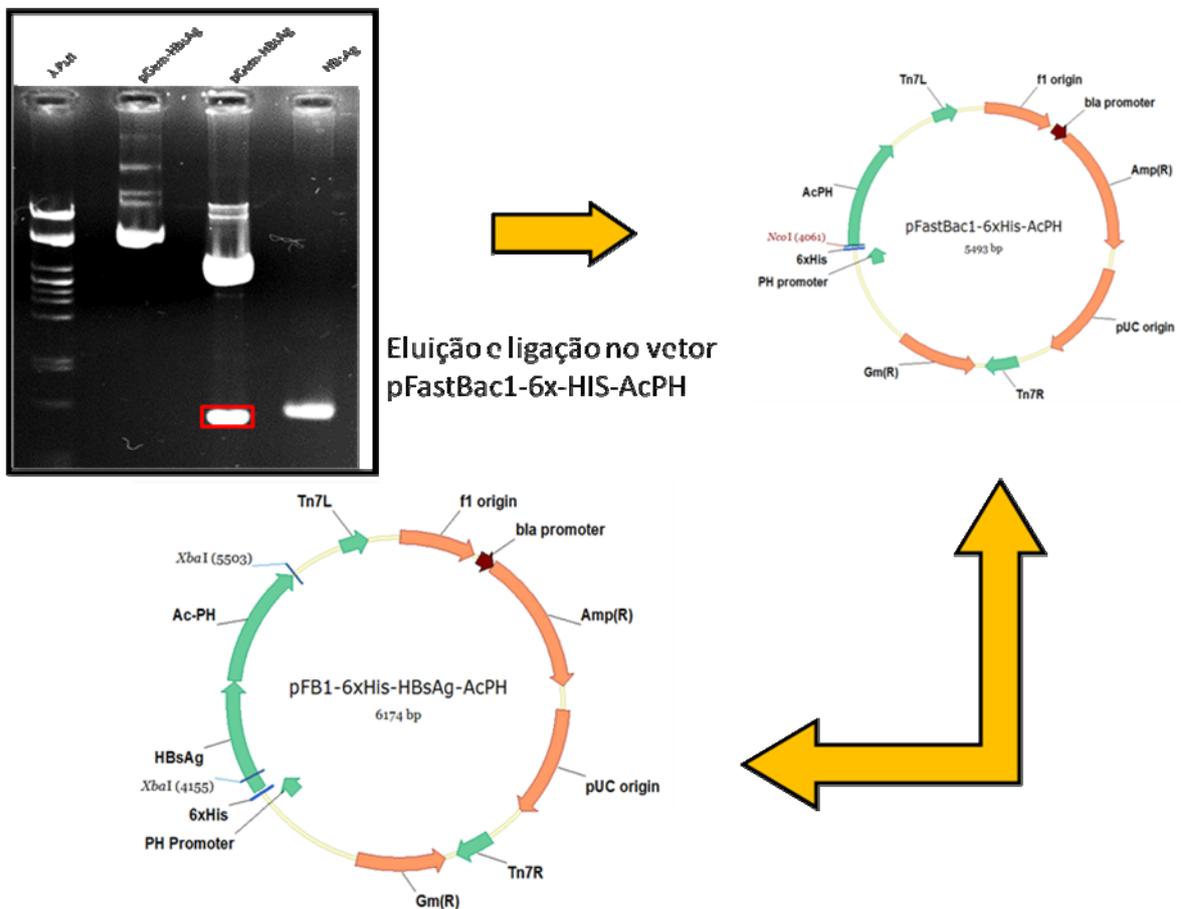


Figura 19: Esquema da construção do vetor de transferência pFB1-6xHIS-sSHBsAgAcPH. O vetor pGemsSHBsAg (sem TAA) foi digerido com a enzima *NcoI* como mostrado no gel de agarose 0,8% , liberando um fragmento de aproximadamente 700 pb que está destacado em vermelho. Após eluição dessa banda do gel de agarose

0,8%, ela foi ligada ao vetor pFB1-6xHIS-AcPH previamente digerido com *NcoI* e defosforilado dando origem ao plasmídeo pFB1-6xHIS-sSHBsAgAcPH com 6.174pb.

5.6 Construção do Vírus recombinante vAchISsSHBsAgAcPH

Após quantificação do DNA purificado por lise alcalina, o DNA foi transformado em bactéria competente DH10Bac por choque térmico. A transposição foi confirmada por resistência a antibiótico e quebra da α galactosidase. Após confirmação da transposição o sSHBSAg foi amplificado utilizando os primers M13 F e HBsAg R *NcoI* com His gerando um fragmento de tamanho esperado de 2.1 Kpb (Figura 20).

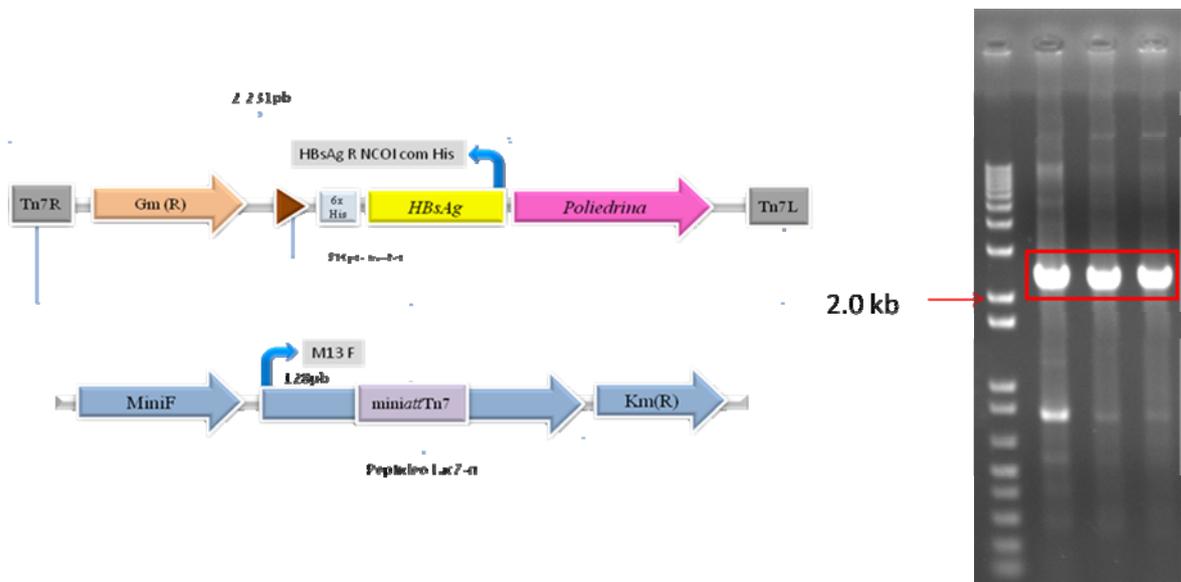


Figura 20: Esquema da construção do vírus vAchISsSHBsAgAcPH. O plasmídeo pFB1-6xHIS- sSHBsAgAcPH contendo o gene HBsAg foi transformado em células DH10-Bac. Além do gene HBSAg, o cassete contém um gene de resistência a gentamicina, o promotor da poliedrina, uma calda de 6 histidinas e o gene HBsAg em fusão com o gene da poliedrina. O cassete foi transposto para o bacmídeo interrompendo o peptídeo lacZ- α e evitando a α -complementação da enzima β -galactosidase. Após coleta das colônias, a presença do gene sSHBsAg foi confirmada por PCR gerando um fragmento de tamanho de 2.1Kb destacado no gel de agarose 0,8% em vermelho.

5.7 Infecção de células de inseto TN5B com o vírus recombinante vAcHISsSHBsAgAcPH

Uma placa de 6 poços contendo 10^6 células TN5B foi infectada com uma MOI de 10 com 3 vírus diferentes (AcMNPV, vAcHISsSHBsAg e vAcOCC-) por um período de 96 hs. Noventa e seis h p.i, as células se apresentam com o núcleo hipertrofiado, rugoso e se destacaram do fundo da placa. A presença de poliedros não foi identificada porém corpos de oclusão de morfologia disforme e em grupos foram encontrados dentro do núcleo das células (Figura 21).

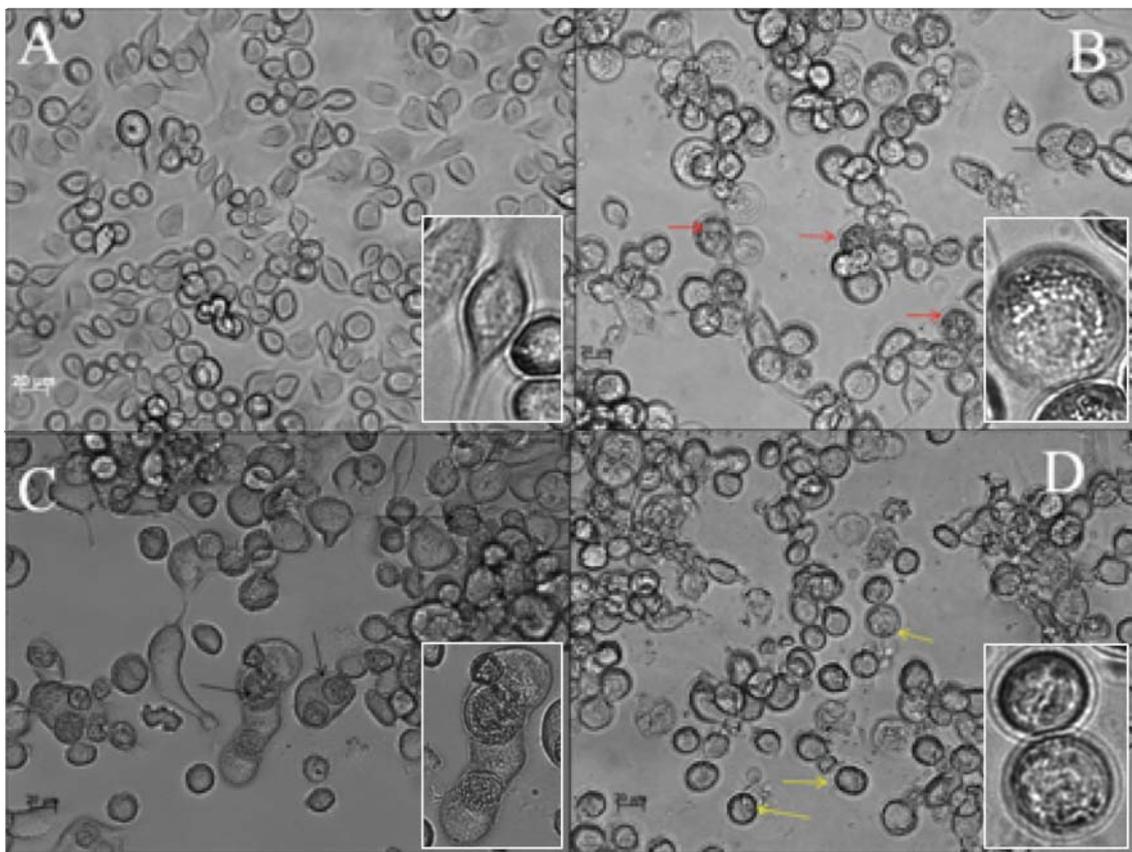
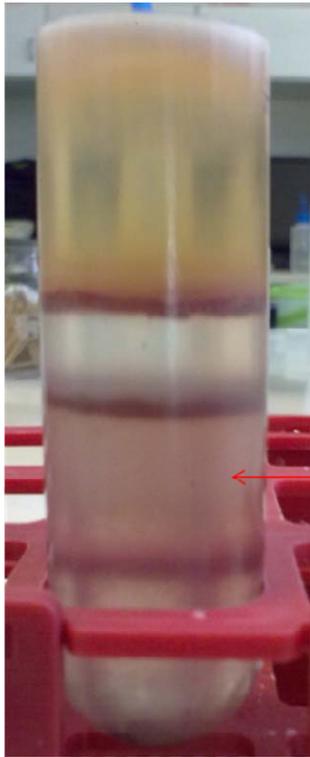


Figura 21: Análise do efeito citopático da infecção de células BTI-TN5B1-4 com diferentes baculovírus a 96h.p.i. A) Células BTN-TN5B4-1 não infectadas. B) Vírus AcMNPV. C) Vírus vAcHISsSHBsAgAcPH. D) Vírus vAcOCC-. Em A inset evidenciando características de uma célula BTN-TN5B4-1 não infectada, com

morfologia fusiforme e proporção núcleo e citoplasma normais. As setas vermelhas indicam células infectadas com efeito citopático típico da infecção por baculovírus como, alteração morfológica (perda da forma típica fusiforme), núcleo hipertrofiado e a presença no núcleo dos poliedros (características evidenciadas pela célula destacada no insets). As setas pretas indicam as células com núcleos hipertrofiados e rugosos, a presença de poliedros não foi identificada porém corpos de oclusão de morfologia disforme e em grumos são vistos dentro do núcleo das células (características evidenciadas pela célula destacada no insets). As setas amarelas indicam células infectadas com efeito citopático característico da infecção por baculovírus, porém com ausência de poliedros, visto que o vírus vAcOCC- que não contém o gene da poliedrina (características evidenciadas pela célula destacada no insets).

5.8 Infecção de lagartas *Spodoptera frugiperda* com o vírus recombinante vAcHISsSHBsAgAcPH

Lagartas de *Spodoptera frugiperda* foram infectadas no quinto instar por injeção de sobrenadante das células SF21 infectadas pelo vírus recombinante vAcHISsSHBsAgAcPH no segundo par de patas. Após 5 dias, as lagartas mortas foram coletadas e os possíveis cristais derivados da fusão da proteína poliedrina com a small S do HBV foram purificadas em gradiente de sacarose como mostrado na figura 22.



Banda contendo os corpos de oclusão

Figura 22: Purificação da proteína recombinante por centrifugação em gradiente de sacarose. Foto mostrando um tubo de centrífuga após a centrifugação de extrato de insetos infectados com o vírus recombinante vAcHISsSHBsAgAcPH seguindo as instruções do procedimento para purificação de OBs descritos em O Reilly et al. (1992). A seta indica a posição da proteína recombinante no gradiente..

5.9 Análise da expressão da proteína fusionada a poliedrina na infecção do vírus recombinante em células de insetos (SF21) por SDS-PAGE

Extrato de células infectadas (96 h p.i.) com os vírus vAcMNPV, vAcOCC+, vAcOCC- e vAc-6x-HIS-sSHBsAg-ACPH foram analisados por SDS-PAGE e foi possível a detecção de uma proteína de aproximadamente 54 kDa no extrato de célula infectada com o vírus recombinante (indicado na figura 23, marcação em vermelho) indicando a fusão da poliedrina de 29kDa com o sSHBsAg de 25kDa. No extrato de células infectadas com os vírus AcMNPV e vAcOCC+ foi observada uma banda de

aproximadamente 24 kDa correspondente a proteína poliedrina selvagem (marcação em vermelho) mostrado na Figura 23.

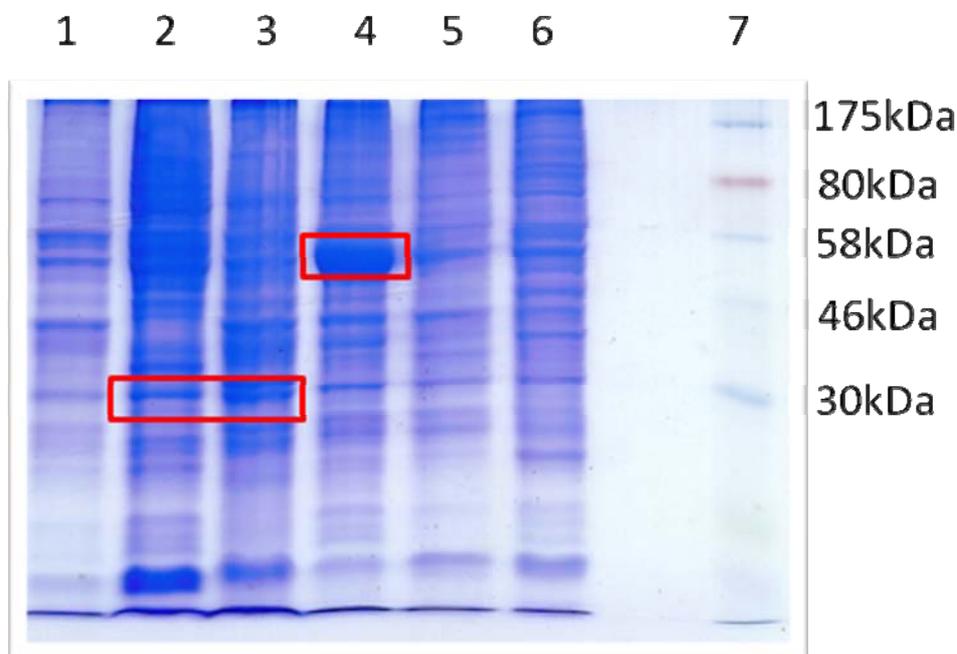


Figura 23: Análise da expressão da proteína recombinante sSHBsAg em células de inseto infectadas com o baculovírus recombinante vAc-6x-HIS-sSHBsAg-AcPH. SDS-PAGE 12 %: poço 1: extrato de células SF21 não infectadas (Mock). Poço 2: extrato de células SF21 infectadas com o vírus AcMNPV, marcação em vermelho indicando poliedrina selvagem. Poço 3: células SF21 infectadas com o vírus vAcOCC+, marcação em vermelho indicando poliedrina. Poço 4: células SF21 infectadas com o vírus vAc-6x-HIS-sSHBsAg-AcPH, marcação em vermelho indicando a proteína recombinante sSHBsAgPH com aproximadamente 54kDa. Poço 5: células SF21 infectadas com o vírus vAcOCC- (vírus não contém o gene da poliedrina). Poço 6: células SF21 mock. Poço 7: Marcador de massa molecular Color plus prestained protein marker, broad range (Biolabs)

5.10 Imunoensaio com Kit comercial automatizado e manual Anti HBsAg

Extrato de células de inseto BTI-TN5B4-1 infectadas (MOI de 10) com os vírus AcMNPV, vAc-6x-HIS-AcPH e vAc-6x-HISsSHBsAg-AcPH, células BTI-TN5B4-1 não infectadas (mock) (Figura 24) e corpos de oclusão produzidos nas lagartas

Spodoptera frugiperda infectadas com os vírus AcMNPV, vAc-6x-HIS-AcPH e vAc-6x-HISsSHBsAg-AcPH (Figura 25) foram testadas com o Kit Laboratorial Anti HBsAg da empresa Diasorin em 3 concentrações diferentes, 300ng, 400ng e 500ng. Todas as 3 concentrações testadas com os extratos de células infectadas com o vírus recombinante vAc-6x-HIS-sSHBsAg-AcPH e corpos de oclusão produzidos pela infecção das lagartas com o mesmo vírus recombinante obtiveram positividade significativa no teste, sendo que os corpos de oclusão na concentração de 500ng apresentaram um valor de absorbância acima do limite detectável semelhante ao encontrado em soro de pacientes com HBV aguda (Figura 26). Os controles Negativo e Positivo do teste consistem respectivamente, soro/plasma humano não reativo para HBsAg com conservantes e soro/plasma humano contendo HBsAg (subtipos *ad* e *ay*) inativado pelo calor, na concentração de 0,5-3,0 U/mL e conservantes.

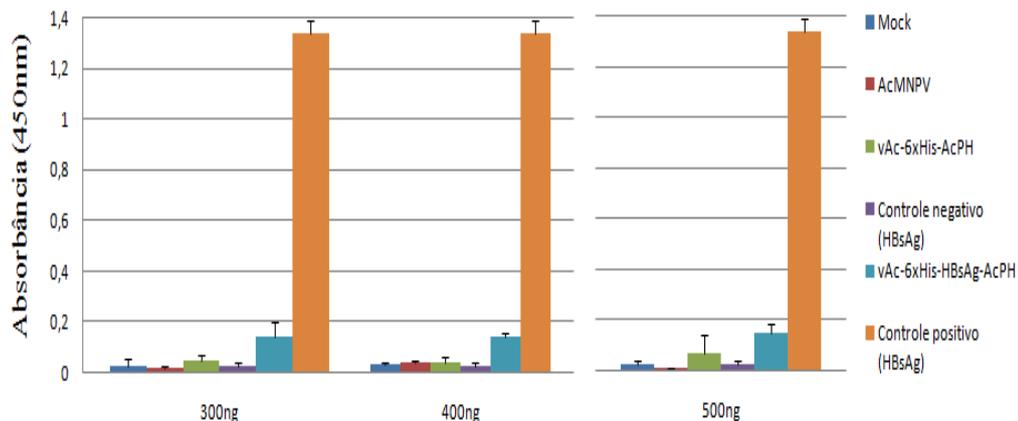


Figura 24: Imunoensaio (ELISA) para detecção de anticorpos anti-HBsAg em soro de pacientes infectados pelo HBV. O gráfico mostra o resultado da absorbância (450nm) do imunoensaio contendo o extrato de células solubilizadas infectadas com os vírus AcMNPV, vAc-6x-HIS-AcPH e vAc-6x-HISsSHBsAg-AcPH, células mock, controles positivo e negativo (controles para HBsAg presentes no Kit)

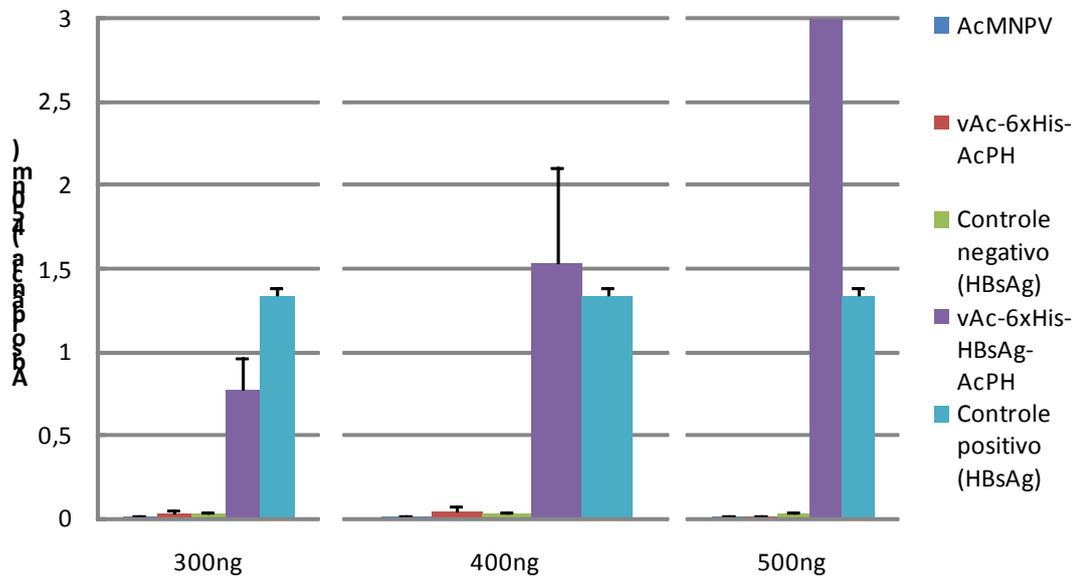


Figura 25: Imunoensaio (ELISA) para detecção de anticorpos anti-HBsAg em soro de pacientes infectados pelo HBV. O gráfico mostra o resultado da absorvância (450nm) do imunoensaio contendo os corpos de oclusão solubilizados dos vírus AcMNPV, vAc-6x-HIS-AcPH e vAc-6x-HISsSHBsAg-AcPH e controles positivo e negativo (controles HBsAg presente no Kit diagnóstico).

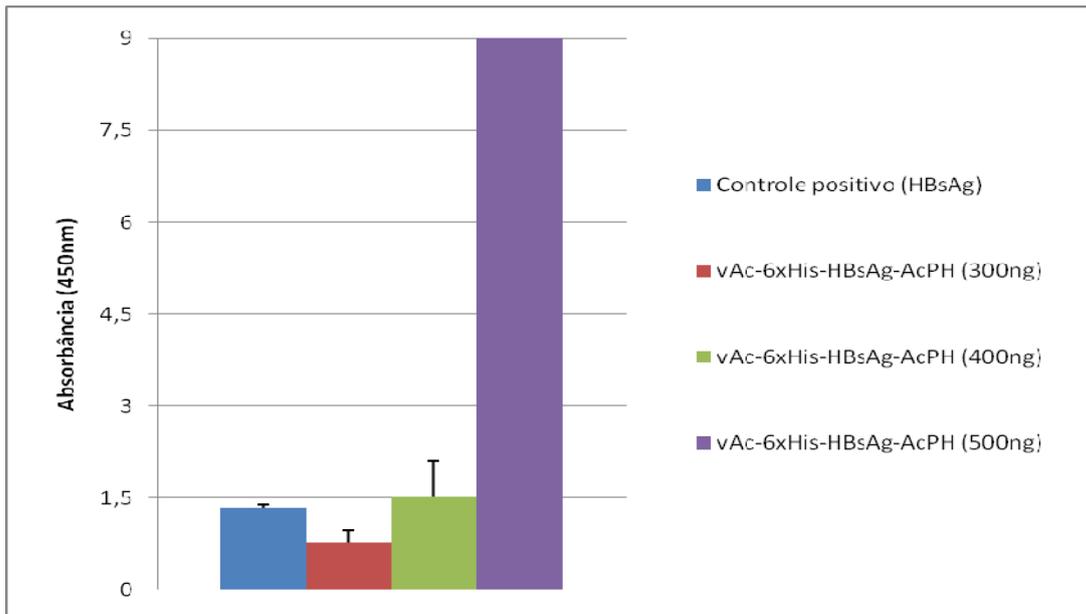


Figura 26: Resultados do ELISA nas 3 concentrações (300, 400 e 500ng) dos corpos de oclusão purificados de lagartas *Spodoptera frugiperda* infectadas com o vírus recombinante vAc-6x-HISsSHBsAg-AcPH. Na concentração de 500ng não foi possível a detecção, pois, ultrapassou o valor máximo de absorbância do teste.

6. Discussão e Conclusão

Foram construídos neste trabalho dois Baculovírus recombinantes: o vAcPH3sSHBsAg, que apresenta o gene sSHBsAg fusionado na porção Carboxi terminal do gene da poliedrina do AcMNPV e o vAc-6x-His-AcsSHBsAgPH, que apresenta o gene sSHBsAg fusionado ao gene da poliedrina do AcMNPV na porção amino terminal.

Durante a construção do baculovírus recombinante vAcPH3sSHBsAg foi constatado por sequenciamento, que o vetor de transferência pFastPH3sSHBsAg estava com o gene de interesse na posição invertida, mesmo reações de PCR confirmando o tamanho adequado do plasmídeo. Durante o ano de 2010 Ji e colaboradores, mostraram em seu trabalho que a região Carboxi-terminal da poliedrina é essencial para a formação dos corpos de oclusão (poliedro). Essa região deve ser evitada para fusão com genes

heterólogos, pois, pode prejudicar a montagem da massa proteica contendo a poliedrina e o gene de interesse fusionados gerando um vírus recombinante que não vai conseguir produzir corpos de oclusão. De posse dessa informação, essa construção foi abandonada e um novo vetor onde a fusão do gene heterólogo se dá na porção amino-terminal foi construído. A partir desse momento, o gene sSHBsAg foi preparado para fusão no novo vetor obtendo sucesso na construção e produção dos corpos de oclusão. Não houve produção de poliedros como ocorre na infecção com o baculovírus selvagem, houve produção de corpos de oclusão disformes e rugosos encontrados no núcleo das células infectadas. Esse formato dos corpos de oclusão também foi observado nos resultados de trabalhos realizados com esse novo vetor no laboratório de microscopia eletrônica e virologia da UnB (dados não mostrados).

A construção do baculovírus recombinante vAc-6x-His-sSHBsAgPH foi concluída com sucesso como demonstrado nos resultados (item 4.4). Após infecção de células de inseto *in vivo e in vitro* pode-se observar a presença de corpos de oclusão disformes contendo além da proteína poliedrina a proteína sSHBsAg.

A glicoproteína de membrana HBsAg presente no envelope do vírus HBV como descrito por Ganem, (1996) é formada pelo gene pré sS/S que contém as regiões pré S1, pré S2 e S. A maior proteína que compõe o HBsAg é a *large S*, com códon de iniciação localizado no início da região pré S1, a proteína de tamanho intermediário designada de *middle S*, é codificada pelas regiões pré S2 e S e a menor proteína, *small S*, sintetizada a partir do códon de iniciação localizado no início da região S. O HBsAg é altamente imunogênico e na maioria dos kits diagnósticos é usada em sua totalidade, neste trabalho somente a menor proteína que compõe o HBsAg foi utilizada, proteína 'small S' (sSHBsAg), e mesmo assim anticorpos monoclonais foram capazes de identificar essa

proteína nos testes de imunoensaio. Lanford *et al.* (1998), também criou baculovírus recombinantes que expressavam as proteínas `small S' e `middle S' juntas e separadas e constatou que a antigenicidade e imunogenicidade delas juntas ou separadas não apresentou diferença significativa.

A utilização de proteínas recombinantes para a produção de teste de detecção antígeno-específica e para a produção de vacinas vem ganhando espaço devido a sua segurança e facilidade. A manipulação de vírus patogênicos como o HBV para produção de vacinas e insumos tem sido uma preocupação latente, sendo a produção de vírus recombinantes uma alternativa cada vez mais utilizada. Price *et al.* (1989), utilizou o sistema de expressão em baculovírus para expressar o antígeno de superfície do HBV, HBsAg, e uma glicoproteína do envelope do vírus Influenza A, neuraminidase (NA). As proteínas recombinantes produzidas foram testadas em imunoensaios e sua antigênica foi comprovada com sucesso. A produção em larga escala do HBsAg utilizando o sistema de expressão em baculovírus gerou bons resultados como demonstrado por Wang *et al.* (1999) em seu trabalho. Wang propôs um novo protocolo de cultivo das células durante a infecção pelo baculovírus recombinante HBsAg, onde a mudança do pH era corrigido pelo acréscimo de nutrientes essenciais como a glicose e a glutamina. O novo protocolo proposto foi capaz de gerar um aumento na produção do HBsAg em 100% em relação ao protocolo de cultivo celular usado anteriormente. O resultado deste trabalho demonstra a possibilidade da produção de HBsAg em grandes quantidades utilizando células de inseto, que diferentemente das células de mamíferos são de fácil cultivo e baixo custo.

O diagnóstico laboratorial específico confirmatório utilizado hoje para detecção da HBV é realizada através de teste sorológicos como o ensaio imunoenzimático (EIA) e

Radioimunoensaio (RIA) que buscam identificar no soro, os antígenos HBsAg e HBeAg e os anticorpos Anti-HBcAg, anti-HBeAg e anti-HBsAg. Os laboratórios clínicos devido a alta demanda de diagnóstico para HBV tem procurado utilizar Kits prontos para realizar os testes diagnósticos poupando tempo e diminuindo os custos. Os laboratórios de referência como os Laboratórios Centrais chegam a realizar mais de mil exames dia para HBV, e isso faz com que a necessidade de utilização de kit de fácil execução, baixo risco de manipulação e menor custo aumente significativamente forçando as empresas a sempre estarem em busca de novas técnicas (Focaccia, 2007). A utilização do teste HBsAg é sem dúvida o maior dentre os outros testes sorológicos para HBV. Sua utilização hoje é estendida para além de casos de pacientes com suspeita de HBV para acompanhamento da progressão da doença e para segurança de todo sangue doado nos Hemocentros e Bancos de sangue privados (Agência nacional de vigilância Sanitária RDC número 57, 2010). A produção de HBsAg utilizando o sistema de expressão em baculovírus é uma boa ferramenta para ser utilizada na criação de kits diagnóstico para detecção de HBsAg e Anti-HBs, pois, sua produção é simples e não oferece risco de contaminação viral, como demonstrado nesse trabalho.

A imunodeteção realizada no Laboratório Central do Distrito Federal, com os kits automatizado e manual, mesmo sendo realizado com anticorpos monoclonais foram bem sucedidas, comprovando a eficácia do sistema de expressão em baculovírus do sSHBsAg. Esse resultado demonstra que o sSHBsAg produzido em células de inseto é capaz de ser reconhecido por anticorpos monoclonais comerciais produzidos hoje no país, sendo que com isso ele se torna um grande promissor para produção de kits diagnóstico Anti-HBs nacional, gerando menos onus para o governo na compra e produção desses Kits utilizados em larga escala nos laboratórios e centros de referência.

A proteína recombinante HBsAg produzido neste trabalho, pelo sistema de expressão baseado em baculovírus e células de inseto, pode ser utilizada para produzir testes diagnósticos do tipo ELISA (EIA) diretos ou indiretos. O HBsAg recombinante pode ser fixado no fundo da placa de ELISA e servir de antígeno para ligação dos anticorpos presentes no soro dos pacientes infectados pelo HBV (ELISA direto), ou, através da inoculação do HBsAg recombinante em cobaias e produção de anticorpos, ser usado no fundo do poço da placa de ELISA para detectar antígenos presentes no soro de pacientes infectados com o HBV. Takehara *et al.* (1988) em seu trabalho, fabricou dois testes de ELISA utilizando HBsAg recombinante produzido pelo sistema de expressão em baculovírus. No primeiro teste o HBsAg recombinante foi utilizado como antígeno (ELISA indireto), e no segundo teste o HBsAg recombinante foi inoculado em cobaias e os anticorpos produzidos é que foram utilizados (ELISA direto). Ambos os testes foram feitos para detecção de anticorpos e antígenos, respectivamente, presentes no soro de pacientes infectados com o HBV. testes hoje comercializados também foram testados com o mesmo soro humano e utilizados como controle. A comparação entre o teste recombinante e o comercial mostrou boa concordância, demonstrando que o HBsAg recombinante e seus anticorpos produzidos em cobaias são capazes de reconhecer antígenos e anticorpos do soro de pacientes com Hapatite B.

Como o HBV é um agente biológico de risco 3, com risco a saúde humana principalmente dos trabalhadores que ficam expostos ao vírus como, pesquisadores, agentes de saúde e todos os profissionais que participam dos estudos e produção de manufaturas como kits diagnóstico e vacinas, é preconizado pelo Parlamento Europeu e conselho da União Européia (7º directiva especial nos termos do nº 1 do artigo 16º da directiva 89/391/CEE) que devem ser sempre mantidas as atualizações de melhora e aperfeiçoamento da proteção da saúde e segurança dos trabalhadores através de

manipulação de vírus recombinantes ou partículas virais mais seguros. O sistema de expressão em baculovírus é uma boa ferramenta para criação de kits diagnóstico seguros, pois, o baculovírus não é patogênico para o homem, sendo ele incapaz de infectar células humanas, mesmo ele sendo capaz de transduzir células de mamíferos e fazer entrega gênica.

A construção do baculovírus recombinante vAcHISsSHBsAgAcPH, um baculovírus recombinante contendo o gene da porção 'Small S' do antígeno HBsAg de HBV fusionado ao gene da poliedrina do baculovírus AcMNPV na sua porção Amino-terminal foi bem sucedida. A análise da expressão da proteína recombinante em células de inseto infectadas mostrou que a proteína recombinante sSHBsAgPH está sendo produzida corretamente tanto *in vitro* como *in vivo*. Além disso, o teste feito utilizando extrato de células de inseto infectadas com o vírus recombinante contendo a proteína sSHBsAgPH produzida e corpos de oclusão purificados em gradiente de sacarose foram reconhecidos como antígenos pelos anticorpos comerciais Anti-HBsAg dos testes de imunoenensaio (EIA) realizados no Laboratório Central do Distrito Federal (LACEN-DF). Porém para uma melhor análise da proteína construída é necessário a realização de Western Blot utilizando anticorpos Anti-HBsAg e Anti-Poliedrina e a realização de um teste de ELISA onde a proteína produzida será utilizada como antígeno para reconhecer anticorpos presentes no soro de pacientes infectados com HBV. Outra possibilidade é a geração de anticorpos a partir da inoculação de cobaias com a proteína recombinante e uma nova análise em Western Blot utilizando os anticorpos produzidos para reconhecer a proteína recombinante e novos testes utilizando a técnica de ELISA com os anticorpos agora reconhecendo no soro de pacientes infectados o HBV.

Referências Bibliográficas

ARIF, B.M. **The structure of the viral genome.** Current Topics Microbiology and Immunology , v.1313, p.21-29, 1986.

CARVALHO, A.M.C.A. & TELMA, M.E. **Analysis of the scientific production on Hepatitis B in post-graduate nursing.** Rev. bras. Enferm, v. 6, p. 518-522, 2008.

CASTRO, M.E.B.; SOUZA, M.L.; SIHLER, W.; RODRIGUES, J.C.M.; RIBEIRO, B.M. **Biologia Molecular de Baculovirus e seu uso no Controle Biológico de Pragas no Brasil.** Pesquisa Agropecuária Brasileira. v. 34, p. 1733-1761, 1999.

CHANG, J.H.; CHOI, J.Y.; JIN, B.R.; ROH, J.Y.; OLSZEWSKI, J.A.; SEO, S.J.; O'REILLY, D.R.; JE, Y.H. **An improved baculovirus insecticide producing occlusion bodies that contain Bacillus Thuringiensis insect toxin.** Journal of Invertebrate Pathology, v. 84, p.30-37, 2003.

CHENG, K.C.; SMITH, G.L. **Hepatitis B virus large surface protein is not secreted but is immunogenic when selectively expressed by recombinant vaccinia virus.** J Virol, v. 60(2), p. 337-44, 1986.

COSTA, M.H. O. **Construção de vetor baculoviral modificado para produção de poliedros contendo proteína capsidial de vírus do complexo viral de alho visando produção de anti-soros.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Molecular). Universidade de Brasília, 2008

DELANEY, W.E. & ISOM, H.C. **Hepatitis B virus replication in human Hep G2 cells mediated by hepatitis B virus recombinant baculovirus.** Hepatology, v. 28(4), p. 1134-46, 1998.

FEDERICI, B.A. Baculovirus pathogenesis. In: MILLER, L.K. The baculovirus. New York; Plenum Press, p. 33-59, 1997.

FERREIRA, C.T.& SILVEIRA, T. R. **Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção.** Rev. bras. Epidemiol, v. 7,p. 4, 2004.

FERREIRA, Marcelo Simão. Diagnóstico e tratamento da hepatite B. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 33, n. 4, ago. 2000 .

FOCACCIA, Roberto. **Tratado de Hepatites Virais.** 2° ed. Editora Atheneu. São Paulo, 2007.

FOCACCIA, R.; CONCEIÇÃO, O.J.G.; SETTE, JR. **Estimated prevalence of viral hepatitis on the general population of the municipality of São Paulo, Measured by plasmatic markes through sample collected from a stratified, randomized and residence-based population survey.** Braz J Infect Dis.,2:268-8, 1998.

FONSECA, José Carlos Ferraz da. História natural da hepatite crônica B. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 40, n. 6, dez. 2007 .

FRANCKI, RIB.; FAUQUEST, C.M.; KNUDSON, D.L.; BROWN, F. (Eds). **Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses.** Archives of Virology V. 2, p.117-123, Supplement, 1991.

GALLE, P.R.; Hagelsen, J. **In vitro experimental infection of primary human hepatocitys with hepatitis B virus.** Gastroenterology., 106(3): 664-73, 1994.

GANEM, D. **Hepadnaviridae: The virus and their replication.** 3° edn. Philadelphia lippincott-Raven., 2703-3737, 1996.

GANEM, D.; Varmus, H.E. **The molecular biology of the hepatitis B viruses.** Annu Rev Biochem., Review; 56:651-93, 1987.

GERLICH, W.H., ;Robinson, W.S. **Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand.** Cell 21(3):801-9, 1980.

GONÇALES Jr FL. Hepatite B. IN:Veronesi tratado de infectologia. São Paulo:**Atheneu** 1996; 299-314.

GRANADOS, R.R.; LI, G.X.; DERKSEN, A.C.G.; MCKENNA, K.A. **A new insect cell line from trichoplusia ni (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to Trichoplusia ni single enveloped nuclear polyhedrosis virus.** Journal of Invertebrate pathology, v. 64, p. 260-266, 1994.

HEERMANN, K.H.; GOLDMANN, U. **Large surface protein of hepatitis B virus containing the pre-s sequence.** J Virol, v 52(2), p.396-402, 1984.

HOFFMANN CAMPO, C.B.; OLIVEIRA, E.B.; MOSCARDI, F. **Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Soja**, Londrina, PR, Brasil, Documentos 10, p. 23, 1985.

HORTON, H.M.; BURAND, J.P. **Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion.** Journal of Virology, v. 67, p. 1860, 1993.

JARVIS, D.L.; REILLY, L.M.; HOOVER, K.; SCHULTZ, C.; HAMMOCK, B.D.; GUARINO, L.A. **Construction and characterization of immediate early baculovirus pesticides.** Biological Control, v. 7, p. 228-235, 1996.

JE, Y.H.; JIN, B.R.; PARK, H.W.; ROH, J.Y.; CHANG, J.H.; SEO, S.J.; OLSZESKI, J.A.; O'REILLY, D.R.; & KANG SK. **Bbaculovirus Expression Vectors that**

Incorporated the Foreign Protein into Viral Occlusion Bodies. *Biotechniques*, v. 34, p. 81-87, 2003.

JEHLE, J. A.; BLISSARD, G. W.; BONNING, B. C.; CORY, J. S.; HERNIOUS, E. A.; ROHRMANN, G. F.; THEILMANN, D. A.; THIEM, S. M.; VLAK, J. M. **On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision.** *Archives of Virology*. **151**: 1257–1266, 2006.

JI, X.; SUTTON, G.; EVANS, G.; AXFORD, D.; OWEN, R.; STUART, D.I. **How baculovirus polyhedral fit square pegs into round holes to robustly package viruses.** *EMBO Journal*, 29. 505-514, 2010.

KANG, C.Y.; BISHOP, D.H.L.; SEO, J.S.; MATSUURA, Y.; CHOE, M. **Secretion of Particles of Hepatitis B Surface Antigen from Insect Cells Using a Baculovirus Vector.** *J. gen. Virol.*, 68, 2607-2613, 1987.

KOST, T.A.; CONDREAY, J.P.; JARVIS, D.L. **Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells.** *Nature Biotechnology*, v.23(5), p.567-575, 2005.

LAEMMLI, U.K. **Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* v. 227. P. 680-685. 1970.

LANFORD, R.E.; LUCKOW, V.; KENNEDY, R.C.; DREESMAN, L.N.; SUMMERS, M.D. **Expression and characterization of hepatitis B virus surface antigen polypeptides in insect cells with a baculovirus expression system.** *Journal of Virology*, p. 1549-1557, 1988.

LU, A.; MILLER, L.K. **Regulation of baculoviruses late and very late expression.**
In: Miller, L.K. (Eds). The baculoviruses. New York: Plenum Press, p. 193-216,
1997.

LUNEL, F.; Cadranel, J.F.; Rosenheim, M. **Hepatitis virus infections in heart
transplant recipients: epidemiology, natural history, characteristics, and impact on
survival.** *Gastroenterology.*, 119:1064-74, 2000.

MARCHESINI, Angela Mattos . Hepatites B e C em usuários de drogas injetáveis
vivendo com HIV em São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, 2009.

MARUNIAK, J.E.; **Baculovirus structural protein and proteins synthesis. In:
GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. (Eds.).** *The Biology of Baculoviruses.* Boca
Raton: CRC, v. 1. p. 129-146, 1986.

MILLER, L. K. **Introduction to the baculoviruses. In: L. K. Miller (ed). The
baculoviruses.** Plenum Press, New York, p.1-6. 1997

MILLER, L.K.; TRIMARCHI, R.E.; BROWNE, D.; PENNOCK, G.D. **A temperature-
sensitive mutant of the baculovirus *Autographa californica nuclear polyedrosis*
virus defective in an early function required for further gene expression.** *J.
Virology*, v. 126(1), p. 376-80, 1983.

MOSCARDI, F. **Utilização de Baculovirus Anticarsia para o controle da lagarta-
da-soja, *Anticarsia gemmatalis*.** Londrina: Embrapa-CNPSO. P. 13, Embrapa-CNPSO.
Comunicado técnico, 23. 1983.

MURPHY, F.A; FAUKQUET, C,M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A; JARVIS,
A.W; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A.; SUMMERD, M.D. (Eds.). **Virus taxonomy;**

classification and nomenclature of viruses. Sixth report of international committee on Taxonomy of Viruses. New York: Springer-Verlag Wien, p. 104-113, 1995.

OLSZEWSKI, J. A.; WILSON, R.; JE, Y. H.; BUGEON, L.; STRASCHIL, U.;

O'REILLY, D.R.; MILLER, L.K.; LUCKOW, V.A. **Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual.** New York: W.H. Freeman and Company, 1992.

PEARSON, M.N.; GROTEN, C.; ROHRMANN, G.F. **Identification of the *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus envelope fusion protein provides evidence for phylogenetic division of the Baculoviridae.** Journal of Virology, v. 74, p. 6126-6131, 2000.

PENNOCK, G.D.; SHOEMAKER, C.; MILLER, L.K. **Strong and regulated expression of *Escherichia coli* β galactosidase in insect with a baculovirus vector.** Molecular and Cellular Biology, v. 4, p. 399-406, 1984.

PRICE, P.M.; REICHELDEDERFER, C.F.; JOHANSSON, B.E.; KILBOURNE, E.D.; ACS, G. **Complementation of recombinant baculoviruses by coinfection with wild-type virus facilitates production in insect larvae of antigenic proteins of hepatitis B virus and influenza virus.** Biochemistry. ,p. 1453-1456, 1989.

RICHARDSON, C.D. Baculovirus expression protocols. Methods in Molecular Biology, p. 418-39, 1995.

RIBEIRO, B.M; SOUZA, M.L.; KITAJIMA, E.W. **Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus de insetos.** In: Alves, S.B. Controle Microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ, p. 481-507, 1998.

SATTLER, F.; ROBINSON, W.S. **Hepatitis B viral DNA molecules have cohesive ends.** J Virol., p. 32(1):226-33, 1979.

SILVEIRA TR, da Fonseca JC, Riviera L. Hepatitis B seroprevalence in latin America. **Ver Panam Salud Publica.**, p. 6(6):378-83, 1999.

SLACK, J., ARIF, B.M. **The baculovirus occlusion-derived virus: virion structure and function.** Advances in virus research, p. 69: 99-165, 2007.

SMITH, G.E; VALK, J.M; SUMMERS, M.D. **Physical analysis of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus transcripts for polyhedron and 10.000 molecular weight protein.** Journal of Virology, v.45, p. 215-225, 1983.

TAKEHARA, K.; IRELAND, D.; BISHOP, D.H.L. **Co-expression of the Hepatitis B surface and core antigens using Baculovirus Multiple Expression Vectors.** J. gen. Virol, p. 69,2763-2777, 1988.

TIOLLAIS P, P. C. **The hepatitis B virus.** Nature. Review, p. 10-16, 317(6037): 489-95, 1985 .

VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUEST, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MCGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. **Virus taxonomy.** Seventh report of the International Committee on Taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego, 2000.

VOLKMAN, L.E & HOM, G. **Autographa californica Multiple Nucleopolyhedrovirus chiA is required for processing of V-CATH.** Virology, v. 277, p. 178-183, 2000.

WANG, S.L.; BENTLEY, W.E.; LIU, C.C.; WANG, M.Y. **The use of glucose to regulate pH values of culture media and increase the production of baculovirus (BmNPV) and foreign protein (HBsAg).** Process Biochemistry, p. 34, 295-301, 1999.