

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas

**Produção e caracterização funcional de proteínas
multiepitopos e uso como insumos biotecnológicos -
Hepatite B e Rubéola.**

Marilen Queiroz de Souza

Brasília, 2011

**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós Graduação em Biologia Molecular**

**Produção e caracterização funcional de proteínas
multiepitopos e uso como insumos biotecnológicos -
Hepatite B e Rubéola.**

Dissertação apresentada ao
Departamento de Biologia Celular
da Universidade de Brasília como
requisito parcial para obtenção do
grau de mestre em Biologia
Molecular.

Orientadora: Dra Maria Sueli Soares Felipe
Co-Orientador: Dr. Fernando Araripe Torres

Aluna: Marilen Queiroz de Souza

Brasília, 2011

Dedicatória

Aos meus amados pais, que são os grandes responsáveis por tudo que sou e por tudo que conquistei até hoje. Obrigada pelo amor, carinho, dedicação, paciência, esforço, compreensão, apoio, incentivo e por possibilitar a realização deste sonho.

Agradecimento

Agradecer é um privilégio! Só podemos agradecer por aquilo que vivenciamos e nos foi válido. Não importa o quão duro foi, nem pelo término que se aproxima, mas valeu por cada passo e cada minuto vivido. Por isso agradeço:

A Deus, pelo dom da vida, pelas oportunidades e por Sua presença sempre.

Aos meus pais, que amo incondicionalmente, Rauflin e Célia. Agradeço pelo exemplo que foram para mim com a garra que possuem, pelo carinho, compreensão, paciência, incentivo e apoio em todos os momentos de minha vida.

Aos meus irmãos, Wanessa e Rodrigo, pelo carinho, ajuda, ensinamentos que me foram muito úteis nesta caminhada.

Ao meu namorado, André, pelo amor, companheirismo, compreensão e bom humor que contribuíram em vários momentos deste trabalho, pelos momentos juntos e por me ensinar que ficar ansiosa não resolve os problemas.

À professora Maria Sueli pela oportunidade, apoio, incentivo, confiança e, principalmente pela orientação e ensinamentos que levarei sempre comigo em minha vida profissional e pessoal.

Ao professor Fernando Araripe que muito me ensinou, contribuindo de forma decisiva em meu crescimento científico e intelectual.

Aos meus amigos de faculdade (turma 2º/2004), companheiros nesta interminável jornada em busca do conhecimento. Chegamos juntos, aprendemos juntos, muitas vezes trabalhamos juntos e, com certeza, crescemos muito juntos. Sem vocês, meus amigos, tudo teria sido diferente.

A todos que fizeram ou fazem parte do Laboratório de Biologia Molecular. Sem a amizade e ajuda de vocês a realização deste trabalho não seria possível.

Às minhas grandes amigas e companheiras, Camila e Clarisse Cipriano, com quem moro e divido experiências maravilhosas.

À Clara Daldegan, sempre prestativa, imediata e concreta, que me ofereceu ajuda nas traduções em inglês.

À toda comunidade do Movimento dos Focolares, em especial aos jovens, que por muitas vezes me inspiraram confiança para persistir diante das incertezas, me iluminaram na escuridão e me fizeram mais luminosa.

À CAPES pelo apoio financeiro que permitiu a execução deste trabalho.

Tê-los comigo durante esta caminhada foi uma dádiva, o meu grande afeto a cada um e o meu MUITO OBRIGADA!

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Hepatites por vírus	12
1.2. Hepatite B	13
1.2.1. Descoberta do HBV.....	13
1.2.2. Classificação	14
1.2.3. Epidemiologia – nacional e mundial.....	14
1.2.4. Transmissão	15
1.2.5. Sintomas – aspectos clínicos	16
1.2.6. Estrutura viral	18
1.2.7. Genoma	18
1.2.8. Proteínas – antígenos	19
1.2.9. Diversidade viral – subtipos e variantes.....	21
1.2.10. Replicação viral.....	22
1.2.11. Evolução da doença – marcadores moleculares.....	23
1.2.12. Diagnósticos laboratoriais.....	25
1.3. Rubéola	29
1.3.1. Descoberta do vírus da Rubéola.....	29
1.3.2. Classificação	30
1.3.3. Epidemiologia – nacional e mundial.....	31
1.3.4. Transmissão	32
1.3.5. Sintomas.....	32
1.3.6. Estrutura viral	32
1.3.7. Proteínas – antígenos	33
1.3.8. Genoma	33
1.3.9. Diversidade viral – subtipos e variantes.....	34
1.3.10. Replicação viral.....	34
1.3.11. Aspectos clínicos – evolução da doença.....	35
1.3.12. Diagnósticos laboratoriais.....	36
1.4. Estratégia multiepitopo para diagnóstico	37
1.4.1. Epitopos contra o HBV	38
1.4.2. Epitopos contra o RV.....	39
2. JUSTIFICATIVA	41
3. OBJETIVOS	42

3.1.	Geral	42
3.2.	Específicos	42
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1.	Considerações gerais	43
4.2.	Linhagens de <i>E. coli</i>	43
4.3.	Meios de cultura	44
4.4.	Soluções	44
4.5.	Preparo das células competentes	48
4.6.	Transformação de bactéria.....	49
4.7.	Mini-preparação plasmidial – extração de DNA.....	50
4.8.	Digestão	50
4.9.	Indução.....	51
4.10.	Análise em gel	51
4.11.	Análise de proteínas por <i>Western Blotting</i>	52
4.12.	Preparação da resina de purificação de proteínas.....	53
4.13.	Purificação	53
4.14.	Dicroísmo Circular	54
4.15.	Quantificação das amostras – Bradford.....	55
4.16.	Teste de atividade antigênia.....	55
4.17.	Teste de atividade antigênica – rMEHB.....	56
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1.	Desenho e síntese química dos genes.....	57
5.2.	Expressão heteróloga das proteínas multiepitopos	60
5.3.	Purificação das proteínas multiepitopos recombinantes	62
5.4.	Análises de Dicroísmo circular	63

5.5.	Testes de atividade imunológica	66
6.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	75
7.	LISTA DE ABREVIACÕES	76
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
	ANEXO I – PATENTE HEPATITE B.....	85
	ANEXO II – ARTIGO HEPATITE B	109
	ANEXO III – PATENTE RUBÉOLA	122

Índice de Figuras e Tabelas

FIGURA 1	13
FIGURA 2	19
FIGURA 3	20
FIGURA 4	21
FIGURA 5	24
FIGURA 6	24
FIGURA 7	28
FIGURA 8	29
FIGURA 9	36
FIGURA 10	39
FIGURA 11	40
FIGURA 12	58
FIGURA 14	59
FIGURA 15	59
FIGURA 16	60
FIGURA 17	61
FIGURA 18	62
FIGURA 19	63
FIGURA 20	64
FIGURA 21	64
FIGURA 22	65
FIGURA 23	65
FIGURA 24	66
FIGURA 25	67
FIGURA 26	67
FIGURA 27	67
FIGURA 28	68
FIGURA 29	69
FIGURA 30	69
FIGURA 31	70
FIGURA 32	71
FIGURA 33	72
FIGURA 34	73
FIGURA 35	73
FIGURA 36	74
TABELA 1	12
TABELA 2	26
TABELA 3	27
TABELA 4	57
TABELA 5	58

Resumo

A Hepatite B é uma inflamação hepática causada pelo vírus HBV. O primeiro anticorpo a ser detectado após a infecção é o anti-HBc-IgM. A presença deste anticorpo possibilita a distinção da infecção atual de uma infecção passada ou remota pelo HBV, pois, após a infecção, o anti-HBc-IgM torna-se indetectável. O anti-HBc-IgG aparece logo após o IgM, alcançando rapidamente títulos elevados na hepatite aguda e permanecendo mesmo após a cura. Por ser o primeiro anticorpo presente, e algumas vezes o único marcador detectado durante a evolução da infecção, o anti-HBc pode ser usado tanto para indicar infecção aguda pelo HBV (anti-HBc-IgM) quanto para identificar indivíduos que entraram em contato com o vírus (anti-HBc-IgG).

A rubéola é uma infecção causada pelo vírus RV. Geralmente, é uma doença viral leve causada na infância. A doença é de importância para a saúde pública, devido à infecção adquirida na gravidez precoce, que muitas vezes resulta em anomalias fetais, classificados como síndrome da rubéola congênita (SRC). Portanto, um diagnóstico preciso para a diferenciação da rubéola entre outras doenças infecciosas existentes com as mesmas características é imperativo para o tratamento adequado.

O objetivo deste projeto é a construção de proteínas antigênicas multiepitopos recombinantes dos vírus HBV e RV, causadores de hepatite B e rubéola respectivamente, que sejam eficazes no reconhecimento de marcadores moleculares de forma que possam ser utilizados como insumos em kits de diagnóstico de hepatite B e rubéola e na produção de anticorpos monoclonais e potencial utilização para fins de pesquisa e desenvolvimento de vacinas, fármacos e medicamentos. Para o desenho da seqüência do gene MEHB (609 pb) foi feita uma busca na literatura para a seleção dos epitopos mais comuns e conservados do vírus HBV. Utilizando a mesma estratégia e com a finalidade de desenvolver uma proteína recombinante multiepitopo, denominada rMERUB, para o diagnóstico de rubéola, seqüências conservadas e imunodominantes de epitopos da região do envelope viral foram unidas. Os genes sintéticos foram clonados, com sucesso, no vetor de expressão pET21a na forma de um inserto *Nde* I-*Xho* I contendo uma sequência codificadora para uma cauda his_{6x} tag no C-terminal. Os plasmídeos resultantes foram transformados em *Escherichia coli* BL21 (λ DE3) pLysS. Clones selecionados

foram cultivados para a indução das proteínas recombinantes, na presença de IPTG. As análises em gel SDS-PAGE mostraram bandas de indução compatíveis com o tamanho previsto da proteína multiepitopo. Foi realizado Western blot utilizando anticorpo anti-polyHistidine ainda a confirmar a identidade das bandas de indução. A purificação das proteínas foi realizada por uma única etapa por cromatografia de afinidade Ni-NTA. Foram realizados testes para comprovar a atividade imunológica das proteínas, através de ELISA foram comprovadas as reações das proteínas recombinantes com os anticorpos específicos para os respectivos vírus (HBV e RV). Este trabalho encontra-se em fase de ajustes dos testes ELISA para utilização destas proteínas na detecção dos anticorpos virais em soros de pacientes infectados, o que será feito pela empresa WAMA diagnóstica (projeto em parceria).

Abstract

Hepatitis B is a liver inflammation caused by HBV virus. The first antibody detected after exposure to this virus is the anti-HBc IgM. The presence of this antibody enables the identification of the clinical stage of the disease and becomes undetectable after the acute phase. Anti-HBc IgG appears quickly after IgM, reaching high titers in chronic hepatitis and remains even after cure. Since anti-HBc is the first antibody identified and sometimes the only marker detected during the course of infection, it can be used both to indicate HBV acute infection (anti-HBc-IgM), and to identify individuals who have come in contact with the virus (anti-HBc-IgG).

Rubella is an infection caused by RV virus. Generally, is a mild childhood viral disease. The disease is of public health importance because infection acquired early pregnancy often results in fetal abnormalities, classified as congenital rubella syndrome (CRS). Therefore, accurate diagnosis for differentiation of Rubella among others infection diseases with the same features is imperative for proper treatment.

The goal of this work was to produce recombinant multiepitope antigenic proteins of HBV and RV, which are effective at recognizing molecular markers for diagnosis of hepatitis B and rubella. They can be used in production of monoclonal antibodies and possible use for researching and developing vaccines, drugs and

medicines and diagnostic kits for hepatitis B and rubella. For this purpose, a gene sequence named rMEHB was designed taking into account the most common and conserved HBV epitopes. Using the same strategy, with the purpose to develop a recombinant multiepitope protein, called rMERUB, for rubella diagnostic purposes, sequences conserved and immunodominant of epitopes from viral envelope have been joined together. The synthetic genes were cloned into vector pET21a with a *NdeI/XhoI* fragment and containing a sequence coding for a 6xHis tag at the C-terminal. The resulting plasmids were transformed into *Escherichia coli* BL21 (λ DE3) pLysS. Selected clones were grown for induction of the recombinant proteins in the presence of IPTG. SDS-PAGE analysis showed induction bands, which were consistent with the predicted sizes of the multiepitopes proteins. Western blot using anti-polyHis antibody was further performed to confirm the identity of induced protein. The purification of the proteins was performed by a single step with Ni-NTA affinity chromatography. Tests were performed by ELISA to confirm the proteins immunological activity. Were proved the reaction of the recombinant proteins with the antibodies specific for respective virus (HBV and RV). This work is in process of adjustment of the ELISA for use of these proteins to detection of viral antibodies in sera from infected patients, which will be done by the company WAMA diagnóstica (project in partnership).

1. Introdução

1.1. Hepatites por vírus

As hepatites virais (tabela 1) acometem principalmente o fígado e apesar de serem bioquimicamente semelhantes entre si e provocarem um quadro clínico também semelhante, pertencem a diversos grupos virais, compreendendo vírus de DNA ou RNA como material genético, envelopados ou não, com características funcionais e estruturais diferentes (Pinho *et al.*, 1995).

As hepatites virais tornaram-se um grave problema de saúde pública no mundo e no Brasil. Bilhões de pessoas já tiveram contato com algum dos vírus das hepatites e milhões são portadores crônicos (Ministério da Saúde, 2005). Os avanços no conhecimento das hepatites por vírus caracterizam-se por várias descobertas que se iniciaram com o registro de casos ou de surtos epidêmicos e culminaram com a aplicação da biologia molecular ao estudo da estrutura dos vírus (Silva, 1995).

Tabela 1. Período de incubação e formas clínicas das diferentes hepatites virais.

Agente etiológico	Período de incubação	Forma icterica	Cronificação
HAV	15 a 50 dias	5% a 10% em menores de 6 anos 70% a 80% nos adultos	Não existem relatos de formas crônicas
HBV	15 a 180 dias	30%	90% em recém-nascidos 5% a 10% após 5 anos
HCV	15 a 150 dias	Cerca de 20%	70 a 85%
HDV	É semelhante ao da hepatite B, porém menor na superinfecção: 14 a 56 dias.	Variável	Variável
HEV	15 a 60 dias (média de 40 dias)	Variável	Não existem relatos de formas crônicas

(Fonte: Ministério da Saúde, 2005).

1.2. Hepatite B

Nome proposto pela Organização Mundial de Saúde em substituição às denominações antigas de hepatite por soro homólogo, hepatite pós-transfusional, hepatite MS-2, hepatite sérica, hepatite associada ao antígeno Austrália (Silva, 1995).

A hepatite B é uma enfermidade hepática causada por infecção do vírus HBV (figura 1). A via parenteral é muito importante na transmissão do vírus da hepatite B, principalmente através do sangue e derivados. No entanto, a demonstração do vírus na saliva, secreção vaginal, sêmen e outros líquidos orgânicos apontam para um largo espectro de contaminação (Silva, 1995). Transfusões de sangue sem investigação laboratorial para doenças transmissíveis, procedimentos odontológicos, cirúrgicos e de hemodiálise que desrespeitam as normas universais de biossegurança, podem promover a transmissão do vírus. (Chávez *et al.*, 2003).

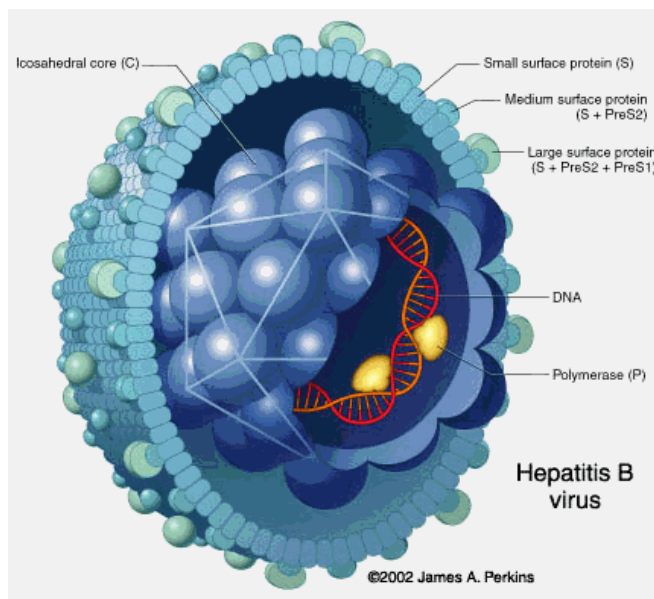


Figura 1. Esquema do vírus HBV. (Fonte: Perkins, 2002).

1.2.1. Descoberta do HBV

A existência de uma forma de hepatite de transmissão parental foi documentada em 1885, transmitida por vacina antivariólica. Vários casos foram citados na literatura e em 1947, MacCallum definiu o termo hepatite B para esta enfermidade (Silva, 1995). O antígeno de superfície da hepatite B foi inicialmente descrito como antígeno Austrália, em 1965, observada pela primeira vez no soro de

um aborígine australiano, por Blumberg e Tiddell durante suas pesquisas acerca do polimorfismo genético de seres humanos (Youmans *et al.*, 1983). Sua associação com a hepatite B foi feita em 1968, por Prince e Okochi & Murakami, sendo posteriormente denominado antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg). Posteriormente, uma série de outros antígenos foi associada ao HBV e descritos (Pinho *et al.*, 1995).

1.2.2. Classificação

O HBV está, atualmente, classificado dentro da família dos *Hepadnaviridae*, que compreende uma série de vírus hepatotrópicos que infectam outras espécies e que compartilham características estruturais e funcionais. Esta família se divide em dois gêneros: Avihepadnavirus e Orthohepadnavirus. O primeiro gênero compreende vírus que infectam exclusivamente pássaros como o vírus do pato (DHBV), o vírus do ganso (SGHBV), o vírus da cegonha (SHBV) entre outros. O segundo gênero compreende o vírus da hepatite B da marmota (WHV), do esquilo terrestre (GSHV) e da hepatite B humana. As características comuns a estes vírus são seu tropismo por células hepáticas, partículas virais envelopadas com capsídeo de simetria icosaédrica, genoma formado por DNA fita dupla parcial e replicação por intermediários RNA, via transcriptase reversa (Pinho *et al.*, 1995).

Embora os hepadnavírus apresentem uma série de semelhanças, existem diferenças a serem consideradas entre os membros desta família. De maneira geral, os genomas dos hepadnavírus de aves são menores do que os dos vírus de mamíferos e pouca homologia de seqüência nucleotídica é observada (Focaccia, 2003).

1.2.3. Epidemiologia – nacional e mundial

A infecção pelo vírus HBV é um problema de saúde pública mundial. Estima-se que mais de dois milhões de pessoas já entraram em contato com o vírus em alguma fase da vida. Além disso, aproximadamente 350 bilhões são portadores crônicos, estando em alto risco para o desenvolvimento de uma cirrose e/ou hepatocarcinoma. Ocorrem, por ano, aproximadamente um milhão de óbitos relacionados a complicações da hepatite crônica (Focaccia, 2003).

A infecção pelo HBV é considerada alta onde a prevalência do HBsAg é superior a 7%, ou onde 60% ou mais da população têm evidência sorológica de

infecção prévia. Essas condições são encontradas em regiões como a África, parte da América do Sul, Sudeste da Ásia, China, partes do Oriente Médio e ilhas do Pacífico. São consideradas como de endemicidade intermediária as áreas onde a prevalência do HBsAg vai de 2 a 7% com menos de 60% da população apresentando histórico sorológico. Nessa categoria se encontram o Leste Europeu e os países europeus do Mediterrâneo, parte da América do Sul, Oriente Médio e Rússia. No restante do mundo, que inclui a América do Norte, a Europa Ocidental e a Austrália, a prevalência do HBsAg é menor do que 2%, e a prevalência total de infectados previamente (portadores crônicos do vírus da hepatite B) é inferior a 10%. Mesmo nessas áreas, contudo, existem grupos de alto risco, que são os usuários de drogas injetáveis, homossexuais masculinos, profissionais da área da saúde, pacientes de hemodiálise ou aqueles sujeitos a tratamento clínico por hemoderivados (Pinho *et al.*, 1995; Focaccia, 2003).

No Brasil, a literatura refere-se à Região Sul como área de baixa endemicidade, e as regiões Centro-Oeste, Nordeste e Sudeste como áreas de endemicidade intermediária. A Amazônia (média de 8% de prevalência de HBsAg), o Estado do Espírito Santo e o oeste do Estado de Santa Catarina são considerados de alta endemicidade. De modo geral, a taxa de letalidade dos pacientes hospitalizados é de 0,8 a 2%, podendo aumentar nos indivíduos com mais de 40 anos de idade e ser maior nos casos associados ao vírus da hepatite D. No Brasil, a taxa de mortalidade por hepatite B é de 0,6 por 100 000 habitantes (Pinho *et al.*, 1995; Focaccia, 2003).

1.2.4. Transmissão

O HBV é transmitido principalmente por vias parenterais, mucosas ou fluídos corpóreos contaminados. As maiores concentrações de vírus são verificadas no sangue e secreções serosas, diminuindo consideravelmente no sêmen, fluido vaginal e saliva. As principais formas de contágio são:

- Transmissão perinatal;
- Relações sexuais;
- Transfusão de sangue ou derivados;
- Uso de drogas intravenosas;
- Transplante de órgãos ou tecidos;
- Lesão de pele ou acidente com agulhas contaminadas.

A saliva pode ser veículo de transmissão em casos de mordidas, porém, não foram documentados casos de transmissão por beijos ou outros tipos de exposição à saliva. Outros fluidos corporais, como por exemplo, lágrima, suor, urina, fezes, leite materno e líquido sinovial podem apresentar o HBsAg, porém não apresentam o vírion intacto, razão pela qual não têm sido associados com a transmissão do HBV.

Pode haver grande variação na frequência dos modos de transmissão de acordo com o padrão endêmico encontrados. Sendo assim, é esperado encontrar diversidade na prevalência dos modos de transmissão em diferentes ambientes epidemiológicos. Em regiões de alta prevalência do vírus a transmissão perinatal assumi grande importância, já em regiões de baixa prevalência as transmissões sexuais e parenteral, principalmente em usuários de drogas injetáveis, assumem maior importância. Regiões de prevalência intermediária apresentam certa mistura de padrões de transmissão com comportamento variável (Focaccia, 2003).

1.2.5. Sintomas – aspectos clínicos

O vírus da hepatite B é um vírus citopático e a infecção com este agente está associada a um largo espectro de dano hepático que varia de hepatite aguda fulminante a hepatite assintomática. Estudos da patogenicidade do HBV estabeleceram que a diversidade de manifestações clínicas e a evolução da infecção pelo HBV dependem primariamente da resposta imune do hospedeiro ao vírus. Durante a infecção aguda é um envolvimento eficiente e coordenado das respostas imune celular e humoral para a resolução da infecção pelo HBV. Na infecção crônica pelo HBV a resposta imune celular ao vírus é fraca, permitindo a replicação viral em níveis elevados nos hepatócitos infectados. No decorrer dos anos, alguns pacientes podem suprimir espontaneamente a replicação do HBV a um nível que não desencadeia mais qualquer inflamação hepática (Focaccia, 2003).

Após a infecção aguda, pelo vírus da hepatite B, diversas manifestações clínicas e diferentes evoluções podem ser observadas nos pacientes infectados. O período de incubação da infecção pelo HBV na hepatite aguda varia de dois a seis meses. Entre o primeiro e o quinto mês após o contato com o vírus, o HBsAg pode ser detectado no soro. Cerca de 10% dos pacientes já apresentam negatividade ao HBsAg na primeira visita ao clínico (Silva *et al.*, 1995). A recuperação da hepatite aguda é dependente da resposta das células B que produzem anticorpos contra o antígeno das regiões S e pré-S, bem como da resposta das células T. Na evolução

da infecção crônica do HBV, vários fatores estão envolvidos como a época de aquisição da doença, aspectos relativos à etnia, sexo e genótipo do HBV. Define-se formalmente a hepatite crônica, do ponto de vista sorológico, quando a persistência do HBsAg é superior a 180 dias (Silva *et al.*, 1995). A progressão para o estado de portador crônico do HBV é percentualmente maior nos indivíduos infectados pela via vertical. A infecção crônica pode produzir quadros de portador sadio do HBV, hepatite crônica persistente, hepatite crônica ativa, cirrose hepática, e hepatocarcinoma, após vários anos de evolução. Estes indivíduos cronicamente infectados apresentam os marcadores sorológicos HBsAg e HBeAg. Em dado momento da evolução podem surgir, espontaneamente, os anticorpos Anti-HBeAg, , significando que cessou a replicação viral (Focaccia, 2003).

Em pacientes com infecção adquirida no período perinatal observa-se uma fase inicial (fase replicativa) dividida em duas fases distintas e sequenciais. Inicialmente, existe a fase de imunotolerância, que se caracteriza por altos níveis de replicação do HBV, sem doença hepática ativa. Estes pacientes usualmente são assintomáticos. Ainda na fase replicativa, 15% dos pacientes infectados precocemente pelo HBV pode entrar na fase de imunoeliminação, passa a ser detectado o anti HBeAg . A transição para a fase não replicativa pode ser rápida e silenciosa ou prolongada e com exacerbações recorrentes. Depois da fase imunoeliminação bem-sucedida, tem início a fase não-replicativa (Focaccia, 2003).

Nos pacientes com infecção crônica adquirida na infância ou na idade adulta observa-se duas fases. Uma inicial de imunoeliminação com intensa replicação viral e doença hepática ativa e uma outra fase posterior de infecção, não replicante, com doença hepática inativa. Durante a fase replicativa ocorrem vários episódios de necroinflamação e regeneração do fígado, processo responsável pelo desenvolvimento de fibrose e cirrose do fígado. (Focaccia, 2003)

A infecção pelo HBV na idade adulta geralmente leva à recuperação e ao desenvolvimento de imunidade específica, em 92% dos pacientes, tanto nos que apresentam quadros de hepatites agudas, quanto naqueles que tiveram infecções subclínicas. Se após seis meses do quadro agudo, o HBsAg ainda for detectado na circulação a infecção é considerada crônica. No início do quadro crônico, a infecção por HBV é subclínica e geralmente leve (Focaccia, 2003).

1.2.6. Estrutura viral

O HBV pode ser encontrado no soro de pacientes infectados sob três formas: partículas completas infecciosas, partículas incompletas esféricas e partículas incompletas filamentosas (Focaccia, 2003). As partículas completas infecciosas são esféricas, de 42nm de diâmetro (partícula de Dane), de dupla camada, uma externa protéica também chamada de envelope que contém o antígeno de superfície (HBsAg) e uma interna chamada de “central” ou *core* que constitui o nucleocapsídeo de simetria icosaédrica e contém a proteína antigênica do *core* (HBcAg), polimerases e o DNA viral, sendo este circular e de dupla hélice, codificando para proteínas estruturais e não-estruturais (Lei *et al.*, 2006). Esta partícula é indicativa de replicação viral. As partículas incompletas não são infecciosas e são compostas exclusivamente por HBsAg. São encontradas em excesso em soro de pacientes infectados. As partículas não-infecciosas esféricas possuem 22nm de diâmetro e as filamentosas possuem diâmetro semelhante às partículas esféricas e comprimento aproximadamente 10 vezes maior (Focaccia, 2003).

1.2.7. Genoma

O genoma do HBV é um dos menores entre os genomas de vírus que infectam o homem e possui aproximadamente 3200 pares de bases (pb). O HBV produz mais proteína por nucleotídeo que qualquer outro vírus conhecido. É composto por uma molécula de DNA circular de fita parcialmente dupla. A fita longa é complementar aos RNAs virais e por convenção possui polaridade negativa. Na fita de polaridade positiva, que possui uma região de fita simples, a posição da extremidade terminal 5' é fixa, enquanto que a posição da extremidade terminal 3' é variável. Sendo assim, o comprimento da fita positiva é variável. A fita negativa do DNA não é um círculo fechado, apresentando uma região aberta em um sítio aproximadamente a 224pb da extremidade 5' da fita positiva (Focaccia, 2003).

Todo o genoma do HBV é codificante, todos os genes são codificados pela fita longa e possuem pelo menos uma região de sobreposição a outro gene (fig.2). O gene pré-S/S codificam 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 cobre aproximadamente três quartos do genoma e codifica as enzimas DNA polimerase viral, transcriptase reversa e RNase H (Focaccia, 2003). O gene X é o menor dos

genes do HBV. A seqüência deste gene é conservada entre os hepadnavírus que infectam mamíferos. Acredita-se que este gene não esteja envolvido na encapsidação e replicação viral. O gene X é um gene regulador que pode ativar a transcrição de certos genes virais e celulares (Focaccia, 2003).

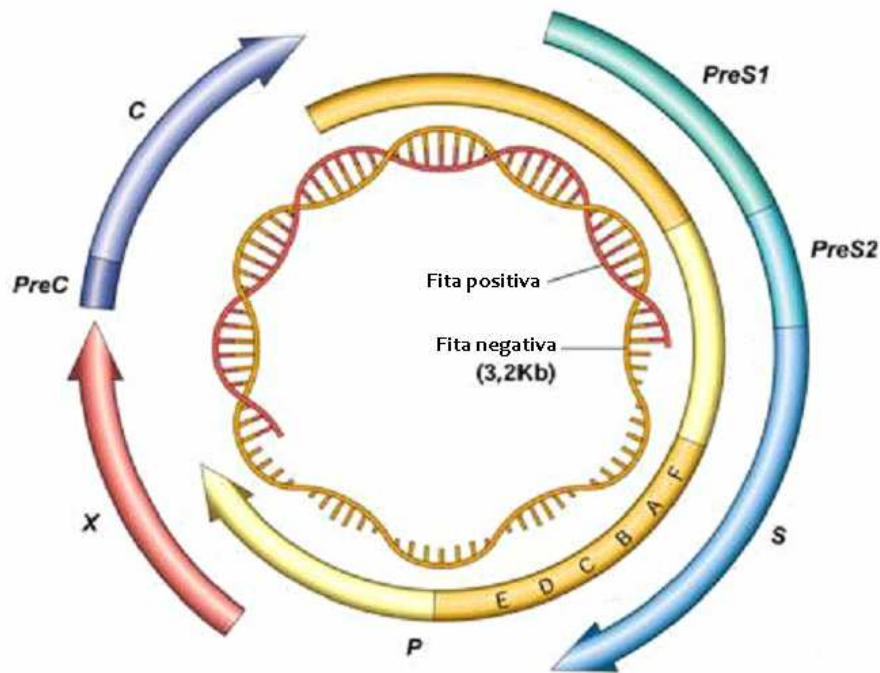


Figura 2. Esquema do genoma do vírus HBV com as quatro regiões de leitura aberta (ORF): pré-S/S, pré-C/C, P e X. (Fonte: <http://www.drthuthuy.com/images/genotype02.jpg> - com adaptações)

1.2.8. Proteínas – antígenos

O envelope do HBV é formado por uma membrana bilipídica contendo três proteínas denominadas grande (L), média (M) e pequena (S) (fig. 3). Estas são proteínas antigênicas de superfície (HBsAg) encontradas, geralmente, em altas concentrações no sangue e em outros líquidos orgânicos. O AgHBs (S), É a proteína mais abundante em partículas não-infecciosas esféricas e contém os principais epitopos, ou seja, proteínas capazes de induzir uma resposta imune. As partículas filamentosas apresentam em adição ao HBsAg (S) os polipeptídeos gp33 e gp36. Enquanto que, o vírion possui quantidades equimolares das três proteínas de superfície. As proteínas L e M contém os antígenos correspondentes às regiões pré-S1 e pré-S2 do genoma viral (Focaccia, 2003). O HBsAg (S) de 226 aminoácidos é encontrado no envelope viral em sua forma não-glicosilada (p24), com massa molecular igual a 24kDa, e glicosilada (gp27) com 27kDa. O HBsAg (M) com 281

aminoácidos é encontrado em duas formas glicosiladas (gp33 e gp36) e o HBsAg (L) de aproximadamente 400 aminoácidos, em uma forma não glicosilada (p39) e outra glicosilada (gp42) (Focaccia, 2003).

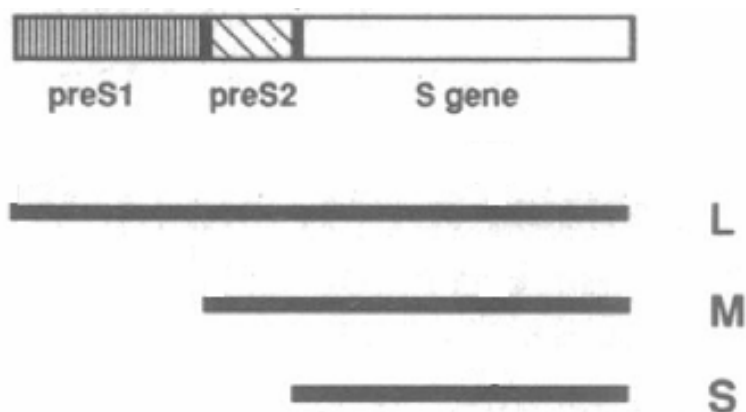


Figura 3. Gene pré S/S e proteínas antigênicas codificadas L, M e S. (Fonte: Bruss, *et al.*, 1991)

A proteína que compõe o capsídeo viral é uma estrutura eletrodensa quando vista a microscópio eletrônico e é formada por unidades repetitivas de uma proteína de 21kDa, chamada de proteína c ou antígeno do *core* (HBcAg) Está presente somente durante a infecção viral, não sendo detectado livre no plasma. A análise bioquímica desta proteína revela uma seqüência semelhante ao das cinases protéicas. Esta atividade autolítica gera outra proteína denominada de antígeno e (Silva *et al.*, 1995). O gene da proteína HBe, conhecida como proteína pré-*core*, está sobreposto ao gene de HBc (fig. 4). Descrito em 1972 por Magnius & Espmark, é uma proteína solúvel com coeficiente de sedimentação semelhante ao de proteínas séricas. O HBeAg é um bom marcador de multiplicação viral e, portanto, de infecciosidade. Para a formação deste antígeno, inicialmente é produzido um polipeptídeo precursor de 214 aminoácidos, compreendendo os 29 aminoácidos da região pré-C e os demais aminoácidos do gene C. O produto é translocado para o retículo endoplasmático onde é processado por clivagem nas duas extremidades, resultando na formação do HBeAg com 159 aminoácidos. O códon de iniciação para o HBcAg está localizado a 87nt após o sítio de iniciação da região pré-C (Chen *et al.*, 2001). O polipeptídeo do *core* possui 185 aminoácidos. O capsídeo viral é composto por 180 monômeros desta proteína que espontaneamente se unem para formar uma partícula icosaédrica. A seqüência da região pré-C codifica um domínio hidrofóbico responsável por transportar o HBeAg para o retículo endoplasmático.

Essa mudança de localização é fundamental para a alteração da antigenicidade do HBeAg, de forma que este não compartilha homologia antigênica com o HBcAg, embora ambos possuam seqüências de aminoácidos quase que idênticas. (Focaccia, 2003)

A polimerase viral, codificada pelo gene P, apresenta quatro domínios: o domínio aminoterminal, que atua como domínio terminal ou primase e é necessário para o início da síntese da fita de DNA de polaridade negativa; uma região “espaçadora”, que parece não ter nenhuma função em particular; o domínio de transcriptase reversa e o domínio C-terminal que exibe atividade de RNase H. O gene X codifica um polipeptídeo em torno de 154 aminoácidos que pode ser detectado apenas nos hepatócitos infectados (Focaccia, 2003).

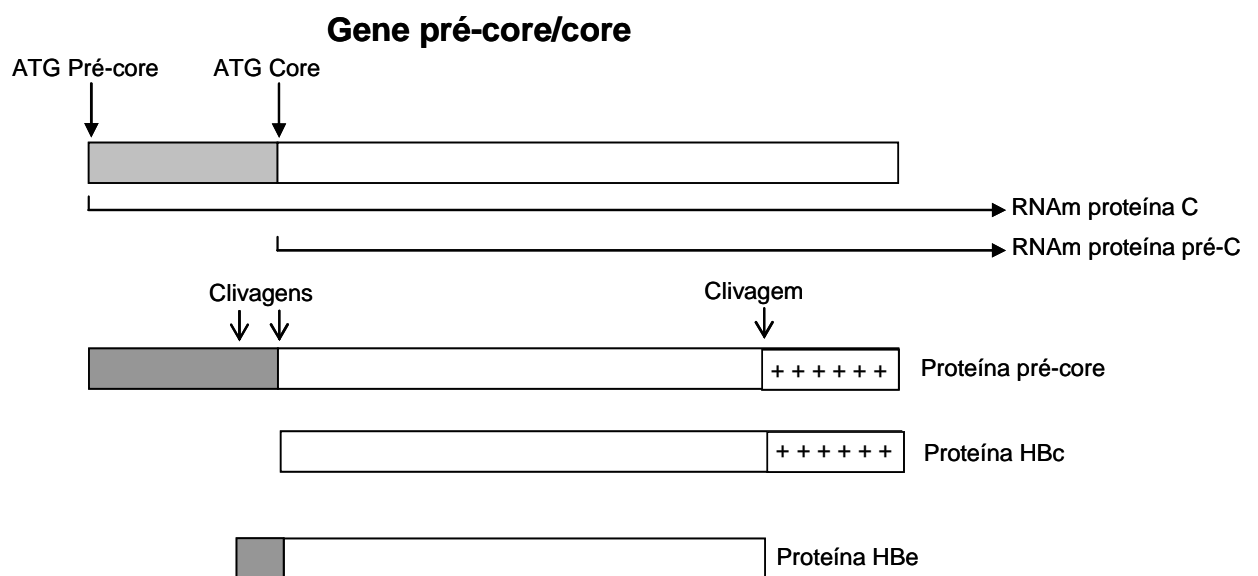


Figura 4. Gene C e pré-C, codificando as proteínas antigênicas *core* (HBcAg) e *pré-core* (HBeAg). (Fonte: Wasenauer *et al.* 1992 – com adaptações).

1.2.9. Diversidade viral – subtipos e variantes

A primeira variabilidade conhecida do HBV foi a do HBsAg que possibilitou a classificação das variantes antigênicas do HBV em nove subtipos diferentes: ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq- e adrq+. Atualmente, por comparação das seqüências nucleotídicas do gene pré-S/S ou do genoma completo, as variantes de HBV foram classificadas em seis genótipos, A-F. As bases genômicas dos determinantes antigênicos HBsAg foram elucidadas pelo sequenciamento do gene S e atualmente é conhecido que os determinantes que especificam os subtipos do

HBV residem na proteína S do HBsAg. De modo geral, os genótipos A e B abrigam linhagens adw, o genótipo C abriga linhagens adw, adr, ayr. As linhagens ayw4 e adw4 agrupam-se nos genótipos E e F, respectivamente (Focaccia, 2003).

Os subtipos e genótipos do HBV não são uniformemente distribuídos na população mundial. O genótipo D é bastante disseminado em diferentes regiões mundiais sendo bastante prevalente na área mediterrânea e Ásia. Os genótipos E e F aparentemente são originários de aborígenes da África e do Novo Mundo, respectivamente. O genótipo F é um dos mais prevalentes na América do Sul e América Central, além de ser um dos mais divergentes entre os genótipos do HBV (Focaccia, 2003).

1.2.10. Replicação viral

Muitas etapas da replicação do HBV são pouco conhecidas. Após a adsorção nos hepatócitos, o vírus penetra na célula e perde o envoltório. A multiplicação do genoma viral ocorre no núcleo da célula infectada. Primeiramente o DNA viral é convertido na forma de dupla fita circular covalentemente ligada (cccDNA). Para isso a fita positiva é completada pela DNA polimerase e as estruturas 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. Entre estes RNAs, alguns servirão como RNA mensageiros e irão ao citoplasma onde serão traduzidos para gerar a DNA polimerase do HBV, o HBcAg e o HBeAg. O RNA pré-genômico (pgRNA) será encapsidado dentro das partículas do *core*. A polimerase do HBV inicia a transcrição reversa. A cadeia de DNA de polaridade negativa é então estendida pela polimerase viral enquanto que a atividade de RNase H desta enzima degrada o molde de RNA. Quando a polimerase viral alcança a extremidade 5', uma seqüência de RNA desta extremidade é deixada intacta pela RNase H. Este oligorribonucleotídeo é utilizado como iniciador da síntese da fita de DNA de polaridade positiva, que também é gerada pela polimerase viral. Uma vez que a síntese da fita positiva é iniciada, as partículas do *core* contendo o genoma viral adquire o envoltório viral (HBsAg). Este processo ocorre no retículo endoplasmático e complexo de Golgi e então os vírions são secretados.

1.2.11. Evolução da doença – marcadores moleculares

Após a infecção pelo HBV, o vírus fica incubado por volta de 180 dias. De maneira geral, o HBsAg permanece detectável por dois ou três meses. Ainda durante o período de incubação, poucos dias após o aparecimento do HBsAg, detectam-se anticorpos dirigidos contra o HBcAg, chamados de anti-HBc. Nesta fase inicial, predominam os anticorpos da classe IgM (anti-HBc-IgM), que perduram até dois ou três meses após o início do quadro clínico. Durante a infecção, o anti-HBc da classe IgG (anti-HBc-IgG) apresenta títulos progressivamente crescentes e permanece detectável por toda a vida. Portanto, enquanto o anti-HBc-IgM representa importante auxílio diagnóstico na fase aguda (fig. 5) da infecção, o anti-HBc-IgG é um marcador clínico e epidemiológico importante desta infecção (Silva et al., 1995).

O antígeno HBe (HBeAg) é detectável após o aparecimento do HBsAg, entre o final do período de incubação e o início da fase clínica. Na doença aguda tem duração de poucas semanas. A persistência do HBeAg após 8 a 10 semanas do início das manifestações clínicas é sugestiva de evolução a cronicidade (fig. 6).

Após o desaparecimento do HBsAg, segue-se um período onde não se detecta o HBsAg nem seu anticorpo (anti-HBs). Este período recebe o nome de janela imunológica. A janela imunológica se caracteriza pela ausência de marcadores HBs, neste período, o anti-HBc-IgM pode ser o único marcador detectável. Após algumas semanas passa-se a detectar o anti-HBs, indicando resolução da infecção. Os primeiros anticorpos do sistema HBs a surgirem são os anti-pré-S1, seguidos do anti-pré-S2 e posteriormente o anti-HBs. A constatação desta seqüência de eventos é sinal de um bom prognóstico. Por outro lado, a continuidade da presença dos antígenos pré-S1 e pré-S2 indica dificuldade no clareamento e resolução da infecção (Silva et al., 1995).

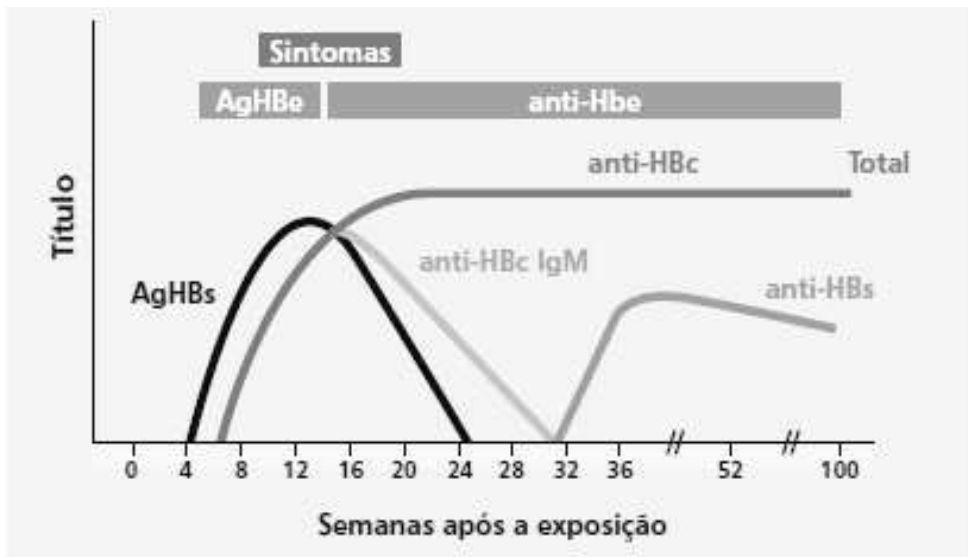


Figura 5. Curso sorológico da Hepatite B aguda. (Fonte: Ministério da Saúde, 2005)

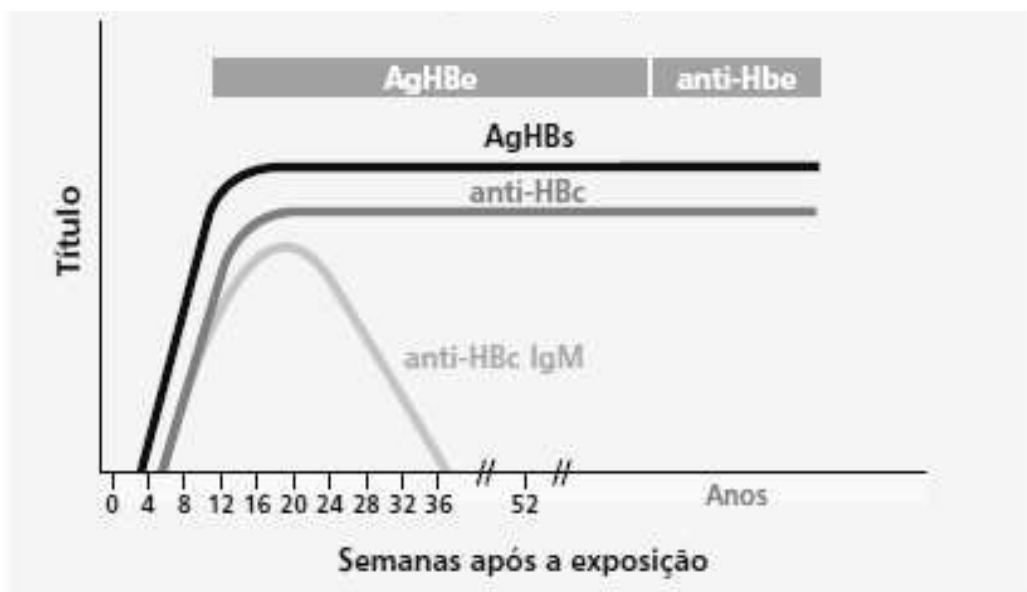


Figura 6. Curso sorológico da Hepatite B crônica. (Fonte: Ministério da Saúde, 2005)

Uma vez infectado, o indivíduo pode evoluir para três principais formas (Pinho *et al.*, 1995):

- Recuperação completa com desenvolvimento de imunidade – após a infecção aguda (sintomática ou assintomática).
- Hepatite fulminante – forma de elevada gravidade e letalidade.
- Estado de portador crônico – com diversas formas de acometimento clínico.

Cerca de 90 a 95% evoluem para a cura. Menos de 1% apresentam hepatites fulminantes e cerca de 5 a 10% persistem como HBsAg positivos por mais de seis

meses, caracterizando o estado de portador crônico do HBV. O portador crônico pode ser replicante, apresentando altos níveis dos marcadores HBsAg, HBeAg, anti-HBcAg, ou não replicante. Nestes, o genoma viral se integra ao genoma do hepatócito, aumentando de maneira significativa o risco de desenvolvimento do hepatocarcinoma. Parte dos doentes com hepatite crônica evoluem para cirrose, enquanto outros podem desenvolver hepatocarcinoma sem apresentar cirrose hepática anteriormente (Focaccia, 2003).

1.2.12. Diagnósticos laboratoriais

A confirmação diagnóstica de infecção por HBV pode ser realizada por testes moleculares (pesquisa quantitativa e qualitativa do DNA do HBV) e por testes sorológicos, que buscam identificar no soro os antígenos (HBsAg e HBeAg) e os anticorpos (anti-HBsAg, anti-HBeAg e anti-HBcAg) presentes nesta infecção, denominados marcadores moleculares (tabela 2 e 3). Estes antígenos e anticorpos aparecem e desaparecem do soro de acordo com a fase evolutiva da doença (fig. 7) e podem ser correlacionados, temporalmente, com a ocorrência de sinais clínicos, como icterícia, ou seja, de acordo com a fase da doença em que o paciente pode-se identificar diferentes marcadores moleculares (Focaccia, 2003). Desta forma, a identificação dos marcadores (antígenos e anticorpos) possibilita fazer o diagnóstico da infecção e acompanhar a evolução da doença. A metodologia mais usada para a detecção dos antígenos e anticorpos no soro é o ensaio imunoenzimático (EIA).

Durante o período de incubação, que varia de 50 a 180 dias, e de duas a seis semanas antes do aparecimento da icterícia, o único marcador molecular detectado é HBsAg. Após este período, já pode ser detectado no soro também o antígeno HBeAg, que indica, em última análise, a presença do vírus infectante e replicante. O HBeAg é marcador de replicação viral e sua positividade se associa com a presença de DNA viral no soro e com alto risco de transmissão da infecção. O marcador HBcAg é um antígeno intracelular insolúvel, que não pode ser detectado no soro (Richard Ravel, 1997). No período pré-ictérico ocorre elevação gradativa dos níveis das aminotransferases (ALT e AST), expressando a lesão hepatocítica progressiva. No período icterico, além dos sintomas da doença aguda, nota-se também o aparecimento dos anticorpos IgM do *core*, anti-HBcAg IgM, em concentrações crescentes. O anti-HBcAg IgM são marcadores importantes para o diagnóstico de hepatite B recente, sendo este o primeiro anticorpo a aparecer no soro. O

aparecimento do anti-HBeAg evidencia que o paciente caminha para a recuperação, pois este marcador é indicativo de diminuição da replicação viral. Com conseqüente queda da infectividade. Na fase de convalescença ocorre um aumento progressivo das concentrações do anti-HBsAg, que associado ao anti-HBcAg IgG, indica cura da infecção, com desenvolvimento de imunidade para este vírus. Existe um período chamado de janela imunológica que o único marcador presente é o anti-HBcAg IgM. Portanto, o anti-HBcAg pode ser detectado durante a fase aguda, na fase intermediária (janela imunológica), durante a fase de convalescença e de imunidade (Focaccia, 2003), sendo um excelente marcador para o diagnóstico da doença, pois é o único que apresenta em praticamente todas as fases da doença.

Nos pacientes que evoluem para hepatite crônica, o HBsAg permanece detectável no soro por mais de seis meses. Nestes casos, os pacientes podem permanecer com o HBeAg no soro por vários anos ou apresentar o anti-HBe em um período variável (Focaccia, 2003).

Pacientes vacinados contra a enfermidade do HBV apresentam um padrão sorológico típico, desenvolvendo apenas anticorpos contra o HBsAg (anti-HBsAg) (Focaccia, 2003).

Tabela 2. Interpretação do resultado sorológico para os seis marcadores moleculares do HBV.

Marcadores	Interpretação
HBsAg	Primeiro marcador a aparecer no soro precedendo a sintomatologia clínica. Nos casos que evoluem para a cura, deixam de ser detectado. Sua persistência por mais de seis meses indica infecção crônica. Em 1% dos casos não pode ser expresso.
IgM anti-HBcAg	A positividade da fração IgM associada à presença do HBsAg indica infecção aguda recente. Sua persistência por longo tempo tem valor preditivo de evolução para cronicidade.
IgG anti-HBcAg	Presente nas fases iniciais da doença é também marcador característico da janela imunológica. Associado ao anti-HBsAg indica desenvolvimento de imunidade ao HBV. O encontro isolado deste marcador pode indicar infecção antiga, em que o anti-HBsAg já não é mais encontrado ou encontrado em baixos níveis.
HBeAg	Importante marcador de replicação viral ativa e de infectividade.
Anti-HBeAg	Indica evolução para a cura, com parada de replicação viral.
Anti-HBsAg	Anticorpo associado à cura e ao desenvolvimento de imunidade. É o marcador que quando presente, isoladamente, indica desenvolvimento de imunidade vacinal ao HBV.

Tabela 3. Determinação da fase da doença, de acordo com o resultado sorológico.

Interpretação	HBsAg	HBeAg	Anti-HBc IgM	Anti-HBc IgG**	Anti-HBe	Anti-HBs
Susceptível	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Incubação	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Fase aguda	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
Fase aguda final	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)
ou hepatite	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
crônica	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
Início fase convalescente	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
Imunidade, infecção passada recente.	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
Imunidade, infecção passada	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
Imunidade, infecção passada	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-) ^{***}
Imunidade, resposta vacinal	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)

(Fonte: Ministério da Saúde, 2005)

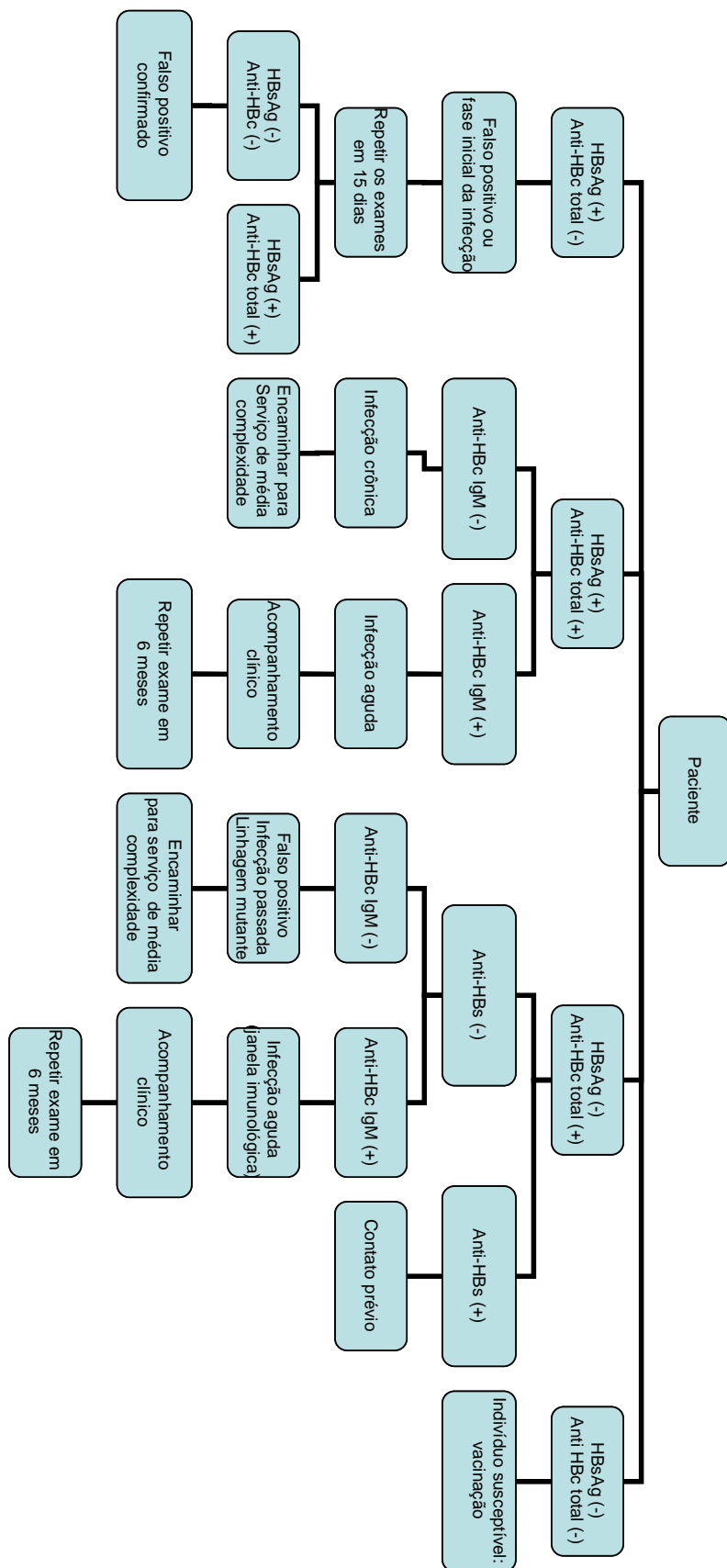


Figura 7. Fluxograma da investigação laboratorial da hepatite B. (Fonte: Ministério da Saúde, 2005 – com adaptações)

1.3. Rubéola

A rubéola ou *german measles* (sarampo alemão) é uma doença infecciosa causada pelo vírus da Rubéola (RV) (fig. 8), do gênero *Rubivirus* que freqüentemente, produz manifestações discretas ou ausentes (assintomática). A doença acomete crianças e adultos, embora esteja entre as que os médicos comumente denominam como próprias da infância. Outra designação que os médicos comumente usam para doenças virais que causam manchas na pele como a rubéola é de viroses exantemáticas (Castiñeiras, *et al.*, 2006).

Apesar de tratar-se de doença com evolução comumente benigna que cursa com febre, erupções cutâneas com duração de aproximadamente três dias e aumento de gânglios linfáticos, pode tornar-se potencialmente grave quando acomete mulheres grávidas. A infecção durante as primeiras semanas de gestação pode ocasionar o aborto e a síndrome da rubéola congênita (SRC), caracterizada por defeitos múltiplos no feto, principalmente no cérebro, retina e coração.

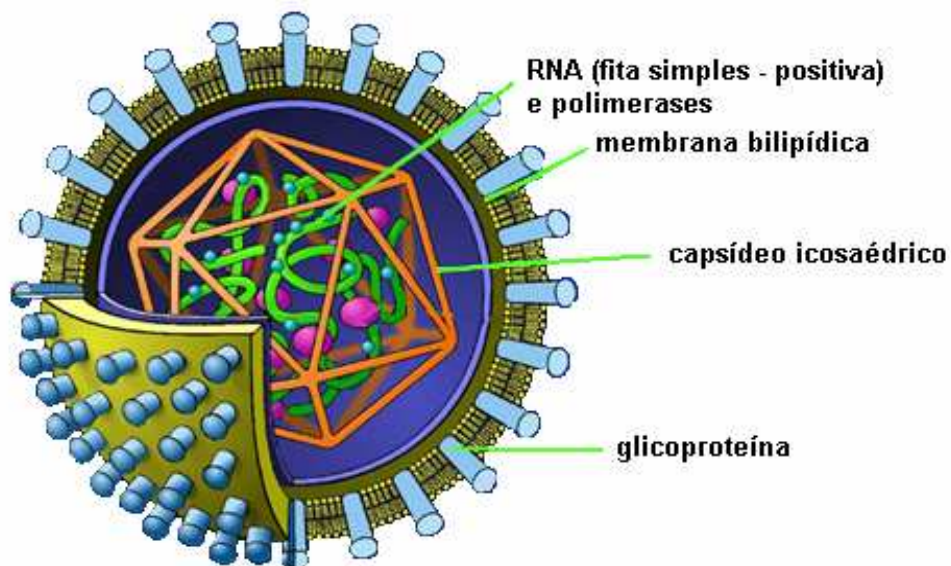


Figura 8. Esquema do vírus da Rubéola, RV.
(Fonte: <http://researchnews.osu.edu/archive/HTLV1cartoon.jpg>)

1.3.1. Descoberta do vírus da Rubéola

A rubéola foi primeiramente descrita em meados do século XVIII. Em 1740, Friedrich Hoffmann fez a primeira descrição clínica de rubéola (Ackerknecht *et al.*, 1982), considerada como uma forma de sarampo e escarlatina. A partir de então,

dois médicos alemães, consideraram a doença como uma entidade clínica definida, que recebeu a denominação de sarampo alemão até meados do século XIX. A nomenclatura atual de rubéola (do latim, vermelho) foi conferida pelo médico escocês Veale, em 1866, e reconhecida no Congresso Internacional de Medicina em Londres, em 1881. A virose era considerada banal até 1941, quando o oftalmologista australiano Norman McAlister Gregg relacionou casos de catarata e cardiopatias congênicas à ocorrência de rubéola materna (Best, 2007).

Novas pesquisas mostraram que o vírus da rubéola pode ser devastador para o feto, se a mãe for infectada durante a gravidez. Esses efeitos passaram a ser conhecidos como a síndrome da rubéola congênita, que é caracterizada por surdez, cegueira, doenças cardíacas e possível retardo mental. A descoberta de Gregg, não só possibilitou elucidar o vírus da rubéola em si, mas também deu origem à idéia de um vírus que age como um teratógeno (Lee, *et al.*, 2000).

No Brasil, um caso de catarata congênita foi descrito, pela primeira vez, em 1946 por Barbosa, em um recém-nascido cuja mãe apresentou uma doença com erupções cutâneas, no segundo mês de gestação (Steibel, *et al.*, 2007).

O vírus foi cultivado pela primeira vez em 1962, por dois grupos de pesquisadores que trabalhavam isoladamente empregando técnicas diferentes. Em 1966, Meyer e colaboradores prepararam a vacina com vírus atenuado e realizaram os primeiros ensaios no homem (Best, 2007). Em 1969, foi desenvolvida a vacina contra a rubéola. Em 1972, esta vacina foi combinada com vacinas contra sarampo, caxumba e tem sido crucial na prevenção da rubéola e seus efeitos congênicos em vários países (Atkinson *et al.*, 2007).

1.3.2. Classificação

O vírus da rubéola infecta somente humanos e é o único membro do gênero *Rubivirus*, pertencente à família *Togaviridae*. Esta família de vírus também inclui o gênero *Alphavirus* que contém pelo menos 26 espécies de vírus que infectam vertebrados, como humanos, roedores, peixes, pássaros, e invertebrados. Diferente da maioria dos vírus da família *Togaviridae*, o vírus da rubéola não é transmitido por artrópodes e sim por via aerossol e por contato.

A semelhança entre os dois gêneros pode ser notada pelo genoma de RNA fita simples, com polaridade positiva, delimitado por um capsídeo icosaédrico (Domingues, *et al.*, 1990).

1.3.3. Epidemiologia – nacional e mundial

A Rubéola possui uma distribuição mundial. Antes da implementação dos programas de vacinação, a doença era endêmica em todo o mundo e os surtos de epidemia tendiam a ocorrer na primavera e no verão de 4 a 7 anos. Estudos soropidemiológicos, em climas temperados, mostraram um aumento na proporção de soropositividade com a idade, sendo que 50% de crianças 9 a 11 anos de idade tinham evidência de infecção passada e 15 a 20% das mulheres em idade fértil permaneceram suscetíveis (Best, 2007).

A rubéola foi recentemente eliminada nos Estados Unidos e nos países escandinavos e está se tornando uma doença rara em muitos outros países. Em 1997, a incidência de ambas as doenças rubéola e síndrome da rubéola congênita (SRC) foi analisada nos países em desenvolvimento. Foi observada considerável variação na idade da aquisição de rubéola, mas a proporção de mulheres suscetíveis era, de modo geral, o mesmo que nos países industrializados antes da vacinação (15 a 20%), com uma maior taxa de suscetibilidade em áreas rurais do que nas urbanas. No entanto, mais de 25% das mulheres foram sensíveis em 12 dos 45 países estudados (Cutts, *et al.*, 1997).

A Organização Mundial da Saúde estima que ocorram mais de 100.000 casos de Síndrome da Rubéola Congênita por ano, nos países em desenvolvimento. A rubéola e a SRC são doenças de notificação compulsória desde 1996. No entanto, só a partir de 1999, com a vigilância integrada dos vírus do sarampo e da rubéola como estratégia para atingir a meta de erradicação do sarampo passou-se a documentar de forma representativa a circulação do vírus da rubéola no Brasil. Assim, surtos de rubéola foram detectados em diversos estados entre 1999 e 2001 (Ministério da Saúde, 2005).

Foram observados padrões diferenciados de ocorrência da rubéola por faixa etária, provavelmente como consequência da introdução gradual da vacina, o que acarretou deslocamento da ocorrência da doença em adultos e jovens entre 1999 e 2000. Em 1999, a maioria dos surtos ocorreu em estados que ainda não haviam implantado a vacinação contra a rubéola, sendo a população mais atingida a de menores de 15 anos. Em 2000, os surtos atingiram estados que já possuíam a vacina contra rubéola. No período de 2000 e 2001, observou-se um aumento no número de casos de Síndrome da Rubéola Congênita (Ministério da Saúde, 2005).

1.3.4. Transmissão

A transmissão do vírus RV ocorre por contato direto, secreções do nariz ou da garganta ou, ainda, pelo ar. O vírus multiplica-se na faringe e nos órgãos linfáticos e depois dissemina-se pelo sangue para a pele. O período de incubação é de aproximadamente duas semanas e o período de transmissão ocorre em uma semana antes de aparecer o exantema cutâneo, ou seja, manchas avermelhadas na pele (Best, 2007).

A SRC é transmitida pela via transplacentária, após a viremia materna. Recém-nascidos com SRC podem excretar o vírus da rubéola nas secreções nasofaríngeas, sangue, urina e fezes por longos períodos (Costello & Yungbluth, 1999).

1.3.5. Sintomas

A infecção, geralmente, tem evolução benigna e em metade dos casos não produz qualquer manifestação clínica. As manifestações mais comuns são febre branda (até 38 °C), aumento dos gânglios linfáticos no pescoço, hipertrofia ganglionar retro-ocular e suboccipital, manchas avermelhadas cutâneas (exantemas), inicialmente no rosto e que evoluem rapidamente em direção aos pés e em geral desaparecem em menos de 5 dias (Best, 2007). Outros sintomas são a vermelhidão (inflamação) dos olhos, dor muscular das articulações, de cabeça e dos testículos, pele seca e congestão nasal com espirros (Edlich *et al.*, 2005).

O vírus da rubéola só é realmente perigoso quando a infecção ocorre durante a gravidez, com invasão da placenta e infecção do embrião, especialmente durante os primeiros três meses de gestação. Nessas circunstâncias, a rubéola pode causar aborto, morte fetal, parto prematuro e malformações congênitas como cataratas, glaucoma, surdez, cardiopatia congênita, microcefalia com retardo mental ou espinha bífida (Atreya *et al.*, 2004). Outras manifestações clínicas que podem ocorrer por causa da SRC, porém transitórias, são a hepatoesplenomegalia, hepatite, icterícia, anemia hemolítica, adenopatia, meningoencefalite, entre outros (Best, 2007).

1.3.6. Estrutura viral

As partículas esféricas dos vírus da família *Togaviridae* (virions), geralmente, apresentam um diâmetro de 50 a 70 nm. São cobertos por uma membrana lipoprotéica (envelope viral) derivado da membrana da célula hospedeira, onde se observa proeminentes projeções de 6 nm, composto por proteínas do envelope viral

E1 e E2. Estas proteínas apresentam-se tanto como monômeros quanto como complexos ligados por pontes dissulfeto (E1-E1 e E1-E2). Dentro do envelope lipídico há um capsídeo icosaédrico de 40 nm de diâmetro, formado pela proteína C, esta se apresenta exclusivamente como um homodímero. (Gießauf *et al.*, 2004).

1.3.7. Proteínas – antígenos

O vírus RV contém três proteínas estruturais: E1, E2 e a proteína do capsídeo C. A proteína do capsídeo C, de 33 kDa, contém *clusters* de serina e prolina, os quais postula-se estarem envolvidos na ligação ao RNA genômico do vírus para formar os capsídeos virais (Liu, *et al.*, 1996). As proteínas do envelope viral, E1 (58 kDa) e E2 (42 a 47 kDa) são glicoproteínas transmembrana do tipo 1, observadas na forma de heterodímero E1-E2 na superfície do vírus. As proteínas E1 e E2 contém um domínio transmembrana possuindo 22 e 39 resíduos de aminoácidos, respectivamente (Frey, 1994).

Seqüências de aminoácidos têm revelado que proteínas E1 contém três sítios de N-glicosilação, enquanto para E2 o número de sítios parecem variar dependendo do isolado viral. A função dessas glicoproteínas tem sido estudada extensivamente. Usando anticorpos monoclonais, estudos mostraram que a glicoproteína E1 contém pelo menos seis epitopos, muitos dos quais estão associados em hemaglutinação e neutralização (Chaye *et al.*, 1992). A função da N-glicosilação na antigenicidade e imunogenicidade de E1 tem sido investigada. Vários estudos têm mostrado que a subunidade glicoprotéica E1 inclui epitopos que servem como alvo para anticorpos neutralizantes e, associada a E2, é responsável por induzir as respostas imunes contra o RV. A proteína E1 também tem um importante papel na fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira, iniciando o ciclo de replicação do RV (Law *et al.*, 2006).

1.3.8. Genoma

O RV é um vírus de RNA fita simples positiva, com um genoma de aproximadamente 10000 nucleotídeos, codificando duas *ORFs*. A *ORF* da extremidade 5' possui 6.345 nucleotídeos e codifica as proteínas virais não estruturais p150 e p90, enquanto que a *ORF* da extremidade 3' possui 3.189 nucleotídeos e codifica para as proteínas estruturais, capsídeo (C), E2 e E1 (Yao *et al.*, 1998). As proteínas não estruturais são formadas pela clivagem proteolítica da

poliproteína precursora p200 em dois fragmentos p150 e p90. As proteínas estruturais são clivadas pela poliproteína p110 de um RNA mensageiro (mRNA) subgenômico 24S. A poliproteína p110 é translocada para dentro do retículo endoplasmático por dois peptídeos finais separados localizados em E1 e E2. Dentro do retículo endoplasmático, a proteína do capsídeo é clivada de E2, e E2 é clivada de E1 (Baron *et al.*, 1992).

1.3.9. Diversidade viral – subtipos e variantes

A proteína E1 é bastante conservada (Frey *et al.*, 1998). Comparando seqüências de E1 de 63 vírus da rubéola isolados na Europa, Ásia e América do Norte, entre 1961 e 1997 e observaram uma identidade de nucleotídeos superior a 95%, sendo que a seqüência de aminoácidos diferiu menos de 3%. Tendo como base a seqüência desse gene E1, podem-se distinguir dois clados e dez genótipos de RV, sendo que oito dos dez genótipos já tiveram os seus genomas seqüenciados (Zhou *et al.*, 2007). De acordo com estes autores, os vírus dos oito genótipos seqüenciados apresentam 78% de identidade e possuem o mesmo número de nucleotídeos em cada uma das *ORFs* e nas regiões não traduzidas (5' e 3'UTR). A análise da diversidade viral é importante para a escolha das regiões antigênicas estudadas, pois algumas regiões são encontradas em poucos subtipos e variantes, não sendo indicadas para estudos de grande escala.

1.3.10. Replicação viral

A rota de entrada do vírus da rubéola na célula hospedeira não está completamente elucidada. Contudo, o RV pode estabelecer infecções em uma grande variedade de linhagens celulares em cultura. Estudos indicam que o processo de infecção do RV é mediado pela interação da partícula viral com os fosfolípidos e glicolípidos da célula hospedeira (Mastromarino *et al.*, 1990).

Estudos bioquímicos têm mostrado que a exposição das glicoproteínas E1 e E2 a pH 6 induz uma mudança conformacional nas glicoproteínas que favorecem a fusão do envelope viral às membranas do endossomo. Essa hipótese foi corroborada pelos estudos que demonstraram que a replicação viral foi inibida após tratamento com agentes lisossomotrópicos (Petruzzielo *et al.*, 1996).

O RV é caracterizado por ter uma baixa taxa de replicação, o que reflete em um período de latência viral de 8 a 12 horas em nível celular. Durante a infecção

pelo RV, formas distintas de RNA viral podem ser detectadas: o RNA genômico fita simples 40S (3800 kb), RNA subgenômico 24S (1200 kb) e intermediários replicativos virais (RI) 21S, representando duplas fitas de RNA (dsRNA) (Lee & Bowden, 2000). O RNA genômico, que é dotado de 5' *cap* e é poliadenilado, funciona como RNA mensageiro de proteínas não estruturais codificadas na extremidade 5' do genoma. Essas atuam no processo de replicação e tradução do RNA viral, que resulta na formação de um RNA complementar (antisense) feito a partir do RNA genômico. O RNA antisense é o molde para o genoma das novas partículas virais (Baron *et al.*, 1996). Um mRNA subgenômico (referente à extremidade 3' do genoma) é traduzido em todas as proteínas estruturais do vírus. As proteínas estruturais são traduzidas como uma poliproteína C-p62-6K-E1, que é processada co-traducionalmente. A proteína C é liberada pela sua atividade de autoprotease, p62 é um precursor intracelular de E2 e os 6K são peptídeos transmembrânicos que contêm a seqüência líder para E1. Ambos RNAs 40S e 24S podem ser detectados no término do período viral latente, com proteínas estruturais virais aparecendo 4 horas depois (Hemphill *et al.*, 1988). Os picos de produção do vírus ocorrem durante o período de 36 a 48 horas pós-infecção.

1.3.11. Aspectos clínicos – evolução da doença

A rubéola apresenta um período de incubação, em média, de 14 dias. Após este período começam a aparecer os sintomas, quando a infecção é sintomática. Há um risco de 90% do vírus da mãe afetar o desenvolvimento do feto, resultando na Síndrome da Rubéola Congênita – CRS. Recém-nascidos com SRC podem excretar o vírus da rubéola por vários meses ou até anos (Costello & Yungbluth, 1999).

Anticorpos específicos para o vírus da rubéola aparecem logo após o início da doença. A presença de IgM positiva significa que houve infecção recente. Esses anticorpos, geralmente, não são mais detectados após quatro a seis semanas do início do exantema. No entanto, anticorpos IgG, usualmente, persistem por toda vida.

O feto infectado é capaz de produzir anticorpos específicos IgM e IgG para rubéola antes mesmo do nascimento (fig. 9). Os anticorpos IgM maternos não ultrapassam a barreira placentária, portanto, a presença de anticorpos IgM específicos para rubéola no sangue do recém-nascido é evidência de infecção congênita. Os anticorpos IgM podem ser detectados em 100% das crianças com

Síndrome da Rubéola Congênita até o 5º mês, em 60% em crianças de 6 a 12 meses e em 40% em crianças de 12 a 18 meses. Raramente são detectados após o 18º mês.

Os anticorpos maternos da classe IgG, no entanto, podem ser transferidos passivamente ao feto através da placenta, sendo encontrando, também, nos recém-nascidos normais, de mães imunes à rubéola. Não é possível diferenciar os anticorpos IgG maternos daqueles produzidos pelo próprio feto, quando infectado intraútero. Como a quantidade de anticorpos IgG maternos diminui com o tempo, desaparecendo por volta do 6º mês, a persistência dos níveis de anticorpos IgG no sangue do recém-nascido é altamente sugestiva de infecção intra-uterina (Ministério da Saúde, 2005).

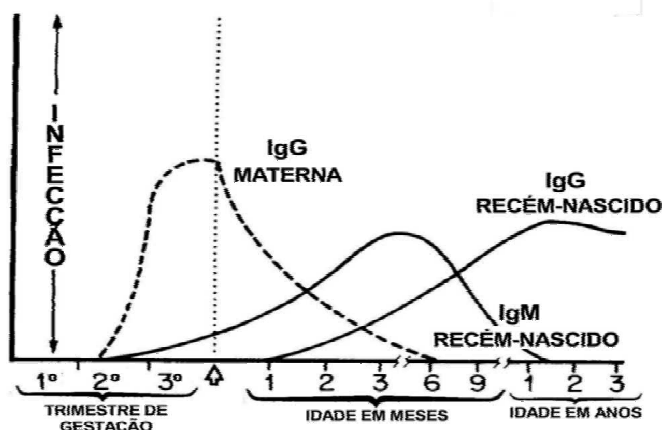


Figura 9. Curso sorológico Síndrome da Rubéola Congênita. Resposta imunitária. (Fonte: Ministério da Saúde, 2005)

1.3.12. Diagnósticos laboratoriais

É difícil diferenciar clinicamente a rubéola de outras doenças exantemáticas. É importante, portanto, a confirmação do diagnóstico por exame laboratorial (Costello & Yungbluth, 1999).

Os exames laboratoriais são imprescindíveis para o estabelecimento do diagnóstico definitivo. Para a investigação de casos suspeitos de Síndrome da Rubéola Congênita, deve ser colhida uma amostra de sangue logo após o nascimento, quando há suspeita ou confirmação de infecção materna durante a gestação, ou logo após a suspeita diagnóstica, em crianças de idade menor que um ano (Ministério da Saúde, 2005).

Assim como para a hepatite B, ensaios imunoenzimáticos (EIA) para detecção de IgM e IgG rubéola-específicas é a metodologia mais usada atualmente para detecção do RV. No entanto, esses ensaios têm limitações pela não-correlação das taxas de IgM e IgG com a presença do RV (Best, 2007). Dentre os ensaios imunoenzimáticos usados com mais frequência para detecção do RV, destaca-se o ELISA. Praticamente a maioria dos anticorpos contra proteínas estruturais do RV são detectados por ELISA RV-IgG. Vários anticorpos monoclonais têm sido usados para estudar os epítopos envolvidos na hemaglutinação e na neutralização do RV (Chaye *et al.*, 1992).

1.4. Estratégia multiepítopo para diagnóstico

Por meio de pesquisa sobre os principais epítopos contra o vírus da hepatite C, Dipti e colaboradores (2006) sugeriram a construção de um antígeno multiepítopo sintético para o diagnóstico de hepatite C.

A escolha desses epítopos foi baseada em quatro critérios. Tinham que ser (i) imunodominantes, (ii) específicos para anticorpos anti-HCV (iii) lineares, e (iv) filogeneticamente conservados na maioria dos genótipos do HCV circulantes nas diferentes partes do mundo. Esses critérios se justificam pela necessidade do antígeno multiepítopo reconhecer anticorpos contra HCV de forma específica e eficiente. Para isso, é necessário que os epítopos escolhidos sejam significativos e apresentem reatividade em soros de pacientes em todo o mundo. É necessário, também, trabalhar com epítopos lineares e conservados, de modo que, quando incorporados à proteína sintética, conservem a sua imunorreatividade nos vários sorotipos de HCV. Caso contrário, se epítopos conformacionais fossem utilizados na construção do antígeno sintético, é improvável que eles iriam manter sua conformação e integridade, portanto, não manteriam as suas imunorreatividades no antígeno sintético.

Constatada a capacidade do antígeno multiepítopo sintético de reconhecer anticorpos específicos para hepatite C, foi analisada sua potencial utilização como diagnóstico anti-HCV. O estudo de Dipti mostrou que a alta densidade de epítopos específicos, filogeneticamente conservados e imunodominantes que foram selecionados para construir a proteína sintética multiepítopo contribuiu para um

elevado grau de especificidade e sensibilidade. Além disso, a estratégia da utilização de uma única proteína recombinante multiepitopo elimina a necessidade de sintetizar e expressar várias seqüências peptídicas.

1.4.1. Epitopos contra o HBV

Os epitopos do vírus HBV reconhecidos pelos anticorpos variam com os estágios da doença. A região genômica precore/core (fig. 10) mostrou-se a mais conservada e, portanto a melhor indicada para análises peptídicas. Em infecção aguda, os anticorpos anti-HBc reconhecem todos os peptídeos. Após a fase aguda, os anticorpos anti-HBc reconhecem principalmente epitopos localizados na região central da proteína HBc, do resíduo 74 ao 123 (Tordjeman *et al*; 1993).

Em testes realizados por Sallberg e colaboradores (1991), utilizando anticorpos monoclonais HBe/HBc, foi observado que todos os mAbs anti HBe/HBc reconheceram o peptídeo: 126-135, sendo que a região 128-133 foi determinada como essencial. Em uma segunda pesquisa de Sallberg e colaboradores (1991), com 46 pacientes para analisar a reação dos peptídeos virais com anticorpos de pacientes infectados, foi observado que dois pacientes reconheceram o peptídeo 76-83 do HBc/eAg, sendo Asp78, Pro79, Arg82, and Asp83 os resíduos essenciais. Dois de dez casos de HB aguda, reagiram com o peptídeo 61-85. Cinco dos doze casos de pacientes HBeAg positivos, reagiram fracamente com os peptídeos 41-60, 61-85, 121-140 e/ou 141-160. Oito dos 12 casos de pacientes anti-HBe positivos reagiram com o peptídeo 121-140. IgG de coelhos imunizados reconheceram os peptídeos 1-20, 61-85 e 71-90.

Peptídeos localizados na região hidrofílica da proteína C foram sintetizados por Colluci e colaboradores (1988). Nesta pesquisa, soros de vinte pacientes, três anticorpos monoclonais anti-HBc e dois anticorpos monoclonais anti-HBe foram testados. O peptídeo 107-118 reagiu com todos os soros e mAbs anti-HBc testados.

Takahashi *et al.*, (2001), utilizando anticorpos monoclonais contra o epitopo 135-145 do HBcAg, mostraram que este peptídeo é equivalente aos utilizados em testes de diagnósticos anti-HBc de rotina.

```

precore/core      MQLFPLCLIIISCSCPTVQASKLCLGWLWGMDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLL 60
Core              -----MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLL 31
                  *****

precore/core      DTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDPASRELVVSYVNV 120
Core              DTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDPASRELVVSYVNV 91
                  *****

precore/core      NMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVVRR 180
Core              NMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVVRR 151
                  *****

precore/core      RGRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSRESQC 212 HBe 17kDa – forma dímeros
Core              RGRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSRESQC 183 HBc 21 kDa – forma capsídeo
                  *****

```

Figura 10. Sequência protéica dos antígenos HBe e HBc.

1.4.2. Epitopos contra o RV

Por meio de altas titulações de IgG anti-RV em indivíduos hiperimunizados com vacinas contra rubéola, foi possível identificar 3 epitopos (Lozzi, L; *et al.*, 1990; Fig. 11) EP-1, EP-2, EP-3) dos 4 epitopos neutralizantes para E1. BCH -178 é um peptídeo representando o quarto domínio neutralizante de E1 e que é o alvo para anticorpos neutralizantes nos humanos em resposta ao RV (Mitchel *et al.*, 1993). Esta região é altamente conservada entre os diferentes tipos de RV, em contraste a outros domínios neutralizantes (Frey *et al.*, 1998). Um único domínio neutralizante fraco tem sido identificado na proteína E2 usando anticorpos neutralizantes. Dois peptídeos sintéticos análogos às regiões BCH-178 e EP-3 mostraram um estímulo à proliferação dos linfócitos (Mitchell *et al.*, 1993) e uma proliferação anormal dos linfócitos em resposta a 3 peptídeos sintéticos da proteína E1 foi observado em pacientes com artrite associada à rubéola (Mitchell *et al.*, 1993). Dessa forma, essas regiões são bastante imunoreativas e promissoras, podendo ser usadas em ensaios para a detecção de anticorpos anti-RV.

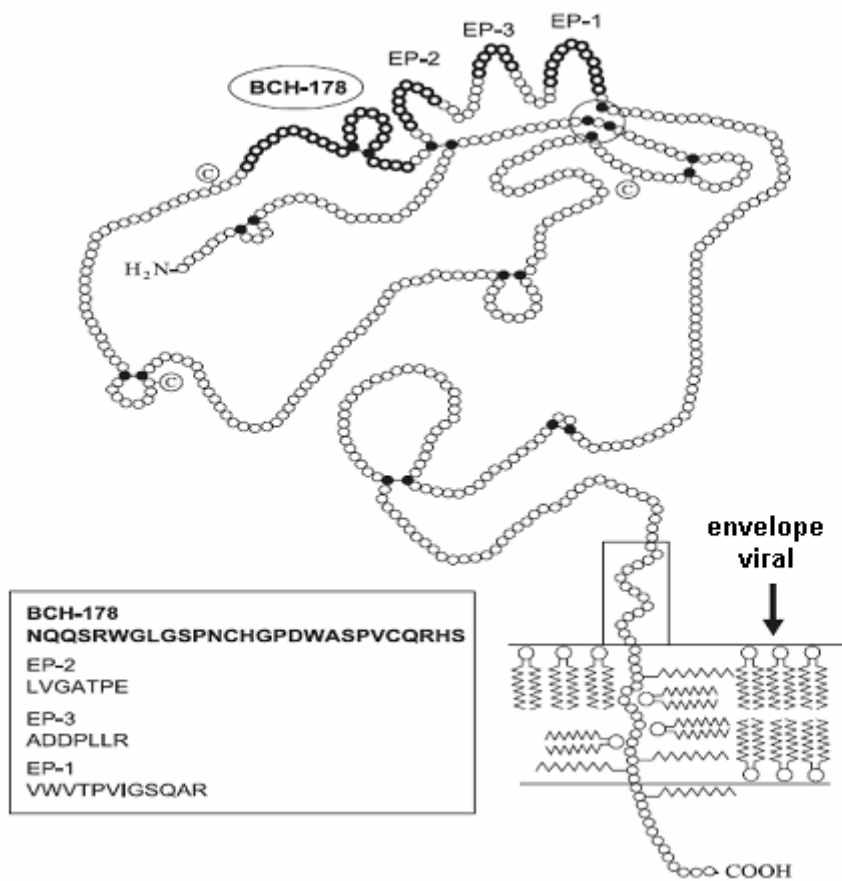


Figura 11. Um modelo da proteína E1 do vírus da rubéola. Círculos em negritos indicam todos os domínios neutralizantes lineares conhecidos na proteína E1. (Fonte: Gießauf *et al*; 2004).

2. Justificativa

Embora muito utilizado, o teste de detecção de Anti-HBs pode ser ambíguo por referir-se a pacientes curados de hepatite B ou, simplesmente, pacientes vacinados contra a doença mas que nunca entraram em contato com o HBV (Jpelaar & Hovanec-Burns, 1999). Desta forma, para obter um resultado mais conclusivo sobre indivíduos que já entraram em contato com o vírus, é necessário fazer testes de detecção de anti-HBc, anticorpo produzido apenas pelo contato direto com a proteína antigênica do vírus (AgHBc) (Ferreira, 2000).

Assim como a hepatite B, a infecção pelo vírus da rubéola é uma doença comum na maioria dos países em desenvolvimento e é um problema de saúde pública no Brasil, onde se observa surtos a cada 7 a 10 anos. Em 1996, a rubéola passou a fazer parte da lista de doenças de notificação compulsória no Brasil (Agência Saúde, 2006).

A construção de polipeptídeos recombinantes multiepitopo possibilita o diagnóstico de hepatite B e rubéola em hemocentros, tanto para evitar o desperdício de bolsas de sangue, como para garantir a utilização de sangue saudável, além de oferecer um diagnóstico preciso para população em geral. No entanto, estas técnicas ainda são pouco exploradas no País.

Os kits de diagnósticos comerciais para hepatite B e para rubéola, baseados em ensaios imunoenzimáticos (EIA) detectam anticorpos específicos contra epitopos presentes nas respectivas proteínas virais. O Brasil importa e utiliza estes kits de diagnóstico. Para contornar esse problema, a estratégia de produção de proteínas recombinantes na forma de multiepitopo em *Escherichia coli* torna-se uma possibilidade viável. Não há relato na literatura de um trabalho genuinamente brasileiro sobre a construção de proteínas multiepitopos. Dessa forma, essa tecnologia, além de aumentar a variabilidade dos epitopos nos kits possivelmente irá reduzir custos, pois reuniria, em uma única cadeia polipeptídica, os diversos antígenos necessários para um diagnóstico confiável.

3. Objetivos

3.1. Geral

Este trabalho encontra-se inserido em um projeto maior que busca utilizar técnicas de engenharia genética que permitam a construção de peptídeos recombinantes para uso em kit de diagnóstico e/ou para produção de anticorpos monoclonais e/ou para pesquisa e desenvolvimento de vacinas, fármacos e medicamentos para hepatite C, citomegalovírus, AIDS e dengue além da hepatite B e da Rubéola. O projeto vai desde o desenho de genes sintéticos codificando proteínas multiepitopos até o seu potencial uso biotecnológico.

3.2. Específicos

- Desenhar os genes que codificam para as proteínas multiepitopos dos vírus HBV e rubéola, sintetizá-los quimicamente visando sua clonagem;
- Induzir a expressão das proteínas recombinantes em *Escherichia coli*.
- Purificar as proteínas recombinantes para verificar a sua funcionalidade.
- Realizar teste de atividade imunológica das proteínas por ELISA visando a sua aplicação em diagnóstico de Hepatite B e rubéola.

4. Materiais e Métodos

4.1. Considerações gerais

Todas as reações enzimáticas relacionadas à manipulação de ácidos nucleicos seguiram protocolos consagrados (Sambrook, *et al.*, 1991) com algumas modificações. Os reagentes utilizados no preparo das soluções foram os de maior grau de pureza disponíveis no laboratório e a água usada foi destilada ou milli-Q. As soluções e meios de cultura foram esterilizados a 120°C durante 15 min. As enzimas e tampões utilizados foram adquiridos das empresas Promega, New England Biolabs e GE.

4.2. Linhagens de *E. coli*

As linhagens de *E. coli* utilizadas neste trabalho, com seus respectivos genótipos, estão representadas na tabela abaixo.

LINHAGEM	GENÓTIPO
EPI 300	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ- rpsL (StrR) nupG trfA dhfr
BL21(DE3)pLysS	F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3) pLysS(cmR)

A linhagem EPI 300 foi escolhida pela disponibilidade no laboratório, utilizada para inserir o plasmídeo pET 21a contendo o gene recombinante, com o intuito de apenas replicar a quantidade de plasmídeo. A linhagem BL21(DE3)pLysS foi escolhida por ser uma célula já preparada, por engenharia genética, para proporcionar a indução de plasmídeos pelo indutor IPTG, através do promotor T7.

4.3. Meios de cultura

4.3.1. Meio LB pH 7,4.

Peptona de Caseína	1,0 %
Extrato de Levedura	0,5 %
NaCl	0,5 %

Para o preparo de meio sólido era adicionado 1,5 % de ágar bacteriológico ao meio LB. Quando necessário, foi adicionado ampicilina ao meio LB para uma concentração final de 100 mg/ml.

4.3.2. Meio SOB pH 7,0

Bacto-triptona	2,0%
Extrato de Levedura	0,5%
NaCl	10,5 mM
KCl	10 Mm

4.3.3. Meio SOC

Para o preparo de meio SOC foram adicionados 98% de meio SOB, 1% de glicose 2M e 1% de solução estoque de íons magnésio 2 M de ($MgCl_2$, 1M + $MgSO_4$, 1M).

4.4. Soluções

4.4.1. New England Biolabs

4.4.1.1. *NEB 2*

Tampão Tris-HCl	10 mM, pH 7,9
$MgCl_2$	10 mM
DTT	1 mM

4.4.1.2. *NEB 4*

Tampão Tris-Acetato	20 mM, pH 7,9
Acetato de Magnésio	10 mM
Acetato de Potássio	50 mM
DTT	1 mM

4.4.2. Soluções para gel de agarose

4.4.2.1. Gel de agarose 0,8%

Agarose	0,8%
TEB	0,5%

4.4.2.2. Tampão de corrida – TEB 10X, pH 8,0

Trizma-base	0,89 M
Ácido Bórico	0,89 M
EDTA	0,08 M

4.4.2.3. Tampão de amostra – TEB 6X

Glicerol	50%
Azul de Bromofenol	0,01%
TEB	6 X

4.4.3. Soluções para gel SDS-PAGE

4.4.3.1. Tampão de Corrida 10X

Trizma-base	125 mM
Glicina	0,96 M
SDS	0,5%

4.4.3.2. Tampão de amostra 2X

Tris-HCl	100 mM, pH 6,8
SDS	2%
2-Mercaptoetanol	10%
Azul de Bromofenol	0,01%

4.4.3.3. Gel separador SDS-PAGE (12%)

Sol. Acril/bis 30% (29:1)	12%
Tris-HCl	0,4 M; pH 8,8
SDS	0,1%
Persulfato de amônia	0,045%
TEMED	0,075%

4.4.3.4. Gel concentrador SDS-PAGE (5%)

Sol. Acril/bis 30% (29:1)	5%
Tris-HCl	0,12 M, pH 6,8
SDS	0,1%
Persulfato de amônia	0,12%

TEMED	0,05%
4.4.3.5. Solução Corante SDS-PAGE	
Metanol	40%
Ácido acético glacial	10%
“Coomassie Brilliant Blue R250”	0,25%
4.4.3.6. Solução Descorante SDS-PAGE	
Metanol	40%
Ácido acético	10%
4.4.4. Tampões para extração plasmidial (mini-preparação)	
4.4.4.1. Tampão TE (solução I)	
Tris-HCl	10mM, pH 8,0
EDTA	1mM
4.4.4.2. Solução II	
NaOH	200mM
SDS	1%
4.4.4.3. Solução III	
Acetato de potássio	5M, pH 4,8
4.4.5. Soluções para Western blotting	
4.4.5.1. Tampão PBS 10X, pH 7,2	
NaCl	137 mM
Na ₂ HPO ₄	7 mM
NaN ₃	0,02% (p/v)
4.4.5.2. Tampão PBST 1X	
Tampão PBS	1 X
Tween 20	0,05% (v/v)
4.4.5.3. Tampão APB	
NaCl	100 mM
Tris-base	100 mM, pH 9,5
MgCl ₂	5 mM
4.4.5.4. Solução de transferência	
Tris-base	48 mM
Glicina	39 mM

SDS	0,037%
Metanol	20%

4.4.5.5. Solução de bloqueio

Leite em pó desnatado (Molico)	5%
PBS	1X

4.4.5.6. Solução de revelação de Western blotting (Zymed Laboratories)

NBT (Nitroblue tetrazolium salt)	10X
BCIP (5-bromo-4chloro-3indolyl phosphate)	10X

4.4.6. Soluções para purificação das proteínas recombinante

4.4.6.1. Solução de Lise, pH 8,0

NaCl	300 mM
Na ₂ HPO ₄	50 mM
Imidazol	10 mM
Uréia	8 M

4.4.6.2. Solução de Lavagem, pH 8,0

NaCl	300 mM
Na ₂ HPO ₄	50 mM
Imidazol	20 mM
Uréia	8 M

4.4.6.3. Solução de Eluição, pH 8,0

NaCl	300 mM
Na ₂ HPO ₄	50 mM
Imidazol	500 mM
Uréia	8 M

4.4.7. Soluções para os teste de ELISA

4.4.7.1. Tampão de diálise

NH ₄ CO ₃	10 mM
---------------------------------	-------

4.4.7.2. Tampão de diálise para Dicroísmo Circular

MOPS	2mM
------	-----

4.4.7.3. Tampão de adsorção, pH 9,5

Na ₂ HCO ₃	10 mM
----------------------------------	-------

Na₂CO₃ 3 mM

4.4.7.4. Tampão de lavagem

PBST 0,05%

4.4.7.5. Solução de bloqueio

Leite em pó desnatado (Molico) 5%

PBS 1X

4.4.7.6. Tampão de revelação

pNPP 2mg/mL de APB

4.4.7.7. Diluição de anticorpos

Monoclonal Anti-poly Histidine – Alkaline phosphatase antibody produced in mouse (Sigma), diluído em solução de bloqueio 1:1000

Anti-Human IgG (Fc specific) – Alkaline phosphatase antibody produced in goat (Sigma), diluído em solução de bloqueio 1:5000

Anti-Human IgM (μ-chain specific) – Alkaline phosphatase antibody produced in goat (Sigma), diluído em solução de bloqueio 1:5000

α-Anti-Human IgG – Alkaline phosphatase antibody produced in goat (Sigma), diluído em solução de bloqueio 1:25000

4.5. Preparo das células competentes

4.5.1. EPI 300 - Eletrocompetente

Uma colônia isolada de EPI300 foi inoculada em 50 mL de meio SOB em um frasco Erlemmeyer de 500 ml e deixada crescer por 16 horas sob agitação a 37°C . No dia seguinte, 500 µl dessa cultura foram diluídos em 500 ml de meio SOB em um frasco Erlemmeyer de 1 litro. Após crescer por 2 a 3 horas, sob agitação a 37°C, até atingir uma densidade ótica a 600 nm de 0,8, as células foram coletadas por centrifugação a 2600 g por 10 minutos. As células foram então ressuspensas em 40 ml de glicerol 10%, gelado e submetidas a uma nova centrifugação como a anterior, a 4°C. Este procedimento foi repetido mais uma vez.

As células foram então suspensas para uma densidade ótica a 600 nm de 200 a 250 e divididas em alíquotas de 100µL. Essas alíquotas foram congeladas e armazenadas a -80°C.

4.5.2. *E. coli* BL21 (λ DE3) pLysS - termocompetentes

Inicialmente, foi feito um pré-inóculo das células de *E. coli* a serem transformadas (um clone isolado, em 5 ml de meio LB) e incubou-se a 37°C por 16 horas. Após este período, um alíquota de 1 ml da cultura obtida foi utilizada para inocular 30 ml de meio LB incubando-se a 37°C, sob agitação, até atingir uma densidade ótica a 600 nm de 0,2 -0,3 (equivalente a 10^8 células/ml). As células foram coletadas por centrifugação a 5000 g por 10 minutos, a 4°C e o sedimento foi suspenso em 10 ml de cloreto de cálcio 100 mM, incubando-se, a seguir, no gelo por 30 minutos. Depois de centrifugar nas condições acima descritas, o sedimento foi ressuspendido em 1 ml de solução de cloreto de cálcio 100 mM e glicerol 15%. Alíquotas de 100µL foram transferidas para tubos Eppendorf novos e mantidas a -80°C.

4.6. Transformação de bactéria

4.6.1. EPI 300 – Eletroporação

Para aumentar a quantidade de material e possibilitar análises dos genes rMEHB e rMERUB, os vetores adquiridos pela empresa *Epoch Biolabs* foram inseridos em *E. coli* EPI300 por transformação com eletroporação (Sambrook *et al.* 2001). Os sistemas de transformação foram mantidos no gelo durante 30 minutos. À linhagem eletrocompetente foram adicionados 5 µL do sistema de ligação (gene MEHB ou o gene MERUB e vetor pET21a). Foram transferidos 100 µL da mistura de células e sistema de ligação para a cubeta do eletroporador, o sistema foi submetido a eletroporação em equipamento GenePulser, da BioRad e foi dado um choque de 3.9 V. Os parâmetros utilizados foram de 25 µF, 200 Ω. As células foram removidas para um Falcon de 15 mL contendo 3 mL de meio SOC. O inóculo foi incubado por 45 minutos no shaker a 37°C a 250 rpm. Em seguida, foi feita uma placa de LB ágar utilizando 10 µL de células transformadas.

4.6.2. *E. coli* BL21 (λ DE3) pLysS – Choque térmico

A transformação da célula hospedeira, *E. coli* BL21 (λ DE3) pLysS, foi realizada utilizando a técnica de choque térmico, possibilitando a inserção da seqüência clonada no vetor de expressão a (Sambrook *et al.*, 2001). Em um

ependorff estéril de 1,5 mL foi adicionado 100 µL de células competentes e 7,5 µL da solução de DNA (vetor de expressão + rMEHB ou rMERUB). O sistema foi incubado no gelo por 30 min. Em seguida, foi incubado a 42°C por 90 segundos. Foi adicionado 1 mL de meio LB e incubado a 37°C por 40 minutos aproximadamente. A cultura foi semeada em 2 placas com 100 µL e 150 µL da suspensão de células em placa de meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina.

4.7. Mini-preparação plasmidial – extração de DNA

Para verificar a presença dos sítios de restrição nas extremidades do gene, foi feita uma extração plasmidial (mini-preparação) utilizando o kit da empresa GE Healthcare. Três colônias isoladas da placa de células transformadas foram inoculadas em 5 mL de meio LB cada. Os inóculos foram incubados por 16 h no shaker a 37°C 250 rpm. Foram centrifugados 4,5 mL de cada inóculo e descartado o sobrenadante. Os pellets foram ressuspensos em 200 µL de solução 1 do kit. Em seguida, foram adicionados 200 µL de solução 2 e misturada gentilmente. Foram adicionados 400µL de solução 3 e misturados gentilmente até aparecer uma massa de restos celulares. Os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 5 min. Os sobrenadantes foram removidos para as colunas do kit e foram centrifugados a 12.000 rpm por 1 min. O líquido que atravessou a coluna foi descartado e à coluna foram adicionados 400 µL da solução 3 e centrifugados a 12.000 rpm por 1 min. Em seguida, à coluna foi adicionados 400 µL de solução de lavagem e centrifugados a 12.000 rpm por 1 min. Depois de descartar o líquido que atravessou a coluna, esta foi recentrifugada por 12.000 rpm por 30 seg. O plasmídeo foi eluído com 50µL de H₂O milli-Q, centrifugados a 12.000 rpm por 30 seg.

4.8. Digestão

O fragmento extraído foi analisado com as endonucleases de restrição *Nde* I e *Xho* I da New England Biolabs. As digestões foram feitas para um volume final de 10 µL. Em cada sistema foram adicionados 1 µL de enzima, 3 µL de DNA no caso das digestões simples e 6 µL no caso das digestões com ambas enzimas. Para cada enzima escolheu-se o tampão mais indicado pela empresa fornecedora

(concentração final de 0,5X), além de BSA (concentração final 1X) nos casos das digestões envolvendo *Xho* I.

4.9. Indução

O procedimento foi realizado para verificar a capacidade da linhagem de *E. coli* BL21 (λ DE3) pLysS de expressar o polipeptídeo desejado. Três clones transformantes MEHB::pET21a BL21 pLysS e três clones MERUB::pET21a BL21 pLysS foram selecionados e coletados. Cada um foi inoculado em 5 mL de meio LB com 100 μ L/mL de ampicilina. Os inóculos cresceram por aproximadamente 16 h a 37°C sob agitação de 250 rpm. Foram inoculados 1,25 mL de cada pré-inóculo em 25 mL de meio LB contendo ampicilina. O inóculo foi incubado sob agitação de 250rpm a 37°C por aproximadamente 90min, até atingir a OD₆₀₀ de 0,6. Em seguida, foram coletados 2 mL das culturas (tempo 0), controle negativo, depois os inóculos foram submetidos a indução de expressão sendo adicionado ao meio 25 μ L do indutor IPTG 1 M afim de se obter uma concentração final de IPTG 1mM e retornou-se a incubação a 37°C. Depois de 30min foi retirado uma alíquota de 1 mL (tempo 1), depois de 1h30min foi retirado uma outras alíquota de 1 mL (tempo 2) e depois de 2h30min foi retirado uma terceira alíquota de 1 mL (tempo 3). As amostras retiradas nos respectivos tempos foram centrifugadas a 10000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 50 μ L de tampão de amostra TEB 6X.

4.10. Análise em gel

4.10.1. Agarose

As amostras de DNA em tampão de amostra 1X foram aplicadas no gel e, em seguida, a eletroforese se processou em tampão de corrida TEB 1X, conforme descrito em Sambrook e cols.(1991). Para a visualização do DNA utilizou-se o transiluminador de ultra-violeta LKB-Pharmacia. Utilizou-se como marcadores de massa molecular do DNA do fago λ digerido com *Eco* RI e *Hind* III e o marcador *100 pb ladder*, da LIFE Technology.

4.10.2. Poliacrilamida

As proteínas foram analisadas em géis de poliacrilamida contendo SDS segundo Sambrook & cols. (1991) com modificações. Inicialmente, preparou-se as soluções de géis separadores 12%, sendo a polimerização catalisada pela adição de 0,045% de persulfato de amônio e 0,075% de TEMED.

A solução de gel concentrador 5% foi preparada, sendo a polimerização catalisada pela adição de 0,12% de persulfato de amônio e 0,05% de TEMED. Foram colocados pentes para permitir a formação dos poços. Após a completa polimerização, o sistema de géis foi acoplado a cuba apropriada.

As amostras foram fervidas por 5 minutos e 10 µL de cada uma delas e o marcador de massa molecular (Fermentas) foram aplicados nos géis de poliacrilamida. As condições de corrida foram de 100 V até a entrada das amostras nos géis separadores e de 120 V até o final da corrida eletroforética em tampão Tris-glicina. Terminada a eletroforese, os géis foram corados para visualização das proteínas ou transferidos para membranas para procedimentos de *Western Blotting*.

Para visualização das proteínas, os géis foram imersos em solução corante contendo *Comassie Brilliant Blue R250* e incubados por 16 horas, sob agitação. Em seguida, procedeu-se à descoloração dos géis de poliacrilamida com solução descorante. Os perfis protéicos foram imediatamente analisados em transiluminador de luz branca, em seguida escaneados para documentação.

4.11. Análise de proteínas por *Western Blotting*

A análise de proteínas por *Western Blotting* foi realizada conforme as recomendações fornecidas pelo fabricante da membrana de nitrocelulose (Amershan Pharmacia Biotech).

Ao final da corrida eletroforética, um dos géis foi corado com *Coomassie Blue*, para a visualização do perfil protéico e o outro gel foi incubado por 30 min em solução de transferência e utilizado para transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose através da eletrotransferência semi-seca com eletrodos de grafite (LKB-Pharmacia). Cada sistema de transferência foi formado por um conjunto de seis papéis de filtro, sob os quais colocou-se a membrana de nitrocelulose, o gel de poliacrilamida e outro conjunto de 6 papéis de filtro, sendo todos previamente embebidos em tampão de transferência e, posteriormente,

removidas todas as bolhas, pressionando um rolo acrílico sobre os papeis e gel. Estes conjuntos foram montados entre dois eletrodos de grafite e submetidos a uma corrente elétrica de $0,8 \text{ mA/cm}^2$ de membrana durante duas horas. As dimensões do gel foram medidas (8,6 cm x 7,8 cm) para definir a amperagem utilizada na transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose ($8,6 \times 7,8 \times 0,8 = 53,6 \text{ mA}$).

Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com solução de leite desnatado comercial (5%) em PBST 1X. Os sistemas foram incubados *overnight* sob agitação lenta a temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com PBST 1X e, então, incubou-se, sob leve agitação, durante 2 horas a temperatura ambiente com anticorpo monoclonal anti-polyHis (Sigma conjugado com fosfatase alcalina) na diluição 1:1000 em solução PBS. Após a incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes de 5 minutos com PBST 1X. Em seguida, as membranas foram submetidas ao tratamento com a solução reveladora de *western blotting* (NBT e BCIP) até o aparecimento das bandas. As membranas foram finalmente lavadas com PBST 1X, secas a temperatura ambiente e fotografadas.

4.12. Preparação da resina de purificação de proteínas

A resina Ni-NTA 1mL (Amershan Bioscience), de cromatografia de afinidade, foi preparada por meio de uma lavagem com 1mL de H₂O destilada. O tubo foi centrifugado a 8000 rpm por 90 segundos, o sobrenadante foi descartado, o procedimento de lavagem foi realizado três vezes, em seguida, a resina foi pré-equilibrada com tampão de lise, adicionando 1mL de tampão, centrifugando o tubo 8000 rpm por 90 segundos, repetindo o procedimento por três vezes. Logo após a lavagem e pré-equilíbrio da resina adicionou-se aproximadamente 1mL do sobrenadante das células lisadas (extrato bruto).

4.13. Purificação

Depois da indução, foi realizado o procedimento para extração dos corpos de inclusão. O material da indução foi centrifugado a 10.000 X g por 25 min à

temperatura de 4°C. Em seguida, o *pellet* foi ressuspenso em 1mL de tampão de lise e incubado *overnight* a 4°C. Esse material foi centrifugado a 10.000 X g por 25 min à 4°C. O sobrenadante, contendo a proteína induzida, foi colocado em um tubo de polietileno de 1,5mL contendo 500µL de resina de níquel (Amershan Bioscience). Depois de homogeneizado o tubo em um rotor vertical a 4°C, durante 45min. A amostra foi centrifugada a (8000rpm) por 90 segundos. O sobrenadante foi coletado (*flowthrough*). Foi então, realizada três lavagens com 1mL de tampão de lavagem, após cada lavagem o tubo foi centrifugado a 8000 rpm por 90 segundos e sobrenadante era descartado. Posteriormente, foi realizada a etapa de eluição da proteína recombinante. Foi adicionado 500µL de tampão de eluição ao tubo, depois de homogeneizar o conteúdo do tubo por aproximadamente 2min, foi feita uma centrifugação a 8000 rpm por 90 segundos e o sobrenadante coletado. Esta etapa foi repetida por três vezes.

4.14. Dicroísmo Circular

A espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) mede a diferença de absorção de radiação com polarização circular e permite verificar se estão ocorrendo arranjos helicoidais dentro de uma molécula de proteína. Desta forma, o experimento de dicroísmo circular em proteínas, informa sobre as características de estrutura secundária da proteína e se estão ocorrendo mudanças na conformação da proteína.

Os ensaios de dicroísmo circular foram realizados utilizando *Jasco J-815* spectropolarimetrias (Jasco, Japão) equipado com um controlador de temperatura tipo *Peltier* e cubeta termostaticada ligada a um banho termostático. Espectros UV foram registrados usando cubetas de quartzo caminho ótico de 0,1cm. Foram acumulados quatro espectro consecutivos de rMEHB (0,2 mg / mL) em 2mM tampão MOPS pH 8,0 e o espectro médio foi registrado. As elípticas observados foram convertidos em elipticidade molar ($[\theta]$) com base na massa molecular por resíduo de 115 Da. O conteúdo de estrutura secundária foi estimado a partir de curvas ajustes com o pacote de programas Dicroprot CD (ftp://ftp.ibcp.fr/pub/C_DICROISM/) e avaliados pelo método de Yang (Deléage & Geourjon, 1993).

4.15. Quantificação das amostras – Bradford

A quantidade de proteína foi medida utilizando o kit de quantificação (Quick Start™ Bradford Dye reagente – Bio-Rad), (Bradford, 1976). A curva foi feita utilizando diferentes diluições do BSA contido no kit, os valores foram plotados para se obter a equação da reta, para se calcular a quantidade de proteínas nas amostras.

4.16. Teste de atividade antigênica

As frações da eluição da purificação foram dialisadas contra tampão Bicarbonato de amônia 10mM, em sacos de diálise com poros de 2kDa.

Nas placas de ELISA (Greiner medisorb) são adicionados rMEHB dialisada ou MERUB em tampão de adsorção em uma concentração final de 35ng de rMEHB em 200µL de tampão de adsorção por poço ou 40ng ou 50ng de rMERUB em 100µL de tampão de adsorção por poço. A placa permanece overnight a 4°C para sensibilização. Em seguida, a placa é lavada 3 vezes com 200µL tampão de lavagem por poço. Após a lavagem, a placa friccionada sobre papel absorvente para retirar o excesso de tampão de lavagem. É adicionado 200µL de tampão de bloqueio por poço durante 1h a 37°C. Novamente, a placa é lavada 3 vezes com 200µL tampão de lavagem por poço, esta é vertida sobre papel absorvente para retirar o excesso de tampão. O primeiro anticorpo (soro de pacientes e controles comerciais), diluído em solução de bloqueio, é adicionado (100µL por poço), a placa é incubada por 1 hora a 37°C ou 2 horas a temperatura ambiente. Lava-se a placa com 200µL tampão de lavagem e a verte sobre papel absorvente para retirar o excesso de tampão. Em seguida, adicionam-se 100µL de 2º anticorpo (anti-IgG humana conjugado com peroxidase, ou anti-IgM humana conjugado com fosfatase alcalina), também diluído em tampão de bloqueio, incuba a placa 1 hora a 37°C ou 2 horas a temperatura ambiente. Lava-se a placa 3 vezes com 200µL tampão de lavagem por poço, verte-a sobre papel absorvente para retirar o excesso de tampão e uma última lavagem com tampão APB. É adicionado 200µL de tampão de revelação por poço, a placa é incubada por 30min a temperatura ambiente protegida da luz. Em seguida a placa é lida no espectrofotômetro (leitora de placa) a 405nm. Os resultados em triplicatas são analisados e calculados os desvios padrões das leituras.

4.17. Teste de atividade antigênica – rMEHB

O método utilizado para o teste se baseia na interação antígeno-anticorpo. Foi utilizado uma placa de teste de ELISA comercial (DiaSorin) contendo um anticorpo anti-HBc adsorvidos em cada poço. Foi adicionado, em cada poço da placa, diferentes concentrações da proteína multiepitopo recombinante rMEHB em triplicata (50ng, 500ng, 1µg, 10µg e 15µg). Após 2h de incubação a 37°C, a superfície é lavada para retirar a proteína que não foram se ligaram aos anticorpos presentes na placa. São feitas três lavagens com PBST. Em seguida, são adicionados 100µL de anticorpo monoclonal Anti-polyhistidina, produzido em camundongo (Sigma) conjugado com fosfatase alcalina, que irá produzir uma substância corada. O anticorpo anti-polyHis é diluído em tampão salino PBS, este tampão também foi utilizado como controle negativo para verificar se não havia reação (inespecífica) por causa do tampão. Após incubação de 2h a 37°C a superfície é lavada novamente para a retirada do anticorpo que não se ligou ao antígeno que está ligado à placa. Adiciona-se o substrato de ligação para a enzima produzir a substância corada (pNPP), assim, medindo-se a intensidade da cor da superfície, por espectrofotômetro, pode-se quantificar e verificar a presença de alguma substância de interesse.

5. Resultados e Discussão

5.1. Desenho e síntese química dos genes

Para o desenho das seqüências gênicas das proteínas recombinantes MEHB (609 pb) e MERUB (621 pb), para que tivessem utilidade diagnóstica, foi feita uma busca na literatura. Baseado nos trabalhos mencionados na introdução, foi possível selecionar epitopos lineares comuns e conservados do vírus HBV (4 epitopos), a partir da região do *core* do vírus HBV e do vírus RV (5 epitopos), a partir das regiões do envelope (E1 e E2), que potencialmente desempenham um papel importante na produção de anticorpos em indivíduos infectados.

Quatro epitopos foram selecionados para o gene MEHB (tabela 4) e cinco epitopos para MERUB (tabela 5). No gene MEHB, o primeiro epitopo contém 23 aminoácidos (aa), o segundo 12 aa, o terceiro 6 aa e o quarto 12 aa. Os epitopos foram separados com linkers flexíveis de Glicina e Serina, compondo, assim, um peptídeo de aproximadamente 7 kDa. Para facilitar a manipulação da proteína, a seqüência do peptídeo foi repetida três vezes para que seu tamanho não fosse muito pequeno e de difícil análise, formando um peptídeo de aproximadamente 21kDa (fig. 12). Por serem sequenciais estarem, os epitopos 3 e 4 não foram separados. No gene MERUB, o primeiro epitopo contém 27 aa, o segundo 7 aa, o terceiro 7 aa, o quarto 12 aa e o quinto 26 aa. Os epitopos separados pelo mesmo linker flexível de serina e glicina formaram um peptídeo de aproximadamente 11 kDa. Pelo mesmo motivo da repetição do MEHB, a seqüência para a proteína recombinante rMERUB foi repetida duas vezes, totalizando um peptídeo de 22 kDa (fig. 13).

Tabela 4. Epitopos HBcAg selecionados para compor a proteína rMEHB

Epitopos	Resíduos	Referência
1 CWGELMNLATWVGSNLEDPASRE	61-83	Sallberg <i>et al.</i> , 1994; Salfeld <i>et al.</i> , 1989 e Thermet <i>et al.</i> , 2004.
2 CLTFGRETVLEY	107-118	Collucci <i>et al.</i> , 1988.
3 TPPAYR	128-133	Sallberg <i>et al.</i> , 1991.
4 PPNAPILSTLPE	134-145	Takahashi <i>et al.</i> , 2001.

Tabela 5. Epitopos do envelope do RV, selecionados para compor a proteína rMERUB.

Epitopos	Resíduos	Referência
BCH-178 NQQSRWGLGSPNCHGPDWASPVCQRHS	213-239	Lozzi <i>et al.</i> , 1990 e Londesborough <i>et al.</i> , 1995
EP-1 VWVTPVIGSQAR	276-285	Lozzi <i>et al.</i> , 1990; Wolinsky <i>et al.</i> , 1993.
EP-2 LVGATPE	235-241	Lozzi <i>et al.</i> , 1990; Wolinsky <i>et al.</i> , 1993.
EP-3 ADDPLL	250-256	Lozzi <i>et al.</i> , 1990; Wolinsky <i>et al.</i> , 1993.
E2 APPTLPQPPRAHGQHYGHHHHQLPFL	10-36	Pedneault <i>et al.</i> , 1994.

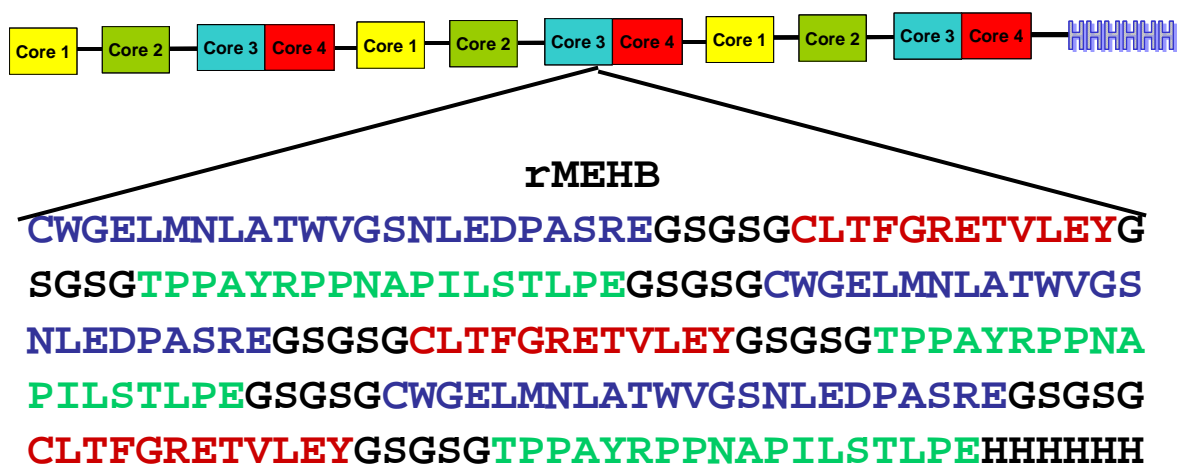


Figura 12. Esquema e seqüência da proteína recombinante rMEHB.

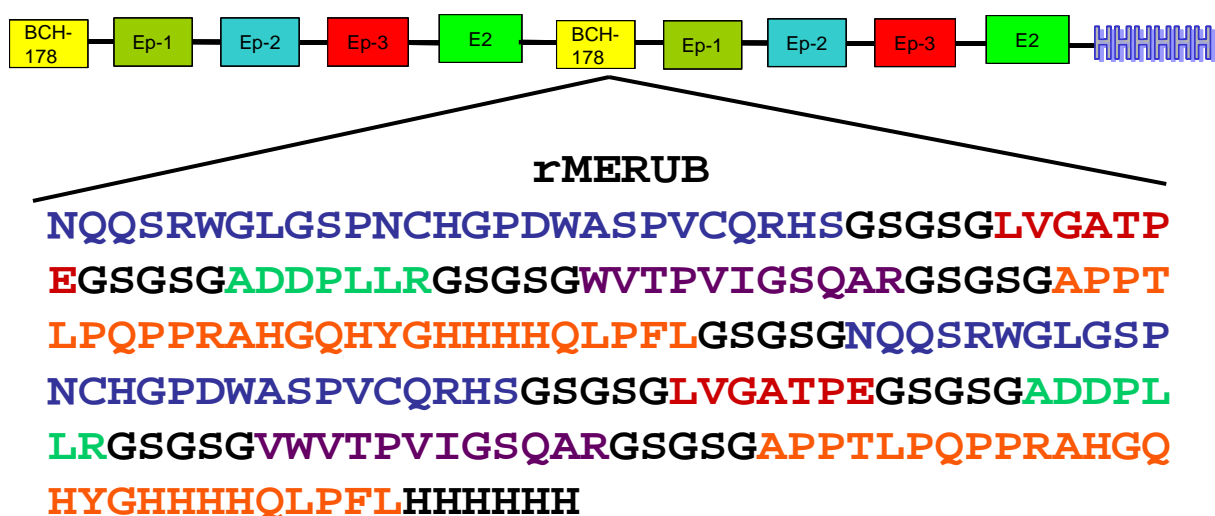


Figura 13. Esquema e seqüência da proteína recombinante rMERUB.

A partir de análises *in silico* foi selecionados codons preferenciais para *E. coli* e foram quantificadas as bases nitrogenadas citocina e guanina (CG), sendo observado um total de 59,8% das bases para MEHB (fig. 14) e 64,3% para MERUB, valores viáveis para expressão das proteínas pela bactéria (fig. 15). O gene foi sintetizado e clonado com sucesso no vetor pET21a na forma de um inserto contendo sítios para *NdeI-XhoI*, nas extremidades.

MEHB

CATATGTGCTGGGGTGAATTAATGAATTTAGCAACGTGGGTTGGCAGCAATCTGGA
 AGATCCGGCTAGCCGCGAGGGCAGCGGCTCTGGCTGCCTGACCTTCGGCCGGGAGA
 CGGTGTTAGAATACGGTTCGGTAGTGGTACGCCTCCTGCGTATCGTCCGCCGAAT
 GCCCCGATTTTAAGCACCCCTGCCGGAAGGTT CAGGTAGTGGTTGCTGGGGTGAGCT
 GATGAATCTGGCCACCTGGGTGGGTTCTAACCTGGAGGACCCGGCCAGCCGCGAGG
 GTAGTGGTAGCGGTTGTTTAACCTTTGGGCGTGAAACAGTTCTGGAATATGGTTCT
 GGCAGTGGCACCCCGCCGGCATAACCGTCCGCCGAACGCTCCGATTCTGAGCACACT
 GCCAGAAGGGTCTGGGT CAGGGTGTGGGGGGAGCTGATGAACCTGGCGACGTGGG
 TAGGGTCAAACCTGGAAGACCCTGCATCTCGCGAAGGCTCAGGCAGTGGCTGTCTG
 ACTTTTGGCCGCGAAACCGTCTTGAATATGGCTCCGGCTCCGGCACTCCGCCAGC
 GTATCGTCCACAAACGCGCCAATCCTGTCCACTCTGCCTGAA**CTCGAGCACCACC**
ACCACCACCCTGA

Figura 14. Sequência de bases nitrogenadas do gene recombinante MERUB.

MERUB

CATATGAATCAGCAATCACGTTGGGGTCTGGGCTCTCCTAACTGTCATGGTCCTGA
 CTGGGCATCTCCAGTTTGCCAACGCCATAGCGGCTCAGGCTCTGGCCTGGTAGGTG
 CGACCCCTGAGGGGAGCGGGAGCGGTGCTGATGATCCGCTGCTGCGTGGGTCTGGG
 TCTGGCGTGTGGGTGACCCCGGTATTGGTTCCCAAGCTCGTGGTAGTGGGT CAGG
 TGCACCGCCGACTTTACCGCAGCCTCCGCGGGCGCATGGCCAGCACTATGGCCATC
 ATCACCACCAGTTACCGTTCCTGGGCAGCGGTAGCGGTAATCAGCAAAGTCGGTGG
 GGCCTGGGGAGCCGAACTGTCATGGCCCGGATTGGGCTCACCAGTCTGCCAGCG
 TCACTCAGGCTCCGGCTCCGGCTGGTTGGGGCAACGCCAGAAGGTTCCGGCAGCG
 GCGCGGACGATCCGCTGTTACGCGGGTCCGGCAGTGGCGTATGGGTGACCCCGGTT
 ATCGGTAGTCAGGCGCGCGGTAGTGGTAGCGGTGCCCCGCCGACACTGCCACAGCC
 TCCACGCGCCACGGTCAGCACTACGGTCAATCATCATCACCAACTGCCATTTCTG
CTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

Figura 15. Sequência de bases nitrogenadas do gene recombinante MERUB.

5.2. Expressão heteróloga das proteínas multiepitopos

O procedimento de indução foi realizado para verificar a capacidade de a linhagem expressar o polipeptídeo desejado sem prejudicá-lo. A linhagem *E. coli* BL21 (λ DE3) pLysS foi transformada com os genes MEHB ou MERUB e seis clones foram selecionados, sendo que três continham o gene MEHB e os outros três continham o gene MERUB. As colônias cresceram em meio LB para indução da expressão das proteínas recombinantes. Esta linhagem foi utilizada por ser uma linhagem já desenvolvida para a indução com o indutor sintético IPTG, indutor análogo à lactose, porém não utilizado no metabolismo da bactéria, sendo assim, mais eficiente. Depois de adicionado o indutor IPTG, foram coletadas amostras da cultura nos tempos 0 min, 30 min, 1h30 min e 2h30 min, a fim de se observar uma cinética de indução da expressão das proteínas recombinantes. Análises por SDS-PAGE, mostraram uma banda de indução de aproximadamente 21 kDa (para MEHB) e 22 kDa (para MERUB), que aumentava de intensidade conforme o tempo de indução (fig.16). A massa molecular da proteína expressa era consistente com o tamanho predito para as proteínas multiepitopos.

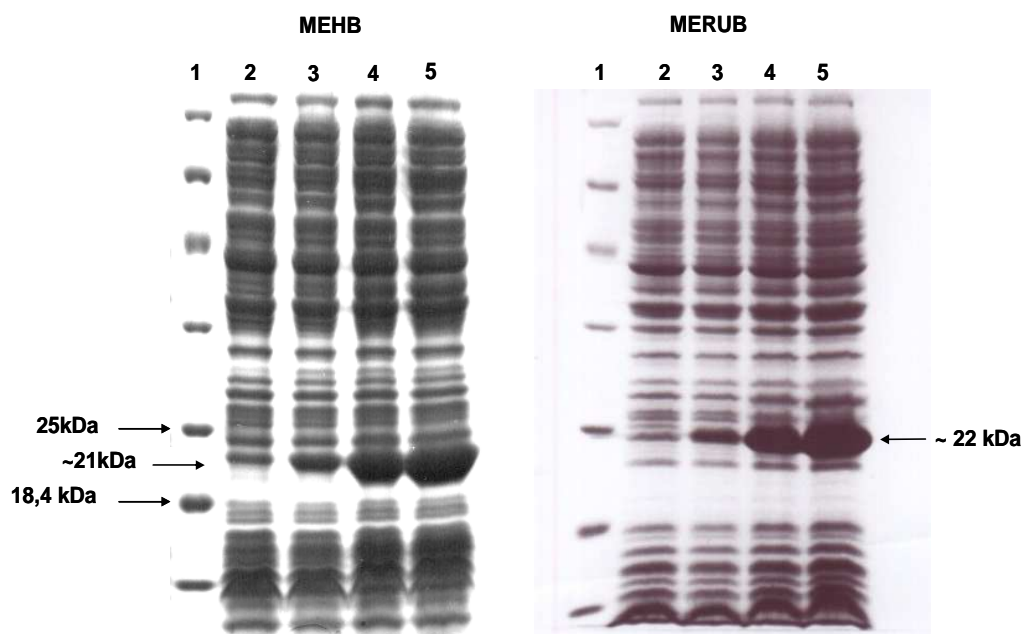


Figura 16. Análise da cinética de indução em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%. Material coletado após a indução de expressão da MEHB e MERUB. 1) marcador de massa molecular (Unstained Protein Molecular Weight Marker – Fermentas); 2) Tempo 0h de indução; 3) tempo 30 minutos de indução; 4) tempo 1h30 min; 5) tempo 2h30min.

O experimento acima mostrou que as proteínas multiepitopos recombinantes para Hepatite B (MEHB) e Rubéola (MERUB) foram expressos com sucesso em *E. coli*, sendo observada a cinética de indução esperada. Para a confirmação deste resultado foi feito um *Western blotting* usando anticorpos anti-His tag que reagem na presença da calda de histidina presente nas proteínas recombinante. As bandas que apareceram na membrana de nitrocelulose deveriam possuir a cauda de histidina, para que houvesse reação com o anticorpo marcado com fosfatase alcalina, confirmando que as bandas de indução correspondiam às proteínas rMEHB e rMERUB (Fig 17).

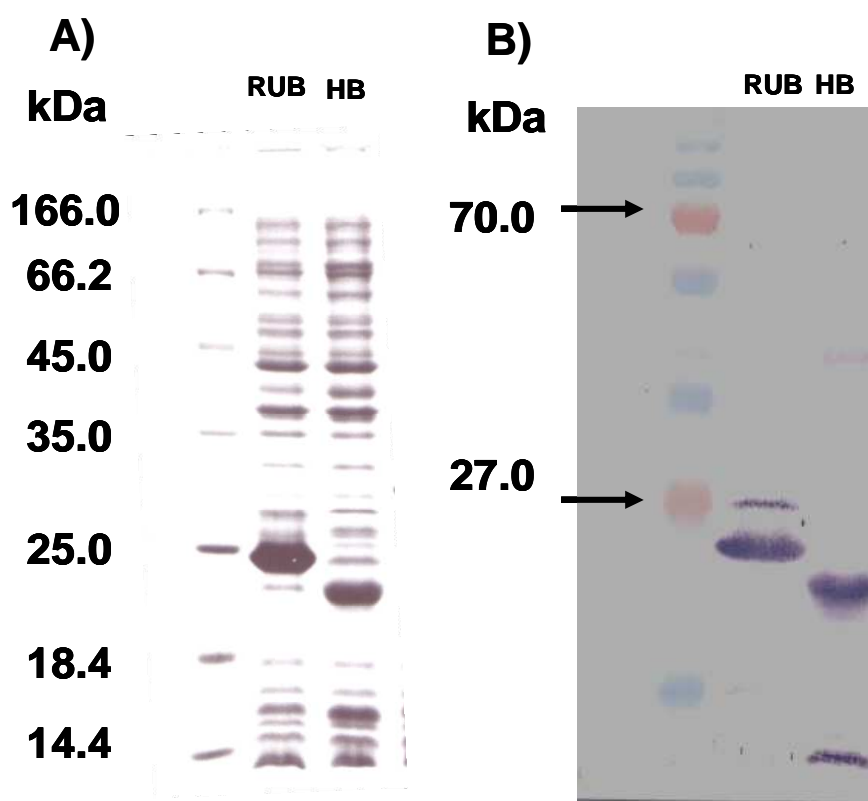


Figura 17. Western-Blot para confirmação da banda de indução. A) Gel de poliacrilamida após 2h30 min de indução das proteínas rMERUB e rMEHB; B) Detecção de proteína por Western Blot em membrana de nitrocelulose.

A confirmação por *Western blotting* é necessária para garantir que a banda induzida é realmente a proteína recombinante e não uma outra proteína comum da bactéria, que por coincidência, foi induzida pelo IPTG. A banda que aparece abaixo da proteína rMEHB sugere que a proteína recombinante sofreu degradação. Para contornar este problema, é necessário adicionar inibidores de proteases ao extrato

celular. Por problemas técnicos foi preciso transferir as proteínas do freezer -80°C para o freezer -20°C . Foi observada uma diminuição da degradação da proteína, sugerindo degradação por frio. Baseados nesta hipótese, as proteínas passaram a ser armazenadas na geladeira (4°C). De maneira geral, observou-se uma melhora na resposta imunológica durante os testes de atividade e uma redução da precipitação das proteínas.

5.3. Purificação das proteínas multiepitopos recombinantes

Como as proteínas recombinantes são insolúveis, sendo encontradas na célula como corpos de inclusão, foi utilizada uréia para solubilizar estas proteínas. A presença da cauda de histidina nas proteínas sintéticas possibilitou a purificação destas em apenas um passo, devido à sua afinidade por níquel. Para purificar as proteínas rMEHB e rMERUB, a cromatografia de afinidade Ni-NTA foi realizada em condições desnaturantes. As frações coletadas durante as diferentes etapas da purificação foram analisadas por SDS-PAGE (Fig. 18).

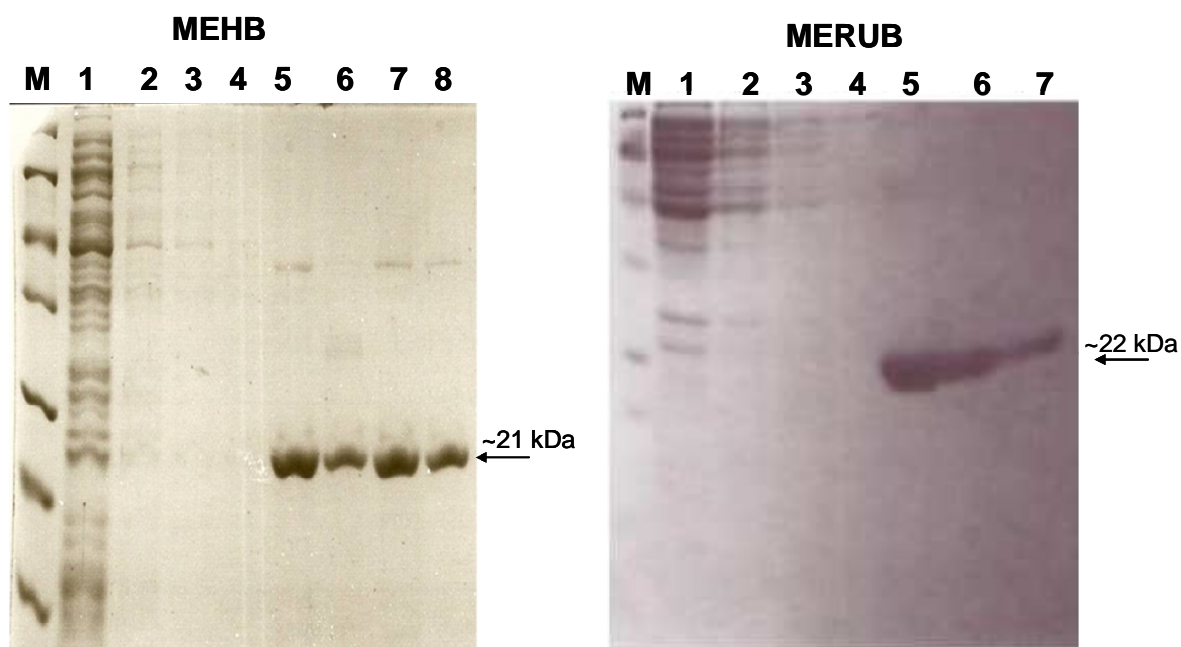


Figura 18. Purificação das proteínas rMEHB e rMERUB recombinantes. Análise por SDS-PAGE das frações da coluna de afinidade Ni-NTA obtidas durante a purificação. M – Marcador de massa molecular, Fermentas Life Science. 1- *flowthrough*, 2, 3 e 4 – etapas de lavagem da resina com o tampão de lavagem; 5, 6, 7 (e 8, para rMEHB) – Frações eluídas com o tampão de eluição com 500 mM de imidazol.

Pode-se observar na Figura 18 que os multiepitopos foram purificados com sucesso.

A concentração, dosada pelo método de Bradford (1976), seguindo a equação da reta estabelecida previamente (fig. 19). Das frações eluídas da rMEHB purificada obtém-se aproximadamente 1,5mg de proteína multiepitopo (oriundos de 25mL de meio de cultura bacteriana), em 1,5mL do tampão de eluição. Das frações eluídas da rMERUB obtém-se aproximadamente 600µg, em 1,5mL do tampão de eluição. Esses dados mostram que as proteínas purificadas obtiveram um bom rendimento com alto grau de pureza.

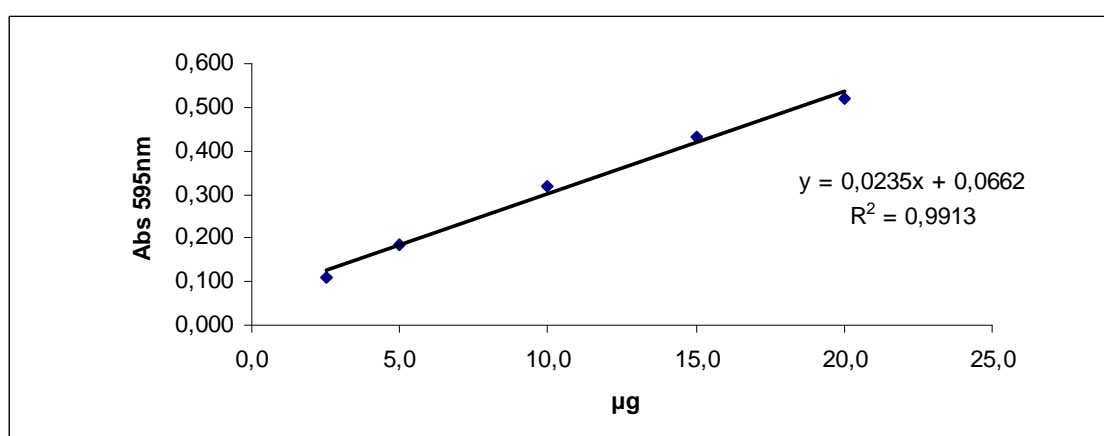


Figura 19. Equação da reta para quantificação de proteína a partir de diluições de BSA.

5.4. Análises de Dicroísmo circular

As análises de espectrometria por Dicroísmo Circular (CD), na faixa de 260 a 195nm, foram realizadas com o objetivo de investigar o dobramento das proteínas recombinantes (rMEHB e rMERUB) e seu conteúdo de estrutura secundária.

A análise dos dados de CD da proteína rMEHB mostram espectros com um pequeno grau de enovelamento. Foram feitas análises de dobramento da proteína recombinante nos pH 7 (~pH do sangue, usado nos testes de diagnósticos) e pH 8 (pH utilizado para purificar as proteínas). Não foi observado nenhuma diferença de dobramento quando comparados os dois pH (fig. 20). As análises no comprimento de onda de 222 nm mostram que não há presença de dobramento em α -hélice, no entanto, analisando o comprimento de onda a 200 nm pode ser observado um pequeno enovelamento. Com o uso de um programa computacional (CDNN 2.1) de comparação de estruturas secundárias obteve-se uma estimativa do conteúdo de

estruturas secundária das proteínas recombinantes, sendo as mais significativas folhas- β antiparalelas (23,5%), de barris β 28,2% e 39,1% de estruturas randômicas. No entanto essas estrutura não são capazes de esconder os epitopos da proteína. Para analisar a estabilidade da proteína foram feitos testes de desnaturação variando a temperatura do teste de 25°C a 95°C. Nas análises de estabilidade da proteína rMEHB nos dois pH (7 e 8) foi observado que não houve diferença de dobramento mesmo nas mais altas temperaturas (fig. 21 e 22).

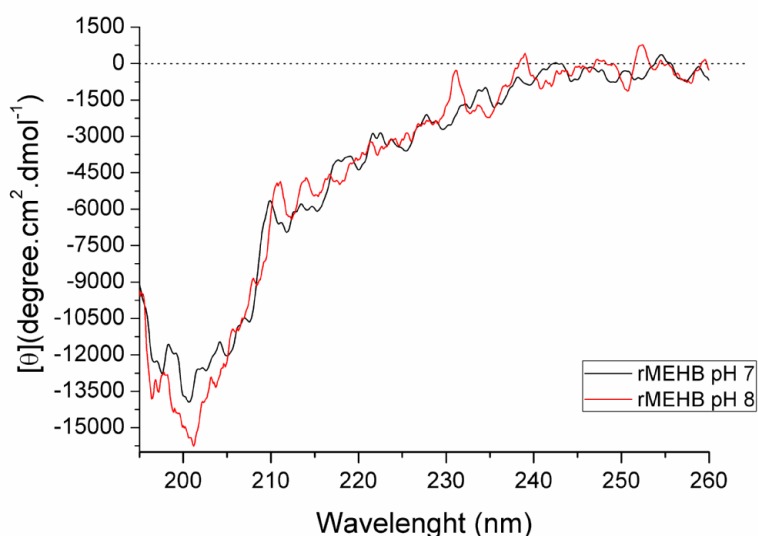


Figura 20. Análises de Dicroísmo Circular. Medições experimentais de rMEHB em pH 7,0. e pH 8,0 variando o comprimento de onda de 195nm a 260nm.

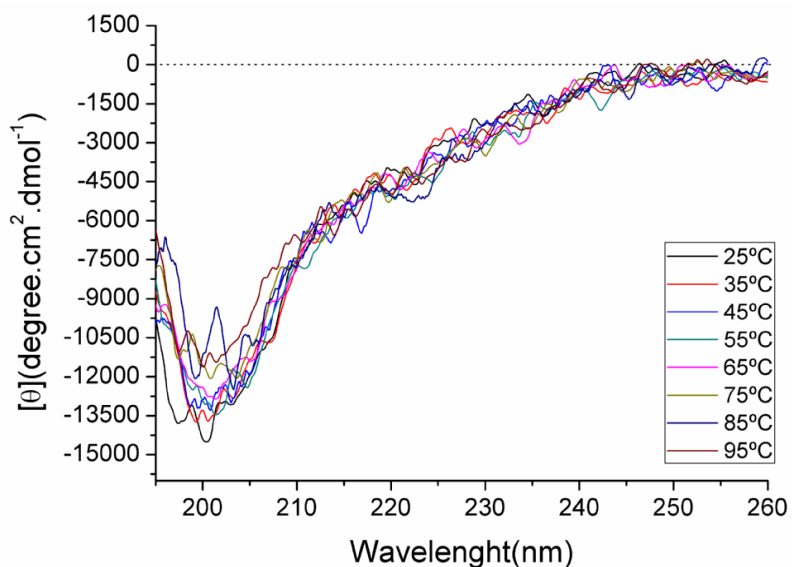


Figura 21. Análises de Dicroísmo Circular. Medições experimentais de rMEHB em pH 7,0 variando o comprimento de onda de 195nm a 260nm. Espectros feitos variando a temperatura de 25°C a 95°C.

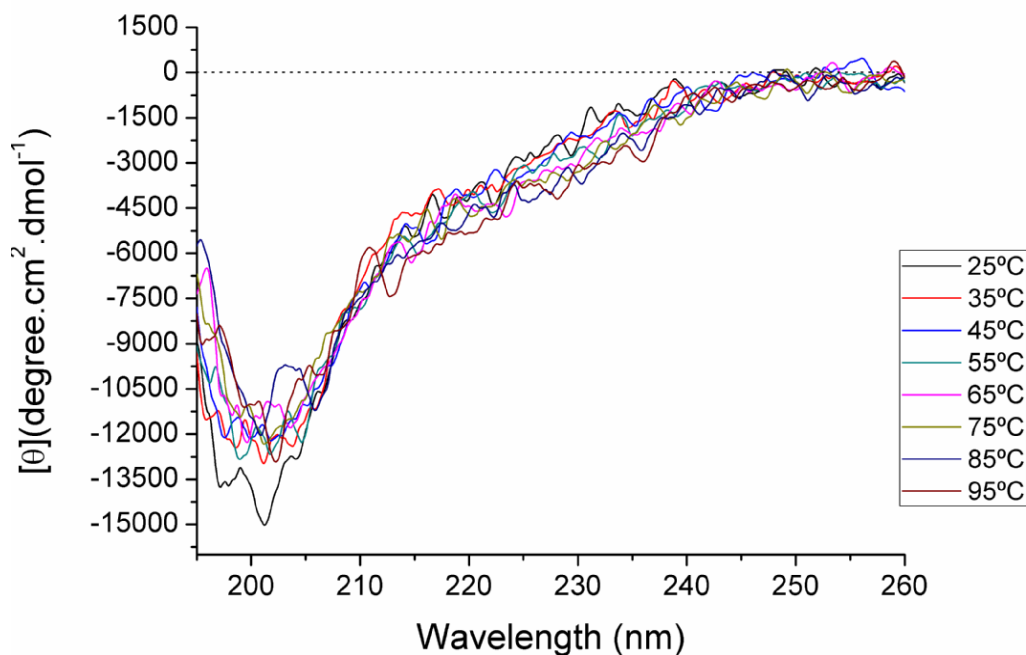


Figura 22. Análises de Dicroísmo Circular. Medições experimentais de rMEHB em pH 8,0 variando o comprimento de onda de 195nm a 260nm. Espectros feitos variando a temperatura de 25°C a 95°C.

As análises dos dados de CD da proteína rMERUB mostram espectros tipicamente de proteína desenovelada como era o esperado para o arranjo estrutural das proteínas recombinantes, que foram desenhadas a partir de epítopos lineares. O espectro revelou a ausência de estrutura secundária predita em todos os algoritmos disponíveis no pacote Dicroprot (fig. 23).

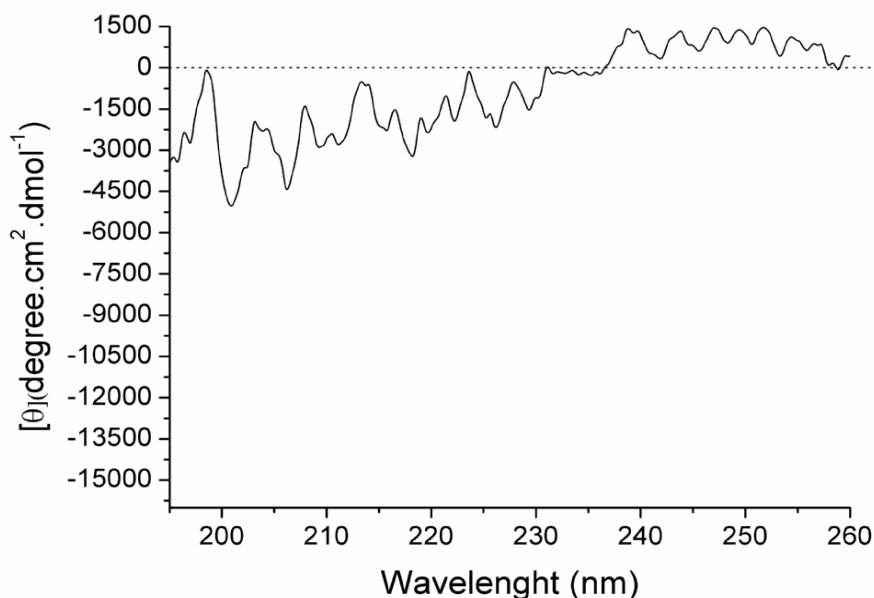


Figura 23. Análises de Dicroísmo Circular. Medições experimentais de rMERUB em pH 8,0 variando o comprimento de onda de 195nm a 260nm.

5.5. Testes de atividade imunológica

5.5.1. Padronização de quantidade de proteína na placa

Para determinar a quantidade de proteína multiepitopo para HB (não-dialisada) na placa de ELISA a ser utilizada para o imunoenensaio foi utilizado o anticorpo Anti-poly His conjugado com fosfatase alcalina (PA). Em cada poço da placa de ELISA foi colocada a proteína rMEHB nas concentrações de 0ng, 100ng, 200ng, 300ng e 400ng, em triplicada. As leituras das densidades óticas (O.Ds) podem ser observadas na figura 24, mostrando que para se obter uma O.D significativa (cerca de 1,5) seria preciso aproximadamente 300ng de proteína por poço.

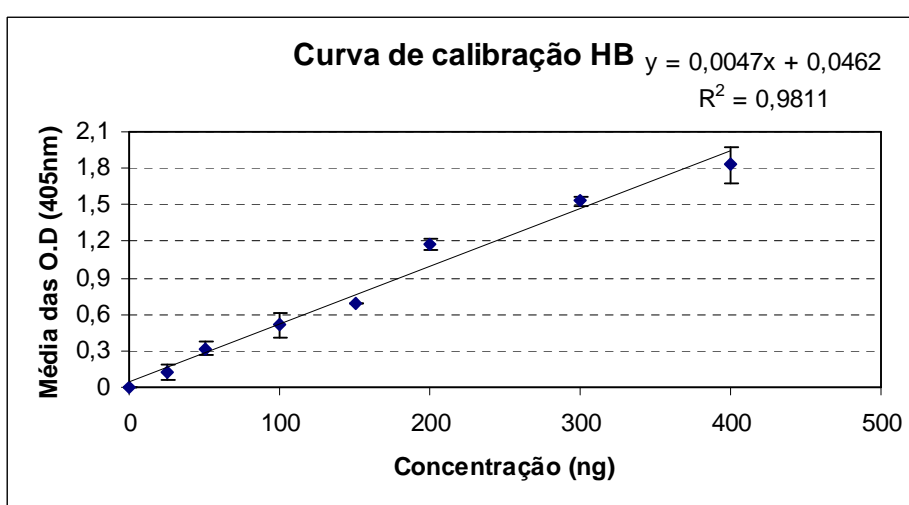


Figura 24. Curva de calibração da concentração de proteína rMEHB por poço, na placa de ELISA.

Para verificar se a presença da Uréia e demais componentes do tampão de eluição influenciavam na resposta do teste de ELISA foi feito o mesmo experimento utilizando a rMEHB dialisada em tampão bicarbonato de amônia 10mM. Utilizando as mesmas concentrações citadas acima, todas as O.D.s foram acima de 3, valores fora do alcance da leitura dentro do espectro de 405nm. Desta forma, já pôde ser observado que os componentes do tampão de eluição interferem na resposta do teste de ELISA. Faixa de menores concentrações foi testada para estabelecimento da concentração de proteína dialisada por poço; 0ng, 10ng, 20ng, 30ng, 35ng, 40ng, 45ng e 50ng. Os valores de OD podem ser observados na figura 25, mostrando que com aproximadamente 30ng de rMEHB por poço obtém-se resposta máxima de ligação para os testes de ELISA. Foi então estabelecido 35ng de proteína (dialisada) por poço para os testes subsequentes utilizando soros de pacientes.

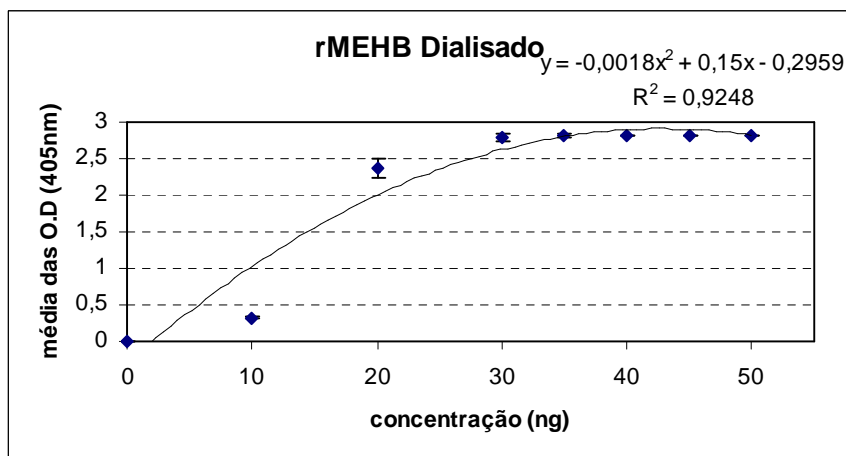


Figura 25. Curva de calibração da concentração proteína rMEHB (dialisada) por poço, na placa de ELISA.

Os mesmos testes foram feitos para a rMERUB não dialisada, figura 26, e dialisada, figura 27. Foram utilizadas as concentrações de 0ng, 10ng, 20ng, 40ng, 60ng, 80ng, 100ng e 200ng por poço nos dois testes.

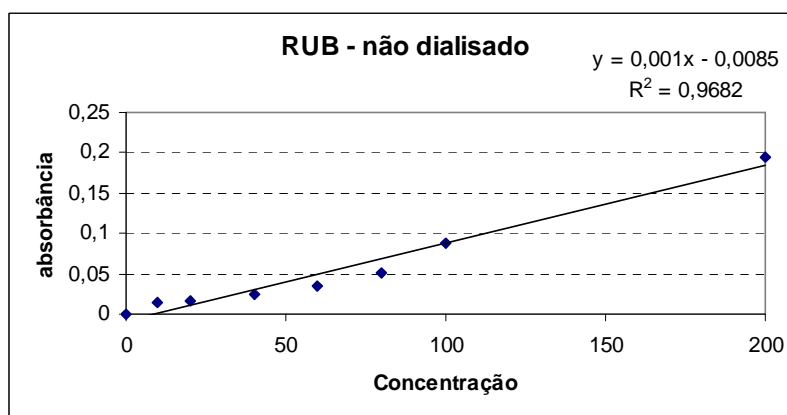


Figura 26. Curva de calibração da concentração proteína rMERUB (não dialisada) por poço, na placa de ELISA.

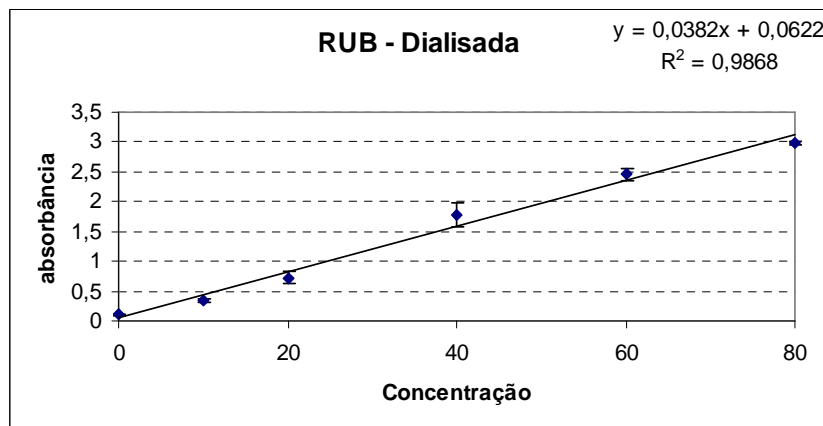


Figura 27. Curva de calibração da concentração proteína rMERUB (dialisada) por poço, na placa de ELISA.

As concentrações acima de 80ng por poço saíram da faixa útil de leitura (>3) em 405nm. Também para a proteína rMERUB observou-se que o teste de ELISA utilizando a proteína dialisada obteve resposta melhor que o teste com a proteína sem dialisar, o que evidencia que provavelmente algum componente do tampão de eluição esteja interferindo na ligação da proteína na placa do ensaio (placa Greiner). Para os testes com soro de pacientes, estabeleceu-se 40ng de proteína rMERUB (dialisada) por poço.

5.5.2. Teste de ELISA com soros de pacientes HB positivo

Os testes de ELISA utilizando soros de pacientes infectados pelo vírus HBV apresentaram um *background* alto, como observado na figura 28, sugerindo que os soros dos pacientes (seja positivo ou negativo) reagem inespecificamente, reagem inclusive no poço onde não é colocada proteína adsorvida na placa (0ng + SP), demonstrando reação falso-positiva.

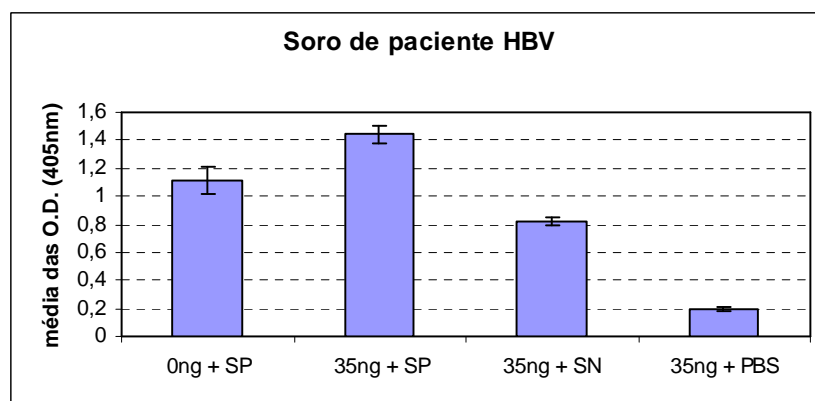


Figura 28. Teste de ELISA com soro de paciente positivo e negativo para HBV. (0ng – não há proteína adsorvida na placa; 35ng – há 35ng de proteína adsorvida na placa; SP – soro positivo como 1º anticorpo; SN – soro negativo como 1º anticorpo e Anti-IgG humano conjugado com PA como 2º anticorpo).

Quando, no teste de ELISA, foram utilizados controles tanto positivos quanto negativos de kits comerciais, previamente tratados para eliminar reação inespecífica (filtragem, centrifugação, comunicação pessoal com técnico da empresa Wiener), o *background* observado foi aceitável, embora ainda persista (fig. 29). Isto evidencia que o soro humano coletado infectado utilizado (sem tratamento prévio) reage inespecificamente com maior intensidade ou com a placa ou com o bloqueio utilizado.

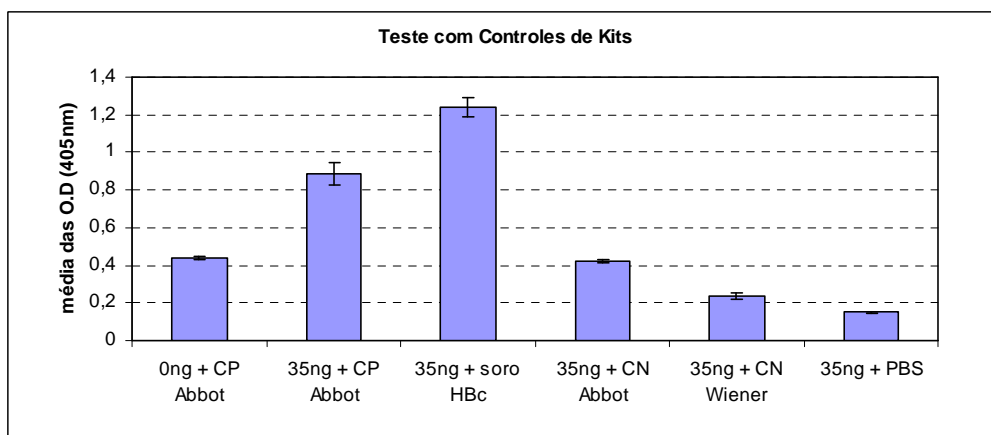


Figura 29. Teste utilizando controles (positivos e negativos) de kits comerciais. (0ng – não há proteína adsorvida na placa; 35ng – há 35ng de proteína adsorvida na placa; CP Abbot: controle positivo do kit Abbot como 1º anticorpo; soro HBc – soro de paciente HBc positivo; CN Abbot – controle negativo do kit Abbot como 1º anticorpo; CN Wiener – controle negativo do kit Wiener como 1º anticorpo e Anti-IgG humano conjugado com PA como 2º anticorpo).

Para evitar o *background* e as ligações inespecíficas foram testados alguns tipos de bloqueio como BSA (fração V) 5%, leite molico 5% pré-fervido, gelatina 5%, soro pré-centrifugado por 20min a 10.000g. Os resultados observados na figura 30 não mostraram nenhuma mudança significativa, sugerindo que as ligações inespecíficas não estão relacionadas com o bloqueio, ou ainda que, independentemente do bloqueio as reações inespecíficas acontecem. Considerando este resultado, todos os experimentos subseqüentes foram feitos utilizando o leite molico 5%, já que apresentou a maior diferença de A_{405nm} entre os controles positivos e negativos.

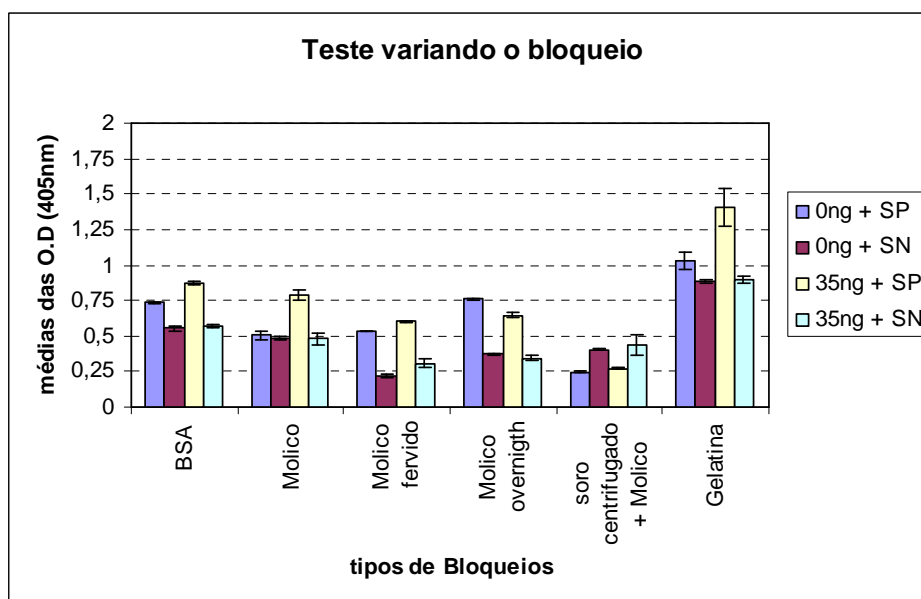


Figura 30. Variação do Bloqueio para diminuir o *background*. No eixo X, observa-se os tipos de bloqueios utilizados e no eixo Y as A_{405nm} . (0ng – não há proteína adsorvida na placa; 35ng – há 35ng de proteína adsorvida na placa; SP – soro positivo como 1º anticorpo; SN – soro negativo como 1º anticorpo e Anti-IgG humano conjugado com PA como 2º anticorpo).

Ainda, para diminuir o *background* foram testados dois tipos de placas de ELISA: Greiner e Costar (fig. 31). Também neste teste, não se observou mudança significativa no *background*. Apesar do *background*, na placa Greiner observou-se uma maior diferença entre os controles positivos e negativos, por isso os teste seguintes foram feitos utilizando a placa Greiner.

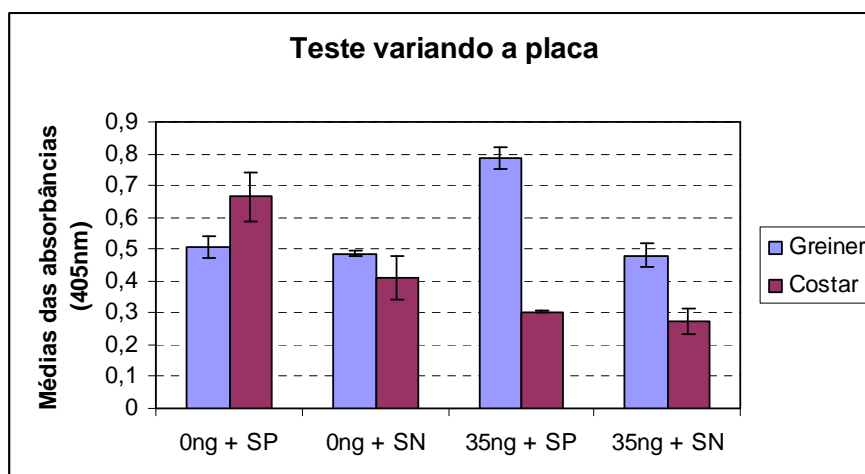


Figura 31. Teste de ELISA com as placas Greiner e Costas para diminuir o *background*. (0ng – não há proteína adsorvida na placa; 35ng – há 35ng de proteína adsorvida na placa; SP – soro positivo como 1º anticorpo; SN – soro negativo como 1º anticorpo e Anti-IgG humano conjugado com PA como 2º anticorpo).

Comercialmente, observa-se que os kits de diagnóstico anti-HBc total detectam tanto IgG como IgM, utilizando testes competitivos, ou seja, o anticorpo anti-HB é que se encontra adsorvido na placa, competindo com o anticorpo presente no soro do paciente infectado pela ligação ao antígeno em solução. O conjugado anti-HB-peroxidase, também presente em solução, detecta o complexo previamente formado antígeno-anticorpo. Sendo assim, o teste com o soro positivo do paciente resultará em uma leitura menor de A_{450nm} . Por isso, alteramos a estratégia para realizar o teste competitivo, utilizando a placa do kit comercial DiaSorin contendo um anticorpo monoclonal Anti-HBc, substituindo o antígeno do kit comercial pela proteína rMEHB. Na figura 32, observa-se que as reações utilizando os controles do kit comercial apresentaram resultados de acordo com o esperado, sugerindo a ação específica da proteína. No entanto, quando usado soro de paciente, também foi observado inespecificidade na reação, já que os soros de pacientes, positivo e negativo, resultaram em leitura de A_{450nm} similares.

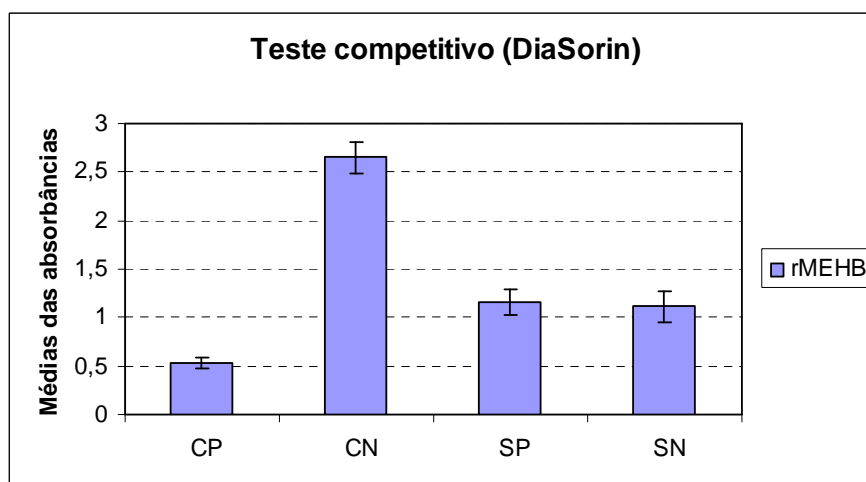


Figura 32. Teste de ELISA competitivo utilizando componentes do kit comercial DiaSorin. (CP – controle positivo do kit como 1° anticorpo; CN – controle negativo do kit como 1° anticorpo; SP – soro de paciente positivo como 1° anticorpo; SN – soro de paciente negativo como 1° anticorpo. Para competição com rMEHB foi utilizado Anti-poly His conjugado com PA como 2° anticorpo.

No experimento acima, também foi colocado em um poço separado (resultado não mostrado) a proteína recombinante rMEHB, sem adicionar soro de paciente ou outro fator de competição da reação. Em poucos minutos após adicionado o tampão de revelação o poço ficou com uma coloração forte ($A_{450nm} >3$), estando fora do espectro de leitura, mostrando que a proteína recombinante se ligou ao anticorpo monoclonal (anti-HBc) presente na placa. Este resultado confirma a capacidade da proteína de reconhecer anticorpos anti-HBc.

Para confirmar o resultado da ligação da proteína recombinante ao anti-HBc presente na placa do kit comercial, o experimento foi repetido com diferentes concentrações de proteína rMEHB 50ng, 500ng, 1µg, 5µg, 10µg e 15µg (Fig. 33), mostrando a resposta dose-dependente. Foi utilizado PBS (tampão utilizado para diluir as proteínas) como controle negativo, mostrando que o tampão não apresenta ligações inespecíficas com a placa ou qualquer outro componente do teste.

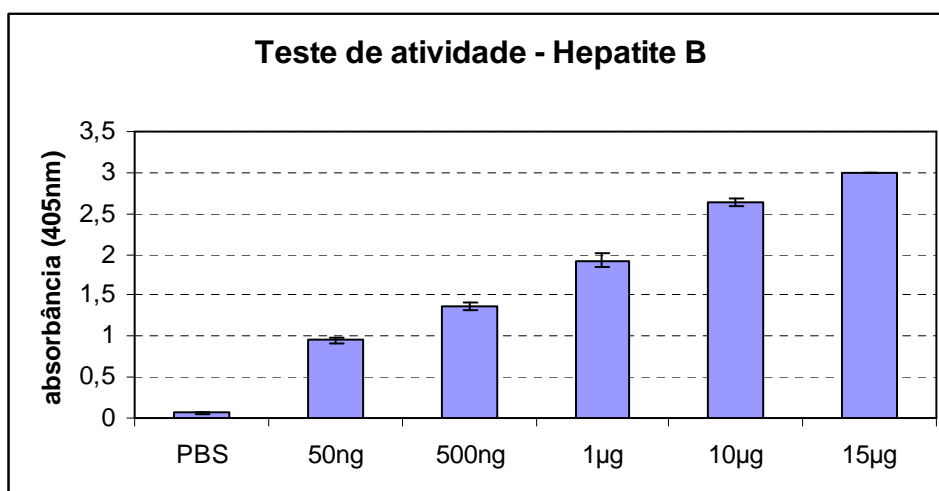


Figura 33. Teste de atividade biológica da proteína recombinante rMEHB. Utilizando várias concentrações da proteína recombinante 50ng, 500ng, 1µg, 10µg e 15µg. Como controle negativo foi utilizado PBS, o mesmo tampão em que as amostras foram diluídas. Anti-polyhistidina conjugada com fosfatase alcalina como 2º anticorpo.

Observa-se que a proteína multiepitopo recombinante rMEHB é capaz de se ligar a anticorpos específicos anti-HBc, conforme mostrado na Fig. 33, confirmando sua atividade antigênica, o que demonstra a sua capacidade de ser utilizado em kits de diagnóstico comerciais. No entanto, ainda precisam ser padronizados parâmetros (tipo da placa – Greiner nos parece mais adequada, tipo de bloqueio, tempo de incubação em cada etapa, quantidade de lavagens, tempo de reação para revelar a formação do complexo antígeno-anticorpo) visando diminuir o *background* e reações inespecíficas, quando utilizados soros de pacientes infectados. Esta etapa está sendo realizada pela empresa WAMA diagnóstica (projeto em parceria UnB-WAMA Diagnóstica), que desenvolverá os kits para comercializá-los.

5.5.1. Teste de ELISA com soros de pacientes RUB positivo

Quanto à proteína rMERUB, depois de estabelecida a quantidade de 40ng por poço, foram testados soros de pacientes IgG positivos. Com a frequência da rubéola na infância e as campanhas de vacinação contra esta doença, é difícil encontrar indivíduos IgG negativos e IgM positivos para rubéola. Para a realização deste teste foi utilizado anti-IgG humano conjugado com fosfatase alcalina como segundo anticorpo, observando-se também um *background* elevado (fig. 34).

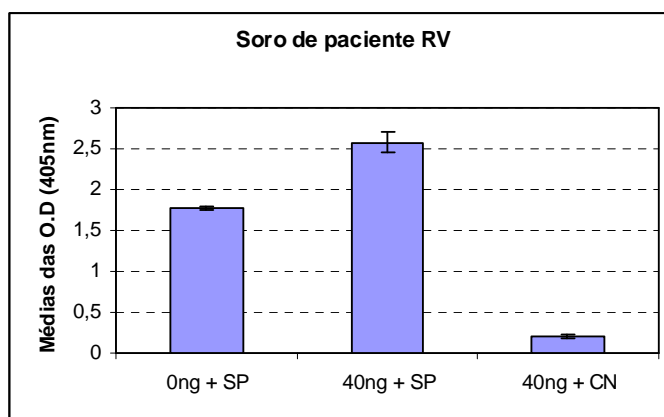


Figura 34. Teste de ELISA com soro de paciente IgG positivo para RV. (0ng – não há proteína adsorvida na placa; 40ng – há 40ng de proteína adsorvida na placa; SP – soro IgG positivo como 1º anticorpo; CN – controle de kit negativo como 1º anticorpo e Anti-IgG humano conjugado com PA como 2º anticorpo).

Consta na literatura (Sambrook *et al*; 1989) que o uso de fosfatase alcalina em ensaios imunoenzimáticos utilizando soro humano é inadequado, pois há grande quantidade de fosfatase no soro o que gera um alto *background* nos ensaios dificultando a análise dos resultados. Desta forma, o teste foi repetido com anti-IgG humano conjugado com peroxidase como segundo anticorpo (fig. 35). Foram utilizados, também, soros positivos de duas pessoas (SP1 e SP2). Para análise de *background*, foram utilizados estes mesmos dois soros, reagindo diretamente com o segundo anticorpo (sem a proteína adsorvida na placa – SP1 + 0ng e SP2 + 0ng). Este controle negativo, com 0ng de proteína na placa, possibilitou demonstrar que a reação de ligação do anticorpo presente no soro de paciente infectado com a proteína multiepitopo é específica.

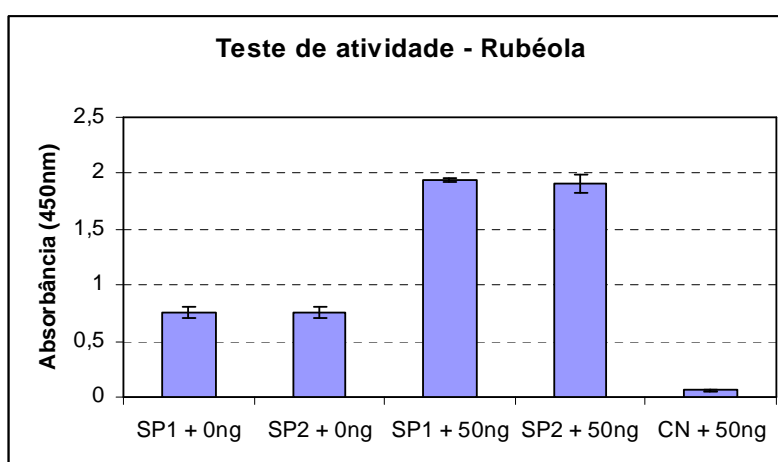


Figura 35. Teste de atividade biológica da proteína recombinante rMERUB. Utilizando dois soros positivos SP1 e SP2. SP1 + 0ng: soro positivo 1 em poço sem proteína adsorvida; SP2 + 0ng – soro positivo 2 em poço sem proteína adsorvida; SP1 + 50ng: positivo 1 em poço com 50ng de proteína adsorvida na placa; SP2 + 50ng: positivo 2 em poço com 50ng de proteína adsorvida na placa; CN + 50ng: controle negativo do kit comercial em poço com 50ng de proteína adsorvida.

O resultado do teste de ELISA (fig. 35) mostra que utilizando o segundo anticorpo conjugado com peroxidase o *background* diminui. Pode-se verificar que a leitura da A_{450nm} dos soros positivos é três vezes maior que a leitura nos poços sem proteína adsorvida, sugerindo reação específica do antígeno contra os anticorpos presentes no soro dos pacientes.

Foi também analisada a capacidade da proteína reconhecer o anticorpo IgM contra rubéola. Para isso, utilizamos controles positivos e negativos do kit comercial DiaSorin, que contem soro de paciente com IgM positivo e negativo, já que não conseguimos soros de pacientes para rubéola IgM. O segundo anticorpo utilizado foi o anti-IgM humano conjugado com fosfatase alcalina. Os resultados obtidos são observados na figura 36.

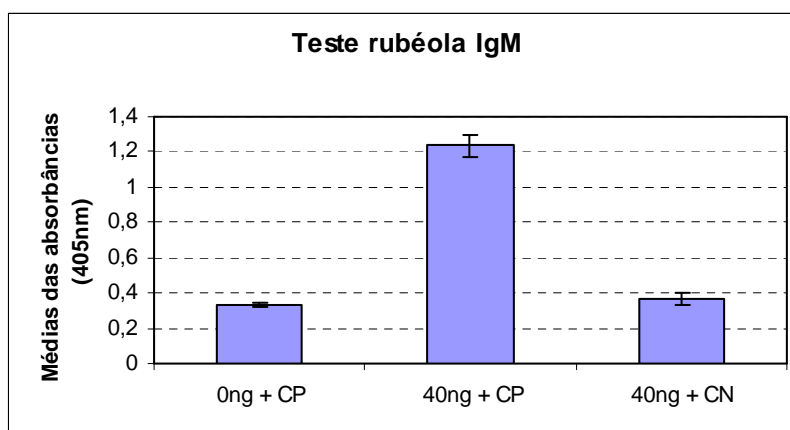


Figura 36. Teste de ELISA com controles IgM positivo e negativo para RV. (0ng – não há proteína adsorvida na placa; 40ng – há 40ng de proteína adsorvida na placa; CP – controle do kit IgM positivo como 1° anticorpo; CN – controle de kit IgM negativo como 1° anticorpo e Anti-IgM humano conjugado com PA como 2° anticorpo).

Percebe-se que a proteína recombinante rMERUB é capaz de reconhecer anticorpos específicos anti-RV IgG e IgM, confirmando sua atividade imunológica, como observado nas figuras 35 e 36. Também esta proteína recombinante tem a capacidade de ser utilizada em kits de diagnóstico como a rMEHB. Assim como para a rMEHB, também para rMERUB, ainda precisam ser padronizados parâmetros (tipo da placa, tipo de bloqueio, tempo de incubação em cada etapa, quantidade de lavagens, tempo de reação para revelar a formação do complexo antígeno-anticorpo) para diminuir o *background* e reações inespecíficas, o que será feita pela empresa WAMA diagnóstica, que desenvolverá os kits de diagnósticos para comercializá-los.

6. Conclusão e perspectivas

A aplicação de técnicas de biologia molecular permite, além de avanços no conhecimento do HBV e RV, o desenvolvimento de insumos para uso biotecnológico utilizando técnicas de engenharia genética. Esta estratégia de uma única cadeia polipeptídica contendo os epitopos imunodominantes, lineares e mais representativos do Brasil e no mundo, formando assim uma proteína multiepitopo é uma estratégia inovadora. Não existem kits de diagnóstico baseado em proteínas multiepitopos para hepatite B ou rubéola, o que torna essa tecnologia uma inovação, por este motivo estas proteínas estão sendo patenteadas (via CDT). Além disto, possibilita o seu uso na produção de anticorpos monoclonais e possível utilização destas proteínas para fins de pesquisa e desenvolvimento de vacinas, fármacos e medicamentos.

Os resultados apresentados por este trabalho são apenas o início de várias pesquisas que permitirão o uso das proteínas recombinantes comercialmente. As perspectivas traçadas são a realização de testes de atividades mais acurados permitindo a padrnização do kit de diagnóstico. Para tais experimentos, estão sendo produzidos anticorpos monoclonais contra a proteína rMEHB. Estes serão utilizados para testes de atividade antigênica de captura de anticorpos, permitindo a construção do kit de diagnóstico competitivo, como os encontrados comercialmente. Outra possível utilização comercial da proteína recombinante rMERUB é na fabricação de vacinas contra rubéola, já que foram utilizados epitopos neutralizantes na contrução da proteína.

7. Lista de abreviações

anti-HBc: anticorpo do *core* de Hepatite B

HBcAg: antígeno da região do *core* de Hepatite B

HBeAg: antígeno e de Hepatite B

HBsAg: antígeno de superfície de Hepatite B

anti-HBs: anticorpos de superfície de Hepatite B

anti-HBe: anticorpo e de Hepatite B

APB: tampão fosfato alcalino

ALT: alanina aminotransferase

AST: aspartato aminotransferase

HBV: vírus da Hepatite B (Hepatitis B virus)

CD: dicroísmo circular

HBcAg: antígeno do *core* de Hepatite B

rMEHB: multiepitopo recombinante de Hepatite B

MEHB: Multiepitopo de Hepatite B

PA: fosfatase alcalina

BSA: albumina de soro bovino

pNPP: p-nitrofenil fosfato

mL: mililitros

μL: microlitros

min: minutos

nm: nanômetros

x g: gravidade

°C: graus Celsius

mM: milimolar

M: molar

OD: densidade ótica

kDa: quilodalton

PBS: tampão fosfato salino (Phosphate Buffered Saline)

PBST: tampão fosfato salino tween (Phosphate Buffered Saline Tween)

ELISA: ensaio de ligação imunoenzimática (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

RV: vírus da Rubéola (Rubella vírus)

CDT: Centro de Desenvolvimento Tecnológico
IgG: imunoglobulina G
IgM: imunoglobulina M
CP: soro controle positivo comercial
CN: soro controle negativo comercial
SP: soro de paciente positivo
SN: soro de paciente negativo
 A_{450nm} : Absorbância a um espectro de 405nm
ORF: esquadro de leitura (open reading frame)
UTR: região não traduzida (untranslated region)
SRC: síndrome da rubéola congênita

8. Referências Bibliográficas

- ACKERKNECHT, E. H. 1982. A short history of medicine. Baltimore. Johns Hopkins University Press. p.129.
- AGENCIA Saúde. MS – Ministério da saúde. Base de dados do Portal Saúde. Saúde discute com ONGs prevenção e controle das hepatites 6/11/2003. Disponível em<http://portal.saude.gov.br/aplicacoes/noticias/noticias_detalhe.412>
- ANDRADE, J.Q; Bunduki, V; Curti, S.P; Figueredo, C.A; de Oliveira, M.I; Zubaib,M. 2006. Rubella in pregnancy: Intrauterine transmission and perinatal outcome during a Brazilian epidemic. *Journal of Clinical Virology*, 35: 285-291.
- ATKINSON W; Hamborsky J; McIntyre L; Wolfe S. 2007. Rubella. *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*. 10th ed.
- ATREYA C.D; Mohan K.V; Kulkarni S. 2004. Rubella virus and birth defects: molecular insights into the viral teratogenesis at the cellular level. *Birth Defects Res. Part a Clin. Mol. Teratol*, 70 (7): 431-7.
- BARON, M.D; Ebel, T; Suomalainen, M. 1992. Intracellular transport of rubella virus structural proteins expressed from cloned cDNA. *Journal of Virology*, 73:1073-1086.
- BARON, S; Peake, R.C; James, D.A; Susman, M; Kennedy, C.A; Singleton, M.J.D.; Schuenke, S. 1996. The University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas. *Medical Microbiology*, ed. 4.
- BEST, J..M. 2007. Rubella. Seminars in Fetal & Neonatal Medicine. *Science direct*, 12:182-192.
- BRADFORD, M.M. 1976 A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem*. 72:248-254.
- BRUSS, V. & Ganem, D. 1991. The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Medical Sciences*. 88:1059-1063.

- CAETANO, M. M; Beck, S. T. 2006. Importância da detecção de anticorpos anti-HBc na prevenção da transmissão do vírus da hepatite B (VHB) em bancos de sangue. *RBAC*, 38(4):235-237.
- CHÁVEZ, J. H; Campana, S. G; Haas, P. 2003. An overview of hepatitis B in Brazil and in the state of Santa Catarina. Washington. *Rev Panam Salud Publical Pan Am J Public Health*,14(2):277-284.
- CHAYE, H.P; Chong, B; Triplet, B; Brush, B; Gillam, S. 1992. Localization of virus neutralizing and hemmagglutinin epitopes of E1 glycoprotein. *Virology*, 189: 483-492.
- CHEN, J; Delbrook, K; Dealwis, C; Mimms, L; Mushahwar, I. K; Mandeck, W. 2001. Discontinuous epitopes of hepatitis B surface antigen derived from a filamentous phage peptide library. *PNAS*: 10:1073.
- COLLUCCI, G; Beazer, Y; Cantaluppi, C; Tackney, C. 1988. Identification of a major hepatitis B core antigen (HBcAg) determinant by using synthetic peptides and monoclonal antibodies. *Journal of Immunology*. 141(12): 4376-4380.
- COSTELLO, M; Yungbluth, M. 1999. Infecções virais. Diagnósticos Clínicos e Tratamento por métodos laboratoriais. New York. ed. 19. p. 1100.
- COTRAN, R. S; Kumar, V; Robbins, S. L. 1999. O Fígado e o Trato Biliar. *Patologia Estrutural e Funcional*, Rio de Janeiro; Guanabara Koogan S. A., 6ª ed., p.770.
- CUTTS F.T; Robertson S.E; Diaz-Ortega J-L; Samuel R. 1997. Control of rubella and congenital rubella syndrome (CRS) in developing countries. *Part 1: burden of disease from CRS. Bull World Health Organ*; 75:55-68.
- DOMINGUEZ G;Wang C.Y; Frey T.K. 1990. Sequence of the genome RNA of rubella virus: evidence for genetic rearrangement during togavirus evolution. *Virology* 177(1):225-38.
- EDLICH R.F; Winters K.L; Long W.B; Gubler K.D. 2005. Rubella and congenital rubella (German measles). *J Long Term Eff Med Implants* 15(3):319-28.

- FERRAZ M.L.G; Yoradjian A; Barbieri A; Figueiredo V; Neto E.L; Cruz C.N. 1998. Epidemiology of acute hepatitis B in a university hospital in São Paulo, Brazil: retrospective of two five-year periods. *Rev Paul Med*; 116(3):1695-1699.
- FERREIRA, M. S. 2000. Diagnóstico e tratamento da hepatite B. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 33(4):389-400.
- FOCACCIA, R. 2003. Tratado de hepatites virais. São Paulo. Editora Atheneu.119-192.
- FREY, T.K. 1998. Molecular Biology of rubella virus. *Advance in Virus Research.* 44:69-160.
- GIEFßAUF, A; Letschka, T; Walder, G; Dierich, M.P; Wurzner, R. 2004. A synthetic peptide ELISA for the screening of rubella vírus neutralizing antibodies in order to ascertain immunity. *Journal of Immunological Methods*, 287:1-11.
- HEMPHILL, M.L; Forng, R.Y; Abernathy, E.S; Frey, T.K. 1988. Time course of rubella virus-specific macromolecular synthesis during rubella virus infection in Vero cells. *Virology*, 162:65-75.
- JILBERT A.R; Kotlarski I. 2000. Immune responses to duck hepatitis B virus infection. *Dev Comp Immunol*, 24(2-3):285-302.
- JPELAAR, H; Hovanec-Burns, D. 1999. The Utility of the IMMULITE HBsAg. Confirmatory Kit. *EURO-DPC Technical Report*. ZB186-A
- KIELIAN, M; Jungerwirth, S.1990. Mechanisms of enveloped virus entry into cells. *Molecular Biology & Medicine* , 7:17-31.
- LAW, L.J; Ilkow, C.S; Tzeng, W.P; Rawluk, M; Stuart, D.T; Frey, T.K; Hobman, T.C. 2006. Analyses of Phosphorylation Events in the Rubella Virus Capsid Protein: Role in Early Replication Events. *Journal of virology*, 80(14):6917-6925.
- LEE J.Y; Bowden D.S. 2000. Rubella virus replication and links to teratogenicity. *Clin. Microbiol. Rev.* 13(4):571-87.

- LEE, J.Y; Bowden, S. 2000. Rubella virus replication and links to teratogenicity. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4):571-587.
- LEI, J; Campbel, B. A; Cervantes, C; Bronstein, L; Hong, D; Sustarsic, D. 2006. Detection of Hepatitis B Virus Surface Antigen (HBsAg). Mutants by IMMULITE® 2000 HBsAg Assay. *DPC Technical Report*. ZB248-A
- LIU, Z; Yang, D; Qiu, Z; Lim, K; Chong, P; Gillam, S. 1996. Identification of Domains in Rubella Virus Genomic RNA and Capsid Protein Necessary for Specific Interaction. *Journal of Virology*, 70:2184-2190.
- LONDESBOROUGH, P; Ho-Terry, L; Terry, G. 1995. Sequence variation and biological activity of rubella virus isolates. *Archives of Virology*, 140(3):563-570.
- LOZZI, L; Rustici, M; Corti, M; Cusi, M.G; Valensin, P.E; Bracci, L; Santucci, A; Soldani, P; Spreafico, A; Néri, P. 1992. Structure of rubella E1 glycoprotein epitopes established by multiple peptide synthesis. *Archives of Virology*, 110:3-4, 271-276.
- MARINHO, C; Agostinho, C. 2003. Hepatite B. *Hepatites víricas*. ed Núcleo de Gastreenterologia dos Hospitais Distritais. Brasília, DF. p 53-98.
- MASTROMARINO, P; Cioe, L; Riete, S; Orsi, N. 1990. Role of membrane phospholipids and glycolipids in the Vero cells surface receptor for rubella vírus. *Medical Microbiology and Immunology*, 179:105-114.
- MENDES, F. 1978. Hepatite. *Progresso em hepatite por vírus*. Rio de Janeiro. Serviço de hepatologia. 2ª ed, p.13.
- MINISTÉRIO da Saúde, Secretaria de Vigilância em saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2005. Hepatites Virais: o Brasil esta atento. Brasília. 2ª ed. 8-28.
- MINISTÉRIO da Saúde, Secretaria de Vigilância em saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2005. Guia de vigilância epidemiológica. Brasília. 6ª ed. p. 684-688.

- MITCHELL, L.A; De´carie, D; Tingle, A.J; Zrein, M; Lacroix, M; 1993. Identification of immunoreactive regions of rubella virus E1 and E2 envelope proteins by using synthetic peptides. *Virus Research*, 29:33.
- PEDNEAULT, L; Zrein, M; Robillard, L.1994. Comparison of Novel Synthetic Peptide-Based DETECT-RUBELLA Enzyme Immunoassays with Enzygnost and IMx for Detection of Rubella-Specific Immunoglobulin G. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(4):1085-1087.
- PETRUZZIELO, R; Orsi, N; Macchia, S; Rieti, S; Frey, K; Mastromarino, P. 1996. Pathway of rubella virus infection entry into Vero cells. *Journal of General Virology*, 77: 303-308.
- PINHO, J. R; Bassit, L; Sáez-Alqu zar, A. 1995. Estrutura dos vírus das hepatites. São Paulo. Savier Editora de livros médicos LTDA. 2^a ed. p. 9-25.
- REVILL P; Yuen L; Walsh R; Perrault M; Locarnini S; Kramvis A. 2010. Bioinformatic analysis of the hepadnavirus e-antigen and its precursor identifies remarkable sequence conservation in all orthohepadnaviruses North Melbourne, Australi. *J Med Virol*; 82(1):104-15.
- RAVEL, R.1997. Laboratório Clínico: Aplica es Clínicas dos Dados Laboratoriais. 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- SALFELD, J;Pfaff, E; Noah, M; Schaller, H. 1989. Antigenic determinants and functional domains in core antigen and e antigen from hepatitis B virus. *Journal of Virology*. 63(2):798-808.
- SÄLLBERG, M; Rud n, U; Wahren, B; Magnius, L.O. 1994. Immune recognition of linear antigenic regions within the hepatitis B pre-C and C-gene translation products using synthetic peptides. *Journal of Medical Virology*, 42(1):7-15.
- SÄLLBERG, M; Rud n, U; Wahren, B; Magnius, L.O.1991. Human and murine B-cells recognize the HBeAg/beta (or HBe2) epitope as a linear determinant. *Molecular Immunology*, 28(7):719-26.

- SAMBROOK, J. T; Fritsch, E. F; Maniatis, T. 1991. Molecular cloning: a laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- SILVA, L.C. 1995. Hepatites agudas e crônicas. São Paulo. Savier Editora de livros médicos LTDA. 2ª ed. p. 2-140.
- SILVA, L.C; Granato, C.F. H. 1995. Importância clínica dos marcadores virais. São Paulo. Savier Editora de livros médicos LTDA. 2ª ed. p. 27-34
- Sítio da Internet da Organização Mundial da Saúde - OMS: <http://www.who.int/en>
- Sítio da Internet: http://researchnews.osu.edu/archive/HTLV1_cartoon.jpg.jpg
- Sítio da Internet: <http://www.drthuthuy.com/images/genotype02.jpg>
- STEIBEL, G; Milan, C; Piffero Steibel, J.A; Cunha Filho, E.V; Torrens, M.C; Stucky, J.M. 2007. Prevalence of rubella IgG antibodies in pregnant women of São Lucas Hospital. Porto Alegre. *Scientia Medica*. 17:115-118.
- TAKAHASHI, K; Mishiro, S; Prince, M. 2001. Novel Hepatitis B Virus Strain from a Chimpanzee of Central Africa (*Pan troglodytes troglodytes*) with an Unusual Antigenicity of the Core Protein. *Intervirology*, 44:321-326.
- THERMET, A; Robaczewska, M; Rollier, C; Hantz, O; Trepo, C; Deleage, G; Cova, L. 2004. Identification of Antigenic Regions of Duck Hepatitis B Virus Core Protein with Antibodies Elicited by DNA Immunization and Chronic Infection *Journal of Virology*, 78(4):1945-1953.
- TORDJEMAN, M; Fontan, G; Rabillon, V; Martin, J; Treco, C; Hoffenbach, A; Mabrouk, K; Sabatier, J.M; Van Rietschoten, J; Somme, G. 1993. Characterization of minor and major antigenic regions within the hepatitis B virus nucleocapsid. Paris. *J Med Virol*, 41(3):221-9.
- WASENAUER, G; KrCK, J. & Schlicht, H.-J. 1992. A cysteine and a hydrophobic sequence in the noncleaved portion of the pre-C leader peptide determine the biophysical properties of the secretory core protein (HBe protein) of human hepatitis B virus. *Journal of Virology*. 66:5338-5346.

- WOLINSKY, J; Sukholutsky, E; Moore, W.T; Lovet, A. 1993. An Antibody- and Synthetic Peptide-Defined Rubella Virus E1 Glycoprotein Neutralization Domain. *Journal of Virology*. 67(2):961-968.
- WYNGAARDEN, J. B; Smith, L. H. 2000. Hepatite Viral Aguda. *Cecil – Tratado de Medicina Interna: Saunders*, 21^a ed., p.721.
- YAO, J.D; Yang, P; Chong, D; Hwang, Y; Liang Gillam, S. 1998. Proteolytic processing of rubella virus nonstructural proteins. *Virology*, 246:74-82.
- YOUMANS, G.P; Paterson, P. Y; Sommers, H..M. 1983. Bases Biológicas e Clínicas das doenças infecciosas. *Hepatite por vírus*.Filadélfia; Editora Artes médicas LTDA. 2^a ed. p. 612-613.
- ZHOU, Y; Ushijima, H; Frey, T.K. 2007. Genomic analysis of diverse rubella vírus genotypes. *Journal of General Virology*, 88(3):932-941.

Anexo I – Patente Hepatite B

“PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE PARA USO EM KIT DE DIAGNÓSTICO PARA HEPATITE B E/OU PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E/OU PARA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE VACINAS, FÁRMACOS E MEDICAMENTOS”

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção trata da construção biotecnológica de uma proteína antigênica recombinante contendo quatro epitopos dominantes, do nucleocapsídeo (core) do vírus *HBV*, causador da Hepatite B, e sua utilização na produção de anticorpos monoclonais e possível utilização da mesma para fins de pesquisa e desenvolvimento de vacinas, fármacos e medicamentos e em kits de diagnóstico de Hepatite B na fase aguda, na fase de convalescência, fase crônica e após a cura, para identificar indivíduos que já tiveram contato com o vírus.

Utilizando as técnicas de biologia molecular é possível demonstrar a importância do HBV como fator etiológico de hepatopatias crônicas e do hepatocarcinoma (Ferreira, M. S. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 33 389-400. 2000). A construção de um polipeptídeo anti-HBc recombinante multiepitopo é mais eficaz no reconhecimento de marcadores moleculares por possuir maior sensibilidade e especificidade ao substrato, o que possibilita o diagnóstico de hepatite B em hemocentros, tanto para evitar o desperdício de bolsas de sangue, como para garantir a utilização de sangue saudável, além de oferecer um diagnóstico preciso para população em geral. No entanto, estas técnicas ainda são pouco exploradas no País. Na maioria dos casos, os kits de diagnósticos moleculares são importados. Sendo assim, a estratégia desenvolvida apresenta interesse para a indústria farmacêutica e biotecnológica para a fabricação de kits de diagnósticos com baixos custos para sua exequibilidade industrial, aliado a praticidade utilitária, oferecendo ao público consumidor, uma opção de menor custo no mercado de kits de diagnósticos atuais, utilizando tecnologia nacional.

ESTADO DA TÉCNICA

O HBV é um adenovírus pertencente ao grupo de vírus *Hepadnaviridae*, caracterizado por possuir uma replicação do DNA a partir de RNA, transcrição reversa. Consiste de uma partícula esférica de dupla camada, uma externa também chamada de envelope, e uma interna

chamada de central. A parte central contém polimerases e o DNA viral, sendo este circular e de dupla hélice, que codifica proteínas estruturais e não-estruturais (Lei, J. *et al. DPC Technical Report. ZB248-A. 2006*). A proteína que compõe o capsídeo viral é a proteína do core HBc e está presente somente durante a infecção viral, não sendo detectado livre no plasma. As proteínas antigênicas de superfície (HBsAg) são encontradas, geralmente, em altas concentrações no sangue e em outros líquidos orgânicos. O HBsAg é o principal marcador para teste de diagnóstico de Hepatite B. A sua presença significa infecção mantida, porém não está relacionada com o nível de atividade viral, assim como não é indicador da cinética da doença, sua negatividade não significa ausência de infecção (Wyngaarden, J. B. & Smith, L. H. *Cecil – Tratado de Medicina Interna: Saunders, 21ª ed., p.721. 2000*).

Na hepatite B, o primeiro antígeno detectado é o AgHBs. Em seguida, detecta-se o antígeno AgHBe. O primeiro anticorpo a ser detectado é o anti-HBc-IgM. A presença deste anticorpo possibilita a distinção da infecção atual de uma infecção passada ou remota pelo HBV, pois após a infecção o anti-HBc-IgM torna-se indetectáveis. O anti-HBc-IgG também aparece cedo, logo após o IgM, alcançando rapidamente títulos elevados na hepatite aguda, permanecendo por toda a vida, mesmo após a cura. Após o desaparecimento do AgHBe, aparece o anti-HBe. A soroconversão é indicativa de redução da replicação, abrindo perspectiva para a cura (Wyngaarden, J. B. & Smith, L. H. *Cecil – Tratado de Medicina Interna: Saunders, 21ª ed., p.721. 2000*).

Por ser o primeiro anticorpo presente, e algumas vezes o único marcador detectado durante a evolução da infecção, o anti-HBc pode indicar tanto infecção aguda pelo HBV (anti-HBc IgM) como identificar indivíduos que entraram em contato com o vírus (anti-HBc-IgG), pois este marcador usualmente persiste após a eliminação do vírus. A detecção do anti-HBc pode evitar a transmissão de cepas mutantes ou cepas selvagens, em bolsas de sangue destinadas a transfusão, que não são detectadas pelas limitações nos métodos convencionais ainda utilizados na triagem dos doadores de sangue (Caetano, M. M. & Beck, S. T. *RBAC, vol. 38(4), p. 235-237. 2006*).

Os epitopos do vírus HBV reconhecidos pelos anticorpos variam com os estágios da doença. A região genômica precore/core mostrou-se a mais conservada e, portanto a melhor indicada para análises peptídicas. Em infecção aguda, os anticorpos anti-HBc reconhecem todos os peptídeos. Após a fase aguda, os anticorpos anti-HBc reconhecem principalmente

epitopos localizados na região central da proteína HBc, do resíduo 74 ao 123 (Tordjeman *et al.*, 1993. J Med Virol. 41(3):221-9.).

Estudos utilizando anticorpos monoclonais HBe/HBc, mostraram que todos os mAbs anti HBe/HBc reconheceram o peptídeo: 126-135, sendo que a região 128-133 foi determinada como essencial. Outra pesquisa com 46 pacientes para analisar a reação dos peptídeos virais com anticorpos de pacientes infectados, foi observado que dois pacientes reconheceram o peptídeo 76-83 do HBc/eAg, sendo Asp78, Pro79, Arg82, e Asp83 os resíduos essenciais. Dois de dez casos de HB aguda, reagiram com o peptídeo 61-85. Cinco dos doze casos de pacientes HBeAg positivos, reagiram fracamente com os peptídeos 41-60, 61-85, 121-140 e/ou 141-160. Oito dos 12 casos de pacientes anti-HBe positivos reagiram com o peptídeo 121-140. IgG de coelhos imunizados reconheceram os peptídeos 1-20, 61-85 e 71-90 (Sallberg *et al*; 1991 Mol Immunol. 28(7): 719-26).

Peptídeos localizados na região hidrofílica da proteína C foram sintetizados por Colluci e colaboradores (1988). Nesta pesquisa, soros de vinte pacientes, três anticorpos monoclonais anti-HBc e dois anticorpos monoclonais anti-HBe foram testados. O peptídeo 107-118 reagiu com todos os soros e mAbs anti-HBc testados (Colluci, *et al*; 1988 . J. Immunol. 141(12): 4376-4380).

Takahashi e colaboradores (2001), utilizando anticorpos monoclonais contra o epitopo 135-145 do HBcAg, mostraram que este peptídeo é equivalente aos utilizados em testes de diagnósticos anti-HBc de rotina (Takahashi *et al*; 2001, Intervirology; 44:321-326).

Estudos mostraram que a alta densidade de epitopos específicos para uma doença, filogeneticamente conservados e imunodominantes, quando selecionados para construir uma proteína sintética multiepitopo, são capazes de reconhecer anticorpos específicos e contribuir para um elevado grau de especificidade e sensibilidade (Dipti, C.A et al. Protein Expres Purif. 47: 319-328. 2006). Além disso, a estratégia da utilização de uma única proteína recombinante multiepitopo elimina a necessidade de sintetizar e expressar várias seqüências peptídicas (Pat. No WO 2005/014627 A1).

A aplicação de técnicas de biologia molecular permitiu, além de notáveis avanços no conhecimento do próprio HBV, a construção de kits de diagnósticos para a doença utilizando técnicas de engenharia genética. No entanto, estas técnicas ainda são pouco exploradas em território nacional. Na maioria dos casos, os kits de diagnósticos moleculares são importados.

A construção de um polipeptídeo anti-HBc recombinante com multiepitopos é mais eficaz no reconhecimento de marcadores moleculares por possuir maior sensibilidade e

especificidade ao substrato. Isto possibilita o diagnóstico de hepatite B em hemocentros, tanto para evitar o desperdício de bolsas de sangue, como para garantir a utilização de sangue saudável, além de oferecer um diagnóstico preciso para população em geral.

Diferente deste trabalho, outros estudos descrevem a utilização de peptídeos sintéticos em vacinas (US Pat. No. 5,204,096) ou ainda em kits de diagnósticos (US Pat. No. 6,544,520 B1). No entanto, a síntese de vários peptídeos pode tornar a sua utilização inviável comercialmente devido o alto custo. A construção de uma única molécula multiepitopo elimina este problema e apresenta a vantagem da facilidade de manipulação.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

As proteínas recombinantes multiepitopos produzidas em *Escherichia coli* podem ser usadas em kits de diagnóstico para Hepatite B, podendo eliminar o problema da quantidade dos epitopos nos kits e ausência de epitopos mais prevalentes no Brasil e no mundo. Essas proteínas multiepitopos consistem de uma única cadeia polipeptídica contendo os epitopos imunodominantes, lineares e mais representativos do Brasil e no Mundo. Esses epitopos correspondem a regiões virais que conhecidamente elicitam uma resposta imune em indivíduos infectados com Hepatite B. É uma estratégia inovadora uma vez que no Brasil e no Mundo não existe um kit de diagnóstico baseado em proteínas multiepitopos para hepatite B, o que torna essa tecnologia uma inovação. Assim o desenvolvimento dessa estratégia visa aumentar a sensibilidade de um kit de diagnóstico anti-HBc. Por isso, essa tecnologia tem como objetivo principal fornecer um modo de melhorar o processo de detecção do vírus em relação aos outros kits de diagnóstico anti-HBc encontrados no mercado.

Quatro epitopos foram selecionados para o gene do vírus HBV. Na sequência gênica, MEHB, o primeiro epitopo (resíduos 61-83) contém 23 aminoácidos (aa), o segundo (resíduos 107-118) 12 aa, o terceiro (resíduos 128-133) 6 aa e o quarto (resíduos 134-145) 12 aa. Os epitopos foram separados com linkers flexíveis de Glicina e Serina para permitir a distinção da proteína deixando-a linear para facilitar o reconhecimento do anticorpo ao antígeno (Dipti, C.A *et al.* Protein Expres Purif. 47: 319-328. 2006), compondo, assim, um peptídeo de aproximadamente 7 kDa. Para facilitar a manipulação da proteína a sequência do peptídeo foi repetida três vezes, formando um peptídeo de aproximadamente 21kDa. Por estarem em tandem, os epitopos 3 e 4 não forma separados. A partir de análises *in silico* foi

selecionados codons preferenciais para *E. coli* e foram quantificadas as bases nitrogenadas citocina e guanina (CG), sendo observado um total de 59,8% das bases para MEHB.

Tem-se, portanto, no pedido de patente em questão, como “insumos para kits de diagnóstico e/ou para produção de anticorpos monoclonais e/ou para pesquisa e desenvolvimento de vacinas, fármacos e medicamentos” as proteínas recombinantes multiepitopos produzidas em *Escherichia coli* especialmente desenvolvida para se obter maior quantidade e sensibilidade dos epitopos mais prevalentes e que traz grandes vantagens, tanto em sua utilização como em sua fabricação de um produto genuinamente nacional, agregando baixos custos para sua exequibilidade industrial, aliado a praticidade utilitária. Oferecendo desta forma ao público consumidor, uma opção de menor custo no mercado de kits de diagnóstico, que ao contrário dos kits atuais tem um custo elevado devido ao fato de serem importados.

A presente invenção representa uma alternativa para o diagnóstico de pacientes infectados com o antígeno do core do vírus da hepatite B, pois permite uma detecção na fase de janela imunológica, onde o AgHBc é o único marcador molecular presente, detecta pacientes que evoluíram para a cronicidade e ainda pacientes que já estão curados da enfermidade mas são impossibilitados de doar sangue, evitando desperdícios nos bancos de sangue e uso de sangue contaminado com o antígeno do vírus.

A **Figure 1** Desenho da seqüência completa de nucleotídeos e seqüência prevista de aminoácidos da proteína recombinante rMEHB.

A **Figura 2** mostra a análise da cinética de indução em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%. Material coletado após a indução de expressão da MEHB. 1) Tempo 0h de indução; 2) tempo 30 minutos de indução; 3) tempo 1h30 min; 4) tempo 2h30min; 5) marcador de massa molecular (Unstained Protein Molecular Weight Marker – Fermentas Life Science).

A **Figura 3** é a confirmação da banda de indução por gel Westrn-Blot. A) Gel de poliacrilamida após 2h30 min de indução da proteína e rMEHB; B) Marcador de massa molecular (Fermentas Life Science); C) Detecção de proteína por Western Blot em membrana de nitrocelulose.

A **Figura 4** mostra a análise do gel SDS-PAGE das frações da coluna de afinidade Ni-NTA obtidas durante a purificação. 1 – Marcador de massa molecular, (Fermentas Life Science). 2 – *flowthrough*; 3, 4 e 5 – etapas de lavagem da resina com o tampão de lavagem; 6, 7, 8 e 9 – frações da eluição da proteína rMEHB pura.

A **Figura 5** mostra a atividade biológica da proteína recombinante rMEHB. Com o aumento das concentrações da proteína recombinante (50ng, 500ng, 1µg, 10µg e 15µg), verifica-se também o aumento da quantidade de moléculas ligadas à placa, confirmando a capacidade da proteína rMEHB e se ligar a anticorpos Anti-HBc. Foi usado como controle negativo tampão salino (PBS), o mesmo tampão em que as amostras foram diluídas.

A **Figura 6** mostra a capacidade do antígeno recombinante rMEHB ser utilizado em kits de diagnóstico. Substituição do antígeno comercial pelo antígeno rMEHB em um teste de diagnóstico comercial competitivo. CP – Soro controle comercial positivo; CN – Soro controle comercial negativo. O anticorpo anti-polyhistidine conjugado com fosfatase alcalina foi utilizado como segundo anticorpo no teste.

O processo de produção da proteína multiepitopo é descrito pelas seguintes etapas subsequentes: síntese, clonagem, expressão e purificação de acordo com os exemplos de 1 a 4.

EXEMPLO 1: SÍNTESE QUÍMICA DOS GENES E CLONAGEM NO VETOR DE EXPRESSÃO

A proteína recombinante produzida nessa invenção foi codificada por seqüências de DNA sintetizadas *de novo* em indústrias especializadas na síntese química de genes. No desenho dos genes, foram considerados os seguintes critérios:

- a) *Codon usage* dos organismos onde os genes serão expressos;
- b) Adição de sítios de restrição apropriados nas extremidades dos genes para facilitar as clonagens;
- c) Os genes sintetizados codificam uma proteína multiepitopo clonada no vetor de expressão em pET21a.

Resultando na seqüência mostrada na figura 1.

EXEMPLO 2: EXPRESSÃO HETERÓLOGA DAS PROTEÍNAS MULTIEPITOPOS RECOMBINANTES

Os genes que codificam para a proteína multiepítopo a serem expressos em *E. coli* foram clonados no vetor pET21a que já possui um *tag* de purificação composto por seis histidinas (His-Tag) que possibilitará a purificação da proteína recombinante em colunas de afinidade Ni-NTA. A clonagem dos genes foi realizada de forma orientada de acordo com os sítios de restrição a serem adicionados na seqüência primária dos genes. Os vetores resultantes foram utilizados para a transformação de *E. coli* cepa BL21(DE3) pLysE. A expressão pode ser feita em pequena escala (até 1 litro) ou em escalas maiores (acima de 1 litro) em frascos sob agitação. A indução da expressão foi feita pela adição do agente indutor IPTG, seguindo-se a coleta de amostras e a análise das mesmas através de SDS-PAGE. Após um processo de otimização da produção da proteína multiepítopo, os clones com maiores níveis de expressão assim como o melhor tempo de indução foram selecionados para a continuidade do processo de produção. Dados da indução são mostrados na figura 2 e confirmados na figura 3.

EXEMPLO 3: OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS MULTIEPITOPO EM FERMENTADOR

Os clones selecionados de acordo com o exemplo 2 podem ser cultivados em fermentadores, que pode monitorar os seguintes parâmetros: crescimento, inóculo inicial, pH e aeração. A análise do perfil protéico pode ser realizada por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), identificando-se deste modo, a presença e integridade das proteínas multiepítopo recombinantes. A quantificação dessas proteínas multiepítopo produzidas pode ser feita pelo método de Bradford para quantificação de proteínas totais (Bradford MMA. *A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein dye binding*. Anal Biochem 72: 248-254. 1976).

EXEMPLO 4: PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS MULTIEPITOPO RECOMBINANTES

As células foram coletadas ao final da indução e centrifugadas, o pellet ressuspensionado em tampão desnaturante (tampão de lise, contendo uréia 8M, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 10 mM, pH 8) ou congelado a – 20 °C. Foi usado somente tampão de lise para liberação do conteúdo intracelular da *E.coli*, diferente dos outros trabalhos descritos no estado da técnica que usam uma etapa adicional de sonicação, dispensada na presente

invenção. A sonicação é utilizada para o rompimento das células visando a liberação de uma maior quantidade da proteína de interesse na fração solúvel. Entretanto, no presente pedido de patente a tecnologia foi otimizada de modo a dispensar essa etapa que, em alguns casos, dependendo do tempo de exposição ao ultra-som, pode desnaturar a proteína de interesse. O extrato total foi clarificado por centrifugação (6000 x g por 30min) e o sobrenadante, contendo as proteínas solúveis, foi utilizado para as etapas subsequentes de purificação. A purificação da proteína recombinante, que contém a cauda de histidina, foi feita em condição desnaturante. O extrato total de proteína foi incubado por 1h30min, 4°C, sob agitação orbital com a resina Ni-NTA para ligação da proteína recombinante por afinidade. A lavagem e remoção das proteínas não ligadas ou fracamente ligadas à resina foi feita com tampão de lavagem contendo ureia 8M, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 20 mM, pH 8.0, por 3 vezes utilizando 2 vezes o volume da resina em cada etapa. A eluição da proteína recombinante ligada à resina de níquel foi feita com tampão NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM contendo imidazol 50 mM, pH 8.0 em 3 etapas utilizando um volume da resina cada uma. Alíquotas da etapa de eluição (15ul) foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Dados da purificação são mostrados na figura 4.

EXEMPLO 5: TESTES DE ATIVIDADE IMUNOLÓGICA

O método utilizado para o teste se baseia na interação antígeno-anticorpo. Foi utilizado uma placa de teste de ELISA comercial contendo um anticorpo anti-HBc adsorvidos em cada poço. Foi adicionado, em cada poço da placa, diferentes concentrações da proteína multiepitopo recombinante rMEHB em triplicata (50ng, 500ng, 1µg, 10µg e 15µ). Após 2h de incubação a 37°C, A superfície é lavada para retirar as proteínas que não se ligaram aos anticorpos presentes na placa. São feitas três lavagens com PBS Tween 5% (PBST). Em seguida, são adicionados 100µL de anticorpo monoclonal Anti-polyhistidine, produzido em rato (Sigma) conjugado com fosfatase alcalina, que irá produzir uma substância amarelada. O anticorpo é diluído em tampão salino PBS, este tampão também foi utilizado como controle negativo para verificar se não havia reação (inespecífica) por causa do tampão. Após incubação de 2h a 37°C a superfície é lavada novamente para a retirada do anticorpo que não se ligou ao antígeno que está ligado à placa. Adiciona-se o substrato de ligação (pNPP – 2mg/mL) para a enzima produzir a substância corada e, assim, medindo-se a intensidade da cor da superfície, por espectrofotômetro, pode-se quantificar e verificar a presença da

substância de interesse. Dessa forma, pode-se analisar a capacidade da proteína recombinante em se ligar ao anticorpo presente na placa. O comprimento de onda utilizado para quantificar a intensidade da coloração foi de 405nm (A_{405nm}). A leitura verificada para a maior concentração usada (15 μ g) está acima da curva de leitura pelo espectrofotômetro (acima de três).

A capacidade da proteína recombinante se ligar ao anticorpo presente na placa comercial é mostrada na figura 5.

Para comprovar a capacidade da proteína recombinante rMEHB ser utilizada em um teste de diagnóstico de Hepatite B, foi utilizado o mesmo kit comercial substituindo o antígeno do kit pela proteína rMEHB. O teste foi realizado com os soros controles do kit (positivo e negativo). Foram seguidos os passos do protocolo do kit comercial, adicionando à placa do kit, que continha anticorpos monoclonais aderidos à superfície, 50 μ L de tampão de incubação, em seguida, 50 μ L do controle (positivo ou negativo) e 50 μ L da solução contendo o antígeno recombinante rMEHB (0,75 μ g/mL em PBS). A placa foi incubada por 2h a 37°C. Após a incubação a placa foi lavada 4 vezes com 200 μ L/poço de PBST. Após a lavagem, foi adicionada à placa 100 μ L do segundo anticorpo (anti-polyhistidine conjugado com fosfatase alcalina diluído 1:1000 em PBS). A placa foi incubada durante 1h a 37°C. Novamente foi lavada 4 vezes com 200 μ L/poço de PBST e, por fim, foi adicionado o tampão de revelação pNPP (2mg/mL). Por ser um teste competitivo o anticorpo anti-HBc presente no soro (controle positivo) competirá com o anticorpo presente na placa do kit pelo antígeno rMEHB. O rMEHB se liga ao anticorpo do soro e não na placa, sendo descartado durante a lavagem. Na ausência de anticorpos anti-HBc no soro (controle negativo) o rMEHB se liga ao anticorpo da placa ficando “preso” mesmo após as lavagens. O segundo anticorpo se liga a cauda de histidina presente no antígeno rMEHB e com a adição do tampão de revelação a fosfatase alcalina emite uma coloração amarelada e pode ser mensurada em espectrofotômetro (A_{405nm}). A interpretação dos resultados se dá da seguinte forma: se há coloração amarelada forte o soro ou controle utilizado é negativo, se há ausência de cor ou coloração amarelada fraca o soro ou controle utilizado é positivo, fazendo assim o diagnóstico.

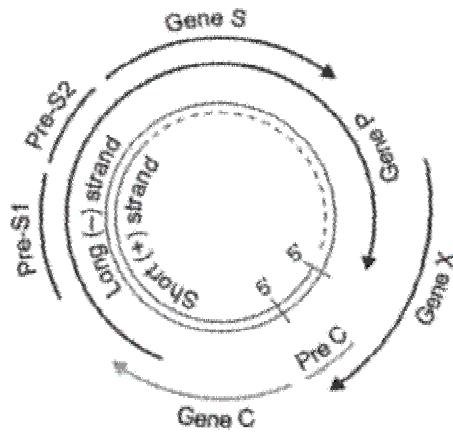
A figura 6 mostra a capacidade da proteína recombinante (rMEHB) ser utilizada em kits de diagnósticos.

RESUMO

“PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE PARA USO EM KIT DE DIAGNÓSTICO PARA HEPATITE B E/OU PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E/OU PARA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE VACINAS, FÁRMACOS E MEDICAMENTOS”

A Hepatite B é uma inflamação hepática causada pelo vírus HBV. O primeiro anticorpo a ser detectado após a infecção é o anti-HBc-IgM. Por ser o primeiro anticorpo presente, e algumas vezes o único marcador detectado durante a evolução da infecção, o anti-HBc pode ser usado tanto para indicar infecção aguda pelo HBV (anti-HBc IgM) quanto para identificar indivíduos que entraram em contato com o vírus (anti-HBc-IgG). O objetivo do presente trabalho é a produção de uma proteína multiepitopo HBc (rMEHB) que seja eficaz no reconhecimento de marcadores moleculares para diagnóstico de hepatite B. Para o desenho da sequência do gene rMEHB (609 pb) foi feita uma busca na literatura para a seleção dos epitopos mais comuns e conservados do vírus HBV. O gene sintético foi clonado no vetor pET21a contendo uma cauda de histidina na extremidade C-terminal. O gene foi inserido em *E. coli* BL21 (λ DE3)pLysS, para indução da expressão da proteína recombinante (r-ME-HB). Em seguida, a proteína foi purificada por cromatografia de afinidade. Testes de ELISA comprovaram a atividade antigênica da proteína rMEHB e a capacidade desta proteína ser utilizada em kits de diagnóstico. Tem-se, portanto, no pedido de patente em questão, como insumo para kit de diagnóstico Anti-HBc, uma proteína multiepitopo engenheirada especialmente projetada e desenvolvido para trazer vantagens, tanto em sua utilização, visando aumentar a sensibilidade dos kits de diagnósticos anti-HBc como em sua fabricação, agregando baixos custos, uma vez que se trata de um tecnologia genuinamente nacional. Além disso, é a primeira vez, descrito na literatura, o uso de proteínas multiepitopos recombinantes contendo os epitopos mais representativos do Brasil.

FIGURA 1



DNA sequence

```

CATATGTGCTGGGGTGAATTAATGAATTAGCAACGTGGGTTGGCAGCAATCTGGAAGATCCGGCTAGCCGCGAGGGCAGC
GGCTCTGGCTGCCTGACCTTCGGCCGGGAGACGGTGTAGAAATACGGTTCGGGTAGTGGTACGCCTCCTGCGTATCGTCCG
CCGAATGCCCCGATTTTAAGCACCCCTGCCGGAAGGTTACAGGTAGTGGTTGCTGGGGTGAGCTGATGAATCTGGCCACCTGG
GTGGGTTCTAACCTGGAGGACCCGGCCAGCCGCGAGGGTAGTGGTAGCGGTTGTTAACCTTTGGGCGTGAAACAGTTCTG
GAATATGGTTCTGGCAGTGGCACCCCGCGCATAACCGTCCGCGAACGCTCCGATTCTGAGCACACTGCCAGAAGGGTCT
GGGTCAGGGTGTGGGGGAGCTGATGAACCTGGCGACGTGGGTAGGGTCAAACCTGGAAGACCCTGCATCTCGGAAGGC
TCAGGCAGTGGCTGTCTGACTTTTGGCCGCGAAACCGTCTGGAATATGGCTCCGGCTCCGGCACTCCGCCAGCGTATCGT
CATGTAACCGCGCAATCCTGTCCACTCTGCCTGAACTCGAG
    
```

Protein sequence

```

MCWGELMNLATWVGSNLEDPASREGSGSGLTFGRETVLEYGSGSGTTPPAYRPPNAPILSTLPEGSGSGCWGELMNLATWVGSNLE
DPASREGSGSGLTFGRETVLEYGSGSGTTPPAYRPPNAPILSTLPEGSGSGCWGELMNLATWVGSNLEDPASREGSGSGLTFGRE
TVLEYGSGSGTTPPAYRPPNAPILSTLPE
    
```


FIGURA 2

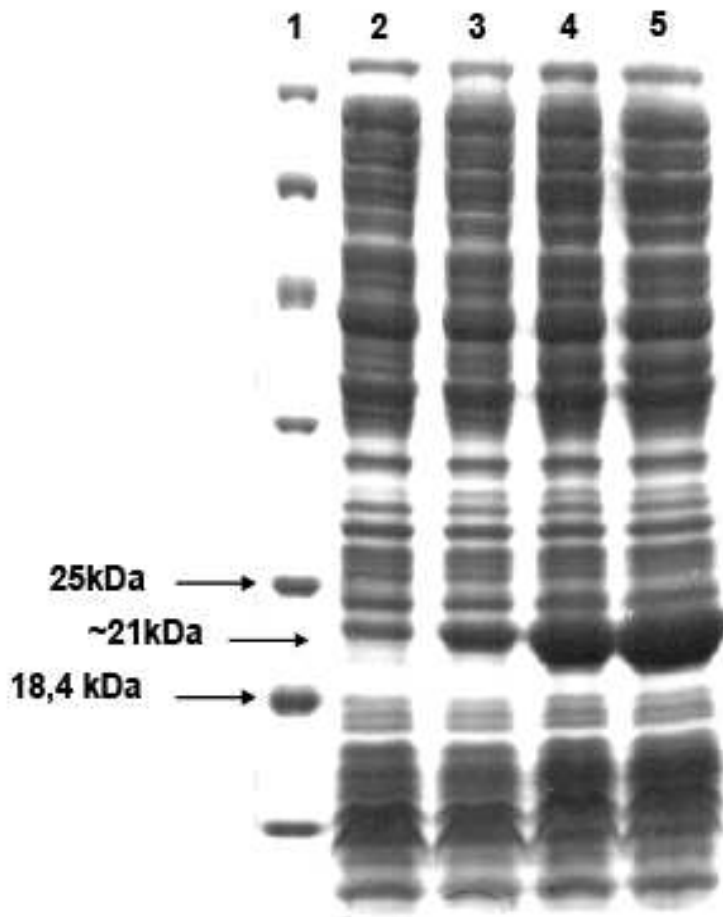


FIGURA 3

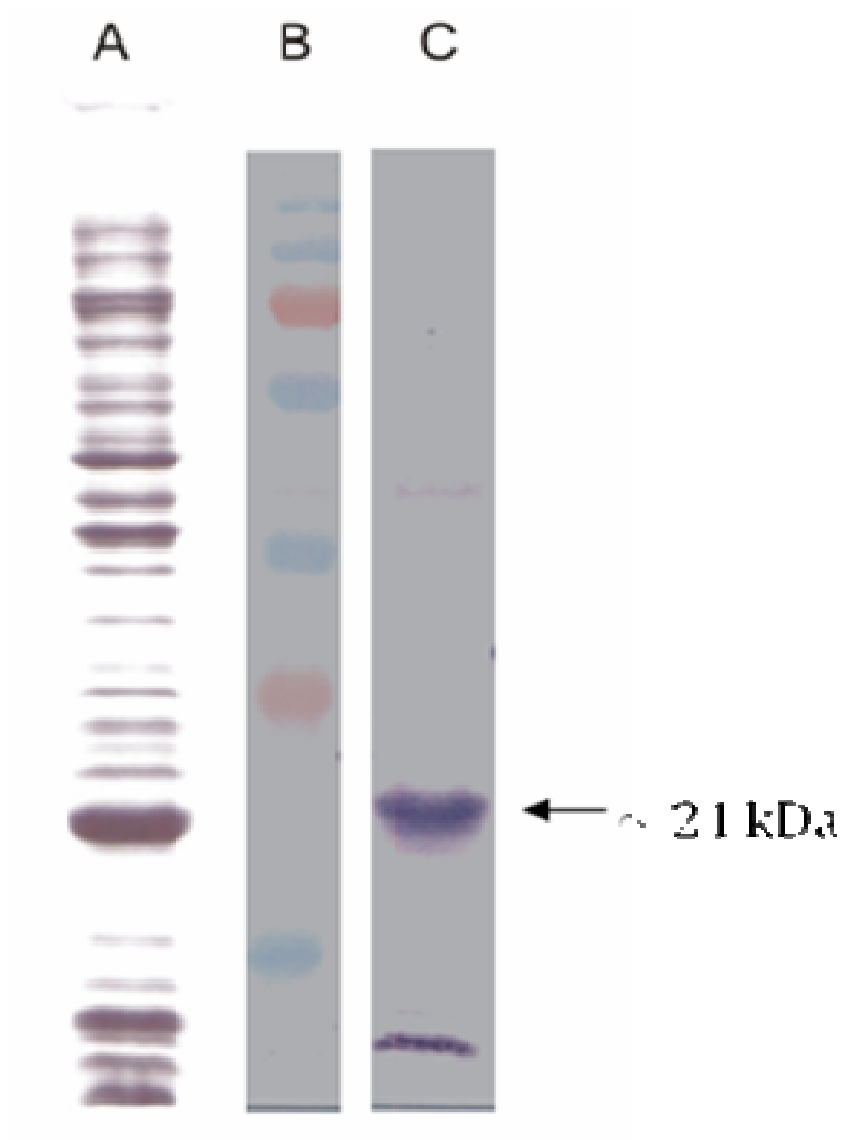


FIGURA 4

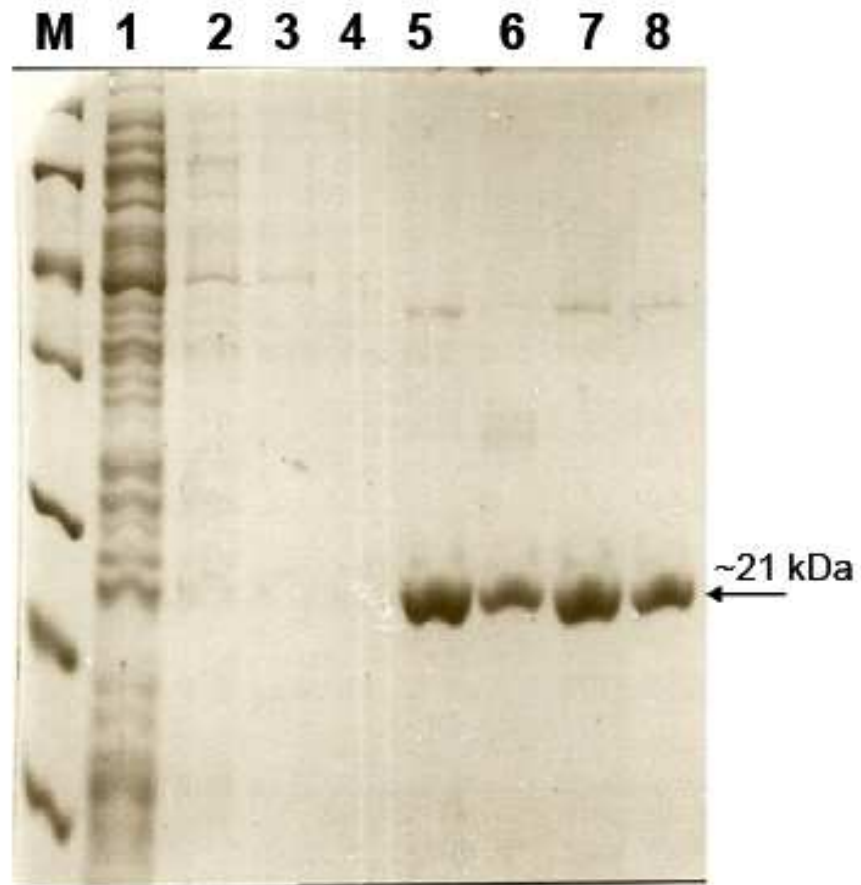


FIGURA 5

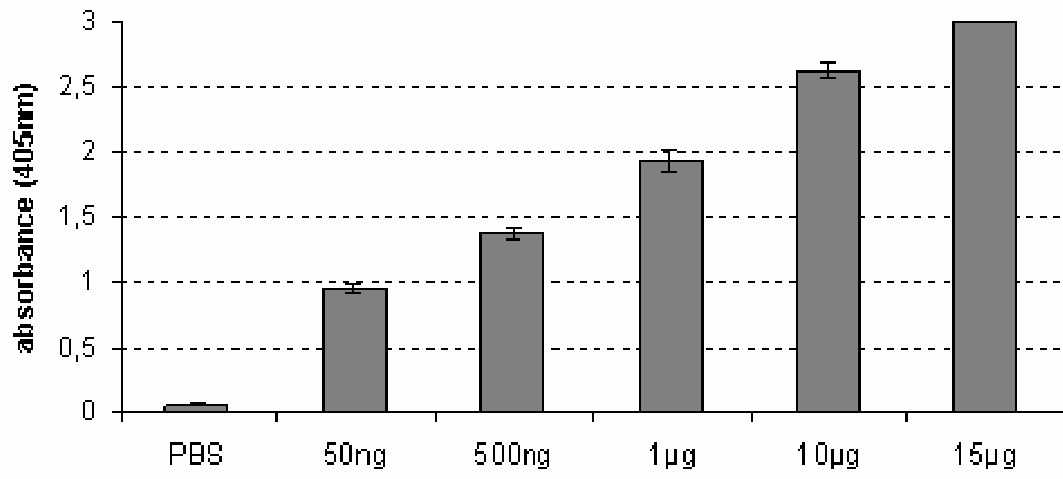
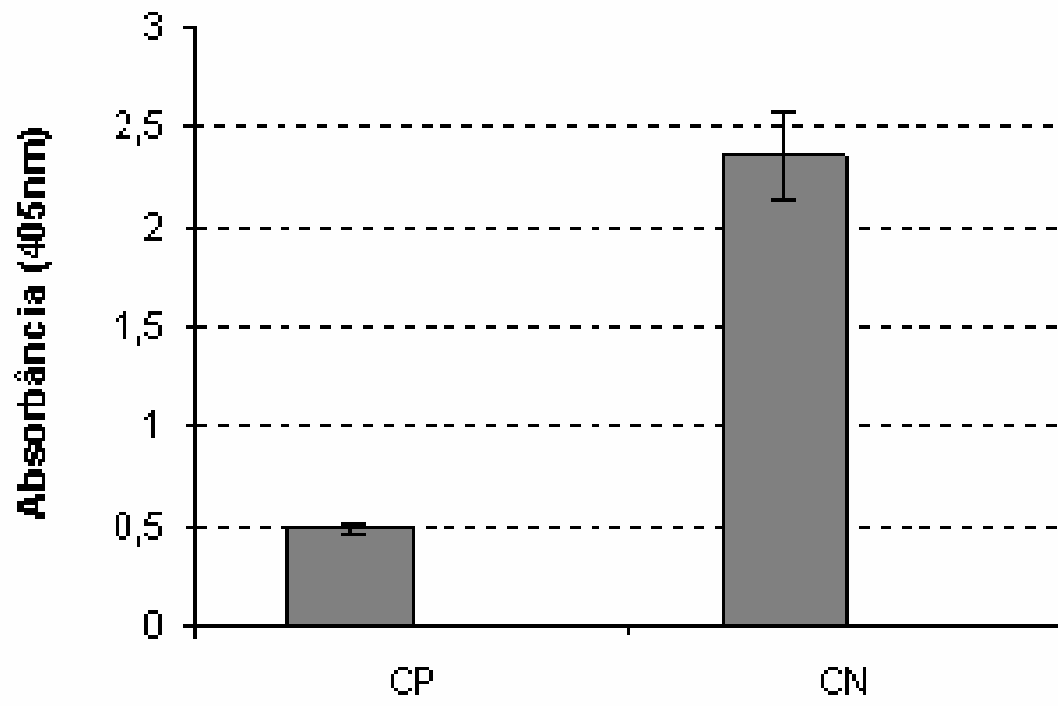


FIGURA 6



SEQ ID 1

CATATGTGCTGGGGTGAATTAATGAATTTAGCAACGTGGGTTGGCAGCAATCTGGAAGATCC
GGCTAGCCGCGAGGGCAGCGGCTCTGGCTGCCTGACCTTCGGCCGGGAGACGGTGTTAGAAT
ACGGTTCGGTAGTGGTACGCCTCCTGCGTATCGTCCGCCGAATGCCCGATTTTAAGCACC
CTGCCGGAAGGTTTACGGTAGTGGTTGCTGGGGTGAGCTGATGAATCTGGCCACCTGGGTGGG
TTCTAACCTGGAGGACCCGGCCAGCCGCGAGGGTAGTGGTAGCGGTTGTTTAACCTTTGGGC
GTGAAACAGTTCTGGAATATGGTTCTGGCAGTGGCACCCCGCCGGCATAACCGTCCGCCGAAC
GCTCCGATTCTGAGCACACTGCCAGAAGGGTCTGGGTGAGGGTGTGGGGGGAGCTGATGAA
CCTGGCGACGTGGGTAGGGTCAAACCTGGAAGACCCTGCATCTCGCGAAGGCTCAGGCAGTG
GCTGTCTGACTTTTGGCCGCGAAACCGTCTGGAATATGGCTCCGGCTCCGGCACTCCGCCA
GCGTATCGTCCACCAAACGCGCCAATCCTGTCCACTCTGCCTGAACTCGAGCACCACCACCA
CCACCACTGA

SEQ ID 2

MCWGELMNLATWVGSNLEDPASRE~~GS~~~~SG~~CLTFGRETVLEY~~GS~~~~SG~~TPPAYRPPNAPILSTL
PE~~GS~~~~SG~~CGWELMNLATWVGSNLEDPASRE~~GS~~~~SG~~CLTFGRETVLEY~~GS~~~~SG~~TPPAYRPPNA
PILSTLPE~~GS~~~~SG~~CGWELMNLATWVGSNLEDPASRE~~GS~~~~SG~~CLTFGRETVLEY~~GS~~~~SG~~TPPA
YRPPNAPILSTLPEHHHHH

REIVINDICAÇÕES

1. PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE PARA USO EM KIT DE DIAGNÓSTICO PARA HEPATITE B E/OU PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E/OU PARA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE VACINAS, FÁRMACOS E MEDICAMENTOS caracterizado por conter uma proteína multiepitopo (rMEHB) compreendendo uma seqüência de aminoácidos e/ou suas possíveis variações em sua seqüência primária tais como adição, deleção ou substituição de aminoácidos ou outros grupos químicos.
2. PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE PARA USO EM KIT DE DIAGNÓSTICO PARA HEPATITE B E/OU PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E/OU PARA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE VACINAS, FÁRMACOS E MEDICAMENTOS de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela proteína multiepitopo ser codificada pela seqüência de nucleotídeos SEQ ID No. (1).
3. PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE PARA USO EM KIT DE DIAGNÓSTICO PARA HEPATITE B E/OU PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E/OU PARA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE VACINAS, FÁRMACOS E MEDICAMENTOS de acordo com as reivindicações 1 e 2 caracterizado pela proteína multiepitopo compreender a seqüência de aminoácidos SEQ ID No. (2).
4. PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE PARA USO EM KIT DE DIAGNÓSTICO PARA HEPATITE B E/OU PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E/OU PARA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE VACINAS, FÁRMACOS E MEDICAMENTOS de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por conter epítopos imunodominantes de proteínas estruturais do vírus da Hepatite B.
5. PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE PARA USO EM KIT DE DIAGNÓSTICO PARA HEPATITE B E/OU PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E/OU PARA PESQUISA E

DESENVOLVIMENTO DE VACINAS, FÁRMACOS E MEDICAMENTOS de acordo com as reivindicações 1 e 4 caracterizado pelos epitopos imunodominantes compreenderem as regiões do core, sendo unidos por um peptídeo conector de 2 a 10 aminoácidos.

6. PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE PARA USO EM KIT DE DIAGNÓSTICO PARA HEPATITE B E/OU PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E/OU PARA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE VACINAS, FÁRMACOS E MEDICAMENTOS de acordo com as reivindicações 1, 4 e 5 caracterizado por conter um peptídeo conector de 2 a 10 aminoácidos de glicina e serina.
7. PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE PARA USO EM KIT DE DIAGNÓSTICO PARA HEPATITE B E/OU PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E/OU PARA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE VACINAS, FÁRMACOS E MEDICAMENTOS de acordo com a reivindicação 1 a 6 caracterizado por ser obtida por procedimento de expressão heteróloga em microrganismos.
8. PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE PARA USO EM KIT DE DIAGNÓSTICO PARA HEPATITE B E/OU PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E/OU PARA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE VACINAS, FÁRMACOS E MEDICAMENTOS de acordo com a reivindicação 7 caracterizado pela clonagem e expressão da proteína multiepitopo em linhagens da bactéria *Escherichia coli*.
9. PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE PARA USO EM KIT DE DIAGNÓSTICO PARA HEPATITE B E/OU PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E/OU PARA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE VACINAS, FÁRMACOS E MEDICAMENTOS de acordo com a reivindicação 8 caracterizado pela expressão da proteína multiepitopo em *Escherichia coli* da linhagem BL21.
10. PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE PARA USO EM KIT DE DIAGNÓSTICO PARA HEPATITE B E/OU PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E/OU PARA PESQUISA E

DESENVOLVIMENTO DE VACINAS, FÁRMACOS E MEDICAMENTOS de acordo com as reivindicações de 1 a 8 caracterizado por compreender as seguintes etapas consecutivas

- (a) síntese de um gene compreendendo multiepitopos recombinantes de regiões estruturais do vírus da hepatite B contendo epitopos sendo unidos por peptídeos conectores de glicina e serina, preferencialmente GSGSG;
- (b) clonagem do gene sintético dado pela sequência SEQ ID No.(1) no vetor pET21a e sua expressão em *Escherichia coli* BL21 (λ DE3) pLysS;
- (c) Indução da proteína multiepitopo de 1 a 4 horas;
- (d) Purificação da proteína multiepitopo em condições desnaturantes.

11. PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE PARA USO EM KIT DE DIAGNÓSTICO PARA HEPATITE B E/OU PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E/OU PARA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE VACINAS, FÁRMACOS E MEDICAMENTOS de acordo com a reivindicação 10 caracterizada pelo tratamento da fração obtida da etapa de indução após centrifugação entre 5000 a 10000 rpm apenas com tampão de lise, independente de sonicação.

12. PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE PARA USO EM KIT DE DIAGNÓSTICO PARA HEPATITE B E/OU PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E/OU PARA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE VACINAS, FÁRMACOS E MEDICAMENTOS de acordo com a reivindicação 11 caracterizado pela composição do tampão de lise ser uma mistura homogênea de urea de 6 a 10 M, NaH_2PO_4 de 30 a 70 mM, NaCl de 100 a 500 mM, imidazol de 5 a 15 mM, pH básico, preferencialmente, pH 8 a 10.

13. PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE PARA USO EM KIT DE DIAGNÓSTICO PARA HEPATITE B E/OU PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E/OU PARA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE VACINAS, FÁRMACOS E MEDICAMENTOS de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pela purificação em condições desnaturante usando a resina de Ni-NTA.

14. USO DA PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE de acordo com as reivindicações de 1 a 9, caracterizado por ser um insumo em kits de diagnósticos específicos para hepatite B de abrangência no Brasil e no mundo.

15. USO DA PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE de acordo com a reivindicação 13 caracterizada por esta proteína multiepitopo conter os epitopos (genótipos e subtipos) mais prevalentes no Brasil.

16. USO DA PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE de acordo com as reivindicações de 1 a 9, caracterizado por ser um insumo para produção de anticorpos monoclonais e/ou para pesquisa e desenvolvimento de vacinas, fármacos e medicamentos.

LISTA DOS AUTORES

01) Nome completo: **Marilen Queiroz de Souza**

02) Qualificação: Mestre

03) Naturalidade: **Brasileira**

04) Estado civil: **Solteira**

05) Formação (Graduação): **Bióloga**

06) Endereço completo: **SQN 211, BL. K, apt. 202, Asa Norte, Brasília-DF**

07) CEP: **70863-110**

08) CPF: **017.959.271-86**

09) RG: **4363513 – DGPC-GO**

10) Telefone (com o DDD): **(61) 3037-1998/ (61) 8425-6893**

11) Fax (com o DDD): **(61) 3107-3120**

12) E-mail institucional: **marilen.souza@gmail.com**

01) Nome completo: **José Carlos dos Santos**

02) Qualificação: Mestre

03) Naturalidade: **Brasileiro**

04) Estado civil: **Solteiro**

05) Formação: **Farmácia**

06) Endereço completo: **Universidade de Brasília – Colina Bloco K – Apto 205, Asa Norte, Brasília – DF.**

07) CEP: **70910 - 900**

08) CPF: **049.705.136-27**

09) RG: **3148097**

10) Telefone (com o DDD): **(61) 9603-2883**

11) Fax (com o DDD): **(61) 3107-3120**

12) E-mail institucional: **josecarlosbiomol@gmail.com**

01) Nome completo: **Alexsandro Sobreira Galdino**

02) Qualificação: Professor Doutor

03) Naturalidade: **Brasileiro**

04) Estado civil: **Solteiro**

05) Formação (Graduação): **Biólogo**

06) Endereço completo: **Rua Nossa Senhora Aparecida, 520, Apto. 301, Catalão, Divinópolis-MG**

- 07) CEP: **35501-173**
- 08) CPF: **616.837.013-72**
- 09) RG: **3095845-SSP/DF**
- 10) Telefone (com o DDD): **(37) 3221-1552**
- 11) E-mail institucional: **asgaldino@ufsj.edu.br**

01) Nome completo: **Fernando Araripe Gonçalves Torres**

02) Qualificação: Professor Doutor

03) Naturalidade: **Brasileiro**

04) Estado civil: **Divorciado**

05) Formação: **Biólogo**

06) Endereço completo: **SQN 216, Bloco E, Apt. 107, Asa Norte, Brasília-DF**

07) CEP: **70875-050**

08) CPF: **239.233.771-34**

09) RG:

10) Telefone: **(61) 3107-3120**

11) Fax: **(61) 3107-3041**

12) Email: **ftorres@unb.br**

01) Nome completo: **Maria Sueli Soares Felipe**

02) Qualificação: **Professora Doutora**

03) Naturalidade: **Brasileira**

04) Estado civil: **Separada judicialmente**

05) Formação: **Química**

06) Endereço completo: **SHIN QL 15, Conjunto 3, Casa 8, Lago Norte, Brasília - DF** 07) CEP: **71.535-235**

08) CPF: **098.356.791-34**

09) RG: **365.761 SSP-DF**

10) Telefone: **(61) 3107-3120**

11) Fax: **(61) 3107-3041**

12) Email: **msueli@unb.br**

Anexo II – Artigo Hepatite B

Expression and functional characterization of a recombinant multi-epitope protein of hepatitis B virus.

**Marilen Q. Souza^a, Alexsandro S. Galdino^a, Jose C. dos Santos^a,
Marcus V. R. Soares^a, Yanna C. de Nóbrega^b, Sônia M. Freitas^c,
Fernando A. G. Torres^a, Maria S. S. Felipe^{a*}**

^aLaboratório de Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 70910-900, Brazil.

^bLaboratório de Imunopatologia, Departamento de Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 70910-900, Brazil.

^cLaboratório de Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brazil, 70910-900

* Correspondence: Maria S.S. Felipe, Laboratório de Biologia Molecular, Universidade de Brasília, DF, Brazil 74001-970. Tel: +55 (61) 3307-2423;

Email address: msueli@unb.br

Abstract

Hepatitis B is a liver inflammation caused by the HBV virus. The first antibody detected after exposure to this virus is the anti-HBc IgM. The presence of this antibody enables the identification of the clinical stage of the disease and becomes undetectable after the acute phase. Anti-HBc IgG appears quickly after IgM, reaching high titers in chronic hepatitis and remains even after cure. Since anti-HBc is the first antibody identified and sometimes the only marker detected during the course of infection, it can be used both to indicate HBV acute infection (anti-HBc-IgM), and to identify individuals who have come in contact with the virus (anti-HBc-IgG).

The purpose of this study was to produce a recombinant HBcAg (core antigen) multiepitope protein (rMEHB) that could be used for diagnosis of hepatitis B. For this purpose, a gene sequence named MEHB was designed taking into account the most common and conserved HBV epitopes with a worldwide distribution. The synthetic gene was cloned into vector pET21a as a NdeI/XhoI fragment containing a sequence coding for a 6xHis tag at the C-terminal. The resulting plasmids were transformed into *Escherichia coli* BL21 (λ DE3) pLysS. Selected clones were grown for expression induction of the recombinant protein. SDS-PAGE analysis showed induction bands, which were consistent with the predicted sizes of the multiepitope protein. The western-blot using antibody anti-polyHis was used to confirm that induction band correspond to the recombinant rMEHB. The protein purification was performed by a single step with affinity chromatography Ni-NTA. Purified rMEHB has been used to perform an ELISA assay with positive and negative sera. In conclusion, our results show that the careful choice of epitopes offers the development of a synthetic multiepitope protein to be used in a serological diagnostic system that is capable to recognize and binding to antibodies of HBV virus infected people.

Keywords: Hepatitis B virus; Multiepitope protein; Hepatitis B diagnostic test; Ni-NTA chromatography.

Background

Approximately 2 billion people were infected with the Hepatitis B virus (HBV) worldwide, and more than 400 million or 5% of the world's population are chronic carriers of the disease. It was responsible for more than 1 million deaths per year (Komas *et al*; 2010). In Brazil, it is estimated that two million people are HBV chronic carriers, with the majority of

infected individuals concentrated in the northern region (Data from the World Health Organization - WHO).

HBV is an adenovirus belonging to the *Hepadnaviridae*, consisting of a spherical particle double layer, where the outer layer is called the envelope, and the inner layer is called the core. The center contains polymerases and viral DNA, which is circular and double-stranded, coding for structural and non-structural proteins (Law *et al.*, 2006).

The HBV is an adenovirus that belongs to the *Hepadnaviridae* virus group characterized by having its DNA replication from its RNA through reverse transcription. The virus consists of a doubled-layered spherical particle, where the external layer is nominated the envelope and the internal the central layer (Santos, *et al.*; 2010). The central part contains polymerases and the circular, double-helix viral DNA, which codifies structural and non-structural protein (Lei, J. *et al.*; 2006).

Anti-HBc appears during the acute phase of the illness, may persist long after anti-HBs have disappeared. Patients who remain anti-HBc positive for years are at risk of transmitting disease on rare occasions (donation of solid organ tissue) or reactivation of HBV disease once immunosuppressed (Elghannam *et al.*; 2009). The genome region precore/core seem to remain the most conserved, and, therefore, it is the most recommended for peptide analysis. After the acute phase, the antibodies recognize especially the epitopes located in the central region of the HBc protein, from the 74 to the 123 residues (Tordjeman *et al.*; 1993).

Studies about the viral peptides demonstrate that the corresponding regions to the 126-135 residues of the HBcAg are essential in order to recognize the antibodies, and, therefore, to the immunity's response, since the 128-133 region was determined to be vital. Other research show the importance of the 76-83 peptide of the HBc/eAg, where Asp78, Pro79, Arg82, and Asp83 are essential residues of the 61-85 peptide and of the 121-140 peptide (Sallberg *et al.*; 1991).

Peptides located in the hydrophilic region of protein C were synthesized by Colluci and collaborators (1988), who demonstrated that the 107-118 peptide reacted with all of the serum and mAbs anti-HBc that were tested (Colluci, *et al.*; 1988).

Takahashi and collaborators (2001), using monoclonals antibodies against the 135-145 epitope of the HBcAg, showed that this peptide is similar to the ones used in routine anti-HBc diagnostic tests (Takahashi *et al.*; 2001).

The high density of specific epitopes for a disease, filogenetically conserved and immuno-dominant, when selected in order to construct a synthetic multiepitope protein, is capable of recognizing specific antibodies and contribute to the elevated degree of specificity

and sensitivity (Dipti, C.A *et al*; 2006). In addition, the use of a single recombinante multiepitope protein eliminates the need to synthesize and express various peptide sequences (Subramaniam, 2003. Pat. No WO 2005/014627 A1).

The purpose of this study is to, using biotechnology, build an antigenic recombinante multiepitope protein of the HBV virus capable of recognizing molecular markers in order to produce monoclonals antibodies, and, possibly, be used in the research and development of vaccines, pharmaceuticals, medicine, and diagnostic kits of hepatitis B.

Material and methods

Strains and reagents

Escherichia coli BL21 (λ DE3) pLysS and expression vector pET21a were purchase from Novagen. NiSepharose™ 6 fast flow (GE Healthcare) resin was used to purify rMEHB. Restriction enzymes, *NdeI* e *XhoI*, were purchased from New England Biolabs and Illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit from GE Healthcare. The inductor IPTG and ampicilin were obtained from USB Corporation. The monoclonal anti-poly histidine AP antibody was purchased from Sigma. Others reagents were obtained from standard commercial sources and were of analytical degree.

Design and cloning of the synthetic gene

In order to design the genetic sequences of the recombinante protein of hepatitis B virus (rMEHB), literature pertaining to the area was researched, and a few linear and conserved epitopes from the HBV virus were selected from the core region of the virus. A 609 pb. sequence was obtained.

Four epitopes were selected for compose the MEHB gene (table 1). In the MEHB gene, the first epitope contained 23 amino acids (aa), the second 12 aa, the third 6 aa and the fourth 12 aa. The epitopes were separated with residues of Glicine and Serine (GSGSG) flexible linkers, resulting in a peptide of approximately 7 kDa. In order to increase the density of the present epitopes and to facilitate the manipulation of the protein, the sequence of the protein was repeated three times, forming a peptide of approximately 21 kDa (fig. 1). Since they were in tandem, the epitopes 3 e 4 were not separated. A segment of six histidine residues (His-tag) was also added at the N-terminal to purify the protein on nickel resin. The synthetic gene was custom synthesized as *NdeI/XhoI* fragment in the pET21a (Epoch biolabs®). During gene design the codon usage was adapted to the codon bias of *E. coli* genes.

Expression and purification of rMHEB

A single colony was inoculated in 5 mL Luria-Bertani (LB) medium containing 100 µg/mL ampicillin and incubated at 37°C with shaking during overnight. Two mL of the culture was transferred to 20 mL LB medium in a 250 mL E-flask. The culture was grown in the same condition until OD₆₀₀ 0.6 when 1mM of the inductor (IPTG) was added for induction. One mL samples were collected at 0.5, 1.5 and 2.5 h after induction. The cell pellets were resuspended in 50 µL of SDS-PAGE sample buffer and boiled for 5 min. Un-induced controls were analyzed in parallel. A clone harboring rMEHB that expressed high level of the recombinant protein was chosen for further work. Aliquots of the induced and un-induced cultures were analyzed by SDS-PAGE prior to initiating purification. Bacteria from induced culture were centrifuged in a falcon tube at 6000 x g for 30 min at 4°C and the resulting pellet was stored in a freezer at -80 ° C. The purification strategy involved addition of 1 mL of lysis buffer (8M urea, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0) to the pellet cells and incubated at 4 °C, overnight. The sample was sonicated and centrifuged at 6000 x g for 30 min at 4°C and supernatant used for recombinant protein purification. The required amount of the resin Ni Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences) was washed tree times with 1 mL distilled water during two minutes and sedimented by centrifugation for 1 min at 6000 x g, between each wash step. The supernatant was discarded and the procedure was repeated with an equal volume of lysis buffer (8M urea, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0. The sample was incubated at 4 °C for 1h on a vertical disc rotator. After incubation the resin was sedimented by centrifugation for 1 min at 6000 x g and the supernatant was removed and saved as the flow through. The resin was washed tree times with 2 volumes of washing buffer (8M urea, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0). The resin was sedimented by centrifugation 1 min at 6000 x g between each wash steps. The protein was eluted in three fractions using 1 volume of elution buffer (8M urea, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 8.0).

Electroforesis and western blotting

Protein samples were separated on 12% SDS-PAGE gels and electroblotted onto PVDF membrane. The membrane was blocked with 5% milk in 7 mM Na₂HPO₄ with 137 mM NaCl, pH 7.4 (PBS) and 0,1% Tween 20 (PBST) for 2 h at room temperatire. The membrane was then incubated for 2 h at room temperature with monoclonal mouse anti-poliHis AP (Sigma), diluted 1: 1000 in PBS. After three washes with PBST the specific protein band was visualized by NBT/BCIP detection method.

Activity test of rMEHB

Immunoenzymatic assay was used to detect specific binding of the recombinant protein rMEHB with anti-HBc. It was used a commercial plate of HBV diagnostic kit containing a monoclonal anti-HBc (Diasorin – ETI-EBK PLUS No 140). Was added to each well different concentrations of recombinant multiepitope protein rMEHB in triplicate (50ng, 500 ng, 1µg, 10mg and 15µ). After 2h at 37°C incubation, the surface is washed to remove the protein that were not linked to the antibodies on the plate surface. Were made three washes with PBST. Then were added 100µL of second antibody (monoclonal anti-polyhistidine) produced in mouse (Sigma) conjugated with alkaline phosphatase, which will produce a colored substance. The antibody is diluted in PBS, this buffer was also used as negative control. After incubation for 2h at 37°C the plate surface was again washed to remove antibody that did not bind to the antigen that was bound to the plate anti-HBc. Was added the substrate for the enzyme alkaline phosphatase (pNPP) to produce colored substance. By measuring the intensity of surface color with a spectrophotometer (A_{405nm}) we can quantify and verify the presence of some substance of interest.

The recombinant antigen was also used in a commercial diagnostic kit replacing the antigen of the kit. The commercial kit was based on a competitive test in which the antibody present on the plate surface competes with the antibody present in serum of infected patients by the antigen. For this test was used the positive and negative serum controls of the commercial kit. The second antibody used was the anti-polyhistidine alkaline phosphatase conjugated. The readings were made in A_{405nm} .

Results

Design of the hepatitis multiepitope protein (rMEHB)

To design multiepitope protein that could be of diagnostic utility, both linear and immunodominant epitopes were selected which are previously know as an elicitor of anti-HBc antibodies. The rMEHB is predicted to encode a ~ 21 kDa recombinant protein where the four epitopes separated from each other by glicine-serine linkers, repeated three times. The DNA and predicted aminoacid residues sequence of the rMEHB protein are shown in Figure 1. All the epitopes of the rMEHB protein would therefore be freely available for interaction with their cognate antibodies and would contribute to its overall sensitivity and specificity when using patient sera.

Expression and purification of rMEHB protein

The induction continued for 2.5 h and the cells were harvested. Aliquots of the induced cultures were analyzed by SDS-PAGE and western blotting prior to initiating purification. As shown in Figure 2, rMEHB was produced as a ~21 kDa protein. Western blotting analysis of these samples (Figure 3, lane C) showed a unique band with the same size corresponding to the same protein on coomassie gel.

The rMEHB protein was as inclusion bodies, urea was used to solubilize this protein. To purify the rMEHB, the Ni-NTA affinity chromatography was carried out under denaturing conditions. Fractions collected during different steps of the purification were analyzed by SDS-PAGE (Figure 4). Three steps of washing removed practically all contaminants. Elution of the bound proteins by use of 500 mM imidazole resulted in the emergence of highly purified recombinant protein from the column (Figure 4, lanes 6-9).

Activity test of rMEHB

To test the antigenic activity of the recombinant protein was used a plate of commercial diagnostic kit containing a monoclonal anti-HBc was used to verify that the recombinant protein (rMEHB) was capable of recognizing anti-HBc and bind to them, using different concentrations (50ng, 500ng, 1µg, 5µg, 10 µg and 15µg) of rMEHB. Figure 5 shows that higher is the concentration of rMEHB, higher is the absorbance. This result proves the ability of the recombinant protein to recognize antibodies anti-HBc.

To prove the ability of rMEHB be used in a diagnostic test of Hepatitis B it was used a commercial kit replacing the kit's antigen for the recombinant protein rMEHB. The test was done using sera positive and negative controls of the kit. The figure 6 shows the ability of this protein to be used in a diagnostic kit. For this test it was also used the commercial antigen as parameter (data not shown), it was observed that the recombinant antigen rMEHB answers as well as the commercial antigen.

Discussion

The application of techniques from the field of molecular biology enabled, other than the notable advancements in knowledge of the HBV, the assembly of diagnostic kits for the disease using genetic engineering. However, these techniques are still scarcely used in the country. In most cases, the molecular diagnostic kits are imported.

The recombinant multi-epitopes proteins produced in *Escherichia coli* can be used in diagnostic kits for Hepatitis B, which can eliminate the problem concerning the quantity of

peptides in the kits and the lack of more prevalent epitopes in population. These multiepitopes proteins consist of a single polypeptide chain containing the immunodominant and linear epitopes with the highest representation in Brazil and in the world. These epitopes correspond to viral regions that are known to elicit an immune response in infected individuals with Hepatitis B, as showed in figure 5 and figure 6.

This protein represents an alternative for the diagnosis of patients infected with the Hepatitis B virus, as shown in figure 6, because it allows the detection in the phase of the immunological window, where the anti-HBc is the only molecular marker present, in patients that evolved towards chronicity and in patients already cured from the infirmity. Patients with this marker are unable to donate blood, and thus the previous detection of the anti-HBc avoids wasting in blood banks and the use of contaminated blood with the antigen of the virus.

Conclusion

The synthesis of a recombinant anti-HBc would permit the diagnosis of Hepatitis B in hemocenters, in order to avoid the wasting of blood bags, to guarantee the use of healthy blood (Asim, *et al.* 2010), and to offer a precise diagnosis to the population.

This is an innovative strategy, as there does not yet exist, either in Brazil or in the world, a diagnostic kit based on multiepitope proteins for Hepatitis B, making this technology an innovation. Therefore, the development of this strategy aims to increase the sensitivity of an anti-HBc diagnostic kit. In addition to allowing its use in the production of monoclonal antibodies, it is possible to apply it for the means of research and development of vaccines, pharmaceuticals and medicine.

Acknowledgements

This work was supported by a biotechnology research grant to F. Torres and M. Felipe (CNPq and FINEP). M. Souza was supported by a master scholarship by CAPES/Brazil.

List of abbreviations

A_{405nm} : absorbance in a 405 nm
anti-HBc: Hepatitis B core Antibody
HBV: Hepatitis B virus
HBcAg: Hepatitis B core Antigen
rMEHB: Recombinant Multiepitope of Hepatitis B
MEHB: Multiepitope of Hepatitis B

AP: Alkaline Phosphatase
pNPP: p-nitrophenyl phosphate
mL: Mililiter
 μ L: Microliter
min: Minutes
nm: Nanometer
x g: Gravity
 $^{\circ}$ C: Celsius degree
mM: Milimolar
M: Molar
OD: Optical density
kDa: Kilodalton
PBS: Phosphate Buffered Saline
PBST: Phosphate Buffered Saline Tween
ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

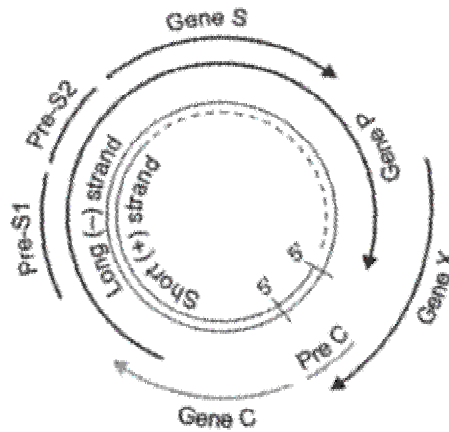
References

1. Asim M, Ali R, Khan LA, Husain SA, Singla R, Har P: **Significance of anti-HBc screening of blood donors & its association with occult hepatitis B virus infection: Implications for blood transfusion.** *Indian J Med Res* 2010, **132**:312-317.
2. Collucci G, Beazer Y, Cantaluppi C, Tackney C: **Identification of a major hepatitis B core antigen (HBcAg) determinant by using synthetic peptides and monoclonal antibodies.** *Journal of Immunology* 1988, **141**: 4376-4380.
3. Dipti CA, Jain SK, Navin K: **A novel recombinant multiepitope protein as a hepatitis C diagnostic intermediate of high sensitivity and specificity.** *Protein Expres Purif* 2006, **47**:319-328.
4. Komas NP, Bai-Sepou S, Manirakiza A, Léal J, Béré A, Le Faou A: **The prevalence of hepatitis B virus markers in a cohort of students in Bangui, Central African Republic.** *BMC Infectious Diseases*: 2010, **10**:226.

5. Law LJ, Ilkow CS, Tzeng WP, Rawluk M, Stuart DT, Frey TK, Hobman TC: **Analyses of Phosphorylation Events in the Rubella Virus Capsid Protein: Role in Early Replication Events.** *Journal of virology* 2006, **80**:6917-6925.
6. Salfeld J, Pfaff E, Noah M, Schaller H: **Antigenic determinants and functional domains in core antigen and e antigen from hepatitis B virus.** *Journal of. Virology* 1989, **63**:798-808.
7. Sällberg M, Rudén U, Wahren B, Magnus LO: **Immune recognition of linear antigenic regions within the hepatitis B pre-C and C-gene translation products using synthetic peptides.** *Journal of Medical Virology* 1994, **42**:7-15.
8. Sällberg M, Rudén U, Wahren B, Magnus LO: **Human and murine B-cells recognize the HBeAg/beta (or HBe2) epitope as a linear determinant.** *Molecular Immunology* 1991, **28**:719-26.
9. Sambrook JT, Fritsch EF, Maniatis T: **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor MY, USA. 1991.
10. Santos AO, Alvarado-Mora MV, Botelho L, Vieira DS, Pinho JR, Carrilho FJ, Honda ER, Salcedo JM: **Characterization of Hepatitis B virus (HBV) genotypes in patients from Rondônia, Brazil.** *Virology Journal* 2010, **7**:315.
11. **World Health Organization - WHO** [<http://www.who.int/en>]
12. Subramaniam, H. WO 2005/014627 A1. 2003
13. Takahashi K, Mishiro S, Prince AM: **Novel Hepatitis B Virus Strain from a Chimpanzee of Central Africa (*Pan troglodytes troglodytes*) with an Unusual Antigenicity of the Core Protein.** *Intervirology* 2001, **44**:321-326.
14. Thermet A, Robaczewska M, Rollier C, Hantz O, Treppe C, Deleage G, Cova L: **Identification of Antigenic Regions of Duck Hepatitis B Virus Core Protein with Antibodies Elicited by DNA Immunization and Chronic Infection.** *J Virol.* 2004 **78**:1945-1953.

Table 6. HBcAg epitopes selected to compose the recombinant protein

	<i>Epitope</i>	<i>Residues</i>	<i>References</i>
1	CWGELMNLATWVGSNLEDPASRE	61-83	Sallberg <i>et al.</i> , 1994; Salfeld <i>et al.</i> , 1989 e Thermet <i>et al.</i> , 2004
2	CLTFGRETVLEY	107-118	Collucci <i>et al.</i> , 1988.
3	TPPAYR	128-133	Sallberg <i>et al.</i> , 1991
4	PPNAPILSTLPE	134-145	Takahashi <i>et al.</i> , 2001



DNA sequence

CATATGTGCTGGGGTGAATTAATGAATTTAGCAACGTGGGTTGGCAGCAATCTGGAAGATCCGGCTAGCCGCGAGGGCAGC
GGCTCTGGCTGCCCTGACCTTCGGCCGGGAGACGGTGTAGAAATACGGTTCCGGTAGTGGTACGCCCTCCTGCGTATCGTCCG
CCGAATGCCCGATTTTAAGCACCTGCCGGAAGGTTTCAGGTAGTGGTTGCTGGGGTGAGCTGATGAATCTGGCCACCTGG
GTGGTTCTAACCTGGAGGACCCGGCCAGCCGCGAGGGTAGTGGTAGCGGTTGTTAACCTTTGGGCGTGAACAGTTCTG
GAATATGGTTCCTGGCAGTGGCACCCCGCCGCATACCGTCCGCCAACGCTCCGATTCTGAGCACACTGCCAGAAGGGTCT
GGGTCAGGGTGTGGGGGGAGCTGATGAACCTGGCGACGTGGGTAGGGTCAAACCTGGAAGACCCTGCATCTCGCGAAGGC
TCAGGCAGTGGCTGTCTGACTTTTGGCCGCGAAACCGTCTGGAATATGGCTCCGGCTCCGGCACTCCGCCAGCGTATCGT
CGAAGCAACCGCCGCAATCCTGTCCACTCTGCCTGAACTCGAG

Protein sequence

MCWGELMNLATWVGSNLEDPASREGSGSGCLTFGRETVLEYGSGSGTPPAYRPPNAPILSTLPEGSGSGCWGELMNLATWVG
SNLEDPASREGSGSGCLTFGRETVLEYGSGSGTPPAYRPPNAPILSTLPEGSGSGCWGELMNLATWVGSNLEDPASREGSGS
GCLTFGRETVLEYGSGSGTPPAYRPPNAPILSTLPE

Figure 1. Nucleotide and predicted amino acid sequences of the rMEHB based on protein organization of hepatitis B virus (HBV).

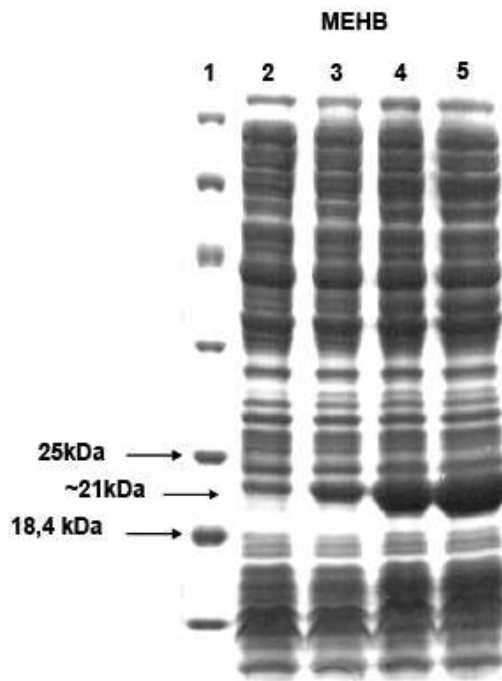


Figure 2. Kinetics analysis in polyacrylamide gel SDS-PAGE 12% of rMEHB induction in *E. coli* using 1mM of IPTG, stain with Coomassie Brilliant Blue. Lane 1 - un-induction control; Lane 2 - 30 min after induction; Lane 3 - 1h30min after induction; Lane 4 - 2h30min after induction; Lane 5 - Mw protein markers (Fermentas Life Science).

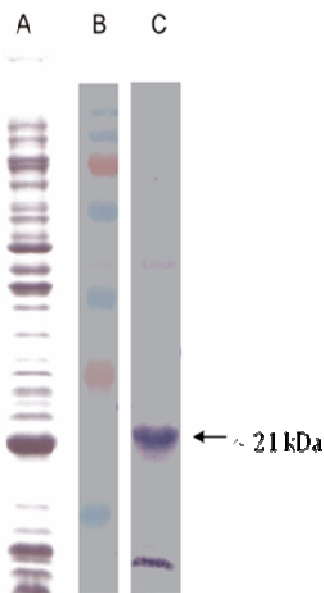


Figure 3. Western-blot analysis of rMEHB. The band of protein rMEHB is indicated by an arrow. Lane A - Crude extract from *E. coli* after 2h30min of induction, stain with Coomassie Brilliant Blue; Lane B - Mw protein markers (Fermentas Life Science), prestain. Lane C - Recombinant protein detected by western-blot on nitrocellulose membrane, using as a second antibody anti-polyhistidine PA.

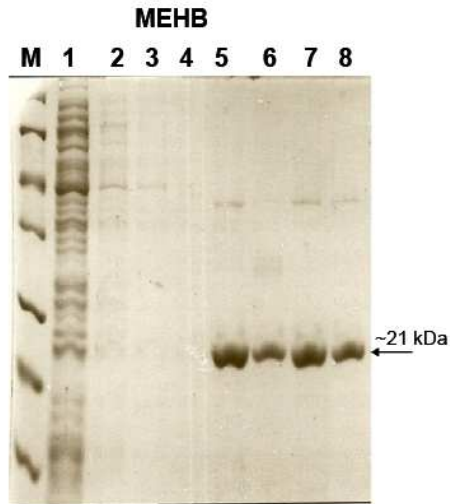


Figure 4. Purification of rMEHB. SDS-PAGE analysis of Ni-NTA affinity column fractions. Lane 1, Mw protein markers (Fermentas Life Science); Lane 2, flow throw after purification; lanes 3-5, wash steps ; lanes 6-9; elution steps. Stain with Comassie Brilliant Blue.

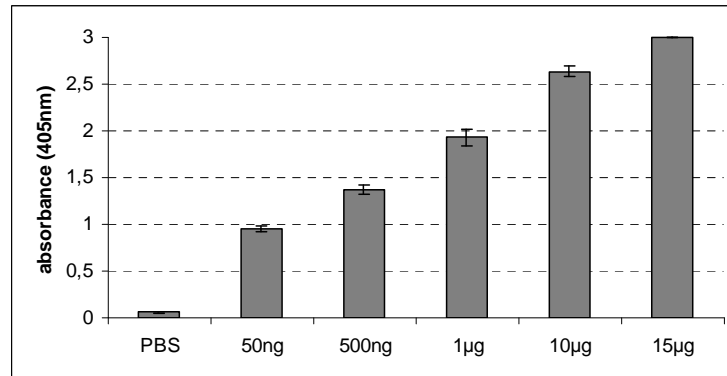


Figure 5. Analysis of the ability of the recombinant protein rMEHB to recognize the monoclonal antibody Anti-HBc presents on the board surface of a commercial kit to the diagnosis of hepatitis B. Using several concentrations of rMEHB for well: 50ng, 500 ng, 1µg, 10mg and 15ug. As a negative control was used PBS, the same buffer in which the samples were diluted. Anti-polyhistidine alkaline phosphatase conjugate as second antibody.

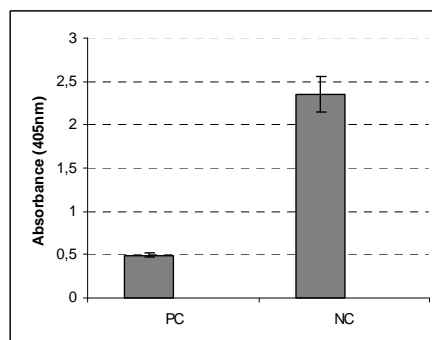


Figure 6. Analysis of the capacity to use recombinant antigen rMEHB in diagnostic kits. Replacement of commercial antigen by the antigen rMEHB for the competitive test. PC: commercial positive control serum; NC: commercial negative control serum. Anti-polyhistidine PA as second antibody.

Anexo III – Patente Rubéola

“PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE PARA USO EM KIT DE DIAGNÓSTICO PARA RUBÉOLA E/OU PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E/OU PARA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE VACINAS, FÁRMACOS E MEDICAMENTOS”

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção trata da construção biotecnológica de uma proteína antigênica recombinante contendo quatro epítomos dominantes, BCH-178, EP1, EP2 e EP3 da glicoproteína E1 e um epítomo da glicoproteína E2 (Michell, L.A. *Journa.l Clin. Microbiol.* 30 1841. 1992a) e sua utilização na produção de anticorpos monoclonais e possível utilização da mesma para fins de pesquisa e desenvolvimento de vacinas, fármacos e medicamentos e em kits de diagnóstico de Rubéola e/ou Síndrome da Rubéola Congênita (CRS) para identificar indivíduos que já tiveram contato com o vírus da Rubéola (RV).

Utilizando as técnicas de biologia molecular é possível demonstrar a importância do RV como fator etiológico da Rubéola e da Síndrome da Rubéola Congênita (Jin, L. *J. Med. Virol.* 79(7) 1017-1024. 2007). A produção de um polipeptídeo recombinante multiepítomo é eficaz no reconhecimento de marcadores moleculares por possuir alta sensibilidade e especificidade ao substrato, o que possibilita o diagnóstico da Rubéola em hemocentros, tanto para evitar o desperdício de bolsas de sangue, como para garantir a utilização de sangue saudável, além de oferecer um diagnóstico preciso para população em geral. Na maioria dos casos, os kits de diagnósticos moleculares são importados. Sendo assim, a estratégia desenvolvida apresenta interesse para a indústria farmacêutica e biotecnológica para a fabricação de kits de diagnósticos com baixos custos para sua exequibilidade industrial, aliado a praticidade utilitária, oferecendo ao público consumidor, uma opção de menor custo no mercado de kits de diagnósticos atuais, utilizando tecnologia nacional.

ESTADO DA TÉCNICA

O RV pertence à família Togaviridae e é membro único do gênero *Rubivirus*. É um vírus de RNA, fita simples positiva, com um genoma de aproximadamente 1000 nucleotídeos, codificando duas ORFs. A ORF da extremidade 5' possui aproximadamente 6.345 nucleotídeos e codifica as proteínas virais não estruturais p150 e p90, enquanto que a ORF da

extremidade 3', possui 3.189 nucleotídeos e codifica para as proteínas estruturais, capsídeo (C), E1 e E2 (Yao, J.D. *J. General. Virol.* 246: 74-82. 1998). As proteínas não estruturais são formadas pela clivagem proteolítica da poliproteína precursora p200 em dois fragmentos p150 e p90. A análise da seqüência de resíduos de aminoácidos da *ORF 5'* tem revelado motivos consenso indicativos de RNA polimerase-RNA dependente (replicase), helicase, metiltransferase e atividade de proteína quinase (Frey, T.K. *Adv. Virus. Res.* 44: 69-160. 1994). A poliproteína p110 é translocada para dentro do retículo endoplasmático por dois peptídeos finais separados localizados em E1 e E2. Dentro do retículo endoplasmático, a proteína do capsídeo é clivada de E2, e E2 é clivada de E1 (Baron *et al. J. Virol.* 73: 1073-1086. 1992).

A proteína do capsídeo C, de 33 kDa, contém *clusters* de serina e prolina, os quais postula-se estarem envolvidos na ligação ao RNA genômico do RV para formar os capsídeos virais (Frey, T.K. *Adv. Virus. Res.* 44: 69-160. 1994). As proteínas do envelope viral, E1 (58 kDa) e E2 (42-47 kDa) são glicoproteínas transmembrana do tipo 1, observadas na forma de heterodímero E1-E2 na superfície do vírus. As proteínas E1 e E2 contêm um domínio transmembrana (TM) possuindo 22 e 39 resíduos de aminoácidos, respectivamente. A seqüência de aminoácidos tem revelado que a proteínas E1 contém 3 sítios de N-glicosilação, enquanto para E2 o número de sítios parecem variar dependendo do isolado viral. A função dessas glicoproteínas tem sido estudada extensivamente. Usando anticorpos monoclonais, estudos mostraram que a glicoproteína E1 contém pelo menos 6 epitopos, muitos dos quais estão associados em hemaglutinação e neutralização (Chaye *et al. Virology.* 189: 483-492. 1992). A função da N-glicosilação na antigenicidade e imunogenicidade de E1 tem sido investigada. Estudos que avaliaram a expressão em *Escherichia coli* da proteína recombinante E1 indicaram que a glicosilação pode ser fundamental para o dobramento correto de E1 e conseqüentemente para expressão de importantes epitopos antigênicos e imunogênicos (Terry *et al. Arch. Virol.* 104: 63-75. 1989). Vários estudos têm mostrado que a subunidade glicoproteica E1 inclui epitopos que servem como alvo para anticorpos neutralizantes e, juntamente com E2, é responsável por induzir as respostas imunes contra o RV (Law *et al. J. Virol.* 80(14) 6917-6925. 2006). A proteína E1 também tem um importante papel na fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira, iniciando o ciclo de replicação do RV.

A proteína E1 é bastante conservada. Frey *et al. J. Infect. Dis.* 178: 642. 1998 compararam seqüências de E1 de 63 RVs isolados na Europa, Ásia e América do Norte, entre 1961 e 1997 e observaram uma identidade de nucleotídeos superior a 95%, sendo que a

seqüência de aminoácidos diferiu menos de 3%. Tendo como base a seqüência desse gene E1, podem-se distinguir 2 cladogramas e 10 genótipos de RV, sendo que 8 dos 10 genótipos já tiveram os seus genomas seqüenciados (Zhou *et al. J. Gen. Virol.* 88(3): 932-941. 2007). De acordo com estes autores, os vírus dos 8 genótipos seqüenciados apresentam 78% de identidade e possuem o mesmo número de nucleotídeos em cada uma das *ORFs* e nas regiões não traduzidas (5' e 3'-UTR). Apenas a UTR entre as *ORFs* possui diferenças de tamanho. A função da proteína E2 tem sido mais difícil de determinar, pois como ela é ligada por pontes dissulfeto à proteína E1, os sítios antigênicos dessa proteína são menos acessíveis para a caracterização por anticorpos monoclonais (Waxham *et al. Rev. Infec. Dis.* 7: 133-139).

A rota de entrada do RV na célula hospedeira não está completamente elucidada. Contudo, o RV pode estabelecer infecções em uma grande variedade de linhagens celulares em cultura. Estudos indicam que o processo de infecção do RV é mediado pela interação da partícula viral com os fosfolípidos e glicolípidos da célula hospedeira (Mastromarino *et al. Med. Microbiol. Immunol.* 179: 105-114. 1990). Estudos bioquímicos têm mostrado que a exposição das glicoproteínas E1 e E2 a pH 6 induz uma mudança conformacional nas glicoproteínas que favorece a fusão do envelope viral às membranas do endossomo. Essa hipótese foi corroborada pelos estudos que demonstraram que replicação viral foi inibida após tratamento com agentes lisosomotrópicos (Petruzzello *et al. J. Gen. Virol.* 77:303-308.1996).

Os ensaios imunoenzimáticos (EIA) para detecção de IgM e IgG rubéola-específicas são a metodologia mais usada atualmente para detecção do RV. No entanto, esses ensaios têm limitações pela não-correlação das taxas de IgM e IgG com a presença do RV (Best, J.M. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine.* 12: 182-192. 2007). Dentre os ensaios imunoenzimáticos usados com mais frequência para detecção do RV, destaca-se o ELISA. Praticamente a maioria dos anticorpos contra proteínas estruturais do RV são detectados por ELISA RV-IgG (Gießauf *et al. J. Immunol. Meth.* 287: 1-11. 2004). Vários anticorpos monoclonais têm sido usados para estudar os epitopos envolvidos na hemaglutinação e na neutralização do RV (Chaye *et al. Virology.* 189:483-492. 1992).

Por meio de altas titulações de IgG anti-RV em indivíduos hiperimunizados com vacinas, foi possível identificar 3 (Lozzi *et al. Arch. Virol.* 110:271. 1990; EP-1, EP-2, EP-3) dos 4 epitopos neutralizantes para E1. BCH -178 é um peptídeo representando o quarto domínio neutralizante de E1 e que é o alvo para anticorpos neutralizantes nos humanos em resposta ao RV (Mitchel *et al. J. Clin. Microbiol.* 30: 1841. 1992a). Esta região é altamente

conservada entre os diferentes tipos de RV, em contraste a outros domínios neutralizantes (Frey *et al. J. Infec. Dis.* 178: 1961-1997). Um único domínio neutralizante fraco tem sido identificado na proteína E2 usando anticorpos neutralizantes. Dois peptídeos sintéticos análogos às regiões BCH-178 e EP-3 mostraram um estímulo à proliferação dos linfócitos (Mitchell *et al. Virus Research.* 29-33. 1993b) e uma proliferação anormal dos linfócitos em resposta a 3 peptídeos sintéticos (aminoácidos 219-24, 389-411 e 462-481) da proteína E1 foi observado em pacientes com artrite associada à rubéola (Mitchell *et al. Virus Research.* 29-33. 1993b). Dessa forma, essas regiões são bastante imunoreativas e promissoras, podendo ser usadas em ensaios para a detecção de anticorpos anti-RV (Gießauf *et al. J. Immunol. Meth.* 287: 1-11. 2004).

Os antígenos do RV usados atualmente em ensaios sorológicos são preparados por concentração das partículas virais obtidos a partir de culturas de células infectadas. Este tipo de preparação antigênica exibe uma variação muito grande e uma cuidadosa padronização é necessária antes do uso. Antígenos sintéticos são também relativamente caros para produzir.

A aplicação de técnicas de biologia molecular permitiu, além de notáveis avanços no conhecimento do próprio RV, a construção de kits de diagnósticos para a doença utilizando técnicas de engenharia genética. No entanto, estas técnicas ainda são pouco exploradas em território nacional. Na maioria dos casos, os kits de diagnósticos moleculares são importados.

A construção de um polipeptídeo anti-RV recombinante com multiepitopos é mais eficaz no reconhecimento de marcadores moleculares por possuir maior sensibilidade e especificidade ao substrato. Isto possibilita o diagnóstico de Rubéola em Hemocentros, tanto para evitar o desperdício de bolsas de sangue, como para garantir a utilização de sangue saudável, além de oferecer um diagnóstico preciso para população em geral.

DESCRIÇÃO DA INVENCÃO

As proteínas recombinantes multiepitopos produzidas em *Escherichia coli* podem ser usadas em kits de diagnóstico para Rubéola, podendo eliminar o problema da quantidade dos epitopos nos kits e ausência de epitopos mais prevalentes no Brasil e no mundo. Essas proteínas multiepitopos consistem de uma única cadeia polipeptídica contendo os epitopos imunodominantes, lineares e mais representativos do Brasil e no Mundo. Esses epitopos correspondem a regiões virais que sabidamente elicitam uma resposta imune em indivíduos

infectados com Rubéola. É uma estratégia inovadora uma vez que no Brasil e no Mundo não existe um kit de diagnóstico baseado em proteínas multiepitopos para Rubéola, o que torna essa tecnologia uma inovação. Assim o desenvolvimento dessa estratégia visa aumentar a sensibilidade de um kit de diagnóstico anti-RV.

Cinco epitopos foram selecionados para desenhar o gene codificador da proteína multiepitopo. Na sequência gênica, MERUB, o primeiro epitopo contém 27 resíduos de aminoácidos (aa), o segundo 7 aa, o terceiro 7 aa, o quarto 12 aa e o quinto 26 aa. Os epitopos foram separados com linkers flexíveis dos resíduos de aminoácidos glicina e serina para permitir a distensão da proteína deixando-a linear para facilitar o reconhecimento dos anticorpos ao antígeno (Dipti, C.A *et al. Protein Expres Purif.* 47: 319-328. 2006), compondo, assim, uma proteína de aproximadamente 11 kDa. Para facilitar a manipulação da proteína, a sequência completa foi repetida duas vezes, originando uma proteína de aproximadamente 21kDa. A partir de análises *in silico* foi selecionados codons preferenciais para *E. coli* e foram quantificadas as bases nitrogenadas citocina e guanina (CG), sendo observado um total de 59,8% das bases para MERUB.

Tem-se, portanto, no pedido de patente em questão, como “insumos para kits de diagnóstico” a proteína recombinante multiepitopo produzida em *Escherichia coli* especialmente desenvolvida para se obter maior quantidade e sensibilidade dos epitopos mais prevalentes e que traz grandes vantagens, tanto em sua utilização como em sua fabricação de um produto nacional, agregando baixos custos para sua exequibilidade industrial, aliado a praticidade utilitária. Oferecendo desta forma ao público consumidor, uma opção de menor custo no mercado de kits de diagnóstico, que ao contrário dos kits atuais tem um custo elevado devido ao fato de serem importados.

A **Figure 1** Desenho da sequência completa de nucleotídeos e sequência predita de resíduos de aminoácidos da proteína recombinante rMERUB.

A **Figura 2** mostra a análise da cinética de indução em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%. Material coletado após a indução de expressão da MERUB. 1) Tempo 0h de indução; 2) indução por 30 minutos; 3) indução por 1h30 min; 4) indução por 2h30min; M) marcador de massa molecular (Unstained Protein Molecular Weight Marker – Fermentas Life Science).

A **Figura 3** análise da indução por western-blot. M) Marcador de massa molecular (Fermentas Life Science); 1) Detecção de proteína por western-blot em membrana de nitrocelulose.

A **Figura 4** mostra a análise do gel SDS-PAGE das frações da coluna de afinidade Ni-NTA obtidas no processo de purificação. M – Marcador de massa molecular, (Fermentas Life Science). 1 – *flowthrough*; 2, 3 e 4 – etapas de lavagem da resina com o tampão de lavagem; 5, 6, 8 e 7 – frações da eluição da proteína rMERUB pura.

A **Figura 5** mostra o teste de imunoenzimático (ELISA) com controles IgM positivo e negativo para o vírus RV. 0ng – não há proteína adsorvida na placa; 40ng – há 40ng de proteína adsorvida na placa; CP – controle do kit IgM positivo (com 1° anticorpo); CN – controle de kit IgM negativo (sem 1° anticorpo); Anti-IgM humano conjugado com fosfatase alcalina como 2° anticorpo. Substrato de revelação p-nitrofenil fosfato. Leitura da absorbância emitida pela colorimetria em um espectro de 405nm.

A **Figura 6** mostra o teste de atividade biológica da proteína recombinante rMERUB. Utilizando dois soros positivos (SP1 e SP2). SP1 + 0ng: soro positivo 1 em poço sem proteína adsorvida; SP2 + 0ng – soro positivo 2 em poço sem proteína adsorvida; SP1 + 50ng: positivo 1 em poço com 50ng de proteína adsorvida na placa; SP2 + 50ng: positivo 2 em poço com 50ng de proteína adsorvida na placa; CN + 50ng: soro controle negativo do kit comercial em poço com 50ng de proteína adsorvida.

O processo de produção da proteína multiepitopo é descrito pelas seguintes etapas subsequentes: síntese, clonagem, expressão e purificação de acordo com os exemplos de 1 a 4.

EXEMPLO 1: SÍNTESE QUÍMICA DOS GENES E CLONAGEM NO VETOR DE EXPRESSÃO

A proteína recombinante produzida nessa invenção foi codificada por seqüências de DNA sintetizadas *de novo* em indústrias especializadas na síntese química de genes. No desenho dos genes, foram considerados os seguintes critérios:

- a) *Codon usage* dos organismos onde os genes serão expressos;
- b) Adição de sítios de restrição apropriados nas extremidades dos genes para facilitar as clonagens;

- c) Os genes sintetizados codificam uma proteína multiepitopo clonada no vetor de expressão em pET21a.

Resultando na seqüência mostrada na **figura 1**.

EXEMPLO 2: EXPRESSÃO HETERÓLOGA DAS PROTEÍNAS MULTIEPITOPOS RECOMBINANTES

O gene que codifica para a proteína multiepitopo a ser expresso em *E. coli* foi clonado no vetor pET21a que já possui um *tag* de purificação composto por seis histidinas (His-Tag), o que possibilitará a purificação da proteína recombinante em colunas de afinidade Ni-NTA. A clonagem do gene foi realizada de forma orientada de acordo com os sítios de restrição que foram adicionados na seqüência primária dos genes. O vetor resultante foi utilizado para a transformação de *E. coli* linhagem BL21(DE3) pLysE. A expressão pode ser feita em pequena escala (até 1 litro) ou em escalas maiores (acima de 1 litro) em frascos sob agitação. A indução da expressão foi feita pela adição do agente indutor IPTG, seguindo-se da coleta de amostras e a análise das mesmas através de SDS-PAGE. Após um processo de otimização da produção da proteína multiepitopo, os clones com maiores níveis de expressão assim como o melhor tempo de indução foram selecionados para a continuidade do processo de produção. Dados da indução são mostrados na **figura 2** e confirmados na **figura 3**.

EXEMPLO 3: OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DA PROTEÍNA MULTIEPITOPO EM FERMENTADOR

Os clones selecionados de acordo com o exemplo 2 podem ser cultivados em fermentadores, que pode monitorar os seguintes parâmetros: crescimento, inóculo inicial, pH e aeração. A análise do perfil protéico pode ser realizada por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), identificando-se deste modo, a presença e integridade das proteínas multiepitopo recombinantes. A quantificação dessas proteínas multiepitopo produzidas pode ser feita pelo método de Bradford para quantificação de proteínas totais (Bradford MMA. *A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein dye binding*. Anal Biochem 72: 248-254. 1976).

EXEMPLO 4: PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE

As células foram coletadas ao final da indução e centrifugadas, o pellet ressuspenso em tampão desnaturante (tampão de lise, contendo uréia 8M, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300

mM e imidazol 10 mM, pH 8) ou congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Foi usado somente tampão de lise para liberação do conteúdo intracelular da *E.coli*, diferente dos outros trabalhos descritos no estado da técnica que usam uma etapa adicional de sonicação, dispensada na presente invenção. A sonicação é utilizada para o rompimento das células visando a liberação de uma maior quantidade da proteína de interesse na fração solúvel. Entretanto, no presente pedido de patente a tecnologia foi otimizada de modo a dispensar essa etapa que, em alguns casos, dependendo do tempo de exposição ao ultra-som, pode desnaturar a proteína de interesse. O extrato total foi clarificado por centrifugação ($6000 \times g$ por 30min) e o sobrenadante, contendo as proteínas solúveis, foi utilizado para as etapas subseqüentes de purificação. A purificação da proteína recombinante, que contém a cauda de histidina, foi feita em condição desnaturante. O extrato total de proteína foi incubado por 1:30hs, 4°C , sob agitação orbital com a resina Ni-NTA para ligação da proteína recombinante por afinidade. A lavagem e remoção das proteínas não ligadas ou fracamente ligadas à resina foi feita com tampão de lavagem contendo ureia 8M, NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 20 mM, pH 8.0, por 4 vezes utilizando 1 ml do tampão em cada etapa. A eluição da proteína recombinante ligada à resina de níquel foi feita com tampão NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM contendo imidazol 50 mM, pH 8.0 em 3 etapas de 500ul cada uma. Alíquotas da etapa de eluição (15ul) foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Dados da purificação são mostrados na **figura 4**.

EXEMPLO 5: TESTES DE ATIVIDADE IMUNOLÓGICA POR ELISA

O método utilizado para o teste se baseia na interação anticorpo-antígeno. Normalmente é usada uma placa de superfície inerte com poços onde serão adsorvidos os antígenos de interesse juntamente com um tampão de carbonato (processo conhecido como sensibilização, que pode ser do antígeno ou do anticorpo.). Depois é realizada uma lavagem com PBS. Posteriormente é feito o bloqueio com PBS e 5% de BSA para que esta ocupe os espaços livres (sítios inespecíficos que podem gerar resultados falso positivo ou negativo). Novamente é feita a lavagem com PBS contendo 0,05% de Tween. A superfície é então tratada com solução de anticorpo primário (soro de pacientes com anticorpos contra o vírus da rubéola ou soros controles positivos e negativos comerciais). A superfície é lavada novamente para retirar os anticorpos primários que não foram incorporados em nenhuma proteína. Em seguida, adiciona-se o anticorpo secundário, que irá se ligar ao anticorpo primário (anti-IgG humana conjugado com peroxidase alcalina ou anti-IgM humana conjugada com fosfatase

alcalina). A enzima acoplada irá produzir uma substância corada quando adicionado o substrato de revalação. A superfície é lavada novamente para a retirada do anticorpo secundário que não se ligou ao anticorpo primário. Adiciona-se o substrato de revelação para a enzima produzir a substância corada e, assim, medindo-se a intensidade da cor da superfície, pode-se quantificar e verificar a presença e a capacidade da proteína adsorvida na placa em reconhecer os anticorpos primários presentes no soro de pacientes.

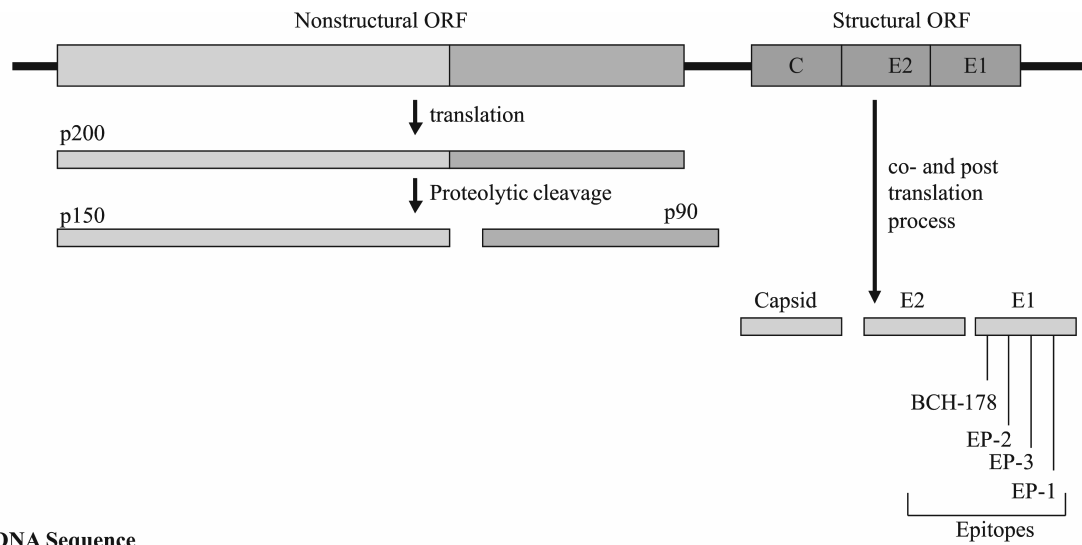
A capacidade da proteína recombinante se ligar ao anticorpo IgM presente nos soros controle do kit comercial é mostrado na figura 5. Assim como a capacidade desta proteína se ligar aos anticorpo IgG presente nos soros de pacientes é mostrada na figura 6.

RESUMO

“PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE PARA USO EM KITS DE DIAGNÓSTICO PARA RUBÉOLA”

A Rubéola, também denominada de sarampo alemão, é uma doença infecciosa, de transmissão respiratória, causada pelo vírus da rubéola (RV). As consequências da doença tornam-se ainda mais graves se a pessoa infectada estiver no primeiro trimestre de gravidez, pois o RV é um agente teratogênico para humanos. Os antígenos do RV usados atualmente em ensaios sorológicos são preparados por concentração das partículas virais obtidos a partir de cultura de células infectadas. Este tipo de preparação antigênica exibe uma variação muito grande e uma cuidadosa padronização é necessária antes do uso. Antígenos sintéticos são também relativamente caros para produzir. Assim, o objetivo do presente trabalho é a produção de uma proteína multiepitopo rMERUB que seja eficaz no reconhecimento de anticorpos circulantes em indivíduos infectados para diagnóstico da Rubéola. Para o desenho da seqüência do gene rMERUB (621 pb) foi feita uma busca na literatura e seleção dos epitopos mais comuns e conservados do vírus RV. O gene sintético foi clonado no vetor pET21a contendo uma cauda de histidina na extremidade C-terminal. O gene foi inserido em *E. coli* BL21 (λ DE3)pLysS, para indução da expressão da proteína recombinante (r-MERUB). Em seguida, a proteína foi purificada por cromatografia de afinidade. Tem-se, portanto, no pedido de patente em questão, como insumo para kit de diagnóstico anti-RV, uma proteína multiepitopo engenheirada e, especialmente desenhada e desenvolvida para trazer vantagens, tanto em sua utilização, visando aumentar a sensibilidade dos kits de diagnósticos anti-RV como em sua fabricação, agregando baixos custos, uma vez que se trata de uma tecnologia nacional. Além disso, é a primeira vez, descrito na literatura, o uso de proteína multiepitopo recombinante contendo os epitopos mais representativos do vírus da rubéola circulante no Brasil.

FIGURA 1



DNA Sequence

ATGAATCAACAATCACGTTGGGGTCTGGGTTCTCCTAACTGTCATGGTCTGACTGGGCATCTC CAGTTTGCCAACGCCATTCTGGCTCAGGCTCTGGCCTGGTAGGT
 GCAACCCCTGAAGGGAGCGGGAGCGGTGCTGATGATCCGCTGCTGCGTGGGTCTGGGTCTGGCG TGTGGGTTACCCCGGTTATTGGTTCCCAAGCTCGTGGTAGTGGG
 TCAGGTGCACCCGACCTTACCGCAGCCTCCGCGTGACATGGCCAGCACTATGGCCATCATC ATCATCAGTTACCGTTTCTGGGCTCTGGTTCTGGTAATCAGCAA
 AGTCGTTGGGGCCTGGGGTCTCCGAACTGTCATGGCCCGGATTGGGCCTCACCAGTTTGCCAGC GTCACTCAGGCTCTGGCTCCGGCCTGGTTGGGGCAACTCCAGAA
 GGTCTGGCTCTGGCGCGGACGATCCGCTGTTACGTGGGTCTGGCAGTGGCGTATGGGTGACTC CGGTTATCGGTAGTCAGGCGCGTGGTAGTGGTTCTGGTGCCCCG
 CCGACACTGCCACAGCCTCCACGCGCACCGGTCAGCACTACGGTCATCATCATCAACTGC CATTCTG

Protein sequence

MNQSRWGLGSPNCHGPDWASPVQRHS GSGSGLVGATPEGSGSGADDPLLRGSGSGVVTFVIGSQARGSGSGAPPTLPQPPRAHQHYGHHHQLPFLGSGSNQQ
 SRWGLGSPNCHGPDWASPVQRHS GSGSGLVGATPEGSGSGADDPLLRGSGSGVVTFVIGSQARGSGSGAPPTLPQPPRAHQHYGHHHQLPFL

FIGURA 2

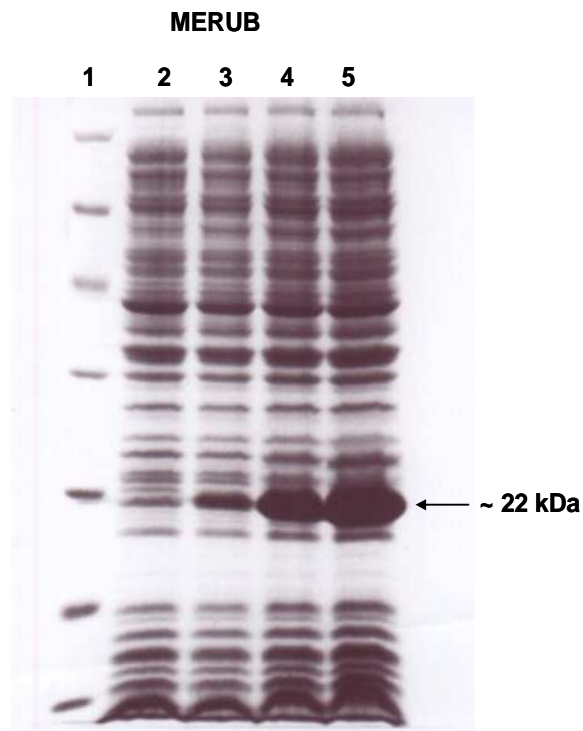


FIGURA 3

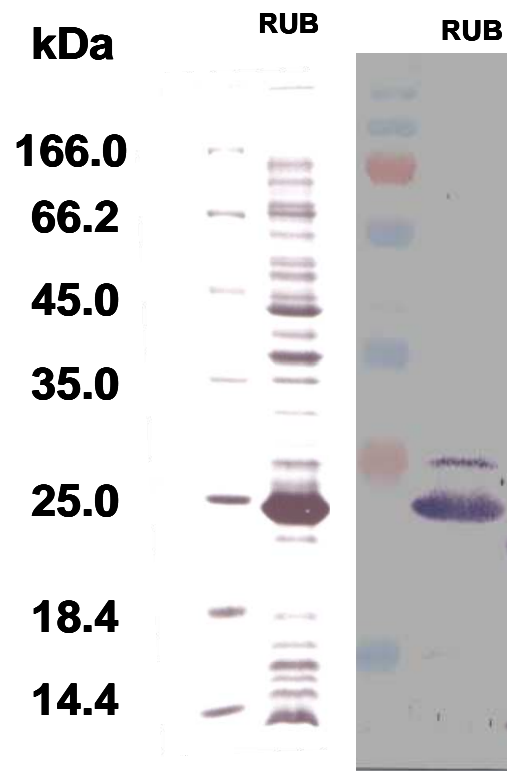


FIGURA 4

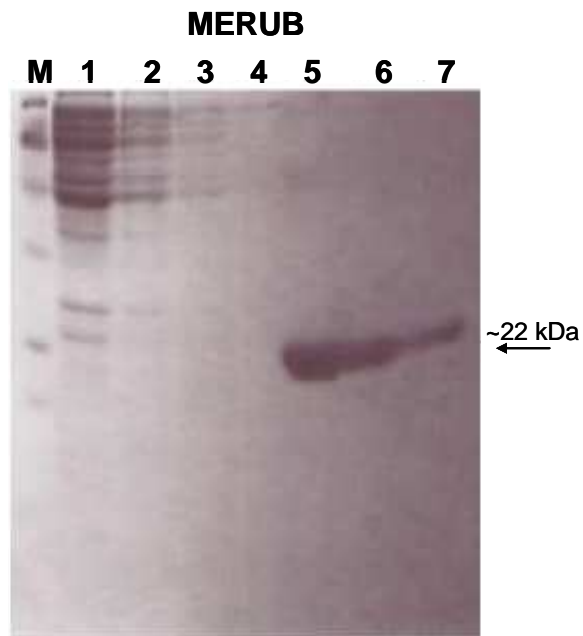


FIGURA 5

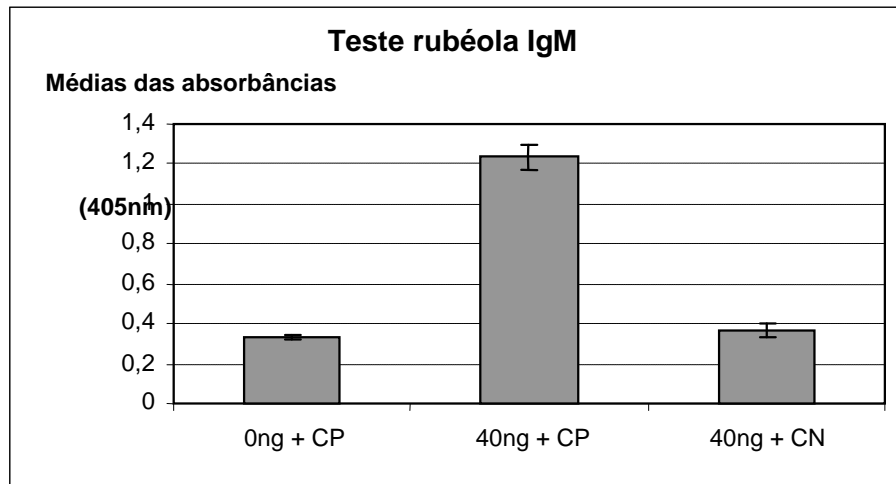
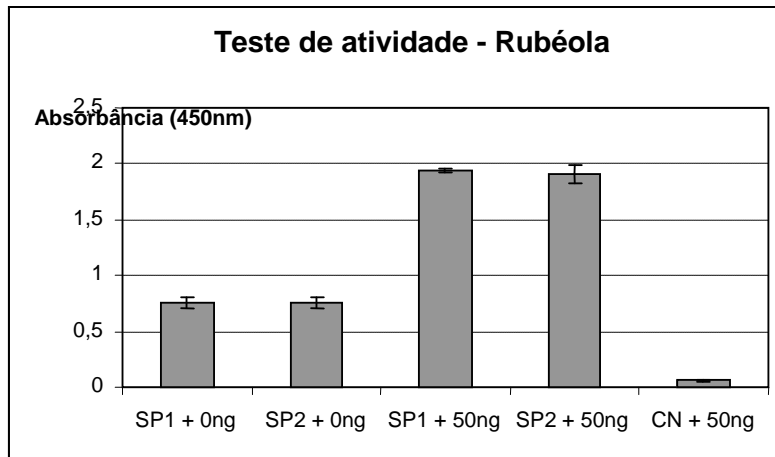


FIGURA 6



SEQ ID 1

CATATGAATCAACAATCACGTTGGGGTCTGGGTTCTCCTAACTGTCATGGTCCTGACTGGGC
ATCTCCAGTTTGCCAACGCCATTCTGGCTCAGGCTCTGGCCTGGTAGGTGCAACCCCTGAAG
GGAGCGGGAGCGGTGCTGATGATCCGCTGCTGCGTGGGTCTGGGTCTGGCGTGTGGGTTACC
CCGGTTATTGGTTCCCAAGCTCGTGGTAGTGGGTGTCAGGTGCACCGCCGACCTTACCGCAGCC
TCCGCGTGACATGGCCAGCACTATGGCCATCATCATCATCAGTTACCGTTTCTGGGCTCTG
GTTCTGGTAATCAGCAAAGTCGTTGGGGCCTGGGGTCTCCGAACTGTCATGGCCCGGATTGG
GCCTCACCAGTTTGCCAGCGTCACTCAGGCTCTGGCTCCGGCCTGGTTGGGGCAACTCCAGA
AGGTTCTGGCTCTGGCGCGGACGATCCGCTGTTACGTGGGTCTGGCAGTGGCGTATGGGTGA
CTCCGGTTATCGGTAGTCAGGCGCGTGGTAGTGGTTCTGGTGCCCCGCGGACACTGCCACAG
CCTCCACGCGCACACGGTCAGCACTACGGTCATCATCATCAACTGCCATTTCTGCTCGA
G

SEQ ID 2

MNQSRWGLGSPNCHGPDWASPVCQRHSGSGSLVGATPEGSGSGADDPLLRSVWVTP
VIGSQARSGSGAPPTLPQP PRAHGQHYGHHHHQLPFLGSGSNQSRWGLGSPNCHGPDWA
SPVCQRHSGSGSLVGATPEGSGSGADDPLLRSVWVTPVIGSQARSGSGAPPTLPQP
PRAHGQHYGHHHHQLPFL

REIVINDICAÇÕES

1. PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE PARA USO EM KIT DE DIAGNÓSTICO PARA RUBÉOLA E/OU PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E/OU PARA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE VACINAS, FÁRMACOS E MEDICAMENTOS caracterizado por conter uma proteína multiepitopo (rMERUB) compreendendo uma seqüência de resíduos de aminoácidos e/ou suas possíveis variações em sua sequência primária tais como adição, deleção ou substituição de aminoácidos ou outros grupos químicos.
2. PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE PARA USO EM KIT DE DIAGNÓSTICO PARA RUBÉOLA E/OU PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E/OU PARA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE VACINAS, FÁRMACOS E MEDICAMENTOS de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela proteína multiepitopo ser codificada pela seqüência de nucleotídeos SEQ ID No. (1).
3. PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE PARA USO EM KIT DE DIAGNÓSTICO PARA RUBÉOLA E/OU PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E/OU PARA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE VACINAS, FÁRMACOS E MEDICAMENTOS de acordo com as reivindicações 1 e 2 caracterizado pela proteína multiepitopo compreender a seqüência de aminoácidos SEQ ID No. (2).
4. PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE PARA USO EM KIT DE DIAGNÓSTICO PARA RUBÉOLA E/OU PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E/OU PARA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE VACINAS, FÁRMACOS E MEDICAMENTOS de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por conter epítomos imunodominantes de proteínas estruturais do vírus da Rubéola.
5. PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE PARA USO EM KIT DE DIAGNÓSTICO PARA RUBÉOLA E/OU PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E/OU PARA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE

- VACINAS, FÁRMACOS E MEDICAMENTOS de acordo com as reivindicações 1 e 4 caracterizado pelos epitopos imunodominantes, sendo unidos por um peptídeo conector de 2 a 10 resíduos de aminoácidos.
6. PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE PARA USO EM KIT DE DIAGNÓSTICO PARA RUBÉOLA E/OU PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E/OU PARA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE VACINAS, FÁRMACOS E MEDICAMENTOS de acordo com as reivindicações 1, 4 e 5 caracterizado por conter um peptídeo conector de 2 a 10 resíduos de aminoácidos de glicina e serina.
 7. PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE PARA USO EM KIT DE DIAGNÓSTICO PARA RUBÉOLA E/OU PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E/OU PARA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE VACINAS, FÁRMACOS E MEDICAMENTOS de acordo com a reivindicação 1 a 6 caracterizado por ser obtida por procedimento de expressão heteróloga em microrganismos.
 8. PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE PARA USO EM KIT DE DIAGNÓSTICO PARA RUBÉOLA E/OU PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E/OU PARA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE VACINAS, FÁRMACOS E MEDICAMENTOS de acordo com a reivindicação 7 caracterizado pela clonagem e expressão da proteína multiepítopo em linhagens da bactéria *Escherichia coli*.
 9. PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE PARA USO EM KIT DE DIAGNÓSTICO PARA RUBÉOLA E/OU PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E/OU PARA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE VACINAS, FÁRMACOS E MEDICAMENTOS de acordo com a reivindicação 8 caracterizado pela expressão da proteína multiepítopo em *Escherichia coli* da linhagem BL21.
 10. PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE PARA USO EM KIT DE DIAGNÓSTICO PARA RUBÉOLA E/OU PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E/OU PARA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE

VACINAS, FÁRMACOS E MEDICAMENTOS de acordo com as reivindicações de 1 a 8 caracterizado por compreender as seguintes etapas consecutivas

- (a) síntese de um gene compreendendo multiepítopos recombinantes de regiões estruturais representativas do vírus da Rubéola contendo epítopos unidos por peptídeos conectores de glicina e serina, preferencialmente pela seqüência GSGSG;
- (b) clonagem do gene sintético dado pela seqüência SEQ ID No.(1) no vetor pET21a e sua expressão em *Escherichia coli* BL21 (λ DE3) pLysS;
- (c) Indução da proteína multiepítopo de 1 a 4 horas;
- (d) Purificação da proteína multiepítopo em condições desnaturantes.

11. PROTEÍNA MULTIEPÍTOPO RECOMBINANTE PARA USO EM KIT DE DIAGNÓSTICO PARA RUBÉOLA E/OU PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E/OU PARA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE VACINAS, FÁRMACOS E MEDICAMENTOS de acordo com a reivindicação 10 caracterizada pelo tratamento da fração obtida da etapa de indução após centrifugação entre 5000 a 10000 rpm apenas com tampão de lise, independente de sonicação.

12. PROTEÍNA MULTIEPÍTOPO RECOMBINANTE PARA USO EM KIT DE DIAGNÓSTICO PARA RUBÉOLA E/OU PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E/OU PARA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE VACINAS, FÁRMACOS E MEDICAMENTOS de acordo com a reivindicação 11 caracterizado pela composição do tampão de lise ser uma mistura homogênea de uréia de 6 a 10 M, NaH_2PO_4 de 30 a 70 mM, NaCl de 100 a 500 mM, imidazol de 5 a 15 mM, pH básico, preferencialmente, pH 8 a 10.

13. PROTEÍNA MULTIEPÍTOPO RECOMBINANTE PARA USO EM KIT DE DIAGNÓSTICO PARA RUBÉOLA E/OU PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E/OU PARA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE VACINAS, FÁRMACOS E MEDICAMENTOS de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pela purificação em condições desnaturantes usando a resina de Ni-NTA.

14. USO DA PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE de acordo com as reivindicações de 1 a 9, caracterizado por ser um insumo em kits de diagnóstico específico para detecção de anticorpos circulantes de indivíduos infectados pelo vírus da Rubéola de abrangência no Brasil e no mundo.
15. USO DA PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE de acordo com a reivindicação 13 caracterizada por esta proteína multiepitopo conter os epitopos (genótipos e subtipos) mais prevalentes no Brasil.
16. USO DA PROTEÍNA MULTIEPITOPO RECOMBINANTE de acordo com as reivindicações de 1 a 9, caracterizado por ser um insumo para produção de anticorpos monoclonais e/ou para pesquisa e desenvolvimento de vacinas, fármacos e medicamentos.

LISTA DOS AUTORES

01) Nome completo: **Marilen Queiroz de Souza**

02) Qualificação: Mestre

03) Naturalidade: **Brasileira**

04) Estado civil: **Solteira**

05) Formação (Graduação): **Bióloga**

06) Endereço completo: **SQN 211, BL. K, apt. 202, Asa Norte, Brasília-DF**

07) CEP: **70863-110**

08) CPF: **017.959.271-86**

09) RG: **4363513 – DGPC-GO**

10) Telefone (com o DDD): **(61) 3037-1998/ (61) 8425-6893**

11) Fax (com o DDD): **(61) 3107-3120**

12) E-mail institucional: **marilen.souza@gmail.com**

01) Nome completo: **José Carlos dos Santos**

02) Qualificação: Mestre

03) Naturalidade: **Brasileiro**

04) Estado civil: **Solteiro**

05) Formação: **Farmácia**

06) Endereço completo: **Universidade de Brasília – Colina Bloco K – Apto 205, Asa Norte, Brasília – DF.**

07) CEP: **70910 - 900**

08) CPF: **049.705.136-27**

09) RG: **3148097**

10) Telefone (com o DDD): **(61) 9603-2883**

11) Fax (com o DDD): **(61) 3107-3120**

12) E-mail institucional: **josecarlosbiomol@gmail.com**

01) Nome completo: **Alexsandro Sobreira Galdino**

02) Qualificação: Professor Doutor

03) Naturalidade: **Brasileiro**

04) Estado civil: **Solteiro**

05) Formação (Graduação): **Biólogo**

06) Endereço completo: **Rua Nossa Senhora Aparecida, 520, Apto. 301, Catalão, Divinópolis-MG**

- 07) CEP: **35501-173**
- 08) CPF: **616.837.013-72**
- 09) RG: **3095845-SSP/DF**
- 10) Telefone (com o DDD): **(37) 3221-1552**
- 11) E-mail institucional: **asgaldino@ufsj.edu.br**

01) Nome completo: **Fernando Araripe Gonçalves Torres**

02) Qualificação: Professor Doutor

03) Naturalidade: **Brasileiro**

04) Estado civil: **Divorciado**

05) Formação: **Biólogo**

06) Endereço completo: **SQN 216, Bloco E, Apt. 107, Asa Norte, Brasília-DF**

07) CEP: **70875-050**

08) CPF: **239.233.771-34**

09) RG:

10) Telefone: **(61) 3107-3120**

11) Fax: **(61) 3107-3041**

12) Email: **ftorres@unb.br**

01) Nome completo: **Maria Sueli Soares Felipe**

02) Qualificação: **Professora Doutora**

03) Naturalidade: **Brasileira**

04) Estado civil: **Separada judicialmente**

05) Formação: **Química**

06) Endereço completo: **SHIN QL 15, Conjunto 3, Casa 8, Lago Norte, Brasília - DF**

07) CEP: **71.535-235**

08) CPF: **098.356.791-34**

09) RG: **365.761 SSP-DF**

10) Telefone: **(61) 3107-3120**

11) Fax: **(61) 3107-3041**

12) Email: **msueli@unb.br**