

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Bruna Varginha Ramos Caiado

**Produção de Partículas Semelhantes a Vírus (VLPs) do
Vírus da Hepatite A para Fins Diagnósticos e Vacinais**

**Recife
2017**

Bruna Varginha Ramos Caiado

**Produção de Partículas Semelhantes a Vírus (VLPs) do
Vírus da Hepatite A para Fins Diagnósticos e Vacinais**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Genética da Universidade Federal de
Pernambuco como parte dos requisitos exigidos
para obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientador: Dr. Rafael Dhalia

**Recife
2017**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Caiado, Bruna Varginha Ramos

Produção de partículas semelhantes a vírus (VLPs) do vírus da Hepatite A para fins diagnósticos e vacinais. / Recife: O Autor, 2017.

125 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Rafael Dhalia

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Genética, Recife, 2017.

Inclui referências, apêndices e anexo

**1. Hepatite A 2. Vacinas 3. Diagnóstico I. Dhalia, Rafael
(orient.) II. Título**

616.3623

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 550

BRUNA VARGINHA RAMOS CAIADO

**PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS SEMELHANTES A VÍRUS (VLPS) DO
VÍRUS DA HEPATITE A PARA FINS DIAGNÓSTICOS E VACINAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Genética da Universidade Federal de
Pernambuco como parte dos requisitos exigidos
para obtenção do título de Doutor em Genética.

Aprovada em 21/02/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Antônio Carlos de Freitas
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Christian Robson de Souza Reis
Fiocruz Pernambuco

Dra. Laura Helena Vega Gonzales Gil
Fiocruz Pernambuco

Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha
Fiocruz Pernambuco

Dr. Rafael Dhalia
Fiocruz Pernambuco

Dr. Tercílio Calsa Junior
Universidade Federal de Pernambuco

RECIFE

2017

Dedico essa tese à minha família! Me sinto privilegiada por ter vocês como pais e irmã...

AGRADECIMENTOS

Todo trabalho científico é resultado de esforços comuns de diversas pessoas. Tenho muito a agradecer por toda a ajuda que recebi durante o período que passei no doutorado. Inicialmente, agradeço ao meu orientador, Dr. Rafael Dhalia, pelas inúmeras oportunidades que ele me proporcionou nos anos que estive sob sua orientação. Também agradeço ao Dr. Roberto Lins por ter me ensinado a olhar meus objetos de estudo por ângulos diferentes. Me sinto privilegiada por ter tido a oportunidade de trabalhar com esses grandes pesquisadores.

Dedico esse trabalho especialmente à minha família, meus pais Arnott, Roberta, minha irmã Bárbara e meus avós por todo o amor, suporte e incentivo que sempre me ofereceram. Todas as minhas vitórias pertencem a vocês!

Aos meus grandes amigos Adriane, Deborah, Janaína, Kennya, Leandro e Michelle pela amizade e suporte constantes durante esse período. Minha vida certamente não seria a mesma sem a presença de vocês. Ao meu namorado João, pela compreensão, incentivo e ajuda em todas as etapas mais difíceis próximas à defesa. Aos dengosos, Danilo, Deborah e Fernando, pelo trabalho intenso, risadas constantes e amizade sempre presente, mesmo que não estejamos fisicamente próximos.

A todos os pesquisadores do Departamento de Virologia e aos meus companheiros de laboratório e dia-a-dia, LaViTEanos, por tornarem meus dias mais divertidos, associando conhecimentos, discussões científicas e inúmeras risadas.

Às companheiras do projeto da Vacina da Dengue do Butantan, em especial, Helena, Leile e Paty, por me ajudarem na divisão entre o projeto e a finalização da

tese e serem compreensivas nos momentos que me ausentei para concluir meu trabalho. A amizade de vocês foi um dos presentes que ganhei nesse último ano.

Aos pesquisadores Dr. Bergmann Ribeiro e Dra. Regina Bressan que me auxiliaram no aprendizado de técnicas com baculovírus e de preparação de materiais para a microscopia eletrônica respectivamente.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Genética (UFPE) pelo financiamento e conhecimentos adquiridos durante os 8 anos em que estive vinculada (entre mestrado e doutorado) e ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, que possibilitou a realização dessa tese, cedendo não somente o espaço físico, como equipamentos de ponta. Gostaria de agradecer ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas financiadas pelo PDTIS e aos órgãos de financiamento CAPES, CNPq e FIOCRUZ.

“There is nothing like a dream to create the future.”

(Victor Hugo)

“The most beautiful thing we can experience is the mysterious. It is the source of all true art and science.”

(Albert Einstein)

RESUMO

A hepatite A é uma doença viral aguda que acomete milhares de pessoas em todo mundo. As vacinas e testes diagnósticos para prevenção e detecção da doença são considerados de alto custo, devido a dificuldade do crescimento do vírus em meio de cultura. Uma alternativa para a produção desses insumos baseia-se na obtenção de Partículas Semelhantes a Vírus (VLPs), que são estruturas compostas de proteínas estruturais que mimetizam a partícula viral sem, no entanto, carrear o material genético do vírus. Este trabalho teve como objetivo principal avaliar abordagens para a geração de VLPs do Vírus da Hepatite A – HAV, como insumo para desenvolvimento de vacinas e testes diagnósticos. Três estratégias com potencial de mimetizarem o vírus, formando suas VLPs, foram testadas para expressão em células de inseto. Em todas as abordagens foram obtidas as proteínas virais, entretanto apenas na terceira foi possível detectar a montagem das VLPs. O estudo foi um dos pioneiros na literatura a demonstrar a visualização de VLPs de HAV, produzidas em sistema heterólogo de expressão. A obtenção de VLPs de HAV tem um enorme potencial na produção de antígenos vacinais/diagnóstico, sem a necessidade da utilização de partículas virais infectivas. Além disso permite a produção em larga escala do antígeno com um custo final relativamente reduzido, apresenta uma maior segurança pois as VLPs não tem capacidade de se autoreplicar como o vírus selvagem, utilizado nas formulações vacinais disponíveis no mercado.

Palavras-chave: Hepatite A. VLPs. Vacinas. Diagnóstico.

ABSTRACT

Hepatitis A is an acute viral illness that affects thousands of people around the world. Vaccines and diagnostic tests for disease prevention and detection are considered to be costly because of difficulty in growing the virus in culture medium. An alternative for the production of these inputs is based on obtaining of Virus-like Particles (VLPs) that are structures composed of structural proteins that mimic the viral particle without, however, carrying the genetic material of the virus. This work had as main objective the generation of VLPs of Hepatitis A Virus - HAV, as an input for the development of vaccines and diagnostic tests. Three strategies with potential to mimic the virus, forming their VLPs, were used for expression in insect cells. In all strategies the viral proteins were obtained, but only in the third it was possible to detect the assembly of the VLPs. This study was the first of the literature demonstrating the visualization of HAV VLPs, produced in a heterologous expression system. Obtaining HAV VLPs has enormous potential in the production of vaccine/diagnostic antigens, without the need for the use of viral infective particles. In addition to allowing the large-scale production of the antigen with a relatively low final cost, it is safer because VLPs do not have the ability to self-replicate like the wild-type virus used in commercially available vaccine formulations.

Keywords: Hepatitis A. VLPs. Vaccines. Diagnosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - PREVALÊNCIA ESTIMADA DA HEPATITE A.	25
FIGURA 2 - CURSO CLÍNICO E PERFIL SOROLÓGICO DA INFECÇÃO AGUDA PELO VÍRUS DA HEPATITE A.	29
FIGURA 3 - ORGANIZAÇÃO DO GENOMA DO HAV E PROCESSAMENTO DA POLIPROTEÍNA.	32
FIGURA 4 - MODELO DA VIA DE MONTAGEM DO CAPSÍDEO DO HAV.	33
FIGURA 5 - PARTÍCULAS DO HAV COMPLETAS E INCOMPLETAS FRACIONADAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA.	34
FIGURA 6 - CARACTERÍSTICAS IMUNOGÊNICAS DE VLPS APRESENTADORAS DE ANTÍGENOS.	36
FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS TRÊS PRINCIPAIS TIPOS DE VLPS.	37
FIGURA 8 - PRODUÇÃO DE VLPS ENVELOPADAS E NÃO-ENVELOPADAS.	42
FIGURA 9 - COMPARAÇÃO ENTRE AS ETAPAS PARA PRODUÇÃO DAS VACINAS CONVENCIONAIS E DE VLPS.	44
FIGURA 10 - PRINCIPAIS ESTÁGIOS DA FORMAÇÃO DE VLPS ENVELOPADAS E NÃO-ENVELOPADAS EM CÉLULAS DE INSETOS.	50
FIGURA 11 - FORMAÇÃO DO CAPSÍDEO DO VÍRUS DA HEPATITE A.	59
FIGURA 12 - ESTRATÉGIA 1 – REPRESENTAÇÃO DA CONSTRUÇÃO HAV-PTRUNC CLONADA NO VETOR COMERCIAL PFASTBAC1.	61
FIGURA 13 - ESTRATÉGIA 2 - REPRESENTAÇÃO DA CONSTRUÇÃO P1+3C CLONADA NO VETOR PFASTBAC-DUAL.	63
FIGURA 14 - ESTRATÉGIA 3 – REPRESENTAÇÃO DA CONSTRUÇÃO VP0+VP3-1 CLONADA NO VETOR PFASTBAC-DUAL.	64
FIGURA 15 - ETAPAS PARA GERAÇÃO DE BACULOVÍRUS RECOMBINANTES.	67
FIGURA 16 - OTIMIZAÇÃO DE CODON USAGE DO VÍRUS DA HEPATITE A (HAV) PARA CÉLULAS DE INSETOS SF9.	75
FIGURA 17 - OTIMIZAÇÃO DAS ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS DO MRNA DA SEQUÊNCIA GÊNICA DA PROTEASE 3C DO HAV.	75
FIGURA 18 - CONFIRMAÇÃO DAS CLONAGENS DAS CONSTRUÇÕES HAV-PTRUNC, P1+3C E VP0+VP3-1 NOS VETORES PFASTBAC1/PFASTBAC-DUAL.	77

FIGURA 19 - CONFIRMAÇÃO DA OBTENÇÃO DOS BACMÍDEOS CONTENDO HAV-PTRUNC.	78
FIGURA 20 - CONFIRMAÇÃO DA OBTENÇÃO DOS BACMÍDEOS CONTENDO P1+3C E VP0+VP3-1.	79
FIGURA 21 - MÉDIA DOS TÍTULOS VIRAIS OBTIDOS EM ENSAIOS DE DILUIÇÃO LIMITANTE.	80
FIGURA 22 - ENSAIO DE EXPRESSÃO DA ESTRATÉGIA 1-HAV-PTRUNC.	82
FIGURA 23 - ENSAIO DE EXPRESSÃO DA ESTRATÉGIA 2-P1+3C.	83
FIGURA 24 - ENSAIO DE EXPRESSÃO DA ESTRATÉGIA 3-VP0+VP3-1.	84
FIGURA 25 - EXPRESSÃO E PROCESSAMENTO DAS PROTEÍNAS DO HAV EM CÉLULAS SF9.	85
FIGURA 26 - ANÁLISE POR <i>IMMUNOBLOT</i> DOS LISADOS DE CÉLULAS INFECTADAS COM VP0+VP3-1/BAC.	86
FIGURA 27 - MORFOLOGIA DE CÉLULAS SF9 NÃO-INFECTADAS E INFECTADAS COM OS BACULOVÍRUS RECOMBINANTES.	87
FIGURA 28 - ELETROMICROGRAFIA DE CÉLULAS SF9 NÃO-INFECTADAS (A) E INFECTADAS COM BACULOVÍRUS RECOMBINANTES (B).	88
FIGURA 29. VLPS DO HAV GERADAS PELA INFECÇÃO DE CÉLULAS SF9 COM BACULOVÍRUS CONTENDO GENES DA ESTRATÉGIA 3.	89
FIGURA 30 - FRAÇÕES 3-11 COLETADAS NA PURIFICAÇÃO DAS VLPS DO HAV.	90

LISTA DE QUADROS E TABELAS

TABELA 1 - NOME E COMPOSIÇÃO DAS ESTRATÉGIAS PARA GERAÇÃO DAS VLPS DO HAV.	58
TABELA 2 - SEQUÊNCIAS DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA A CONFIRMAÇÃO DAS TRANSPOSIÇÕES SÍTIO-ESPECÍFICAS DAS CONSTRUÇÕES DE INTERESSE EM BACMÍDEOS.	65
TABELA 3 - REAGENTES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR E SUAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES.	66
QUADRO 1 - CONDIÇÕES DE CICLAGEM UTILIZADAS NAS PCRS.	66

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ITEM	DEFINIÇÃO
AcMNPV	<i>Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus</i>
ALT	Alanina aminotransferase
AMP	Ampicilina
APC	<i>Antigen-presenting cell</i> / Célula apresentadora de antígeno
AST	Aspartato aminotransferase
BEVS	<i>Baculovirus Expression Vector System</i> / Sistema de expressão utilizando baculovírus como vetor
BmNPV	<i>Bombyx mori nucleopolyhedrovirus</i>
BPV	Papilomavírus bovino
BTV	Vírus da febre catarral bovina
CaCl₂	Cloreto de cálcio
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i> / Centro de Controle e Prevenção de Doenças
cDNA	DNA complementar
CDV	Vírus da cinomose canina
CHIKV	Vírus chikungunya
CMV	Citomegalovírus
CO₂	Dióxido de carbono
CV	Coxsackievírus
CVA16	Coxsackievírus A16
CVB3	Coxsackievírus B3
DH10Bac	Células de <i>Escherichia coli</i> da linhagem DH10B contendo bacmídeo
DNA	<i>Desoxiribonucleic acid</i> / Ácido desoxirribonucleico
eHAV	Forma envelopada do HAV

EMCV	Vírus da encefalomiocardite suína
ER	Retículo endoplasmático
EV71	Enterovírus 71
FCV	Calicivírus felino
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMDV	<i>Foot-and-mouth disease virus</i> / Vírus da Febre Aftosa
IgA	Imunoglobulina do tipo A
IgG	Imunoglobulina do tipo G
IgM	Imunoglobulina do tipo M
IPTG	IsoPropil-beta-DTioGalactopiranosídeo
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i> / Sítio Interno de Entrada do Ribossomo
KMB17	<i>human embryonic lung fibroblast tissue</i> / tecido de fibroblastos de pulmões embrionados humanos
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> / Padrões Moleculares Associados a Aatógenos
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> / Reação em Cadeia de Polimerase
PV	Poliovírus
HAV	Vírus da Hepatite A
HAV-PTRUNC	Estratégia 1 da tese contendo as proteínas estruturais VP0-VP3-VP1-2A, um DNA espaçador e a protease 3C do HAV
HBcAg	Antígeno do core do HBV
HBV	Vírus da Hepatite B
HCl	Ácido clorídrico
HEV	Vírus da hepatite E
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPV	Papilomavírus humano
g	Força gravitacional

kb	Kilobase
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Kilodalton
LB	<i>Luria Bertani medium</i> / Meio de Luria Bertani
LE2x	Tampão de lise para fracionamento de proteínas – concentrado 2x
M	Molar
mM	Milimolar
MBP	<i>Maltose Binding Protein</i> / Proteína Ligadora de Maltose
mg	Miligrama
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> / Complexo principal de histocompatibilidade
ml	Mililitro
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> / Multiplicidade da infecção
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i> / Ácido ribonucleico mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
Na₂HPO₄	Fosfato de sódio dibásico
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NMK	<i>Newborn monkey kidney</i> / rim de macaco recém-nascido
NTR	<i>Non-translated region</i> / Região não-traduzível
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	<i>Open Reading Frame</i> / Quadro de Leitura Aberto
OsO₄	Tetróxido de ósmio
PAGE	<i>Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i> / Eletroforese em gel de poliacrilamida
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i> / Padrões moleculares associados a patógenos

pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> / Tampão salina fosfato
PCV-2	Circovírus Suíno Tipo 2
pfu	<i>Plaque forming unit</i> / Unidade Formadora de Placas
poli-A	Poli Adeninas
polh	Promotor poliedrina (baculovírus)
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i> / Receptores de reconhecimento de padrões
PVDF	Fluoreto Polivinidileno
PX	Proteínas VP1-2A do HAV quando ligadas
P1	VP4-VP2-VP3-VP1-2A
p10	Promotor do polipeptídeo fibroso de 10 kDa (baculovírus)
rpm	Rotações por minuto
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> / Ácido ribonucleico
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> / Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> / Dodecil sulfato de sódio
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> 9
SOC	<i>Super optimal broth with catabolite repression</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
SV40	Vírus vacuolante símio 40
TCA	Ácido tricloroacético
TCID₅₀	<i>50% Tissue culture infectious dose</i> / Dose infectiva de 50% do tecido ou cultura de células
TIM-1	<i>T cell immunoglobulin domain, mucin-like domain gene family</i> / Domínio de imunoglobulina de células T da família de genes do tipo mucina

TLR	<i>Toll-like receptor</i> / Receptores do tipo Toll
Tn5	<i>Trichoplusia ni</i>
U	Unidade
VLPs	<i>Virus-Like Particles</i> / Partículas Semelhantes a Vírus
VP0	Proteína precursora das proteínas estruturais VP4 e VP2 do HAV
VP3-1	Construção gerada na tese contendo as proteínas VP3, 2A do vírus FMDV (apenas o sítio catalítico), VP1 e 2A do vírus HAV
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
2A FMDV	Protease 2A do vírus da febre aftosa
2A HAV	Proteína 2A do HAV
3C HAV	Protease 3C do HAV
5'UTR	5' untranslated region / região 5' não-traduzida
3'UTR	3' untranslated region / região 3' não-traduzida
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 HEPATITE A	23
2.2 EPIDEMIOLOGIA	25
2.3 VACINAS	26
2.4 DIAGNÓSTICO	28
2.5 VÍRUS DA HEPATITE A: CLASSIFICAÇÃO E ESTRUTURA	30
2.6 PARTÍCULAS SEMELHANTES A VÍRUS (VLPS)	35
2.7 VACINAS BASEADAS EM VLPS	42
2.8 SISTEMA DE EXPRESSÃO EM BACULOVÍRUS (BEVS)	47
2.9 VLPS DA FAMÍLIA <i>PICORNAVIRIDAE</i>	50
2.9.1 VLPs do gênero <i>Aphthovirus</i>	51
2.9.2 VLPs do gênero <i>Enterovirus</i>	52
2.9.3 VLPs do vírus da Hepatite A	54
3 OBJETIVOS	56
3.1 OBJETIVO GERAL	56
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
4 MATERIAL E MÉTODOS	57
4.1 DEFINIÇÃO E OTIMIZAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES UTILIZADAS PARA OBTER VLPS	57
4.2 CLONAGENS EM PLASMÍDEOS DE TRANSFERÊNCIA PARA TRANSPOSIÇÃO SÍTIO-ESPECÍFICA	59
4.2.1 Clonagem estratégia 1- HAV-PTRUNC no vetor pFastBac1	59
4.2.2 Clonagem estratégia 2- P1+3C no vetor pFastBac-Dual	61
4.2.3 Clonagem estratégia 3- VP0+VP3-1 no vetor pFastBac-Dual	63
4.3 GERAÇÃO E CONFIRMAÇÃO DOS BACMÍDEOS RECOMBINANTES	64
4.4 CULTIVO DE CÉLULAS E OBTENÇÃO DE BACULOVÍRUS RECOMBINANTES	66
4.5 AMPLIFICAÇÃO E TITULAÇÃO DO ESTOQUE VIRAL	68
4.6 ENSAIOS DE EXPRESSÃO DAS VLPS	69
4.7 PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS POR IMUNOADSORÇÃO	69
4.8 ENSAIOS DE <i>IMMUNOBLOT</i>	70
4.9 VISUALIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS MONTADAS NO INTERIOR	71

DAS CÉLULAS SF9	
4.10 PURIFICAÇÃO DAS VLPS	72
5 RESULTADOS	73
5.1 REGIÕES VIRAIS SELECIONADAS	73
5.2 CONSTRUÇÕES OTIMIZADAS	74
5.3 CONSTRUÇÕES OBTIDAS POR TRANSPOSIÇÃO SÍTIO-ESPECÍFICA	76
5.4 BACMÍDEOS RECOMBINANTES	77
5.5 BACULOVÍRUS RECOMBINANTES	79
5.6 ENSAIOS DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	81
5.7 VISUALIZAÇÃO DAS VLPS NO INTERIOR DAS CÉLULAS DE INSETOS	86
5.8 PURIFICAÇÃO DAS PARTÍCULAS SEMELHANTES A VÍRUS	90
6 DISCUSSÃO	91
7 CONCLUSÕES	99
REFERÊNCIAS	100
APÊNDICE A - Artigo publicado – Revista Brasileira de Saúde Materno-Infantil	111
APÊNDICE B - Artigo a ser submetido para a revista <i>Journal Of Viral Hepatitis</i> (JVH)	112
ANEXO A - Planilha para cálculo do TCID₅₀ e pfu/ml	126

1 INTRODUÇÃO

A hepatite A é uma doença de ocorrência mundial, sendo a principal causa de hepatites agudas na população. A doença é consequência da infecção das células do hospedeiro com o vírus da hepatite A (HAV), um picornavírus que possui como material genético uma fita única de um ácido ribonucleico (RNA) de sentido positivo. Desde os anos 90, foram aprovadas vacinas (com o vírus inativado e atenuado) que induzem com eficiência imunidade protetora contra o agente infeccioso, mas elas possuem custo elevado, o que acaba inviabilizando sua utilização nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, que são locais com maior ocorrência da doença. Além disso, os principais kits diagnósticos utilizados para identificar a infecção pelo HAV utilizam a partícula viral como antígeno, o que também aumenta o custo de sua produção. Mesmo com a existência de vacinas, a infecção pelo vírus da Hepatite A ainda acomete milhões de pessoas todos os anos, o que demonstra a importância de se estudar novas estratégias vacinais e kits diagnósticos com custo reduzido para serem efetivamente utilizados nos países que possuem o maior número de pessoas acometidas.

Devido à existência de vacinas protetoras contra a doença causada pelo HAV, sua patogênese, que difere em diversos pontos relevantes da maioria dos picornavírus, foi pouco estudada nos últimos quinze anos. No entanto, recentemente os pesquisadores “redescobriram” o vírus da hepatite A e vêm dedicando mais tempo ao estudo da sua estrutura e associação com a célula hospedeira.

Uma estratégia viável, que tem sido cada vez mais utilizada em estudos que têm como objetivo obter novos antígenos para vacinas e testes diagnósticos virais, é expressar as proteínas do capsídeo do vírus de interesse (sem contudo expressar genes não-estruturais), em sistemas heterólogos de expressão, gerando partículas semelhantes a vírus (VLPs), que possuem o tamanho e formato semelhante ao vírus de interesse. Sendo assim suas regiões imunogênicas são expostas, sem contudo serem infectivas, já que não possuem o genoma viral. Essas partículas podem ser expressas em diversos sistemas, desde os mais simples, como células de *Escherichia coli*, até mais complexos como células eucarióticas de mamíferos ou sistemas de expressão livres de células. A escolha da estratégia mais adequada

geralmente é baseada na estrutura e modificações pós-traducionais das proteínas virais de interesse.

O vírus da hepatite A possui quatro proteínas estruturais, responsáveis pela formação do capsídeo viral. Essas proteínas, se expressas e processadas corretamente, se agregam formando a estrutura do capsídeo, mesmo na ausência do genoma do HAV. Outros picornavírus que possuem genoma semelhante ao do HAV, como o vírus da febre aftosa (FMDV), já tiveram VLPs expressas e purificadas com a intenção de utilizá-las como estratégias vacinais. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi construir estratégias contendo os genes responsáveis pela expressão das proteínas estruturais do HAV, com o intuito de obter em células de insetos, VLPs do vírus da hepatite A, capazes de serem reconhecidas por anticorpos específicos. Para atingir tal meta, os genes de interesse foram otimizados para expressão em linhagem celular de *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9- células de larvas de lepidópteros) e, posteriormente, inseridos no DNA de baculovírus. Os baculovírus recombinantes foram utilizados para infectar as células Sf9 e induzir a expressão, o processamento das proteínas de interesse, sendo a avaliação da montagem investigada em células infectadas e não-infectadas, através de microscopia eletrônica de transmissão.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HEPATITE A

Hepatite A é uma infecção de curso variável que acomete primariamente o fígado e é considerada um desafio para a saúde pública global. A organização mundial de saúde estima que todos os anos ocorram, aproximadamente, 1,5 milhão de novos casos da doença. Mesmo com a existência de vacinas, que conferem proteção contra a infecção, evidências sorológicas sugerem que a quantidade de novos casos seja cerca de dez vezes maior do que os dados existentes (VAUGHAN *et al.*, 2014). Há relatos da doença desde as civilizações grega e chinesa, onde era denominada icterícia catarral (ZUCKERMAN, 1983), mas apenas em 1912 foi descrita uma epidemia por Cockaine na ilha de Minorca. A associação da hepatite A com o agente que a ocasiona só ocorreu em 1973, quando Feinstone e colaboradores detectaram o vírus em fezes de pessoas infectadas, através de microscopia eletrônica. O interesse pela doença atingiu o seu pico no final dos anos 80, mas declinou devido à introdução de vacinas inativadas que induzem imunidade duradoura contra o agente responsável pela infecção. No entanto, recentemente houve o aumento no número de pesquisas que visam entender o curso diferenciado da hepatite A (WALKER *et al.*, 2015).

A doença é causada pelo vírus da hepatite A que se replica em hepatócitos e interfere na função do fígado, promovendo uma resposta imune que leva à inflamação hepática. Os pacientes podem apresentar desde formas assintomáticas ou subclínicas, doença sintomática ou icterica e quadros mais severos, como a hepatite fulminante (NAINAN *et al.*, 2006). A infecção com o vírus é responsável pela maioria dos casos de hepatites agudas na população, raramente evolui para quadros crônicos e apenas em 0,2% dos casos clínicos resulta em falha aguda do fígado e morte (VITRAL *et al.*, 2006; WU & GUO, 2013).

Após a ingestão do vírus e infecção pelo trato gastrointestinal, o HAV se replica silenciosamente no fígado por algumas semanas (geralmente de 3 a 6), o que corresponde ao período de incubação da doença. Esse período está associado à uma grande quantidade de vírus excretados nas fezes do hospedeiro, característica que se estende até os primeiros dias da doença (CUTHBERT, 2001;

MARTIN & LEMON, 2006; DOTZAUER & KRAEMER, 2012). A infecção sintomática tem início com período prodrômico, quando os sintomas encontrados são inespecíficos, como vômitos, febre, dor abdominal e mialgia. Após dez dias, inicia-se a fase ictérica, na qual há o aparecimento de uma urina escura, devido ao aumento da bilirrubina sérica, sendo também caracterizada pela eliminação de fezes pálidas e a presença de uma coloração amarelada nas membranas mucosas, conjuntiva, esclera e pele (JEONG & LEE, 2010). Essa fase é observada em 80% dos pacientes sintomáticos, sendo na maioria dos casos autolimitada (SCHIFF, 1992). A complicação mais grave da doença é o desenvolvimento de hepatite fulminante, que se caracteriza pelo aumento da icterícia, associado a uma extensa necrose do fígado, o que pode acarretar a perda das principais funções do órgão e causar encefalopatia associada ao quadro hepático (O'GRADY, 1992). O quadro de hepatite fulminante representa menos de 1% de todos os casos da doença e ocorre com mais frequência em adultos. Mesmo após o transplante de fígado, o índice de mortalidade é alto, ultrapassando 50% (LEMON & SHAPIRO, 1994).

As partículas virais do HAV são liberadas nas fezes do hospedeiro infectado, o que torna a via fecal-oral de transmissão a principal forma de contágio, podendo esta ser através do contato íntimo e prolongado entre pessoas ou após o consumo de água e comida contaminadas com fezes (CUTHBERT, 2001; WASLEY *et al.*, 2006). Embora seja raro, pode haver a transmissão do vírus em relações sexuais (principalmente devido ao contato oral com sítios anatômicos contaminados por fezes), entre usuários de drogas e transfusão de sangue (VAUGHAN *et al.*, 2014). As crianças possuem um papel importante na transmissão da doença, já que sua apresentação nelas é, em geral, assintomática ou com sintomas inespecíficos, tornando difícil a associação com hepatite A. Sendo assim, elas acabam servindo como fonte de infecção, principalmente, em ambientes familiares (CDC, 2015).

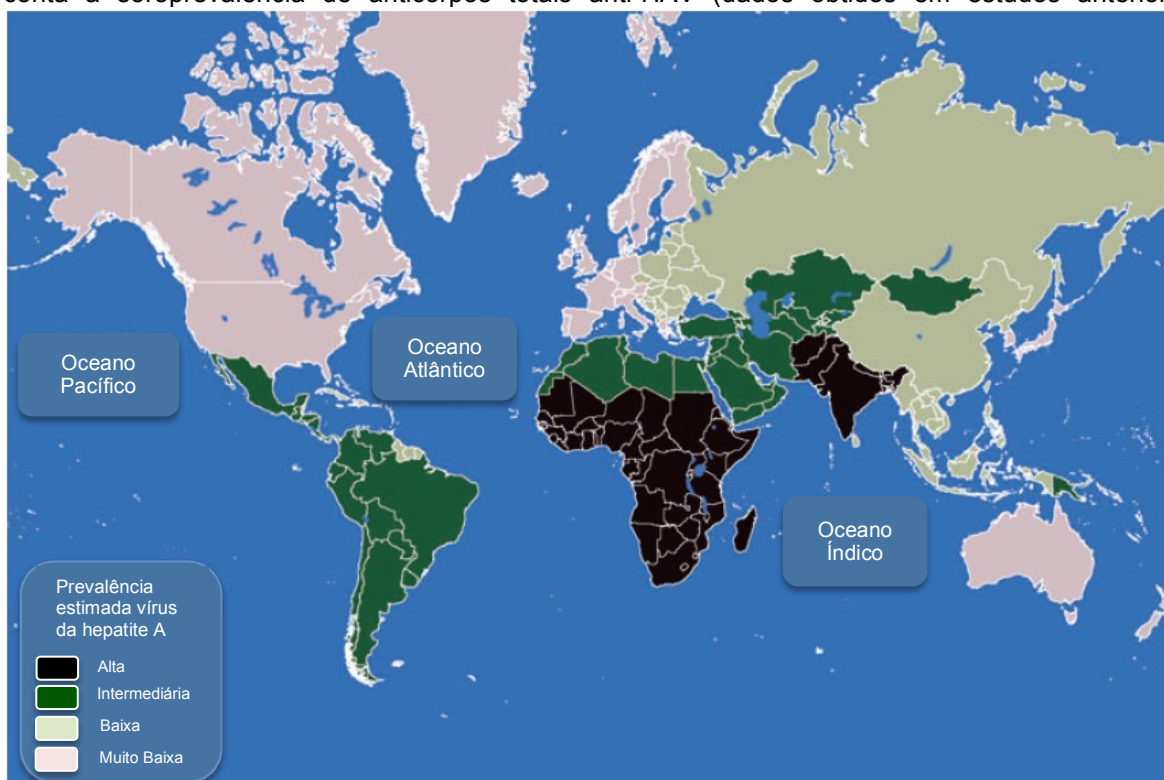
A resposta imune humoral contra o HAV é robusta e extremamente efetiva na eliminação do vírus. Anticorpos neutralizantes (anti-HAV), contra as proteínas do capsídeo viral (em especial VP1 e VP3), aparecem no sangue concomitantemente com o início da elevação das aminotransferases no soro e da injúria hepatocelular, mesmo antes do início dos primeiros sintomas. A resposta inicial é composta principalmente pelos anticorpos IgM anti-HAV, que marcam a fase aguda da doença e permanecem por até seis meses, embora os IgG anti-HAV também sejam produzidos logo após o início dos sintomas e confirmam uma imunidade duradoura

contra a reinfecção, já que persistem por vários anos (MARTIN & LEMON, 2006; NAINAN *et al.*, 2006; DOTZAUER & KRAEMER, 2012).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

A Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou em 2009 uma revisão sistemática da prevalência e susceptibilidade globais à infecção por HAV. As áreas geográficas mundiais foram caracterizadas com relação aos níveis de endemicidade da hepatite A em: alto, intermediário, baixo e muito baixo (Figura 1). Essa classificação utilizou dados de soroprevalência de anticorpos totais anti-HAV, obtidos em diversos estudos com residentes de cada país. Os níveis de endemicidade foram correlacionados com as condições higiênicas e sanitárias de cada área (JACOBSEN, 2009; WU & GUO, 2013).

Figura 1. Prevalência estimada da hepatite A. Classificação das áreas mundiais levando em conta a soroprevalência de anticorpos totais anti-HAV (dados obtidos em estudos anteriores).



Fonte: adaptado de WU & GUO, 2013.

É notório que a infecção pelo vírus da hepatite A possui uma distribuição geográfica distinta, com prevalência alta ou intermediária em países

subdesenvolvidos ou em desenvolvimento localizados em regiões como: África subsaariana, Índia, Paquistão, Afeganistão, América Central e do Sul, Norte da África, Oriente Médio, Turquia, Irã, Cazaquistão e Mongólia, onde são encontrados níveis mais elevados de anticorpos totais anti-HAV, enquanto locais como: Europa Oriental, Rússia, China, Oceania, possuem baixa prevalência e países desenvolvidos localizados na Europa Ocidental, América do Norte, Austrália e Escandinávia, praticamente, não possuem casos da doença, os poucos ocorridos envolvem quase em sua totalidade turistas que viajaram para áreas de risco sem imunização prévia. Naqueles países as condições sanitárias e de higiene são ideais e com isso a circulação do vírus é praticamente inexistente (WU & GUO, 2013; BLUM, 2016). No Brasil, os níveis de soroprevalência variam entre regiões, o Norte e o Nordeste possuem os índices mais elevados (70-90%), enquanto as regiões Sul e Sudeste têm índices de 30% de prevalência da infecção. Esses números refletem a discrepância existente nos sistemas de saneamento ambiental, onde cerca de 80% dos municípios do Sudeste são saneados, enquanto somente 5,8% da região Norte possuem essa infraestrutura (VITRAL *et al.*, 2008). Em 2012, Vitral e colaboradores publicaram um estudo de prevalência de anticorpos anti-HAV em crianças com situações socioeconômicas precárias do Brasil. O estudo mostrou que o número de crianças expostas ao vírus diminuiu, o que está diretamente relacionado a melhoria nas condições higiênico-sanitárias das cidades brasileiras. Entretanto, os dados também foram um alerta de que a vacinação deveria ser implementada pelo sistema único de saúde (SUS), já que as crianças sem anticorpos contra o HAV seriam mais susceptíveis a futuras infecções com o vírus.

2.3 VACINAS

Várias vacinas contra hepatite A foram introduzidas no mercado, por volta dos anos 90, através de esforços iniciados após o isolamento do HAV em 1979. Atualmente, existem dois tipos de vacinas disponíveis: as que utilizam na sua formulação vírus inativados com formaldeído (mais comuns) e as vacinas com vírus atenuados (fabricadas na China e disponíveis também na Índia, Tailândia, Filipinas, Guatemala e Bangladesh) (RAO *et al.*, 2016). As principais vacinas com vírus inativado para hepatite A disponíveis hoje no mercado são: HAVRIX®

(GlaxoSmithKline) e VAQTA® (Merck). Para sua produção, os vírus são propagados em fibroblastos humanos, purificados dos lisados celulares, inativados com formalina e acrescidos do adjuvante hidróxido de alumínio. As duas vacinas possuem formulações pediátricas e adultas, devendo ser administradas em duas doses. Ambas são altamente imunogênicas (tendo uma soroconversão de praticamente 100% dos pacientes após a segunda dose), e efetivas na prevenção de casos da doença, conferindo uma proteção duradoura de mais de 10 anos para os pacientes que completam a vacinação com as duas doses (CDC, 2015).

Um programa com o objetivo de desenvolver uma vacina viva atenuada foi iniciado na China em 1980. A linhagem atenuada H2 do HAV foi isolada das fezes de um paciente de 12 anos com hepatite A e cultivada em células de rins de macacos recém-nascidos (*newborn monkey kidney* – NMK), em passagens seriadas com modificações na temperatura de cultivo, sendo posteriormente adaptada a infecção nas células de tecido de fibroblastos de pulmões embrionados humanos (*human embryonic lung fibroblast tissue* – KMB17) e utilizada na formulação da vacina. A maioria dos estudos feitos sobre essa vacina reportou que ela é segura, bem tolerada e gera uma imunogenicidade similar à obtida com a administração das vacinas inativadas (ZHENG *et al.*, 2011; RAO *et al.*, 2016).

Em 2001, a organização *Food and Drug Administration* (FDA) que regula o registro de medicamentos, alimentos, suplementos, cosméticos entre outros nos EUA, aprovou a vacina combinada para hepatite A e B (Twinrix®, GlaxoSmithKline). Ela é administrada em três doses, podendo ser utilizada em pessoas de grupos de risco com indicação para ambas as vacinas (CDC, 2015).

A infecção pelo HAV induz a produção de imunidade duradoura contra o vírus, sendo assim, não há benefícios em vacinar pessoas que possuam evidência sorológica de infecção prévia por HAV. Como resultado, a decisão de conduzir testes sorológicos antes da vacinação deve ser tomada, levando em conta a prevalência de imunidade na população e o custo das campanhas de vacinação. O teste em crianças não é indicado devido à esperada baixa prevalência da infecção. Os kits comerciais anti-HAV disponíveis devem ser utilizados para o rastreamento de regiões/pessoas que devem ser incluídas nas campanhas de vacinação (CDC, 2015).

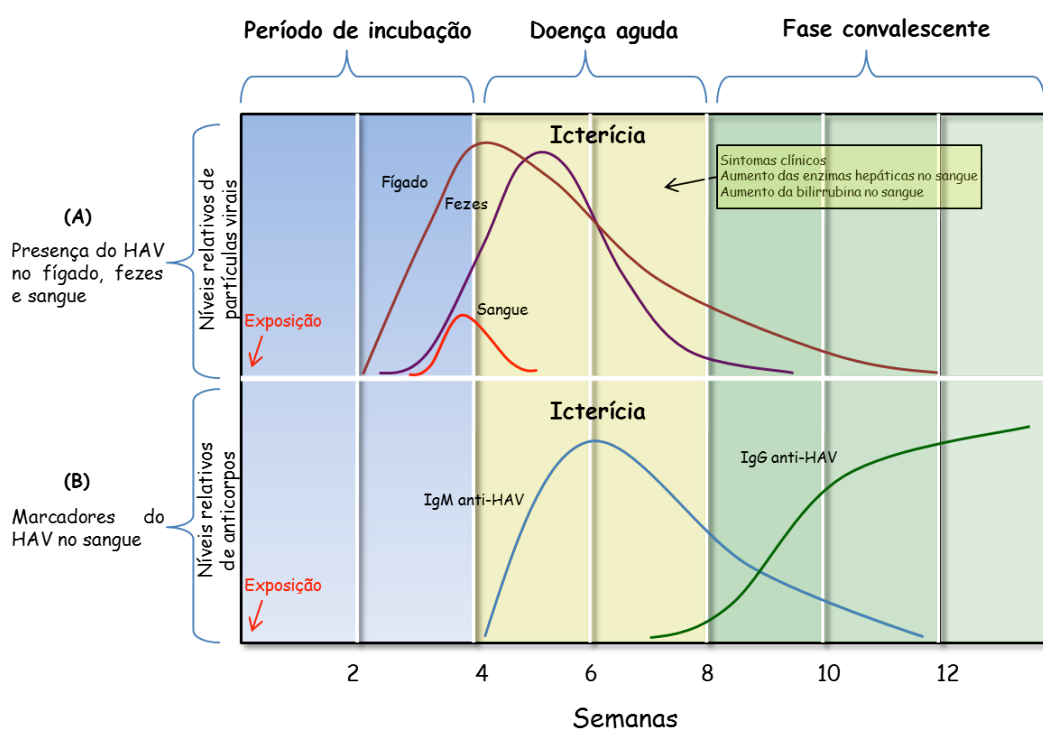
Em 2014, a vacinação contra o vírus da hepatite A para crianças de até 2 anos foi incluída no calendário do SUS, sendo agora oferecida gratuitamente nos postos de saúde (Ministério da Saúde, 2014).

2.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da hepatite A, leva em conta os sintomas relacionados à hepatites virais agudas (como febre, dores de cabeça, indisposição, anorexia, náusea, vômitos, diarreia e dores abdominais), presença de icterícia e níveis elevados de aminotransferases (alanina e aspartato – ALT e AST respectivamente). Como essas características avaliadas também podem ser aplicadas a outras hepatites virais, o diagnóstico sorológico para pesquisa de anticorpos anti-HAV é necessário para confirmação da hepatite A (WESTON & MARTIN, 2001; CDC, 2015).

A resposta imune humoral é de extrema importância para o diagnóstico e diferenciação entre hepatite A e outras hepatites virais. Ela ocorre antes do início dos sintomas da doença. Os anticorpos IgM contra o vírus (IgM anti-HAV) já são detectáveis quando o paciente apresenta sintomas clínicos decorrentes da infecção e declinam após três a seis meses, tornando-se após esse período, indetectáveis por kits sorológicos comerciais. Os anticorpos IgG anti-HAV aparecem logo após os IgM e persistem por anos, conferindo uma imunidade duradoura contra o vírus (Figura 2). Também há a produção de IgA durante a infecção, embora o papel desses anticorpos na resposta imune contra o vírus seja desconhecido. Tanto IgG quanto IgA anti-HAV podem ser detectados no soro, saliva, urina e fezes dos pacientes (NAINAN *et al.*, 2006).

Figura 2. Curso clínico e perfil sorológico da infecção aguda pelo vírus da hepatite A. Após a infecção pelo vírus da hepatite A, existe um período de incubação no hospedeiro que dura cerca de 2 a 4 semanas, no final do período a viremia está próxima do seu nível máximo no fígado (vinho), fezes (roxo) e sangue (vermelho). A doença aguda tem início e pode durar até 4 semanas, nela há a elevação nos níveis de anticorpos IgM anti-HAV, com uma queda considerável após um mês do início dos sintomas. A produção de anticorpos IgG anti-HAV começa na fase convalescente e se mantém estável após muitos anos da infecção, conferindo imunidade duradoura. **A.** Infecção no fígado é seguida pela presença do vírus no sangue e nas fezes. **B.** A icterícia e outros sintomas da infecção aguda surgem paralelamente ao surgimento de anticorpos anti-HAV do tipo IgM. O aparecimento de anticorpos do tipo IgG indica que a doença entrou na fase convalescente (cura) e que o hospedeiro possui imunidade contra uma nova infecção.



Fonte: figura adaptada de **DENTINGER, 2009**.

O diagnóstico laboratorial da hepatite A aguda é baseado prioritariamente na presença de anticorpos IgM anti-HAV. Entretanto, a interpretação de testes com resultados positivos para esses anticorpos é problemática para pessoas sem evidência clínica da doença e quando não se tem uma associação epidemiológica evidente. Nesses casos, a medida de anticorpos IgG anti-HAV, concomitante com detecção do RNA viral, podem ajudar a resolver essas discrepâncias clínico-biológicas. A imunidade adquirida tanto por infecção natural, quanto por vacinação bem sucedida é obtida medindo os anticorpos totais anti-HAV (ROQUE-AFONSO *et al.*, 2010).

A detecção molecular do RNA viral também é possível, já que o RNA do HAV já foi encontrado (por RT-PCR) no soro dos pacientes duas semanas antes do início

dos sintomas e até 1-3 meses após a apresentação dos mesmos. Em alguns pacientes a viremia pode permanecer detectável, por esse método, até 490 dias após a recuperação da doença (ROQUE-AFONSO *et al.*, 2010).

2.5 VÍRUS DA HEPATITE A: CLASSIFICAÇÃO E ESTRUTURA

A família *Picornaviridae* contém nove gêneros, incluindo: *Aphthovirus*, *Enterovirus*, *Cardiovirus*, *Hepatovirus*, *Rhinovirus*, *Poliovirus*, sendo exemplos típicos dessa família os vírus: da hepatite A, da encefalomiocardite (EMCV) e febre aftosa. Seus membros possuem características semelhantes de replicação gênica. Eles são vírus não-envelopados, possuem um genoma de RNA fita única com sentido positivo e tamanho que varia entre 7.1-8.9 kb. Uma proteína de baixo peso molecular denominada VPg, está covalentemente ligada à região 5' do genoma e na sua região 3' existe uma cauda de poli adeninas (poli-A) (TUTHILL *et al.*, 2010; DONG *et al.*, 2014).

Anteriormente, o vírus da hepatite A pertencia ao gênero *Enterovirus*, pois possui aspectos biofísicos e de transmissão semelhantes aos encontrados nos membros do grupo. Entretanto, após o estudo aprofundado do HAV, ficou evidente que ele possuía características marcantes que o afastavam dos outros membros do gênero (LEMON & ROBERTSON, 1993). Hoje ele é o único representante do gênero *Hepatovirus*, pois apesar do seu genoma de RNA possuir características comuns com outros membros da família *Picornaviridae*, suas sequências de nucleotídeos e aminoácidos sejam distintas da maioria dos picornavírus, além dele exibir etapas em sua patogênese que diferem em diversos aspectos das normalmente apresentadas por outros vírus da família (TOTSUKA E MORITSUGO, 1999). O HAV não consegue bloquear a síntese de proteínas da célula hospedeira, pois possui um *codon usage* rico em códons raros, não competindo com a produção de proteínas da célula. Sendo assim, seu crescimento em cultura de células é ínfimo e bastante lento (WANG *et al.*, 2015). Outras diferenças marcantes que ele exibe em relação aos picornavírus são sua estabilidade física (resistência a altas temperaturas como 85-98 °C e variações do pH, sendo resistente até ao pH de 3) e via de morfogênese distinta (WALKER *et al.*, 2015).

O HAV foi identificado pela primeira vez por microscopia eletrônica em 1973 e propagado em cultura de células com sucesso em 1979 (TOTSUKA E MORITSUGO, 1999). Em 2013, outra particularidade que difere o vírus da hepatite A de outros picornavírus foi descoberta: a existência de formas envelopadas do HAV, denominadas “eHAV”. Essas partículas são liberadas dos hepatócitos infectados envolvidas por membranas derivadas das células hospedeiras (escapando dos anticorpos neutralizantes), são infecciosas, sensíveis à extração com clorofórmio, circulam no sangue de humanos infectados com o vírus, mas, no entanto, não possuem glicoproteínas virais como os vírus envelopados clássicos (FENG *et al.*, 2013; WALKER *et al.*, 2015). Estudos de filogenia baseados na estrutura do vírus sugerem que o HAV seja o elo entre picornavírus e o grupo de vírus de insetos semelhantes a picornavírus, devido à presença de características semelhantes a ambos os grupos no vírus da hepatite A (WANG *et al.*, 2015).

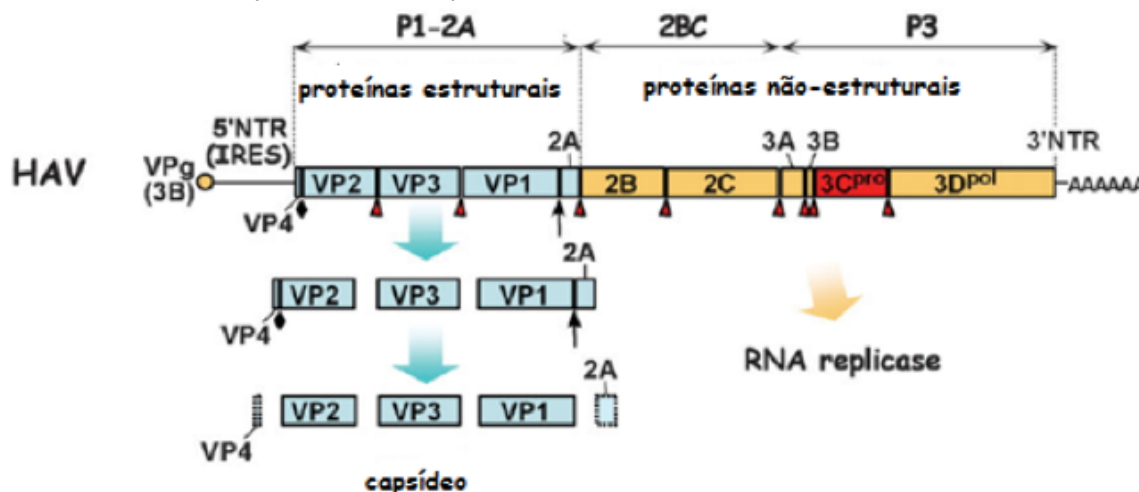
O receptor celular para o HAV é uma glicoproteína de membrana integral classe I, classificada como o membro da família de domínios de imunoglobulinas de células T denominada TIM-1 (*T cell immunoglobulin domain, mucin-like domain gene family* – TIM-1) (TUTHILL *et al.*, 2010).

A partícula viral do HAV possui entre 27-32 nm e engloba seu genoma que é constituído por uma fita simples de RNA com sentido positivo e cerca de ~ 7.5 kb de tamanho. Ele contém um único quadro de leitura (*Open Reading Frame* – ORF) que codifica uma poliproteína. O vírus possui um único sorotipo dividido em múltiplos genótipos (TOTSUKA E MORITSUGO, 1999).

Como outros genomas de picornavírus, o do HAV contém uma região 5' não traduzida (5'UTR) com um sítio interno de entrada do ribossomo (IRES), que corresponde a 10% do genoma e está ligada à proteína viral VPg; uma ORF que codifica todas as proteínas virais e uma região 3' não traduzida (3'UTR) conectada a uma cauda poli-A. O quadro de leitura aberto do RNA viral codifica uma grande poliproteína que pode ser dividida em três regiões: P1, P2 e P3 (TOTSUKA E MORITSUGO, 1999; COSTA-MATTIOLI *et al.*, 2003).

A região gênica didaticamente nomeada P1 codifica quatro proteínas estruturais responsáveis pela formação do capsídeo viral: VP4, VP2, VP3 e VP1. Enquanto as regiões P2 e P3, possuem genes que codificam proteínas virais não-estruturais: 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C e 3D (MARTIN & LEMON, 2006). A estrutura genômica do HAV pode ser visualizada na Figura 3.

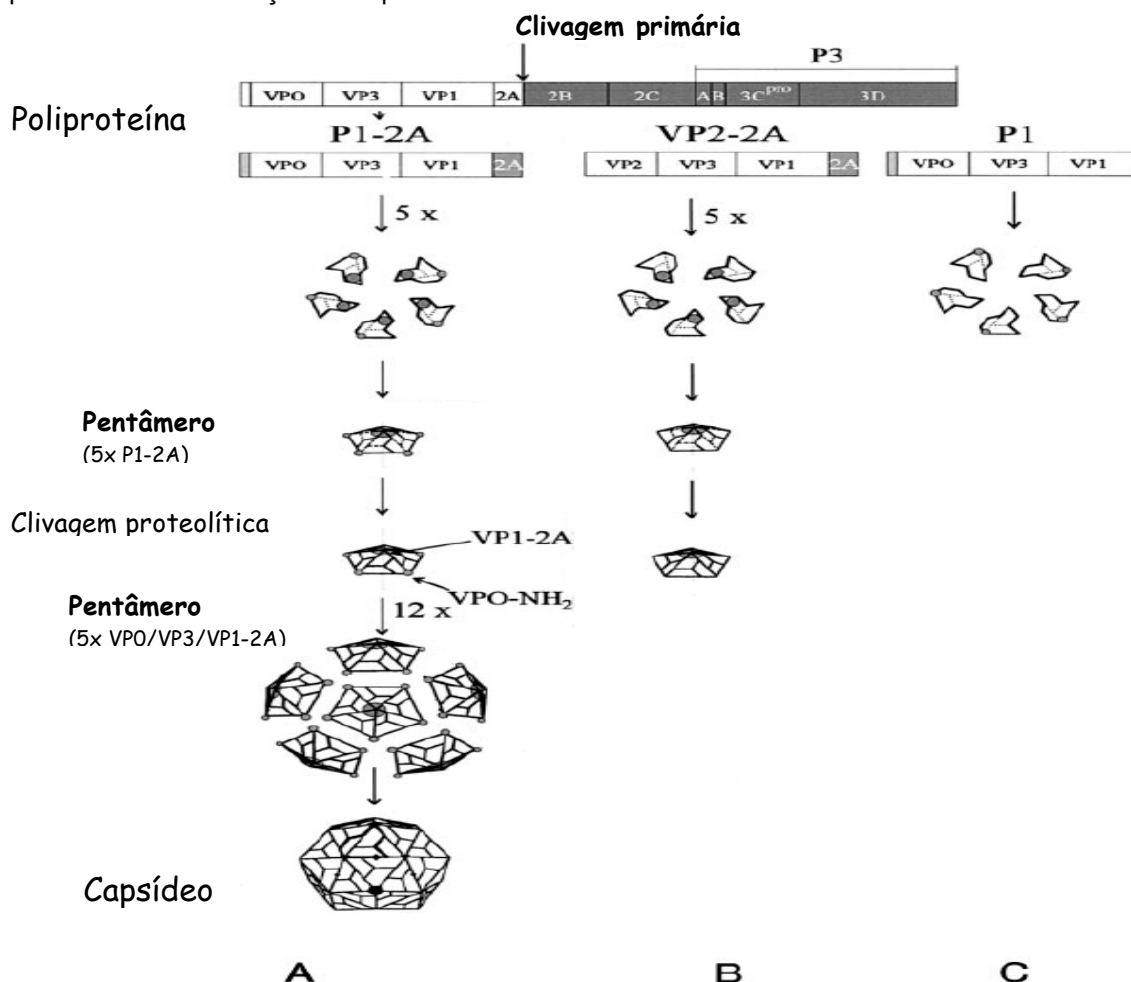
Figura 3. Organização do genoma do HAV e processamento da poliproteína. A fita positiva do genoma de RNA contém um único quadro de leitura aberto que codifica uma poliproteína. Ela é processada pela protease viral 3C (vermelho), por uma protease celular ainda não identificada (setas) e por uma atividade proteolítica desconhecida (diamante preto), para liberar as proteínas estruturais (azul) e não-estruturais (alaranjado e vermelho). As proteínas não estruturais (laranja), são responsáveis pela replicação do material genético viral, enquanto as proteínas estruturais (azul), após processadas, se unem para formar o capsídeo viral.



Fonte: figura adaptada de MARTIN E LEMON, 2006.

Após a tradução do genoma viral em uma poliproteína de aproximadamente 250 kDa, ocorre sua clivagem em onze proteínas (com a participação da protease 3C e de proteases virais) com funções distintas no ciclo biológico viral. A formação do capsídeo começa a partir da clivagem da junção 2A/2B pela protease 3C, formando o precursor P1-2A. Esse polipeptídeo se oligomeriza em pentâmeros devido à sinalização mediada pela proteína 2A. A região P1 é então processada e dividida em VP0 (um precursor das proteínas VP4 e VP2), VP1 e VP3. Em seguida, doze pentâmeros de cada uma das proteínas formadoras do capsídeo se unem em procapsídeos (etapa provavelmente mediada pela VP4). Quando o RNA viral é embalado pelo capsídeo, a base do RNA, como um aceptor de prótons, promove a autocatálise da VP0 nas proteínas VP2 e VP4 (Figura 4). O complexo VP1-2A também é clivado, provavelmente por proteases da célula hospedeira, já que tanto a 2A quanto a VP4 não são observadas em partículas infecciosas do HAV. O capsídeo viral é composto por 60 monômeros das proteínas VP1, VP2, e VP3, as quais possuem as principais regiões antigênicas virais (BISHOP & ANDERSON, 1993; PROBST *et al.*, 1999; MARTIN & LEMON, 2006; DONG *et al.*, 2014).

Figura 4. Modelo da via de montagem do capsídeo do HAV. **A.** Após a clivagem primária mediada pela protease 3C, a região P1-2A é separada das regiões contendo proteínas não-estruturais do vírus e as cinco proteínas da região se organizam para formar pentâmeros, sendo essa fase mediada pela 2A. Os pentâmeros sofrem novas clivagens resultando em VP0, VP3 e VP1, as quais formam os epítomos neutralizantes. Na última fase, os pentâmeros se agregam para formar o capsídeo viral. Essa fase é dependente de VP4. **B.** Na ausência da proteína VP4, os pentâmeros chegam a se formar, pois o sinal para tal é dependente da 2A, porém as demais etapas ficam impossibilitadas por serem mediadas pela VP4. **C.** Na ausência da 2A, a região P1 não se organiza em pentâmeros, o que inviabiliza a formação do capsídeo viral.



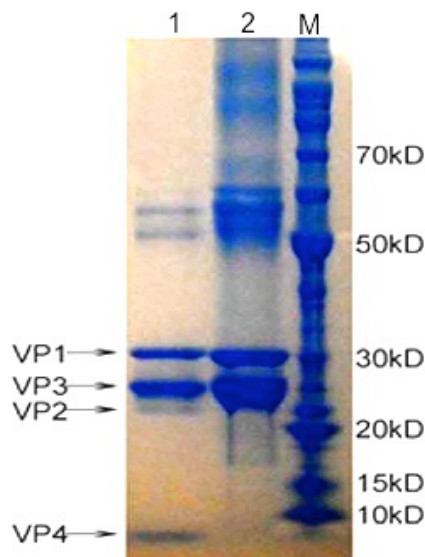
Fonte: figura adaptada de **PROBST et al., 1999**.

A região P2 é composta pelas proteínas 2B e 2C, responsáveis pelo processo de replicação do RNA viral. Nela também está localizada a 2A, que possui como função principal emitir o sinal para a montagem do capsídeo viral. As principais proteínas localizadas na região P3 são a protease 3C e uma RNA polimerase RNA-dependente denominada 3D. Diferente de outros picornavírus, o HAV possui apenas uma protease, a 3C, que se autocliva da poliproteína viral e atua na clivagem da mesma para maturação das proteínas estruturais e das não-estruturais. Também

fazem parte da região P3 as proteínas 3A e 3B (VPg), que possuem funções na replicação do RNA viral (MARTIN & LEMON, 2006).

A proteína VP4 possui apenas 21-23 resíduos de aminoácidos e apesar de compor o províron como a proteína precursora VP0 (VP4-VP2) e ser detectada em partículas vazias do HAV, ela não é detectável nas partículas maduras do vírus (PROBST *et al.*, 1999). As proteínas VP2 e VP3 são compostas por 222 e 246 resíduos de aminoácidos, apresentando 24-30 e 21-28 kDa em gel de poliácridamida respectivamente. O precursor VP0 pode ser identificado como uma única banda de 27-31 kDa. O complexo VP1-2A ou PX pode ser identificado como um polipeptídeo de 38-40 kDa (TOTSUKA E MORITSUGO, 1999). A extensão 2A está relacionada com a montagem da partícula viral, possui 8 kDa, tendo sido encontrada nas partículas que se envolviam nas membranas das células hospedeiras e originavam vírus envelopados. A PX é geralmente clivada do capsídeo após a perda da membrana (MORACE *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2015). As proteínas estruturais e seus respectivos pesos moleculares podem ser observados na Figura 5.

Figura 5. Partículas do HAV completas e incompletas fracionadas em gel de poliácridamida. Partículas completas e incompletas do HAV foram produzidas em cultura de células de mamíferos, purificadas por gradiente de sacarose e fracionadas em gel de poliácridamida. M- marcador, 1- partícula de HAV completa (com o RNA viral), 2- Partícula de HAV incompleta (sem o RNA viral). VP1 ~ 30.73 kDa, VP3 ~ 27.86 kDa, VP2 ~ 24.80 kDa e VP4 ~ 2.5 kDa.



Fonte: WANG *et al.*, 2015.

Mais recentemente, pesquisadores elucidaram as estruturas em raio-X das partículas do HAV completa (madura – com RNA viral) e incompleta (sem o RNA viral). Ambas são estruturalmente indistinguíveis, com exceção de uma leve

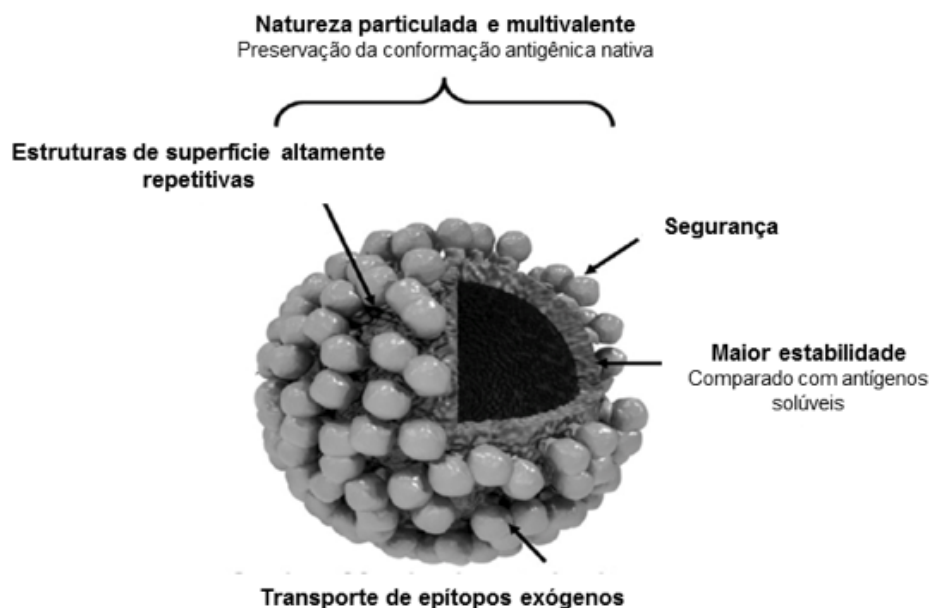
desordem presente no interior da partícula vazia. O vírus maduro contém a proteína VP4, enquanto a partícula vazia possui o precursor VP0 antes de ser clivado. Os dados obtidos indicam que o HAV possui uma estrutura de capsídeo que seria intermediária entre vírus de insetos e picornavírus de mamíferos (WANG *et al.*, 2015).

A estrutura antigênica do vírus é relativamente simples, com um número restrito de epítomos sobrepostos que juntos formam um único sítio antigênico dominante, que interage com anticorpos neutralizantes gerados contra o vírus. Esses epítomos são altamente conformacionais e compreendem aminoácidos localizados em mais de uma das proteínas constituintes do capsídeo viral (VP1, VP2, VP3). Soros obtidos de pacientes na fase convalescente da doença são reativos principalmente à proteína VP1 e em uma menor escala às proteínas VP0 e VP3. O fato da partícula vazia ser antigenicamente idêntica às partículas infecciosas dos vírions, sugere que a antigenicidade do HAV depende da montagem das proteínas do capsídeo (NAINAN *et al.*, 2006).

2.6 PARTÍCULAS SEMELHANTES A VÍRUS (VLPS)

Diversas proteínas estruturais virais possuem a habilidade de se auto-montarem em partículas semelhantes a vírus. Essas partículas mimetizam estruturalmente os vírus das quais são derivadas, possuindo similaridade antigênica e física, características que conferem a elas a propriedade de estimular de forma eficaz a resposta imune do hospedeiro. Elas, no entanto, não possuem o material genético viral, sendo assim, seu potencial replicativo é nulo. Isso faz com que as VLPs sejam candidatas seguras e efetivas para o desenvolvimento de vacinas (Figura 6) (MACHIDA E IMATAKA, 2015; YAN *et al.*, 2015; FRIETZE *et al.*, 2016). Além disso, partículas semelhantes a vírus também podem ser utilizadas no campo de nanomateriais, como ferramentas biológicas no transporte de drogas, terapia gênica, marcação de células, tratamento para câncer e testes diagnósticos (GLASGOW & TULLMAN-ERCEK, 2014; EFFIO & HUBBUCH, 2015; YAN *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015).

Figura 6. Características imunogênicas de VLPs apresentadoras de antígenos. As VLPs incorporam características-chave que impactam sua imunogenicidade, segurança e potencial para protótipo vacinal: (1) geometria bem definida e notável uniformidade com estruturas de superfície repetitivas e ordenadas; elas constituem motivos de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que induzem mecanismos do sistema imune inato. (2) Natureza particulada e multivalente, são incorporadas de forma eficiente pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), sendo consideradas auto-adjuvantes. (3) Preservação da conformação nativa do antígeno. (4) Segurança. São candidatos não-replicativos e não-infecciosos, pois não possuem material genético de nenhum vírus. (5) Maior estabilidade que antígenos solúveis quando submetidos a condições ambientais extremas. (6) Possibilidade de transportar antígenos de outros organismos. (7) Possibilidade de diferenciar entre animais vacinados com VLPs e animais previamente infectados com o vírus.



Fonte: Adaptado de **CRISCI et al., 2012.**

A alta concentração de epítopos apresentados na forma multivalente, altamente repetitiva e nas superfícies das estruturas rígidas das VLPs, faz com que eles sejam extensivamente reconhecidos e apresentados ao sistema imune pelas células apresentadoras de antígenos, o que gera uma estimulação da imunidade humoral e celular por vias similares às dos patógenos originais. Ao mesmo tempo, nenhum material genético viral participa da formação das VLPs e com isso não há risco de replicação ou proliferação viral (YAN *et al.*, 2015; FRIETZE *et al.*, 2016).

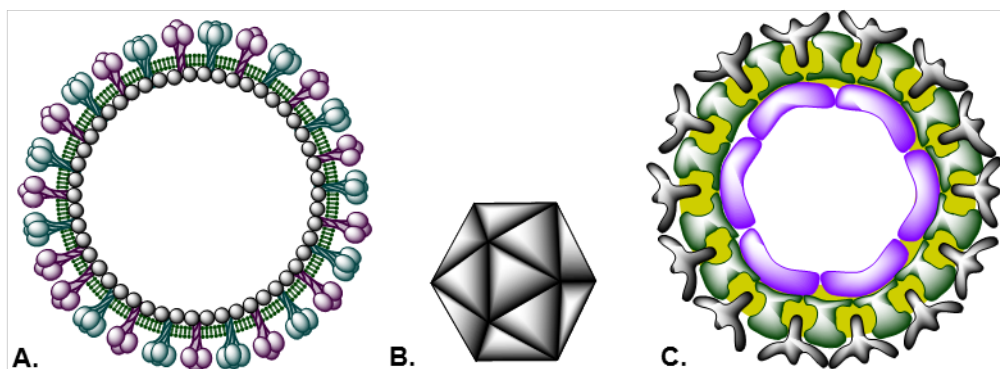
As VLPs possuem uma série de vantagens, como serem produzidas rapidamente em larga escala, possibilidade de serem expressas em diversos sistemas de expressão, alta semelhança (em termos de conformação e aparência), com os vírus nativos das quais são derivadas. Além disso, o capsídeo dessas estruturas pode ser modificado por inserção genética ou conjugação química, para

facilitar a apresentação de epítomos antigênicos homólogos ou heterogêneos (SHIRBAGHAEI & BOLHASSANI, 2015; YAN *et al.*, 2015).

Inicialmente, partículas virais “vazias” semelhantes ao capsídeo do vírus da hepatite B foram identificadas em torno de 1960. Essa descoberta é considerada a primeira observação da ocorrência natural de partículas semelhantes a vírus. Posteriormente, foi observado que as VLPs do vírus da hepatite B induziam uma resposta imune do hospedeiro capaz de eliminar a infecção com o vírus original (YAN *et al.*, 2015).

As VLPs podem ser classificadas levando em conta a taxonomia do vírus original (adenovírus, coronavírus...), ou de acordo com o método de síntese utilizado (expressão em células de mamíferos, leveduras, plantas, insetos, sistema livre de células). Outra classificação normalmente utilizada se baseia em sua arquitetura, distinguindo VLPs envelopadas e não-envelopadas (Figura 7) e ainda em nativas e quiméricas. As partículas não-envelopadas são tipicamente compostas por uma ou mais proteínas virais estruturais, enquanto as envelopadas consistem, em geral, de proteínas de matriz envelopadas em uma membrana lipídica derivada da célula hospedeira, com glicoproteínas virais ancoradas (LUA *et al.*, 2014; NASKALSKA & PYRC, 2015).

Figura 7. Representação esquemática dos três principais tipos de VLPs. Representação das VLPs envelopadas (A), estruturalmente simples não-envelopadas (B) e complexas com multicamadas (C).



Fonte: LIU *et al.*, 2013.

As VLPs mais simples, não-envelopadas e compostas de uma única proteína do capsídeo, podem ser produzidas em sistemas de expressão procariótico, eucariótico ou até sistemas livres de células, enquanto VLPs envelopadas ou compostas por múltiplas proteínas são mais complexas e constituem um desafio

para a produção. Elas são normalmente expressas em células eucarióticas como leveduras, insetos e plantas, que permitem a coexpressão de diferentes proteínas e montagens complexas nas células (LUA *et al.*, 2014).

As partículas envelopadas adquirem membranas lipídicas da linhagem celular na qual são expressas, durante a montagem e brotamento das VLPs da célula. Uma ou mais glicoproteínas podem ser incorporadas na bicamada lipídica e elas são os alvos imunológicos para geração de anticorpos neutralizantes. Essa categoria de VLPs não é bem caracterizada biofisicamente, por serem menos uniformes do que as não-envelopadas (LUA *et al.*, 2014).

O princípio de preparação das VLPs envolve uma (ou diversas) proteínas virais estruturais, que se forem eficientemente expressas se montam, automaticamente, em partículas com formato e tamanho similares ao dos vírus naturais. Para que isso ocorra, as proteínas virais de interesse são clonadas em vetores de expressão, os quais são, posteriormente, transferidos para células procarióticas ou eucarióticas (DONG *et al.*, 2014).

Para a montagem de partículas semelhantes a vírus, as proteínas virais podem se agregar para a formação da partícula completa, ou utilizar passos intermediários, com ou sem a ajuda de *scaffolds* e chaperonas. Independentemente da via, as VLPs formam usualmente estruturas com subunidades multiméricas, como capsômeros, no processo de agregação (ZHANG *et al.*, 2015). Essas subunidades podem ser obtidas em diversos sistemas recombinantes de expressão, como: bactérias, leveduras, plantas, vetores virais, células de insetos/baculovírus, células de mamíferos (TROVATO & BERARDINIS, 2015; ZHANG *et al.*, 2015). O processamento e montagem das partículas *in vivo* é altamente aceito e utilizado, embora possua alguns desafios como a contaminação com ácido desoxirribonucleico (DNA) e proteínas da célula hospedeira. Já o sistema utilizado para a expressão *in vitro* possibilita controle mais sofisticado sobre o processo, eliminando os desafios oriundos da expressão em células (ZHANG *et al.*, 2015). O método mais apropriado e a estrutura resultante são altamente dependentes de cada caso. As aplicações para as quais as VLPs são produzidas, precauções de segurança e a natureza do capsídeo de interesse é que determinarão a forma de produção mais adequada (GLASGOW & TULLMAN-ERCEK, 2014).

As bactérias são o sistema de expressão mais utilizado para a obtenção de proteínas recombinantes, no entanto, elas não são a principal escolha para a síntese da maioria das VLPs. Isso ocorre devido à ausência de modificações pós-traducionais, formação deficiente de pontes dissulfeto e dificuldades com a solubilidade das proteínas obtidas por esse sistema. Ainda assim, bactérias são utilizadas para produzir VLPs não-envelopadas, muitas vezes utilizando bacteriófagos recombinantes com os epítomos fusionados à proteínas de superfície ou expressando as proteínas virais na forma de corpúsculos de inclusão insolúveis. Eles podem ser posteriormente purificados em condições desnaturantes, as proteínas voltam para a sua estrutura terciária e se agrupam *in vitro* (MACHIDA & IMATAKA, 2015; NASKALSKA & PYRC, 2015). A bactéria mais utilizada para produção de VLPs é a *Escherichia coli*, embora existam relatos na literatura de partículas obtidas em *Lactobacillus* (AIRES *et al.*, 2006) e *Pseudomonas* (PHELPS *et al.*, 2007; NASKALSKA & PYRC, 2015). A expressão de proteínas do capsídeo em procariotos requer, na maioria das vezes, uma etapa adicional *in vitro* para a montagem das partículas (EFFIO & HUBBUCK, 2015).

As células de leveduras são um sistema de expressão bem estabelecido e amplamente utilizado. Esse sistema possui, no entanto, algumas limitações que devem ser consideradas. As modificações pós-traducionais das leveduras diferem das utilizadas em células de mamíferos, especialmente, o padrão de glicosilação das proteínas. Por isso, as leveduras são utilizadas, em sua maioria, para expressão de VLPs não-envelopadas. Entretanto, alguns estudos demonstraram a montagem bem sucedida de VLPs em células de *Pichia pastoris* e *Saccharomyces cerevisiae* e duas vacinas licenciadas, utilizadas amplamente em todo o mundo contra os vírus da hepatite B (HBV) e papilomavírus humano (HPV), são baseadas em partículas semelhantes a vírus produzidas em leveduras (NASKALSKA & PYRC, 2015).

O sistema de expressão em plantas representa outra opção custo efetiva, possível de ser utilizado em larga escala e livre de patógenos potencialmente perigosos para mamíferos. As células derivadas das plantas *Nicotiana benthamiana* e *Nicotiana tabaccum* são as mais utilizadas nesse sistema para a geração de VLPs. A expressão de proteínas recombinantes pode se dar tanto da forma estável, quanto transiente após a transfecção do transgene na célula. Já existem VLPs produzidas em plantas, envelopadas e não-envelopadas, nativas e quiméricas, que progrediram para testes clínicos de possíveis vacinas (NASKALSKA & PYRC, 2015).

Células de mamíferos (CHO, BHK, HEK-293T, COS-11 e Vero), aves (ELL-0) e insetos (*Spodoptera frugiperda* e *Trichoplusia ni*), já foram utilizadas como sistema de expressão animal para produção de VLPs. As maiores limitações da utilização dos sistemas descritos são o alto custo da produção em larga escala, potenciais riscos de segurança e dificuldades no escalamento da produção. Nesse sentido, a utilização do sistema de expressão em células de insetos possui algumas vantagens significantes com relação à células de mamíferos e aves. Ele possui o custo reduzido, é mais maleável para o cultivo em larga escala e pode ser utilizado para a expressão simultânea de muitas proteínas, facilitando a montagem das VLPs. Além disso, as células de insetos possuem a habilidade de modificar e processar as proteínas recombinantes após sua tradução e podem ser cultivadas em cultura sem a necessidade dos suplementos necessários para a cultura de células de mamíferos. Isto faz com que o risco de contaminação das VLPs com patógenos oportunistas seja reduzido. Os baculovírus, vetores virais para expressão de proteínas em células de insetos, infectam somente um grupo reduzido de lepidópteros e não apresentam perigo para humanos (IKONOMOU *et al.*, 2003; NASKALSKA & PYRC, 2015). A vacina Cervarix[®] para prevenção da infecção com papilomavírus humano é composta de VLPs produzidas por esse sistema de expressão (YAMAJI, 2014).

As células animais são convenientes para a expressão das partículas semelhantes a vírus, pois possuem a habilidade de executar modificações pós-traducionais complexas que, muitas vezes, são necessárias para a montagem correta das proteínas de interesse. Os genes que codificam estas proteínas virais são introduzidos na célula hospedeira por transfecção plasmidial ou transdução viral (onde utiliza-se um vírus como carreador das sequências alvo). O transgene pode ser integrado ao genoma ou se replicar de uma forma episomal dependendo do método utilizado (NASKALSKA & PYRC, 2015).

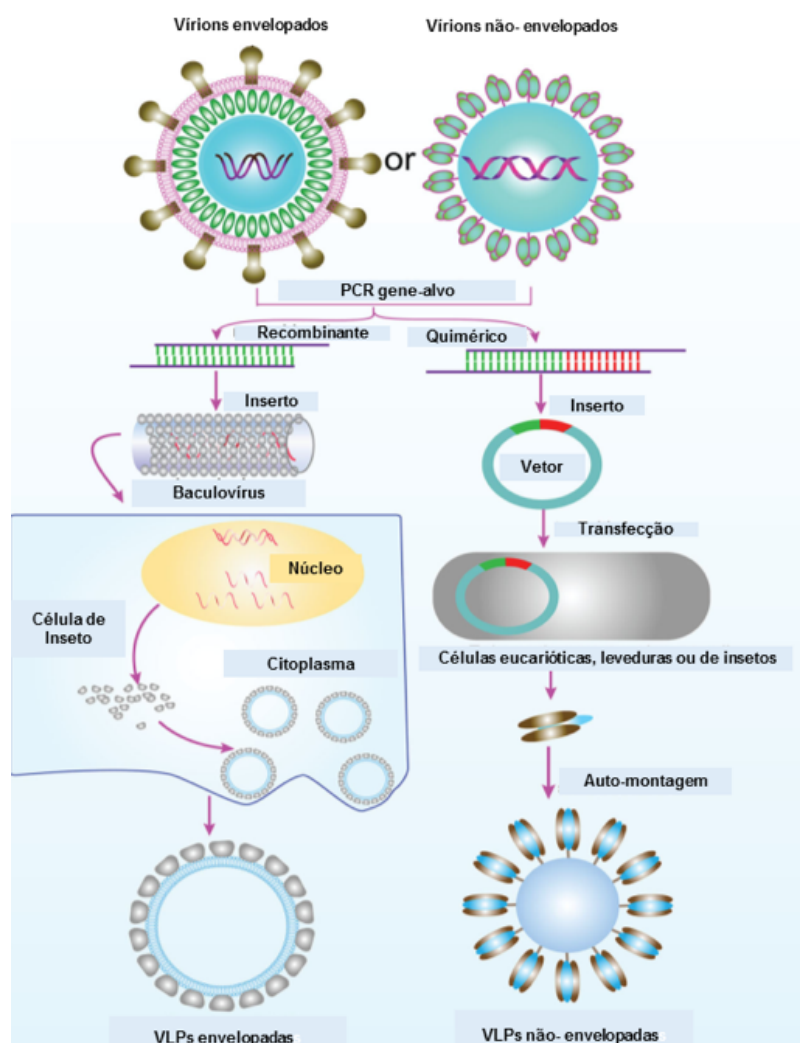
Recentemente, um kinetoplastídeo não patogênico, denominado *Leishmania tarentolae*, começou a ser utilizado como sistema de expressão de proteínas heterólogas. Uma das principais vantagens da expressão nesse parasita é a modificação em glicoproteínas, que é mais fidedigna do que o processo realizado em células de mamíferos, por utilizar oligossacarídeos semelhantes aos deles (SHIRBAGHAEI & BOLHASSANI, 2015).

A síntese de proteínas em sistema livre de células é uma importante ferramenta para a produção de proteínas recombinantes. Algumas VLPs podem ser

montadas nesse sistema com a expressão concomitante de proteínas do capsídeo. O processo é essencialmente similar à síntese de proteínas em sistemas *in vivo* entretanto, nele, os pesquisadores podem alterar as condições da síntese. Nesse tipo de expressão é possível, por exemplo, incorporar aminoácidos incomuns na proteína de interesse, tornando-o mais conveniente para determinadas situações. A desvantagem de utilizá-lo é que a quantidade de partículas obtidas é normalmente inferior às produzidas por sistemas *in vivo* (MACHIDA & IMATAKA, 2015).

A estratégia escolhida para produção de VLPs irá depender do vírus original de interesse e do sistema de expressão disponível para utilização dos pesquisadores. Se forem considerados: acessibilidade, segurança, produção e custo, o sistema de expressão em bactérias seria a primeira escolha. A produção em baculovírus/células de insetos também é uma boa alternativa, por não precisar de uma estrutura com alto nível de segurança, nem de um sistema de cultura especial (como incubadora de CO₂). As VLPs produzidas em plantas também são atrativas por serem mais robustas, mas a utilização desse sistema de expressão pode ser mais difícil de se estabelecer em laboratórios. Os sistemas livres de células também podem ser mais complexos para implantação na maioria dos laboratórios, mas ultimamente existem vários kits disponíveis para essa finalidade, que podem ser cruciais para a obtenção de alguns tipos de partículas semelhantes a vírus (MACHIDA & IMATAKA, 2015; OERS *et al.*, 2015). O esquema para obtenção de VLPs não-envelopadas e envelopadas pode ser visualizado na Figura 8.

Figura 8. Produção de VLPs envelopadas e não-envelopadas. As regiões de interesse de vírus envelopados e não-envelopados são amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) e podem ser: A. inseridas no DNA de baculovírus que infectam células de insetos e induzem a expressão das proteínas recombinantes de interesse, que se unem para formar VLPs. B. As sequências são clonadas em vetores para células procarióticas ou eucarióticas. Após a inserção dos mesmos nas células, elas expressam as proteínas-alvo, que se montam em VLPs não-envelopadas.



Fonte: YAN *et al.*, 2015.

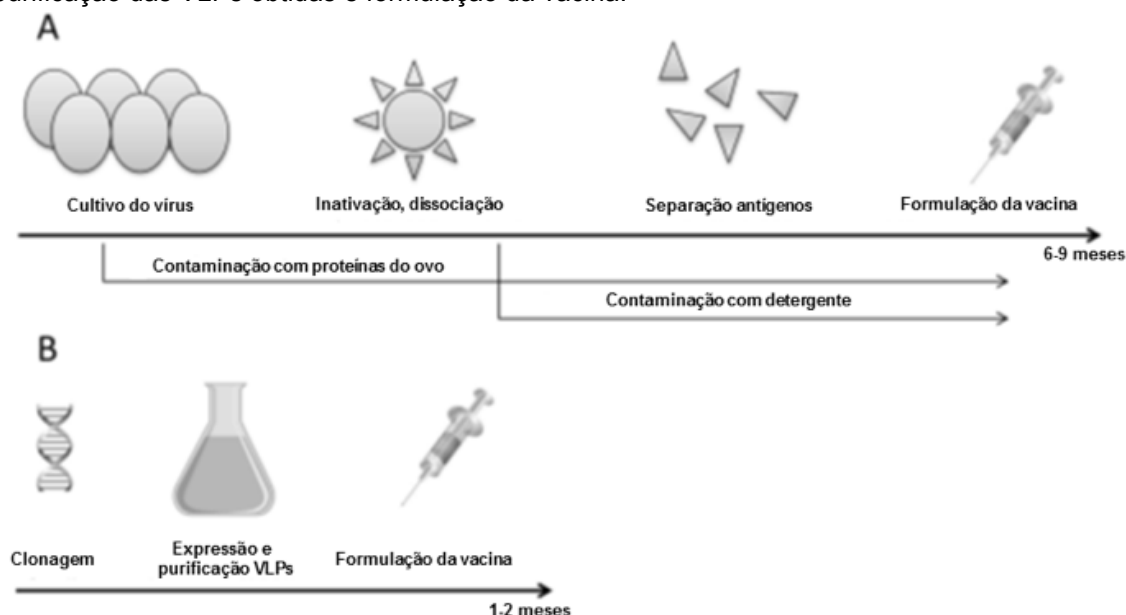
2.7 VACINAS BASEADAS EM VLPS

A utilização de vacinas é uma das estratégias mais efetivas de prevenção contra agentes infecciosos. Desde a primeira vacinação contra varíola feita por Edward Jenner no século XVIII, diversas vacinas foram criadas, para humanos e animais, utilizando principalmente vírus inativados e atenuados. Entretanto, apesar da efetividade e amplo uso, ainda existem deficiências associadas aos dois tipos de vacinas. As atenuadas, por exemplo, induzem na maioria das vezes uma resposta

imune eficiente, mas possuem um risco de segurança, já que elas podem, através de mutações, voltar ao fenótipo patogênico nos indivíduos vacinados. Já as vacinas inativadas não possuem vírus capazes de se replicar, no entanto, elas geralmente necessitam de mais de uma imunização para a indução de uma resposta protetora segura. Essas desvantagens fazem com que haja a necessidade de se encontrar candidatos vacinais capazes de serem produzidos de forma eficiente, segura, em larga escala e com um baixo custo, principalmente, para vírus difíceis de se obter em cultura de células e que possam ter um alto risco de infecção (YAN *et al.*, 2015).

As VLPs surgiram como um candidato promissor, já que se assemelham aos vírus de interesse e, no entanto, não possuem o material genético dos mesmos. Além disso, já foi observado que as VLPs induzem uma forte resposta de células B, mesmo na ausência de adjuvantes. Sua utilização em situações de epidemia de doenças virais também é vantajosa, já que o tempo requerido para o processo de criação e expressão é reduzido, quando comparado às vacinas que utilizam partículas virais (Figura 9). Elas têm sido utilizadas como moléculas imunogênicas em vacinas recombinantes criadas nos últimos anos. Algumas vacinas de VLPs foram licenciadas e comercializadas, como as vacinas contra os vírus HBV, HPV e vírus da hepatite E (HEV), enquanto diversas outras são possíveis candidatas a vacinas e já estão sendo submetidas a testes clínicos (ZHAO *et al.*, 2013; YAN *et al.*, 2015).

Figura 9. Comparação entre as etapas para produção das vacinas convencionais e de VLPs. As vacinas usuais (A), geralmente são produzidas em 6-9 meses e passam pelas seguintes fases de preparação: cultivo do vírus (em cultura de células ou ovos embrionados), coleta, inativação e dissociação da partícula viral, separação dos antígenos e formulação da vacina. Nessas etapas, ainda podem ser necessários processos adicionais para remover contaminação da cultura de células ou de proteínas do ovo e dos detergentes utilizados na dissociação da partícula viral. Já na produção de vacinas de VLPs (B), as principais etapas são: clonagem da região que codifica as proteínas de interesse nos vetores para expressão nos sistemas procarióticos e eucarióticos, expressão e purificação das VLPs obtidas e formulação da vacina.



Fonte: NASKALSKA & PYRC, 2015.

As VLPs, como antígenos exógenos, são eficientemente reconhecidas por receptores de reconhecimento de padrões (*pattern recognition receptors* -PRRs), como os receptores *Toll-like* (TLRs) e incorporadas pelas células apresentadoras de antígenos, particularmente células dendríticas, tendo em seguida os antígenos processados e apresentados por moléculas MHC de classe II, o que leva à estimulação dos linfócitos auxiliares T CD4⁺. Devido à sua similaridade com vírus nativos, as VLPs também são processadas no citosol de células dendríticas como antígenos endógenos e apresentadas por moléculas MHC de classe I para células T CD8⁺. Esses mecanismos de apresentação garantem uma resposta imune forte e abrangente. Adicionalmente, numerosas VLPs candidatas a vacinas são conhecidas por possuírem propriedades auto-adjuvantes, provavelmente devido à sua estrutura e ao tamanho reduzido (~100 nm), o que favorece a captação por APCs (NASKALSKA & PYRC, 2015; YAN *et al.*, 2015).

O avanço nas ferramentas da biologia molecular ajudou no desenvolvimento do sistema de vacinas baseadas em VLPs. Ele possibilitou, por exemplo, que as

VLPs fossem utilizadas como plataformas vacinais, nas quais componentes adicionais do vírus, ou de outros vírus ou patógenos, possam ser ancorados ou inseridos e, ainda assim, estimular imunidade celular e humoral. Sendo assim, alguns estudos já mostram que as VLPs podem ser utilizadas para apresentação de antígenos para células B e T em plataformas multivalentes de vacinação. Os genes dos epítomos de interesse podem ser obtidos por engenharia genética e subclonados em vetores plasmidiais, para posterior incorporação na sequência gênica das proteínas formadoras das VLPs. Numerosos experimentos já comprovaram que a inserção de peptídeos exógenos anteriormente, ou após os genes das proteínas estruturais, possui um efeito pequeno na montagem das partículas. Como um carreador de epítomos, as VLPs também podem ser utilizadas na imunoterapia como uma vacina terapêutica para tratar doenças crônicas e câncer (LUA *et al.*, 2014; YAN *et al.*, 2015).

Na formulação de vacinas de VLPs, o maior desafio é manter a conformação nativa dos epítomos protetores, contidos nas proteínas formadoras das partículas, em todos os estágios de produção, armazenamento e administração, já que alterações conformacionais e agregação dos antígenos podem alterar a estabilidade, eficácia e segurança do candidato vacinal (JAIN *et al.*, 2015).

Os processos de purificação são um desafio na produção dessas partículas, já que eles deveriam resultar em proteínas puras e solúveis, mas, na maioria das vezes, as VLPs obtidas em diferentes sistemas de expressão, estão contaminadas com componentes celulares da célula hospedeira, como: lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas que podem estimular a imunidade inata e amplificar a resposta imune adaptativa. Embora isso pareça ser uma vantagem, a Conferência Internacional de Harmonização de Requerimentos Técnicos para Registro de Fármacos de uso Humano, considera contaminantes, que afetam o sistema imune humano, um motivo de preocupação com a segurança da vacina, o que pode ter um impacto significativo no desenvolvimento desses fármacos por essa técnica (KUSHNIR *et al.*, 2012).

As vacinas de VLPs para humanos mais conhecidas disponíveis no mercado são para os vírus HBV e HPV. As VLPs de HBV possuem o antígeno de superfície viral HBsAg e compõem a primeira vacina de VLPs. A sua produção já foi registrada em sistemas de expressão de mamíferos, leveduras, insetos e plantas. Hoje, existem diversas marcas que as comercializam, sendo as mais comuns: Recombivax HB® (Merck), Engerix-B® (Glaxo-Smith-Kline Biologicals), Elovac B®

(Human Biologicals Institute), Genevac B[®] (Serum Institute), Shanvac B[®] (Shanta Biotchenics in India). O antígeno do core viral, HBcAg, também foi utilizado para produção de VLPs que atualmente estão em estágio pré-clínico de testes para uma futura vacina e podem ser plataformas de apresentação de epítomos de patógenos heterólogos ou antígenos tumorais. As partículas semelhantes ao HPV, que compõem as vacinas protetoras Gardasil e Cervarix contra HPV 16/18 (uma revolução na prevenção do câncer cervical), são formadas através da superexpressão da proteína do capsídeo viral L1 em *S. cerevisiae* (levedura) ou *Trichoplusia ni* (células de insetos) respectivamente, embora a formação de VLPs com essa proteína também tenha sido demonstrada em *Pichia pastoris* (leveduras) e células de plantas (ZHAO *et al.*, 2013; CHROBOCZEC *et al.*, 2014; NASKALSKA & PYRC, 2015).

O site clinicaltrials.gov, que lista pesquisas dos Institutos Nacionais de Saúde dos Estados Unidos, possui, até o presente momento, o cadastro de 110 estudos (que já foram encerrados ou estão sendo realizados) com possíveis vacinas de VLPs. Entre eles, existem diversas pesquisas com partículas semelhantes ao vírus influenza, norovírus, papilomavírus, chikungunya, EV71. Além de estudos que utilizam VLPs como plataforma para vacinas contra malária e melanomas (Clinicaltrials.com, acessado em 2016).

As vacinas para doenças não-infecciosas são uma aplicação cada vez mais apropriada para VLPs quiméricas, construídas para induzir anticorpos específicos contra antígenos do próprio corpo, amplificando a resposta imune humoral. Essas VLPs podem transportar antígenos típicos de cânceres (como melanoma), doenças neurodegenerativas (Alzheimer), doenças autoimunes. A maioria das vacinas terapêuticas de VLPs é baseada no bacteriófago Q β , altamente expresso em *E. coli*, o que possibilita o desenvolvimento de um processo de produção econômico em larga escala (NASKALSKA & PYRC, 2015).

As propriedades de algumas proteínas de capsídeo viral permitem que as VLPs sejam utilizadas para encapsular e transportar moléculas como proteínas e ácidos nucleicos para células, tecidos e órgãos específicos (LUA *et al.*, 2014).

2.8 SISTEMA DE EXPRESSÃO EM BACULOVÍRUS (BEVS)

O sistema de expressão que utiliza baculovírus e células de insetos Sf9 (ou outras linhagens de insetos), é uma ferramenta popular para a produção de proteínas recombinantes. Os baculovírus não são infecciosos para humanos e, além disso, as células de insetos são fáceis de se cultivar, principalmente por não necessitarem de incubadoras de CO₂. Devido a essas vantagens, muitos pesquisadores vêm utilizando esse método para a produção de proteínas do capsídeo virais (MACHIDA & IMATAKA, 2015).

O sistema de expressão com baculovírus foi utilizado pela primeira vez em 1983, para expressar interferon beta humano em células de insetos e, desde então, se tornou uma plataforma versátil e robusta cada vez mais utilizada para a obtenção de proteínas recombinantes (BARFORD *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2013; BERGER & POTERSZMAN, 2015; OERS *et al.*, 2015).

Na natureza existem mais de 500 tipos distintos de baculovírus, todos com hospedeiros restritos a invertebrados, mas os mais utilizados como sistemas de expressão são dois membros da família *Alphabaculovirus*: *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) em maior escala e *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) em casos mais raros, vírus que possuem genoma composto por uma dupla fita de DNA com, aproximadamente, 134 kb. O amplo genoma confere aos baculovírus a possibilidade de acomodar grandes segmentos de DNA de outros organismos, incluindo múltiplos genes, uma vantagem em relação a outros vetores de expressão como vaccínia e adenovírus. Assim, eles podem induzir uma expressão eficiente de genes exógenos sob o controle dos promotores de fase muito tardia de infecção, como o da poliedrina (polh) e o do polipeptídeo fibroso de 10 kDa (p10) (OERS, 2011; LU *et al.*, 2012; CLEM & PASSARELLI, 2013; YAMAJI, 2014; FELBERBAUM, 2015).

As linhagens de células de insetos mais usuais no sistema de expressão são: *Spodoptera frugiperda* (Sf9, Sf21, expresSf+) e *Trichoplusia ni* (Tn5), que crescem a 27 °C sem necessidade de CO₂, o que facilita a expressão em larga escala das proteínas de interesse na maioria dos laboratórios (LIU *et al.*, 2013).

A expressão de genes heterólogos utilizando o sistema de baculovírus possui a vantagem de possibilitar diversas modificações pós-traducionais que,

normalmente, não são realizadas em sistemas de expressão procariotos, tais como o dobramento correto das proteínas, oligomerização, fosforilação, glicosilação, acilação, formação de pontes dissulfeto, clivagens proteolíticas, além de possibilitar a expressão de múltiplas proteínas (com similaridade funcional aos seus análogos naturais), simultaneamente em uma única infecção (YAMAJI, 2014). Além disso, a maioria das modificações pós-traducionais são similares, ou até idênticas, às que ocorrem em células de mamíferos. Sendo assim, o BEVS vem sendo amplamente utilizado para a produção de proteínas heterólogas e geração de VLPs em laboratórios e indústrias (LIU *et al.*, 2013). Nove vacinas derivadas do sistema BEVS já foram aprovados para uso, sendo quatro para humanos (Cervarix[®], Provenge[®], Glybera[®] e Flublok[®]) e cinco para aplicações veterinárias (Porcilis[®] Pesti, BAYOVAC CSF E2[®], Circumvent[®] PCV, Ingelvac CircoFLEX[®] e Porcilis[®] PCV) (FELBERBAUM, 2015).

Entretanto, a quantidade de proteínas secretadas ou ligadas à membrana das células obtidas nesse sistema é baixa, provavelmente devido a efeitos adversos da infecção por baculovírus na maquinaria de secreção da célula hospedeira. A produção contínua de proteínas também é praticamente impossível, já que as células de insetos são lisadas após um certo período do ciclo de infecção dos baculovírus. Nos casos onde as proteínas de interesse não são secretadas, a lise das células hospedeiras é necessária e pode resultar na degradação dessas proteínas por proteases, apresentando ainda um obstáculo para o processamento e purificação dos produtos alvo. O sistema também requer uma manutenção contínua dos estoques de baculovírus. Além disso, nos casos onde as VLPs foram produzidas com sucesso, ainda há a dificuldade de remoção ou inativação dos baculovírus utilizados, embora eles não sejam patogênicos para vertebrados (YAMAJI, 2014).

Para a geração dos baculovírus recombinantes, inicialmente o (s) gene (s) de interesse é (são) clonado (s) em um plasmídeo de transferência, em um promotor forte como da poliedrina ou p10 (que possa induzir altos níveis de expressão das proteínas recombinantes em células de insetos) (FELBERBAUM, 2015). Essa construção pode ser transfectada em células de insetos juntamente com o DNA parental do AcMNPV ou BmNPV, para que os baculovírus sejam gerados através de recombinação homóloga, alternativamente a construção pode ser usada na transformação em células de DH10 de *E. coli* (estratégia utilizada por kits comerciais como Bac-toBac Expression System[®] – Life Technologies) que já contém o

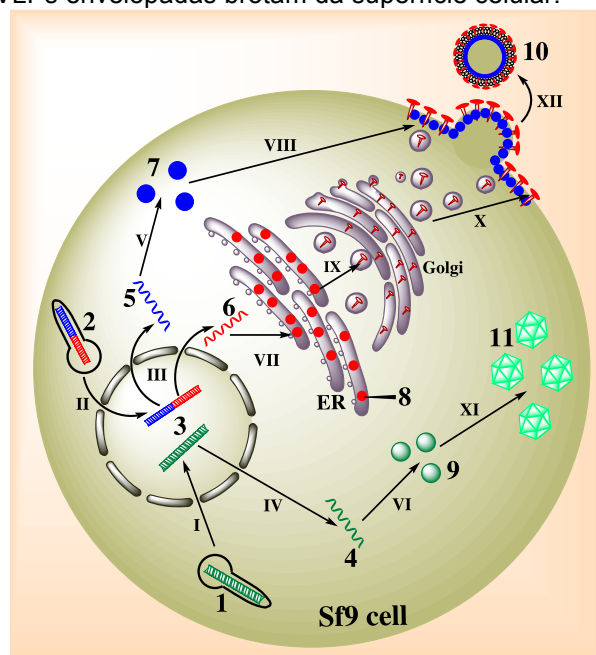
bacmídeo (DNA para a geração do baculovírus) e resultar em bacmídeos recombinantes (gerados por transposição sítio-específica pela região Tn7). Os bacmídeos podem ser inseridos por transfecção lipídica em células de insetos, geram os baculovírus contendo as sequências de interesse (NETTLESHIP *et al.*, 2010; BERGER & PORTERSZMAN, 2015; FELBERBAUM, 2015).

Após a obtenção de títulos altos de baculovírus recombinantes, eles são utilizados para infectar células de insetos e estimular a produção de proteínas. As células podem ser cultivadas de forma semi-aderente em frascos de cultura (para produção em pequena escala), ou em biorreatores (para produção em larga escala) e, geralmente, são infectadas na fase logarítmica de crescimento. Os baculovírus reprogramam a maquinaria celular para a produção das proteínas recombinantes. A expressão se dá tipicamente 48-96 horas após a infecção e as células ou o sobrenadante são coletados (dependendo se os produtos são intracelulares ou secretados), e as proteínas de interesse purificadas por ultracentrifugação ou colunas de cromatografia (FELBERBAUM, 2015).

A maioria das VLPs não-envelopadas é composta de numerosas cópias de subunidades da mesma proteína, e possui simetria icosaédrica. Seus vírus parentais possuem estruturas de capsídeo simples, onde a expressão de uma só proteína do capsídeo em células de insetos gera a formação das VLPs morfologicamente e antigenicamente similares aos vírus nativos. As partículas semelhantes ao HPV são um exemplo de estruturas simples, pois com a superexpressão da proteína imunodominante do capsídeo L1, já são obtidas VLPs que induzem forte resposta imune. Também existem VLPs não-envelopadas compostas por diversas proteínas estruturais virais, elas são obtidas através da expressão simultânea das mesmas em células de insetos (LIU *et al.*, 2013).

A geração de VLPs envelopadas inclui, normalmente, duas etapas: formação do capsídeo e envolvimento da membrana celular para posterior brotamento. Devido às propriedades da membrana lipídica e das glicoproteínas de superfície, a geração desse tipo de VLPs em células de insetos é mais complexa do que a obtenção das partículas não-envelopadas. Entretanto, diversas publicações já demonstraram a obtenção eficiente de VLPs envelopadas nesse sistema (LIU *et al.*, 2013). A Figura 10 ilustra as etapas para formação de VLPs envelopadas e não-envelopadas.

Figura 10. Principais estágios da formação de VLPs envelopadas e não-envelopadas em células de insetos. 1 e 2 – Baculovírus recombinantes infectam a célula de inseto e liberam seus genomas, 3, no núcleo celular; 4, 5 and 6, RNAs mensageiros (mRNAs); 7, proteínas do capsídeo ou de matriz; 8, proteínas de membrana; 9, proteínas do capsídeo; 10, VLPs envelopadas; 11, VLPs não-envelopadas; retículo endoplasmático (ER). I e II: os genomas de baculovírus são liberados no núcleo celular. III e IV: os mRNAs são exportados do núcleo. V, VI e VII, os mRNAs são traduzidos em proteínas estruturais. VIII, as subunidades das proteínas de matriz são transportadas dentro da membrana plasmática. IX e X, as proteínas de membrana são transportadas através do complexo de Golgi para a membrana plasmática. XI, as subunidades das proteínas do capsídeo se unem em VLPs não-envelopadas. XII, VLPs envelopadas brotam da superfície celular.



Fonte: LIU *et al.*, 2013.

2.9 VLPS DA FAMÍLIA PICORNAVIRIDAE

As doenças causadas por picornavírus trazem sérios impactos para a saúde humana e animal, sendo assim, o desenvolvimento de vacinas seguras e eficientes é a chave para prevenção das infecções desses vírus. As características das proteínas que compõem o capsídeo dos picornavírus, onde as quatro proteínas estruturais podem formar pentâmeros para a montagem do capsídeo viral (sem a necessidade do RNA viral), e ainda são compostas pelos epítomos que determinam a antigenicidade dos vírus, possibilitam o desenvolvimento de vacinas de VLPs para essa família (DONG *et al.*, 2014).

A existência de partículas semelhantes a vírus em picornavírus foi inicialmente descoberta no início dos anos 90 e com o avanço das pesquisas na

virologia nas últimas décadas, cada vez mais vírus dessa família possuem VLPs e seus sistemas de expressão têm mudado gradualmente de procariotos para eucariotos (DONG *et al.*, 2014).

2.9.1 VLPs do gênero *Aphthovirus*

A febre aftosa é uma das doenças animais mais infecciosas e possui um grande impacto econômico na importação e exportação de produtos animais. Por isso, na tentativa de evitar e controlar a expansão da doença, existe um esforço contínuo na busca de vacinas eficientes para sua prevenção, e economicamente viáveis (DONG *et al.*, 2014). Em 1981, Kleid e colaboradores publicaram os resultados de um estudo onde conseguiram expressar a proteína estrutural VP3 do FMDV em *E. coli* e utilizá-la para imunizar gados e suínos, induzindo imunidade nesses animais. Entretanto, como a vacina foi feita com apenas uma proteína estrutural, o nível de anticorpos foi inferior ao obtido com a partícula viral completa (atenuada ou inativada).

Outra estratégia, publicada por Roossien e colaboradores em 1990, foi expressar o DNA complementar (cDNA) de FMDV (contendo a região P1-2A e as proteases 3C e L), no sistema de baculovírus/células de insetos, mas, apesar de comprovarem que as proteínas foram expressas em baixos níveis e processadas, ela falhou em detectar as VLPs do respectivo vírus. Em 1995, Abrams e colaboradores conseguiram obter uma montagem correta do capsídeo de FMDV utilizando a sequência P1-2A-3C no sistema de expressão do vírus vaccínia, co-transfectado em um vetor que expressava T7 RNA polimerase.

A partir da comprovação da expressão e montagem de VLPs do FMDV, diversos estudos fizeram modificações na estratégia inicial a fim de obter maiores quantidades de capsídeo viral. A sequência P1-2A-3C foi inserida em baculovírus recombinantes e expressa em células de insetos e gerou anticorpos específicos em animais imunizados (LI *et al.*, 2008; CAO *et al.*, 2009). Os pesquisadores também começaram a otimizar os códons nos genes das proteínas do capsídeo viral e inseriram as sequências em promotores distintos (utilizando um vetor duplo de expressão em baculovírus), obtendo um maior nível de expressão e com isso o número de VLPs observadas por microscopia eletrônica também aumentou (CAO *et*

al., 2010). VLPs de FMDV também foram obtidas através da transformação simultânea dos vetores pSMA, pSMC e pSMK (contendo as proteínas estruturais VP0, VP3 e VP1 respectivamente), em células BL21 (DE3) de *E. coli* e posterior montagem das estruturas *in vitro*. Quando utilizadas na dose de 50 ug para a imunização, as partículas obtidas foram capazes de induzir proteção em porquinhos-da-índia, suínos e gados (GUO *et al.*, 2013). As vacinas de VLPs para FMDV possuem potencial para prevenir epidemias sazonais, mas a pesquisa e desenvolvimento de estratégias para melhorar sua produção e purificação continua sendo uma prioridade.

2.9.2 VLPs do gênero *Enterovirus*

O enterovírus 71 (EV71) é um patógeno que causa uma doença altamente contagiosa, comum em crianças, denominada “doença mão-pé-boca”, que pode evoluir para complicações neurológicas levando a morte do hospedeiro. Apesar disso, os estudos envolvendo VLPs para esse vírus começaram tardiamente se comparados com de outros picornavírus. O sistema de expressão com baculovírus foi utilizado pela primeira vez em 2006 para co-expressar as regiões P1 e 3CD e obter as VLPs do EV71, as partículas foram montadas mas a eficiência de recuperação para vacina foi baixa devido à instabilidade das VLPs (CHUNG *et al.*, 2006). Lin e colaboradores conseguiram, em 2012, expressar partículas semelhantes ao EV71 com o sistema de baculovírus e purificá-las com a tecnologia de cromatografia de troca iônica, o que resultou em uma pureza de 95% das partículas obtidas. As partículas obtidas foram utilizadas para imunizar macacos e os resultados de imunoenaios mostraram que a vacina com essas VLPs estimulou uma forte resposta imune humoral e celular, sendo inclusive semelhante à da vacina inativada. Entretanto, a vacina com o vírus inativado ainda induziu a produção de um nível mais elevado de anticorpos neutralizantes, provavelmente, devido a uma pequena desestruturação da região imunodominante contida na proteína VP1 das VLPs.

Recentemente, a região P1-3CD, sob o controle de dois promotores distintos polh e CMV, foi inserida em baculovírus utilizados para infectar células de insetos *High-Five* e essa estratégia resultou em um alto nível de expressão de VLPs que

induziram imunogenicidade em camundongos e podem ser candidatas a uma vacina economicamente viável contra o EV71 (LIN *et al.*, 2015).

A poliomelite é outra doença viral que possui como agente um picornavírus do gênero enterovírus. Ela afeta neurônios motores no tronco cerebral e medula espinhal, sendo causada por três poliovírus (PV) humanos sorologicamente distintos do gênero enterovírus. Em 1955, Jonas Salk desenvolveu uma vacina com o vírus inativado, o que reduziu drasticamente a morbidade por poliomelite em países em desenvolvimento. Essa vacina foi posteriormente substituída por outra oral que utilizava vírus atenuados, utilizada como a principal ferramenta para erradicação da poliomelite em todo o mundo. Entretanto, por utilizar vírus atenuados, existem casos de poliomelite parálitica associada à vacina, onde houve a reversão para o vírus original. Por isso, a pesquisa com novas alternativas para o combate à doença está sendo incentivada (DONG *et al.*, 2014).

Em 1990, Jewell e colaboradores inseriram as regiões P1-2A (precursora do capsídeo e protease viral) em vírus vaccínia recombinantes. Foi possível observar a expressão e processamento das proteínas de interesse, embora eles não tenham conseguido isolar os vírus recombinantes obtidos. Posteriormente, pesquisadores inseriram as regiões P1 e 3CD no vírus vaccinia para transfectar células HeLa, gerando VLPs que foram detectadas após purificação por gradiente de sacarose (DONG *et al.*, 2014). As regiões P1 e 3CD também foram inseridas em plasmídeos de expressão em leveduras e esse sistema foi utilizado para obter VLPs do vírus da poliomelite. As VLPs obtidas tiveram a mesma imunogenicidade da partícula viral (ROMBAUT & JORE, 1997).

O coxsackievírus (CV) pertence ao gênero entereovírus e possui cerca de trinta sorotipos conhecidos. Eles podem ser divididos em dois tipos, A e B, sendo conhecidos por causarem doenças graves e até fatais. Para prevenir a infecção aguda e a miocardite causadas por esse vírus, diferentes vacinas foram testadas (atenuadas, inativadas, de subunidades, de DNA), mas elas possuíam riscos de biossegurança ou não tinham o efeito imune esperado. Com o desenvolvimento das tecnologias de VLPs, os pesquisadores começaram a investigar vacinas para CV utilizando essas partículas (DONG *et al.*, 2014). Os genes de P1 e 3CD (do CV A16) foram inseridos em baculovírus para infectar células de insetos Sf9 e as VLPs obtidas foram utilizadas para imunizar camundongos, induzindo a geração de anticorpos neutralizantes contra o vírus (LIU *et al.*, 2012). Outros pesquisadores

utilizaram sequências do CVB3 (toda a região codificante do vírus ou uma construção contendo apenas os genes responsáveis pela formação do capsídeo viral) para a construção de baculovírus recombinantes. As VLPs foram obtidas, utilizadas para imunizar camundongos e geraram anticorpos em títulos semelhantes aos da vacina atenuada para CVB3 (ZHANG *et al.*, 2012).

2.9.3 VLPs do vírus da hepatite A

Em 1991, Winokur e colaboradores publicaram um artigo onde relatavam a geração de partículas de HAV utilizando o vírus vaccínia (contendo toda a sequência da ORF do vírus da hepatite A), para infectar células de mamíferos (HeLa). Eles também tentaram gerar partículas a partir da inserção da região P1 do HAV no vírus vaccínia, mas a proteína expressa resultante não foi processada e devido a isso não foi observada a montagem da VLP do HAV. Já em 1993, Rosen e colaboradores conseguiram expressar a ORF do vírus da hepatite A, utilizando o sistema de baculovírus em células de insetos. Foi possível detectar a poliproteína de 220 kDa, observar que ela era capaz de induzir a formação de anticorpos neutralizantes em camundongos. A migração desta proteína em gradientes de cloreto de cério possuía um perfil semelhante à de partículas vazias do HAV, o que pode ser uma evidência da formação de VLPs do vírus.

Devido à formação de VLPs com facilidade (já que não é necessária a presença do RNA viral para a montagem do capsídeo), os pesquisadores têm estudado os genomas de picornavírus para encontrar regiões que possam ser utilizadas como carreadores de outros epítomos nas suas partículas. Em 2002, Beneduce e colaboradores incorporaram uma sequência de aminoácidos do vírus da imunodeficiência humana na região 2A do HAV, sem que a montagem e a antigenicidade do capsídeo viral fossem modificadas. Partículas do HAV também foram utilizadas como carreadores de uma vacina anti-hipertensão (baseada em angiotensina II), tendo as sequências da ORF viral e da proteína sido expressas em células de insetos utilizando baculovírus recombinantes. Ambos os trabalhos confirmam que partículas do vírus da hepatite A podem ser utilizadas, com sucesso, como suportes para apresentação de outros antígenos de interesse (OU *et al.*, 2013).

Com exceção do poliovírus, os estudos em vacinas de VLPs para picornavírus começaram relativamente tarde, provavelmente devido ao complexo processo de montagem desses vírus. Entretanto, como os estudos que focam nos mecanismos de montagem desses vírus continuam, é provável que haja um desenvolvimento das VLPs dos mesmos. Existem muitos sistemas de expressão que podem ser utilizados para gerar partículas semelhantes a vírus de picornavírus, mas, até o momento, nenhuma vacina de VLPs dessa família chegou à produção em larga escala. Isso indica que ainda existem barreiras na pesquisa e no desenvolvimento de vacinas de VLPs para picornavírus (DONG *et al.*, 2014).

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo a geração de partículas semelhantes ao vírus da hepatite A, utilizando o sistema de expressão de baculovírus/células de insetos, ferramenta que permitiu a obtenção de VLPs de outros picornavírus com constituição genômica semelhante ao do HAV. Esses antígenos podem substituir a utilização do vírus em vacinas e testes diagnósticos, o que seria uma alternativa econômica viável para campanhas de vacinação com o objetivo de erradicar a hepatite A, principalmente, nos países com maior quantidade de casos, subdesenvolvidos ou em desenvolvimento.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Produzir partículas semelhantes ao vírus da hepatite A, capazes de serem reconhecidas por anticorpos específicos, visando o desenvolvimento de kits diagnósticos e potenciais vacinas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenhar estratégias contendo os genes das proteínas estruturais do HAV para expressão em células Sf9;
- Construir plasmídeos de transferência com os genes de interesse;
- Gerar Bacmídeos recombinantes com as construções do HAV;
- Obter Baculovírus capazes de induzir a expressão das proteínas de interesse;
- Verificar a expressão e montagem das VLPs;
- Analisar o reconhecimento das VLPs obtidas por anticorpos específicos anti-HAV.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DEFINIÇÃO E OTIMIZAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES UTILIZADAS PARA OBTER VLPS

As sequências gênicas utilizadas para gerar as construções do estudo foram obtidas da cepa HM175 (GenBank acesso: M14707), isolada a partir de um surto ocorrido na Austrália (COHEN *et al.*, 1987). Para a obtenção de VLPs do HAV, foram definidas três estratégias, que incluem os genes das proteínas estruturais do vírus (VP1-4 e 2A) e proteases para a clivagem das mesmas. A primeira, HAV-PTRUNC (SOUSA, 2011), inclui todas as proteínas responsáveis pela formação do capsídeo viral (VP1, VP2, VP3, VP4 e 2A), além de uma região onde foram adicionadas sequências que codificam aminoácidos extras com a função de mimetizar os sítios naturalmente clivados pela protease 3C, juntamente com sequências espaçadoras. A inserção desta região foi uma tentativa de promover um processamento correto das proteínas virais e da protease viral 3C. Na segunda estratégia (P1+3C), duas construções distintas foram idealizadas, uma delas contendo a sequência das proteínas estruturais (VP0-VP3-VP1-2A), enquanto o segundo gene codifica a protease 3C. Nesse caso, a protease já estaria separada das proteínas precursoras do capsídeo viral, o que reduziria tempo no processo de formação das VLPs. Já na terceira estratégia (VP0+VP3-1), as proteínas que formam o capsídeo do HAV foram separadas em duas ORFs distintas. A primeira delas corresponde à sequência da VP0 (VP2-VP4), enquanto a segunda inclui sequências da VP1, a protease 2A de FMDV, VP3 e a 2A do HAV (importante para o sinal de montagem dos pentâmeros). Nesse caso, a protease utilizada é a do vírus FMDV, conhecida por clivar as sequências de proteínas estruturais virais. As estratégias e seus respectivos nomes, podem ser visualizados na Tabela 1.

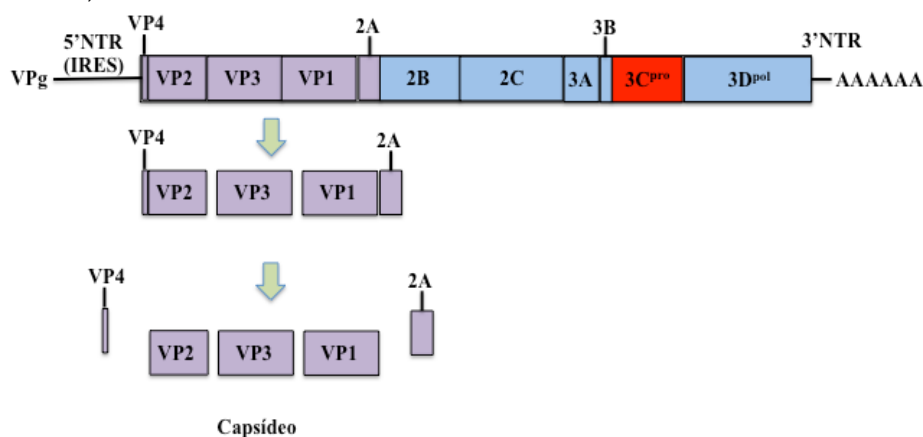
Tabela 1. Estratégias para geração das VLPs do HAV. As três estratégias definidas para a formação das VLPs do HAV foram denominadas **1- HAV-PTRUNC**, **2- P1+3C**, **3- VP0+VP3-1**. A número 1 possui uma ORF que contém as proteínas estruturais VP4-VP3-VP2-VP1-2A, uma região não-codificante espaçadora (para simular espacialmente as regiões do genoma viral que foram deletadas) e a protease 3C. A segunda estratégia possui duas ORFs distintas, sendo a ORF1 composta pela região P1 viral (VP4-VP2-VP3-VP1-2A) e a ORF2 pela protease 3C. A terceira estratégia também possui duas ORFs, a primeira corresponde à VP0 (VP4-VP2) e a segunda contém os genes das proteínas VP3 e VP1, separados pela protease 2A do vírus FMDV e com a 2A do vírus da hepatite A no final.

Estratégias	Composição	Tamanhos
1- HAV-PTRUNC	ORF1: P1-2A (VP4-VP2-VP3-VP1-2A)_Região Espaçadora_3C	ORF1: 3252 pb
2- P1+3C	ORF1: P1-2A + ORF2: 3C	ORF1: 2514 pb ORF2: 660 pb
3- VP0+VP3-1	ORF1: VP0 (VP4-VP2) + ORF2: VP3-2AFMDV-VP1-2AHAV	ORF1: 741 pb ORF2: 1845 pb

Fonte: O Autor (2017).

A estratégia HAV-PTRUNC foi idealizada e sua sequência otimizada utilizando o programa LETO 1.0 (Entelechon®) para expressão em células 293 humanas em um trabalho anterior (SOUSA, 2011). Já as estratégias 2 e 3 foram desenhadas no início deste trabalho e tiveram suas sequências de nucleotídeos otimizadas para expressão em células de insetos utilizando o mesmo programa que utiliza um algoritmo genético capaz de alterar sequências de nucleotídeos, sem, no entanto modificar os aminoácidos codificados por elas. O LETO é usado para alterar parâmetros como: diferenças de códons entre organismos, estrutura secundária do mRNA, distribuição do conteúdo de GC, motivos repetitivos de DNA, sítios de restrição e de *splicing*. A otimização teve como objetivo minimizar diferenças entre os *codon usages* do HAV e da linhagem de células de insetos Sf9 e alterar outros parâmetros relevantes na expressão dos peptídeos, no intuito de expressar uma quantidade mais elevada das proteínas virais recombinantes nas células hospedeiras. Após otimização, as sequências foram enviadas para síntese comercial (Geneart®). Todas as construções foram idealizadas com base no mecanismo de formação do capsídeo do vírus da hepatite A (Figura 11).

Figura 11. Formação do capsídeo do vírus da hepatite A. O RNA do HAV é composto por três regiões distintas: uma região não codificante à esquerda denominada 5'UTR (que contém o sítio IRES), um único quadro de leitura aberto (ORF) que possui os genes de todas as proteínas / enzimas virais e é traduzido como uma poliproteína e uma região não codificante à direita que contém uma cauda poli A. A ORF pode ser representada nas regiões que codificam as proteínas do capsídeo viral (roxo) e nas regiões responsáveis pela replicação do material genético do vírus (azul). Na poliproteína, ainda, existe uma protease (vermelha) que se autocliva e cliva as outras proteínas virais (com ajuda de proteases da célula hospedeira), para que cada uma possa exercer sua função na formação de partículas virais maduras. Para a formação do capsídeo viral, a protease 3C reconhece a região 2A e a cliva, separando-a das proteínas não-estruturais do vírus. Após as clivagens são separadas as proteínas VP4-VP2 (que formam o complexo denominado VP0), VP3 e VP1-2A. Posteriormente, tanto a 2A, quanto a VP4 são clivadas e o capsídeo maduro do HAV é formado com as proteínas VP2, VP3 e VP1.



Fonte: O Autor (2017).

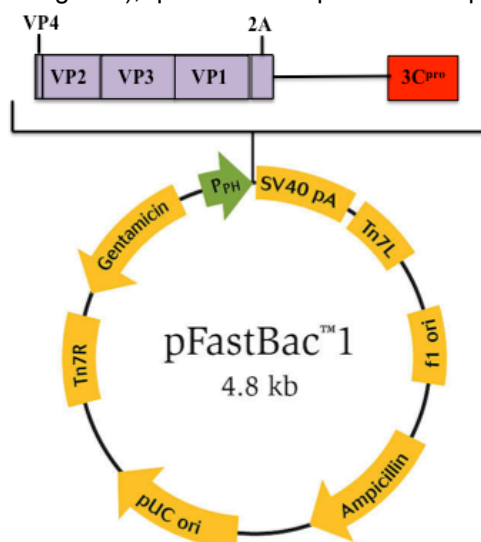
4.2 CLONAGENS EM PLASMÍDEOS DE TRANSFERÊNCIA PARA TRANSPOSIÇÃO SÍTIO-ESPECÍFICA

4.2.1 Clonagem estratégia 1- HAV-PTRUNC no vetor pFastBac1

A construção HAV-PTRUNC (estratégia 1) foi sintetizada com sítos para as enzimas de restrição *NheI* (região 5') e *KpnI* (região 3'). O DNA otimizado clonado em plasmídeo comercial foi inicialmente obtido em larga escala a partir de transformação em cepas DH10B quimiocompetentes de *Escherichia coli* (eficiência de 4×10^7 células/ μ g), utilizando 50 μ l de células e 100 ng de DNA plasmidial. A reação de transformação foi incubada 30 minutos no gelo e 5 minutos a 37 °C. As bactérias foram semeadas em meio Luria-Bertani (LB) sólido, contendo ampicilina (amp), em uma concentração final de 50 μ g/ml. As placas foram incubadas a 37 °C por 18 horas e colônias isoladas foram inoculadas em 250 ml de meio LB amp (50 μ g/ml) líquido, sendo submetidas a agitação de 160 rpm por 18 horas. As culturas

foram centrifugadas a 8.000 *g* e o DNA plasmidial foi extraído utilizando o kit QIAprep® Spin Midiprep (Qiagen®). Para a clonagem, 5 µg do DNA plasmidial e do vetor comercial pFastBac1 (Invitrogen™) foram clivados utilizando 5 unidades de *NheI* e *KpnI* (New England BioLabs®), com o tampão 1.1 (1x) (New England BioLabs®), em uma reação com volume final de 50 µl, por 8 horas a 37 °C. A digestão dos fragmentos foi confirmada após fracionamento das amostras em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e analisado através da observação em luz ultravioleta (UV) de um transluminador. Após a comprovação das clivagens nos sítios de interesse, todo conteúdo das reações foi fracionado e posteriormente excisado do gel, sendo purificado utilizando o kit *GFX PCR DNA and Band Purification* (GE Healthcare®). Os fragmentos purificados da construção e do vetor foram quantificados utilizando o espectrofotômetro Nanodrop™. As ligações foram realizadas com um volume final de 10 µl e continham 1 µl de T4 DNA Ligase *Buffer* 10x (New England Biolabs®), 1 µl de T4 DNA ligase (New England Biolabs®), DNAs do vetor e do inserto (µg:µg) em proporções de 1:1, 1:3, 1:5 e água Mili-Q (para completar o volume da reação). As amostras foram incubadas à 16° C por 18 horas e transformadas em células DH10B, quimiocompetentes, por 30 minutos no gelo e 5 minutos a 37 °C, sendo, posteriormente, plaqueadas em meio LB com ampicilina (100 µg/ml) e incubadas por 18 horas a 37° C. As colônias que cresceram nas placas tiveram seus DNAs plasmidiais expressos em pequena escala (5 ml) e extraídos pelo kit QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen®). A clonagem foi confirmada através da digestão em pequena escala (com volume final de 10 µl), utilizando as enzimas *PstI* e *SacI* (New England Biolabs®). A Figura 12 mostra a sequência utilizada nessa estratégia e o vetor comercial no qual ela foi clonada.

Figura 12. Estratégia 1 – Representação da construção HAV-PTRUNC clonada no vetor comercial pFastBac1. Nessa estratégia todas as proteínas responsáveis pela formação do capsídeo viral (VP4-VP2-VP3-VP1-2A coloridas em roxo) foram acrescidas de um DNA espaçador (logo após o fim da 2A) e da protease 3C (vermelho), no intuito de simular o genoma do vírus da hepatite A. A sequência foi otimizada para expressão em células eucarióticas utilizando o programa Leto 1.0 (Entelechon®) e produzida comercialmente no trabalho de Sousa, 2011. Ela foi clonada no vetor comercial pFastBac 1 (Invitrogen™), que contém o promotor da poliedrina (P_{PH}) e possui 4.8 kb.



Fonte: O Autor (2017).

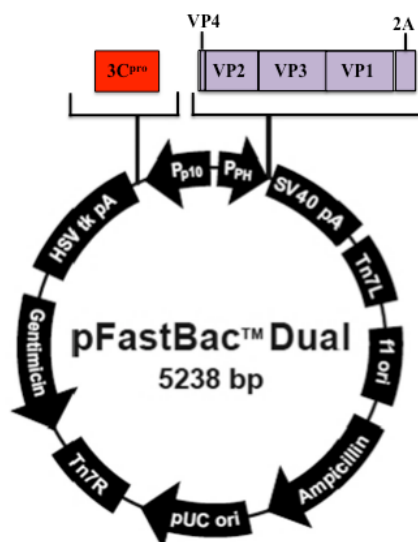
4.2.2 Clonagem estratégia 2- P1+3C no vetor pFastBac-Dual

A estratégia 2- P1+3C compreende duas ORFs distintas. A primeira delas é composta pelas proteínas que formam a região P1 viral (VP4-VP2-VP3-VP1-2A) e a segunda compreende a sequência que dá origem à protease 3C. Inicialmente, a ORF1 (P1) foi clonada no promotor da poliedrina do vetor pFastBac-Dual (Invitrogen™). Para isso, os DNAs comerciais otimizados foram obtidos em larga escala em *E. coli* e extraídos pelo método de midipreparação, como descrito acima para a estratégia 1. Os DNAs do inserto e do plasmídeo foram clivados em larga escala, com um volume final de reação de 50 µl, utilizando 5 µg de cada um deles, 5 unidades das enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI* (New England Biolabs®), com tampão 2.1 (New England Biolabs®) e água Mili-Q para completar o volume final. As digestões foram verificadas por fracionamento em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio, e visualizado com ajuda do transluminador de luz UV. As amostras digeridas foram purificadas para a reação de ligação, seguindo o mesmo protocolo utilizado para a estratégia número 1. A clonagem foi confirmada através da

digestão em pequena escala utilizando as enzimas *SacI* e *XbaI* (New England Biolabs®).

O DNA plasmidial dos clones obtidos foi obtido em larga escala através de midipreparações, utilizando o kit QIAprep® Spin Midiprep (Qiagen®), e utilizado em uma nova digestão em larga escala com as enzimas de restrição *KpnI* e *NheI* (New England Biolabs®), dessa vez, para permitir a clonagem do gene da protease 3C, também submetido à digestão com as mesmas enzimas, no promotor p10. Os procedimentos de ligação e transformação foram semelhantes aos descritos acima. Os clones foram confirmados por digestões em pequena escala, utilizando as enzimas de restrição *KpnI* e *NheI* (New England Biolabs®). A Figura 13 mostra os genes clonados nos promotores p10 e pH do plasmídeo bicistrônico pFastBac-Dual (Invitrogen™).

Figura 13. Estratégia 2 - Representação da construção P1+3C clonada no vetor pFastBac-Dual. Na segunda estratégia, as proteínas estruturais (VP4-VP2-VP3-VP1-2A), (representadas em roxo), foram clonadas no promotor da poliedrina do vetor comercial pFastBac-Dual, enquanto a protease 3C (vermelho) foi clonada no promotor p10 (Invitrogen™). A separação teve como intenção obter genes menores e que na teoria seriam expressos e processados mais rapidamente do que a poliproteína completa.



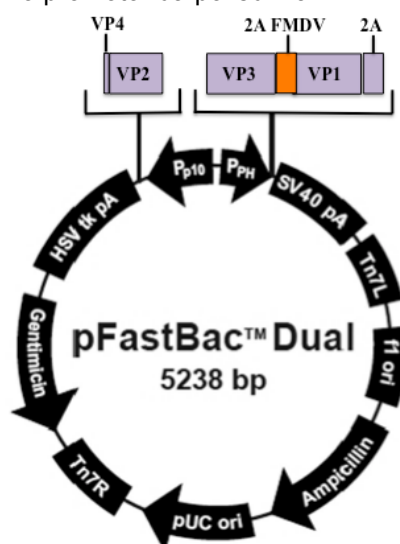
Fonte: O Autor (2017).

4.2.3 Clonagem da estratégia 3- VP0+VP3-1 no vetor pFastBac-Dual

Na estratégia 3, as proteínas responsáveis pela formação do capsídeo viral foram separadas em duas ORFs e clonadas nos promotores da poliedrina e p10 do vetor comercial pFastBac-Dual (Invitrogen™). Após a obtenção dos DNAs comerciais em larga escala, a construção VP3-1, contendo os genes das proteínas estruturais VP3 e VP1-2A, separados pela protease 2A do vírus da febre aftosa, foi clivada com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI* (New England Biolabs®), para clonagem no promotor da poliedrina contido no vetor pFastBac-Dual. O vetor também foi clivado com as mesmas enzimas para permitir a clonagem nos sítios adjacentes ao promotor da poliedrina. As reações de digestão, ligação, transformação e seleção de colônias recombinantes foram semelhantes às descritas nas estratégias anteriores. Após a seleção de colônias, a confirmação da clonagem foi feita através da clivagem dos plasmídeos recombinantes em pequena escala, utilizando as enzimas *SacI* e *XbaI* (New England Biolabs®), e observação do padrão de bandas através do fracionamento do material obtido em gel de agarose 1%. O vetor recombinante (já contendo a região VP3-1) foi novamente clivado, dessa vez com as enzimas *KpnI* e *NheI* (New England Biolabs®), na região do promotor p10,

para possibilitar a clonagem da segunda ORF composta pelas proteínas estruturais VP4-VP2 (VP0), do HAV. Todas as etapas até a confirmação do sucesso da clonagem foram semelhantes às já descritas.

Figura 14. Estratégia 3 – Representação da construção VP0+VP3-1 clonada no vetor pFastBac-Dual. A terceira estratégia consistiu na separação das proteínas estruturais em promotores distintos no vetor pFastBac-Dual (Invitrogen™). Enquanto as proteínas VP4-VP2 (VP0) foram clonadas no promotor P10, a sequência das proteínas VP3-VP1-2A foi acrescida da protease 2A do vírus da febre aftosa (alaranjado) e clonada no promotor da poliedrina.



Fonte: O Autor (2017).

4.3 GERAÇÃO E CONFIRMAÇÃO DOS BACMÍDEOS RECOMBINANTES

O sistema de expressão utilizado, *Bac-to-Bac*® *Baculovirus Expression System* (Invitrogen™), é baseado em transposição sítio-específica de um cassete de expressão em um vetor de transporte para baculovírus (bacmídeo). Quando os plasmídeos doadores pFastBac1 e pFastBac-Dual foram transformados em bactérias modificadas denominadas DH10Bac™ (Invitrogen™), que contêm bacmídeos e plasmídeos de ajuda (*helper*), a transposição ocorreu entre os elementos *attTn7* que flanqueiam a região de clonagem do plasmídeo doador e o sítio alvo mini-*attTn7* presente no bacmídeo, com ajuda de proteínas de transposição codificadas pelos plasmídeos *helper*, gerando bacmídeos recombinantes contendo as sequências de interesse.

Para a ocorrência desse processo, as construções já confirmadas, foram transformadas em células quimiocompetentes MAX Efficiency DH10Bac™ (Invitrogen™) de *Escherichia coli*. Os bacmídeos contêm todos os genes

necessários para a geração de baculovírus em células de insetos. Para isso, 1 ng das construções confirmadas foi incubado com 100 µl das células em gelo por 30 minutos. Subsequentemente, a mistura foi submetida a um choque térmico de 42 °C por 45 segundos, e em seguida os tubos foram transferidos para o gelo por 2 minutos. As células foram inoculadas em 900 µl de meio SOC, sendo colocadas sob agitação de 200 rpm por quatro horas a 37 °C. As células foram, então, submetidas a dez diluições seriadas e 100 µl de cada uma delas foram plaqueados em meio LB sólido contendo gentamicina (7 µg/ml), tetraciclina (10 µg/ml), canamicina (50 µg/ml), X-gal (200 µg/ml) e IPTG (50 µg/ml) e mantidas em estufa a 37 °C por 48 horas.

As colônias que apresentaram coloração branca foram selecionadas e estricadas em placas contendo meio LB e os antibióticos citados acima, sendo mantidas a 37°C por mais 24 horas para comprovar a seleção daquelas que continham os bacmídeos recombinantes. As colônias que cresceram e mantiveram a coloração branca foram inoculadas em 2 ml de meio LB líquido contendo os antibióticos acima mencionados e foram incubadas por 24 horas, sob agitação de 200 rpm a 37 °C. Os DNAs dos bacmídeos foram extraídos em pequena escala com o kit *PureLink™ HiPure Plasmid DNA Miniprep Kit* (Invitrogen™).

A transposição sítio-específica foi confirmada através de PCRs, utilizando *primers* específicos para as construções virais ou para a região M13. Para as reações, as sequências dos *primers* utilizados pode ser conferida na Tabela 2. A enzima utilizada nas reações foi *Phusion® High-Fidelity DNA Polimerase* (New England Biolabs®). As concentrações dos reagentes utilizados e as condições das reações no Termociclador podem ser visualizados na Tabela 3 e Quadro 1.

Tabela 2. Sequências dos *primers* utilizados para a confirmação das transposições sítio-específicas das construções de interesse em bacmídeos. Foram utilizados dois pares de *primers* para a confirmação de cada transposição. Um par compreendeu sequências *Forward* e *Reverse* da região M13 e o outro as regiões *Forward* e *Reverse* de regiões do vírus da Hepatite A.

Primers	Sequência (5'-3')
pUC/M13 <i>Forward</i>	5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3'
pUC/M13 <i>Reverse</i>	5'-AGCGGATAACAATTTACACAGG-3'
HAV1 <i>Forward</i>	5'- ATGAACATGAGCCGACAGGGAATC -3'
HAV1 <i>Reverse</i>	5'- GGTACCTTATCAGAATTCCTCCA -3'

Fonte: O Autor (2017).

Tabela 3. Reagentes utilizados nas reações de PCR e suas respectivas concentrações. As PCRs para a confirmação dos bacmídeos recombinantes foram realizadas utilizando a enzima *Phusion HF DNA Polimerase*, o tampão *Phusion HF 5x*, dNTP's 10 mM, os *primers forward/reverse* e o DNA de interesse. As reações tiveram um volume final de 20 µl e foram incubadas em Termocicladores com ciclos de temperaturas específicos. Após o final das reações, 5 µl de cada reação foram fracionados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e as bandas de interesse foram visualizadas com ajuda do transluminador de luz ultravioleta.

Reação de PCR para Confirmação dos Bacmídeos Recombinantes	
Componentes	Concentração Final na Reação
Tampão <i>Phusion HF 5x</i>	1x
<i>Phusion HF DNA Polimerase</i>	0,02 U/µl
dNTP's 10 mM	200 µM de cada (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
<i>Primer Forward</i>	0,5 µM
<i>Primer Reverse</i>	0,5 µM
DNA	~10 ng
Volume Final da Reação = 20 µl	

Fonte: O Autor (2017).

Quadro 1. Condições de ciclagem utilizadas nas PCRs. As condições mostradas na tabela acima foram utilizadas nos termocicladores onde as reações de PCR foram incubadas. A temperatura de anelamento ideal para os primers foi de 55 °C por 30 segundos.

Condições das PCRs Realizadas			
Fase	Temperatura	Tempo (segundos)	Ciclos
Desnaturação Inicial	98 °C	60	1
Desnaturação	98 °C	10	35
Anelamento	55 °C	30	
Extensão	72 °C	90	
Extensão final	72 °C	420	1
	4 °C	∞	

Fonte: O Autor (2017).

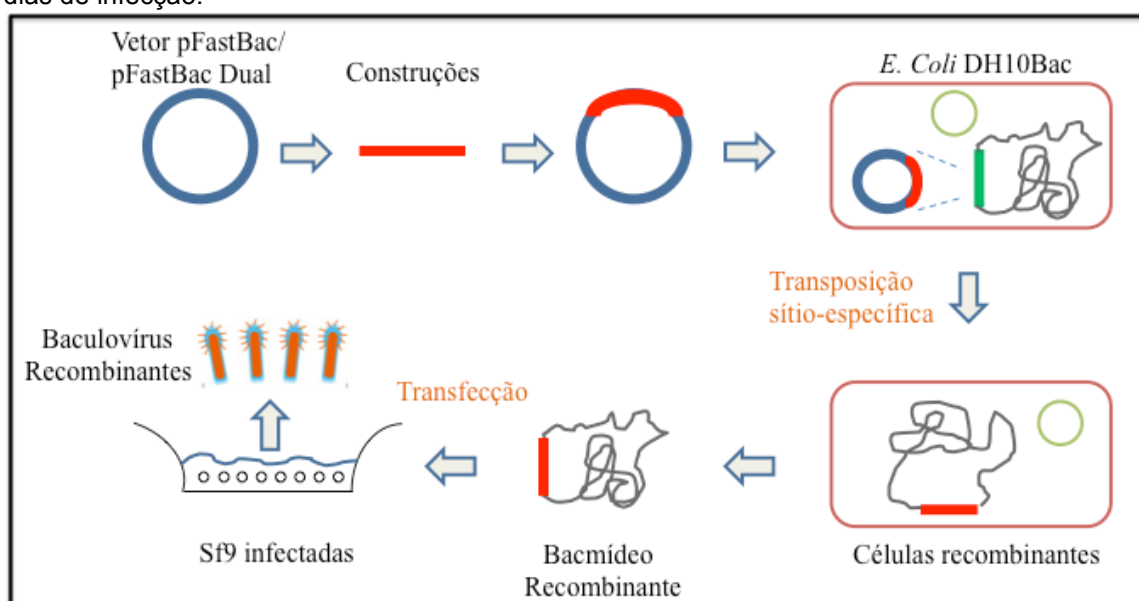
4.4 CULTIVO DE CÉLULAS E OBTENÇÃO DE BACULOVÍRUS RECOMBINANTES

As células de inseto da linhagem Sf9 (Invitrogen™) foram mantidas através de passagens em culturas semi-aderentes com o meio SF-900 II (Life Technologies™), suplementado com gentamicina (10 µg/ml), fungizone (0.25 µg/ml) e penicilina/estreptomicina (100 U/ml – 100 µg/ml, Gibco®), sendo cultivadas em estufas a 27° C. Os repiques de células foram realizados duas vezes a cada semana.

Para geração de baculovírus recombinantes, as células Sf9 foram crescidas em meio SF-900 II sem a presença de antibióticos, sendo inoculadas em placas de 6 poços (8x10⁵ células por poço), que já continham 2 ml de meio, sendo mantidas na

estufa a 27° C até que as células aderissem na placa. Paralelamente, 8 µl do reagente de transfecção lipossomal *Cellfectin II* (Invitrogen™) foi adicionado a 100 µl de meio e a mistura foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos, enquanto uma segunda amostra foi preparada contendo 2 µg de DNA dos bacmídeos em 100 µl de SF-900 II. As amostras *Cellfectin II* -meio de cultura e DNA-meio de cultura foram, então, misturados e deixados por 30 minutos a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, as células nas placas foram incubadas com a mistura de transfecção (DNA-lipídeo), por quatro horas a 27° C (com agitação suave periodicamente). Ao final do período de incubação, o meio contendo a mistura de transfecção foi removido e substituído por 2 ml de meio Sf-900 II. As células foram monitoradas por sete dias em busca de sinais de infecção com baculovírus, utilizando o microscópio invertido e quando elas apresentaram efeitos citopáticos o sobrenadante contendo os vírus (estoque P1), foi coletado e mantido a 4 °C. A Figura 15 mostra um esquema representativo das etapas citadas anteriormente, utilizadas para obtenção de baculovírus recombinantes.

Figura 15. Etapas para geração de baculovírus recombinantes. Para a geração de baculovírus recombinantes, as construções contendo os genes das proteínas estruturais do HAV foram sintetizadas comercialmente e clonadas nos vetores comerciais de transferência pFastBac1 e pFastBac-Dual. Após confirmação da clonagem, as construções foram transformadas em células de *Escherichia coli* DH10Bac (que já continham um bacmídeo e um plasmídeo *helper*). As sequências de interesse foram, dentro das células de *E. coli*, transferidas para os bacmídeos por transposição sítio-específica entre os sítios Tn7 e *attTn7* e as colônias recombinantes foram selecionadas por resistência a múltiplos antibióticos. Após a seleção, os bacmídeos recombinantes foram extraídos e a transposição confirmada por PCR. Eles foram transfectados em células de insetos da linhagem Sf9 e os baculovírus recombinantes resultantes foram coletados do sobrenadante da cultura celular após 7 dias de infecção.



Fonte: Adaptado do manual *Bac-to-Bac Baculovirus Expression System*, 2015.

4.5 AMPLIFICAÇÃO E TITULAÇÃO DO ESTOQUE VIRAL

O estoque viral P1 obtido foi amplificado através da infecção de 2×10^6 células Sf9 com o sobrenadante retirado das culturas de células em placas, sete dias após a transfecção dos bacmídeos recombinantes. Para que a infecção ocorresse, 10 ml de meio das células cultivadas em culturas semiaderentes foram retirados e elas foram incubadas com os vírus por uma hora a 27° C, para que ocorresse a adsorção viral, posteriormente, a cultura celular foi acrescida de meio Sf-900 II novo e incubada a 27 °C. Após cinco dias de infecção e observação do efeito citopático nas células, o sobrenadante contendo o estoque viral foi coletado e utilizado para infectar 10^7 células (com o mesmo procedimento descrito acima). O sobrenadante contendo os vírus recombinantes foi coletado após 5 dias de infecção e mantido a 4 °C, para manter a estabilidade dos baculovírus obtidos.

O método utilizado para titular os estoques virais obtidos foi a técnica de diluição limite (*End-Point dilution*), onde múltiplas culturas celulares são infectadas com diluições virais distintas e a quantidade de vírus que infecta 50% das células é calculada. Para o procedimento, 10 µl de cada estoque viral obtido foi utilizado numa diluição seriada de 10^{-1} a 10^{-9} . As células Sf9 foram monitoradas por microscópio invertido até atingirem uma confluência de 80% e, depois disso, elas foram diluídas para obter alíquotas de 10^5 células/ml. Para cada diluição viral, 2,5 ml de células foram misturadas com 12 µl do vírus, sendo 200 µl posteriormente inseridos em cada um dos 12 poços (da placa de 96 poços), correspondentes a 12 replicatas de cada diluição (assim cada poço da fileira continha 1 µl da diluição viral). As placas foram incubadas por sete dias e, após esse período, todas as replicatas das diluições virais foram analisadas em busca de células que apresentassem efeito citopático típico da infecção por baculovírus. Os poços que continham células infectadas em cada diluição foram contados e os dados inseridos na planilha contida nos Anexos, para cálculo do $TCID_{50}$ e do pfu viral/ml. Cada titulação foi feita em triplicata e o título viral considerado foi a média dos três títulos obtidos.

4.6 ENSAIOS DE EXPRESSÃO DAS VLPS

Para verificar se as células infectadas com baculovírus expressariam as proteínas de interesse, foram realizados testes em pequena escala, onde células Sf9 foram cultivadas em placas de 6 poços utilizando o meio Sf-900 II (2 ml/poço) a 27 °C. Ao atingirem 8×10^5 células por poço o que corresponde a uma confluência de 70-80%, o cultivo foi inoculado com os baculovírus recombinantes em MOIs de 5, 10 e 15. Para cada experimento de infecção, células não-infectadas foram mantidas nas mesmas condições para serem utilizadas como controles negativos. As células infectadas foram coletadas com 24, 48, 72 e 96 horas após a infecção. Elas foram centrifugadas a 1100 g para remoção do meio e dos vírus recombinantes e lavadas por três vezes com 1 ml de PBS 1x (NaCl 137 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KCl 2.7 mM, pH 7.4). Após a lavagem, as células foram lisadas com o tampão LE2x acrescido de inibidor de proteases 8x (Sigma).

Os lisados obtidos foram fracionados em géis SDS-PAGE 15% e corados com azul de Comassie para verificação das proteínas expressas. Amostras dos lisados também foram transferidas para membranas de PVDF (Immobilon-P Millipore), após fracionamento em géis SDS-PAGE 15%, para a confirmação da expressão por *immunoblot* com o anticorpo anti-VP1 descrito abaixo.

4.7 PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS POR IMUNOADSORÇÃO

A produção de soros policlonais específicos anti-VP1 foi realizada em um trabalho anterior (Sousa, 2011), onde a respectiva proteína ligada à proteína ligadora de maltose (*maltose binding protein* – MBP) foi inoculada em coelhos. Para a purificação dos anticorpos, cerca de 150 µg das proteínas MBP e VP1 foram fracionados por eletroforese em gel SDS-PAGE 15%, com posterior transferência para membrana de PVDF (Immobilon-P Millipore). Em seguida, as membranas foram coradas com vermelho Ponceau 0,2% em 1% de ácido tricloroacético (TCA), para a visualização das bandas referentes às proteínas de interesse. A região que continha a banda de cada uma das proteínas foi excisada da membrana e fragmentada. Os soros obtidos dos coelhos imunizados foram, inicialmente,

incubados (700 µl), por 24 horas a 4 °C com fragmentos de membrana contendo a proteína MBP, na tentativa de retirar os anticorpos gerados contra essa proteína. Após esse período, o sobrenadante da incubação foi retirado e armazenado. As membranas com a proteína VP1 foram submetidas a três lavagens de 10 minutos com PBS/Tween-20 0,05%, sendo posteriormente bloqueados por 30 minutos a 4 °C em uma solução contendo leite 5% em PBS 1X/ Tween-20 0,05%. Em seguida, adicionou-se às membranas, o sobrenadante da incubação do soro policlonal contra a MBP, e as amostras foram mantidas sob agitação por um período de 48 horas a 4 °C. Após essa etapa, foram realizadas, novamente, três lavagens das membranas de 10 minutos com PBS/Tween-20 0,05%, com posterior tratamento com solução ácida de glicina 0,1 M (pH 2,5), para a eluição do anticorpo específico. A solução foi então coletada e neutralizada com 20 µl de Tris-HCl 1 M pH 8,0, sendo acrescida de 200 µl PBS duas vezes concentrado. Os anticorpos purificados foram armazenados a -80 °C.

4.8 ENSAIOS DE *IMMUNOBLOT*

As membranas contendo lisados de células infectadas e células não-infectadas foram hidratadas com metanol e água, sendo posteriormente incubadas com soluções de leite 5% (desnatado, Molico) em PBS Tween-20 0,05%, 16 horas a 4 °C, no intuito de bloquear as regiões que não continham proteínas, evitando assim ligações inespecíficas dos anticorpos. No dia seguinte, as membranas foram incubadas com soluções de leite 1% em PBS/Tween-20 0,05%, contendo o anticorpo purificado anti-VP1 (1:500), sob agitação por uma hora a TA. Após a incubação, a membrana foi lavada três vezes (10 minutos/lavagem) com PBS/Tween-20 0,05%, sendo, posteriormente, incubada com o anticorpos secundário (anti-IgG de coelho) conjugado à peroxidase (1:10.000) em solução de leite 1% em PBS/Tween-20 0,05%. Após três lavagens, como descrito anteriormente, à membrana foi submetida à reação de quimioluminescência (ECL), e a membrana foi em seguida exposta a um filme (HyperfilmTM – Amersham Biosciences) por 2 e 7 minutos. O filme foi revelado por uma solução de dektol (1:2)

e fixado em solução de ácido acético.

4.9 VISUALIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS MONTADAS NO INTERIOR DAS CÉLULAS SF9

Para a visualização das VLPs montadas no interior das células de insetos Sf9, foram realizados inóculos semiaderentes em garrafas de 25 cm² com $1,4 \times 10^6$ células e eles foram infectados com os baculovírus recombinantes das três estratégias distintas em um MOI de 10, um dos inóculos não foi infectado para ser utilizado como controle negativo do experimento. Após 72 horas da infecção, as células foram fixadas por 72 horas, com uma solução de paraformaldeído 4%/gluteraldeído 2,5%/ cloreto de cálcio 5 mM (CaCl₂) em tampão cacodilato (0.1M, pH 7.2). As células fixadas foram lavadas com tampão cacodilato e pós-fixadas com uma solução de OsO₄ 1%/Ferr.K. 0,8%/CaCl₂/tampão cacodilato (0.1M, pH 7.2) por uma hora.

As células foram novamente lavadas e desidratadas progressivamente utilizando concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90%, 100% e 100% ultra pura). Após esse processo, os sedimentos celulares obtidos e fracionados em pedaços foram incubados com a resina EPON (Sigma). Inicialmente, cada fragmento foi colocado em uma proporção de 1:2 (epon: acetona ultra pura) por 24 horas, sendo substituído pela proporção 1:1 e posteriormente pelo EPON puro.

As amostras incluídas em EPON foram colocadas em estufa a 60 °C. Após 48 horas, os blocos com as amostras incluídas foram retirados da estufa e submetidos a cortes ultra-finos no ultramicrotomo utilizando lâmina de diamante. A visualização das células foi feita pelo microscópio eletrônico de transmissão da Fiocruz-PE (Tecnai Spirit Biotwin G2).

4.10 PURIFICAÇÃO DAS VLPS

Para purificação das VLPs, as células Sf9 foram cultivadas em quatro garrafas de 175 cm² com meio SF-900 II até uma confluência de 80%, quando foram infectadas com os baculovírus recombinantes (MOI 10), como descrito anteriormente e incubadas a 27 °C por 72 horas. Após esse período, elas foram coletadas (~9,6 x 10⁷ células), centrifugadas a 2000 *g* por 10 minutos e o *pellet* celular foi ressuspensionado em tampão de lise (1% de Triton X-100 em PBS 1x, acrescido de inibidor de protease 8x), sendo incubados por 30 minutos a 4 °C com agitação ocasional.

As amostras foram centrifugadas a 2000 *g* por 15 minutos, para a retirada das células que não lisaram e dos núcleos celulares. O sobrenadante obtido foi inserido sobre um colchão de 30% de sacarose (em PBS 1x) e centrifugado a 30.000 *g* por 100 minutos a 4 °C. O sobrenadante resultante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em PBS 1X. Essa solução foi aplicada a um gradiente descontínuo de sacarose 30-60% (em PBS 1X), feito 24 horas antes do experimento. O gradiente foi formado por uma camada da concentração de 60% seguida de mais seis camadas com 5% a menos de sacarose em cada (55%, 50%, 45%, 40%, 35% e 30%). A amostra sobre o gradiente foi então centrifugada a 30.000 *g* por 16 horas a 4 °C. As frações foram coletadas a partir da região superior, retirando 2 ml para cada uma delas, totalizando sete frações e armazenadas a -80 °C. Elas foram fracionadas em géis SDS-PAGE 15% e transferidas para membranas de PVDF (Immobilon-P Millipore). Essas membranas foram submetidas a ensaios de *immunoblot* com o anticorpo produzido em coelhos anti-VP1, com o intuito de verificar se a purificação das partículas foi bem sucedida e em quais frações coletadas do gradiente de sacarose elas poderiam ser encontradas em maiores quantidades.

5 RESULTADOS

5.1 REGIÕES VIRAIS SELECIONADAS

A primeira estratégia previamente desenhada compreende todas as proteínas responsáveis pela formação do capsídeo do HAV: VP4, VP2, VP3, VP1, 2A. Como essas regiões são traduzidas como uma poliproteína e precisam ser clivadas, foi inserida a protease 3C do HAV, que na poliproteína viral se autocliva e reconhece o sítio de clivagem entre 2A e VP1. Esta estratégia já havia sido construída em estudos prévios do nosso grupo e otimizada para expressão em células de mamíferos (SOUSA, 2011).

Após análise da literatura sobre VLPs do vírus FMDV (que possui uma formação de capsídeo com muitas semelhanças a do HAV), foi constatado que a expressão e formação das VLPs poderia ser mais eficiente se os genes necessários para a mesma fossem menores e estivessem separados. Como já existem vetores que permitem a clonagem de duas construções distintas em promotores fortes de baculovírus (como o pFastBac-Dual - Invitrogen™), para posterior expressão de ambas as construções simultaneamente, neste estudo foram delineadas estratégias para obtenção de VLPs do HAV, separando-se genes que são essenciais para a formação do capsídeo viral em duas ORFs independentes. Essas estratégias foram denominadas P1+3C e VP0+VP3-1.

A segunda estratégia compreende a sequência de todas as proteínas necessárias para a formação do capsídeo do HAV (VP4-VP2-VP3-VP1-2A), clonadas no promotor pH, enquanto a sequência da protease 3C foi separada, sendo clonada no promotor p10. Assim a protease 3C não teria que se autoclivar para dar início às clivagens das proteínas de interesse.

Na estratégia três, o precursor VP0 (VP4-VP2) foi separado das proteínas VP3 e VP1. Além disso, o sítio catalítico da protease 2A de FMDV foi inserido entre as sequências para as proteínas VP3 e VP1, a região 2A de HAV foi mantida após a VP1 para que a protease de FMDV reconheça o primeiro ponto de clivagem e para a manutenção do sinal de montagem do capsídeo do HAV, que evidências da literatura suportam estar relacionado a proteína 2A do vírus. Nesta construção a

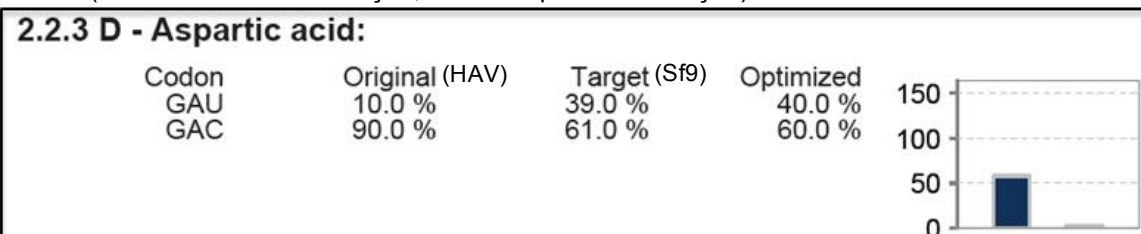
protease 3C não foi expressa, pois a o sítio de clivagem da protease 2A de FMDV inserido teve o papel de efetuar as clivagens necessárias para o processamento das proteínas virais.

5.2 CONSTRUÇÕES OTIMIZADAS

As sequências de DNA das estratégias 2 e 3 foram otimizadas com o algoritmo genético do programa LETO 1.0 (Entelechon). O programa analisa as sequências levando em conta diversos parâmetros biológicos, como: codon usage, distribuição do conteúdo de GC, motivos repetitivos de DNA, estrutura secundária do mRNA, etc. Para uma alta eficiência de expressão da construção otimizada, é preciso que esses parâmetros estejam o mais próximo possível do equilíbrio, de acordo com o algoritmo do programa. A análise do programa demonstrou uma discrepância entre a frequência da maioria dos códons utilizados pelo HAV em relação aos utilizados por células de insetos Sf9, para expressar aminoácidos semelhantes que compunham as proteínas de interesse.

A Figura 16 representa o ácido aspártico, um dos aminoácidos no processo de otimização do *codon usage* do HAV para expressão das sequências na célula de inseto de interesse, que necessitou de uma alteração de códons utilizados para sua expressão. Dos dois códons possíveis para expressar o ácido aspártico (GAU, GAC), o HAV faz uso quase exclusivo do códon GAC (90%). Já no organismo alvo (*Spodoptera frugiperda*), o códon GAU também é utilizado com frequência (39%), assim o aminoácido não é expresso pela predominância de um códon apenas. Nesse caso, a otimização foi tão eficiente que na sequência obtida o códon GAC codifica o aminoácido 60% das vezes, enquanto o GAU em torno de 40% das vezes. A barra azul, indicada no gráfico, representa a discrepância entre os códons utilizados pelo vírus para expressar o ácido aspártico, em relação aos possíveis códons utilizados para expressar o mesmo aminoácido em insetos. Quanto maior for a barra, maior é a diferença entre os *codon usage* das espécies comparadas. Após o processo de otimização, ou seja, após a melhor distribuição dos códons para facilitar a expressão em células Sf9, o tamanho da barra foi reduzido consideravelmente (barra verde). Além do ácido aspártico, todos os outros códons das sequências trabalhadas, também, foram alterados quando necessário.

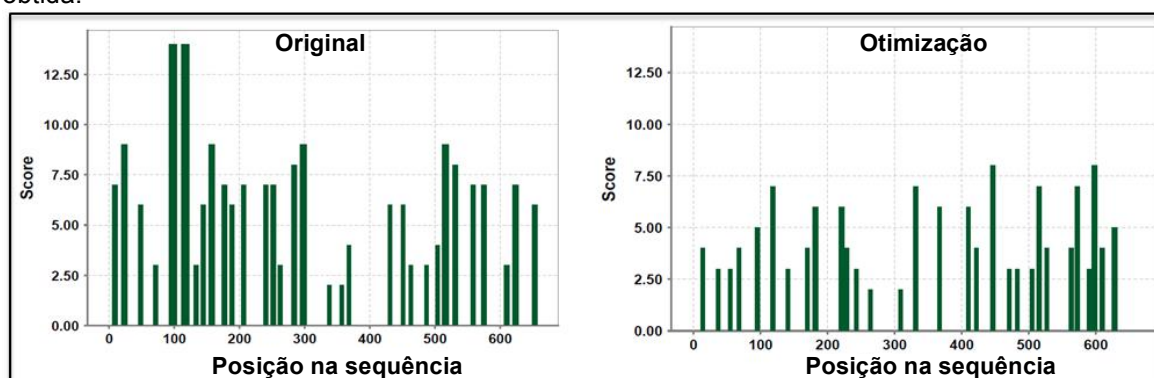
Figura 16 – Otimização de *codon usage* do vírus da hepatite A (HAV) para células de insetos Sf9. A sequência de HAV está representada como original, onde os dois códons (GAU, GAC) são utilizados com frequências discrepantes (10 e 90% respectivamente) para expressar o aminoácido ácido aspártico. Por outro lado, o organismo alvo (*Spodoptera frugiperda* 9 – *target*) utiliza o códon GAU em uma frequência consideravelmente mais alta do que visto no vírus (39%). A sequência otimizada (*optimized*) apresentou, portanto, uma frequência dos códons praticamente semelhante à utilizada em insetos. As barras indicam a discrepância entre os códons usuais da sequência original e a alvo (azul – antes da otimização; verde – após a otimização).



Fonte: Leto Report (2012).

O tamanho e a quantidade de estruturas secundárias do RNA mensageiro também podem influenciar de forma negativa a tradução e obtenção das proteínas de interesse. A presença dessas estruturas pode prejudicar tanto o deslizamento dos ribossomos, ao longo do mRNA, como também o acesso dos anti-códons dos tRNAs aos seus respectivos códons. O processo de otimização também contribui para a redução do número e do comprimento destas estruturas *hairpin-like*, visando aumentar a eficiência da síntese protéica. Segue como exemplo, a otimização da sequência da protease 3C do HAV (Figura 17).

Figura 17 – Otimização das estruturas secundárias do mRNA da sequência gênica da protease 3C do HAV. O número de hélices presentes na sequência original foi reduzido de 16 para 15 na sequência otimizada. O comprimento médio das hélices caiu de 6.56 para 5.40 após o processo. É possível observar a remoção de estruturas secundárias relativamente grandes na sequência final obtida.



Fonte: O Autor (2017).

As sequências foram ainda avaliadas quanto à distribuição do conteúdo de GC, visando à obtenção de estruturas mais estáveis, e quanto à presença de sítios

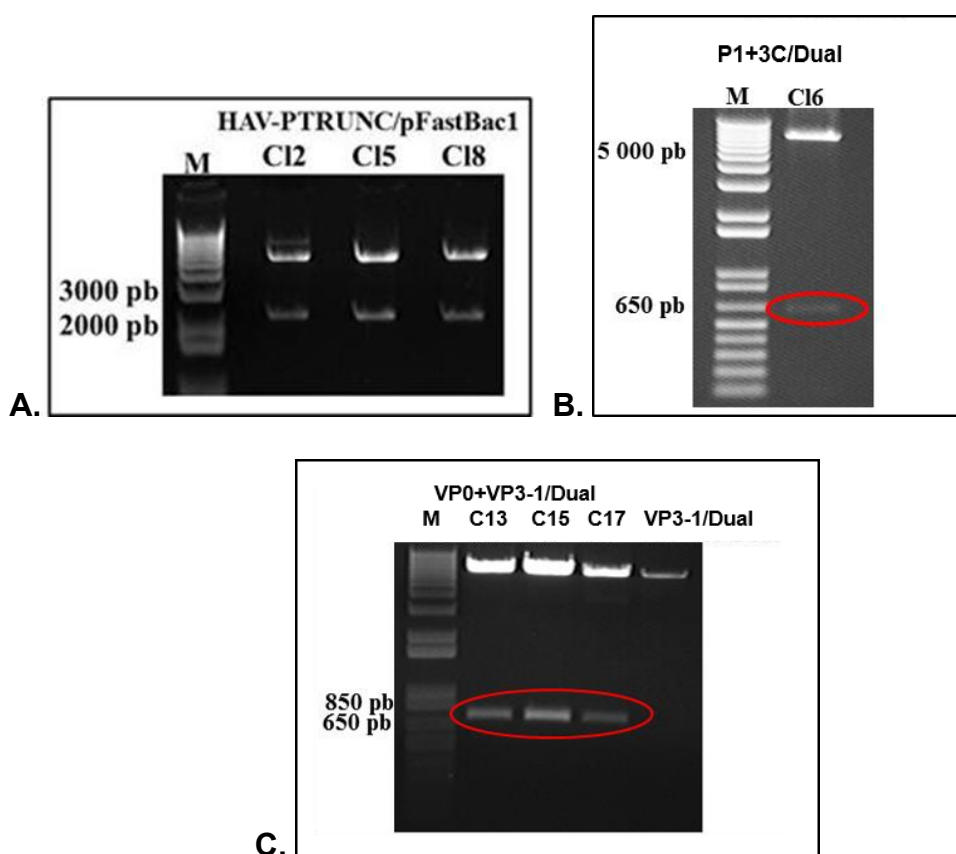
internos de restrição, para permitir as estratégias de subclonagem. A sequência final obtida foi novamente analisada e enviada para síntese comercial.

5.3 CONSTRUÇÕES OBTIDAS POR TRANSPOSIÇÃO SÍTIO-ESPECÍFICA

Os genes otimizados foram enviados para a síntese (Geneart®) e recebidos já clonados em vetores comerciais com identidade das sequências verificadas. Estes vetores foram preparados em larga escala e submetidos a provas de digestão para confirmar a presença dos genes de interesse. Todos os vetores digeridos liberaram os fragmentos de tamanhos esperados: P1-2A (VP0-VP3-VP1-2AHAV: 2514 pb), 3C (3C: 660 pb), VP0 (VP0: 741 pb), VP3-1 (VP3-2AFMDV-VP1-2AHAV: 1845 pb).

As construções HAV-PRTUNC, P1+3C e VP0+VP3-1 foram clonadas nos vetores pFastBac1 (estratégia 1) e pFastBac-Dual (estratégias 2 e 3). Os genes que continham mais pares de bases foram clonados no promotor mais forte, denominado poliedrina (polh), enquanto os menores genes foram ligados ao outro promotor do baculovírus (p10), também considerado eficiente. Os clones obtidos da estratégia 1, ligados ao pFastBac1, tiveram seus DNAs extraídos e submetidos a provas de digestão com as enzimas de restrição *Pst*I / *Sac*I, que clivaram sítios internos do inserto e do vetor respectivamente, liberando as bandas resultantes no tamanho esperado de 5.656 e 2.360 pb (Figura 18A). Para as estratégias 2 e 3, as construções P1 e VP3-1 foram ligadas em sítios adjacentes ao promotor da poliedrina e os clones obtidos foram clivados com as enzimas *Sac*I e *Xba*I. Após a confirmação da clonagem, os DNAs dos clones selecionados foram extraídos em larga escala e utilizados para subclonagens, dessa vez dos genes 3C e VP0 no promotor p10. A verificação das construções recombinantes foi realizada com a clivagem pelas enzimas *Nhe*I / *Kpn*I e a identidade dos fragmentos foi confirmada por migração em gel de agarose 1%, onde foi possível visualizar que as construções liberaram os fragmentos nos tamanhos corretos, 660 pb para a 3C e 741 pb para VP0 (Figura 18B/C).

Figura 18 – Confirmação das clonagens das construções HAV-PTRUNC, P1+3C e VP0+VP3-1 nos vetores pFastBac1/pFastBac-Dual. **A.** Os clones da construção HAV-PTRUNC/pFastBac1 foram submetidos a reações de digestão com as enzimas *Pst*I e *Sac*I, liberando as bandas de 2.360 pb e 5656 pb. **B.** A sequência P1 foi inicialmente clonada no vetor pFastBac-Dual, na região do promotor da poliedrina e os clones foram confirmados com reações utilizando as enzimas de restrição *Sac*I e *Xba*I. O gene correspondente a proteína 3C foi então clonado no promotor p10 e sua clonagem foi confirmada através de reações de digestão com as enzimas *Nhe*I e *Kpn*I, que liberaram o fragmento de interesse de 666 pb (destacado em vermelho). **C.** Para confirmação da clonagem do gene correspondente a proteína VP0 na região adjacente ao promotor p10 da construção VP3-1/pFastBac-Dual, os clones recombinantes foram clivados com as enzimas *Nhe*I e *Kpn*I, que liberaram o fragmento de interesse (destacado em vermelho), que contém 741 pb. M- marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (InvitrogenTM), em pares de bases (pb). Cl- clones.



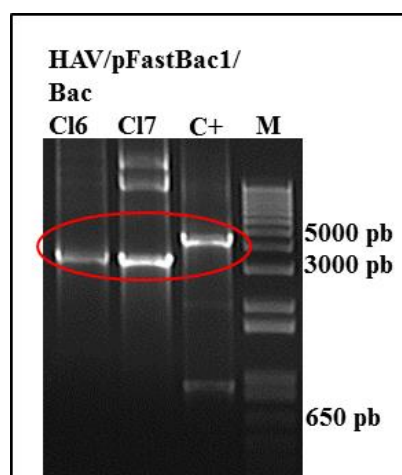
Fonte: O Autor (2017).

5.4 BACMÍDEOS RECOMBINANTES

Os bacmídeos isolados dos clones recombinantes foram confirmados por PCR, tanto com *primers* específicos para as sequências do HAV, quanto com os *primers* M13, que podem se anelar apenas ao bacmídeo, resultando em uma banda de 300 pb. Se houver alguma sequência transposta será gerado um fragmento maior (correspondente ao tamanho do vetor 2300 pb para o pFastBac1 e 2560 pb no pFastBac-Dual + 300 pb do bacmídeo + tamanho do inserto).

Na estratégia 1 foram realizadas PCRs com *primers* específicos (*foward* e *reverse*) para amplificar a construção HAV-PTRUNC (que possui 3267 pb), enquanto o controle positivo pFast-Bac-Gus foi amplificado com *primers* M13 (Figura 19). As reações em cadeia de polimerase confirmaram a transposição das sequências de interesse, e, conseqüentemente, a obtenção de bacmídeos recombinantes HAV-PTRUNC/pFastBac1/Bac e pFastBac-Gus, utilizado como controle positivo da transposição.

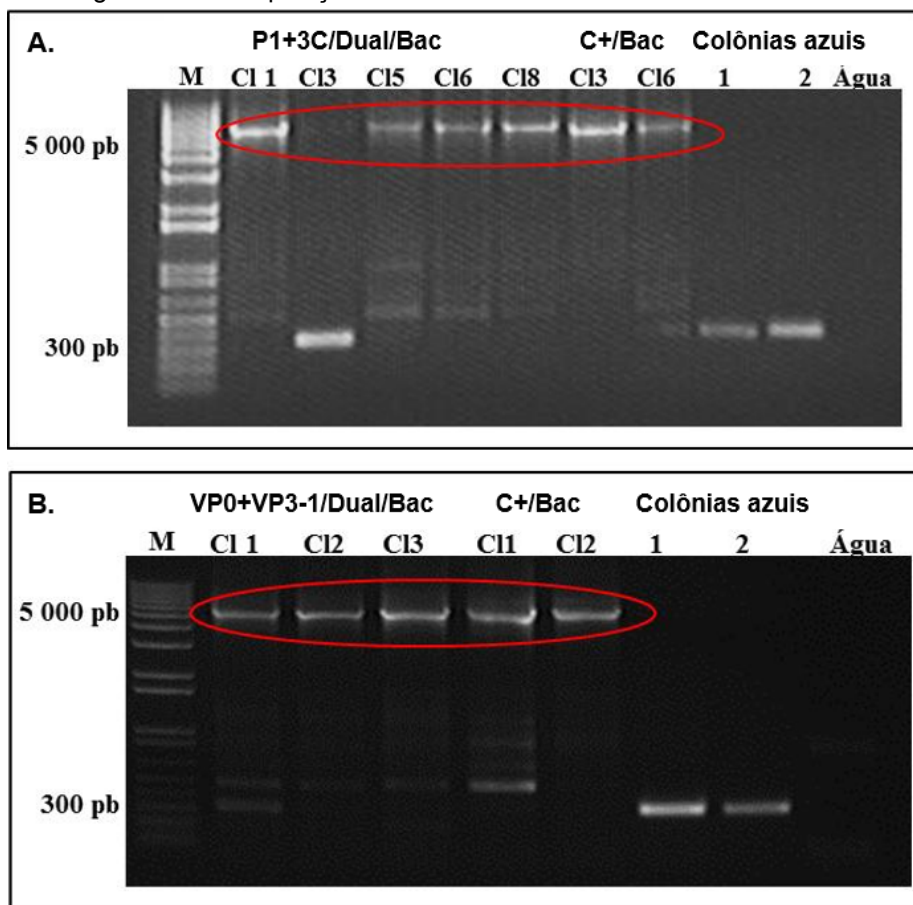
Figura 19 – Confirmação da obtenção dos bacmídeos contendo HAV-PTRUNC. Os bacmídeos obtidos foram submetidos a reações de PCR, sendo posteriormente fracionados em gel de agarose a 1%. As amostras HAV-PTRUNC/pFastBac1/Bac foram amplificadas com *primers* (*foward* e *reverse*), para a construção HAV e apresentaram bandas correspondentes ao tamanho da construção (3267 pb). O bacmídeo do controle positivo pFastBac-GUS (C+) foi amplificado na PCR com *primers* M13 e a banda visualizada foi de ~4200 pb, o esperado na transposição do inserto. M- marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™) em pares de bases (pb). CI- clones.



Fonte: O Autor (2017).

Nas estratégias 2 e 3 foram realizadas PCRs com os *primers* M13 (*foward* e *reverse*), utilizando também um novo controle positivo denominado pFastBac-Dual-GUS/CAT. As reações em cadeia de polimerase confirmaram a transposição das sequências de interesse, e, conseqüentemente, a obtenção de bacmídeos recombinantes P1+3C/Dual/Bac, VP0+VP3-1/Dual/Bac e CAT/Dual/Bac (Figura 20).

Figura 20 – Confirmação da obtenção dos bacmídeos contendo P1+3C e VP0+VP3-1. Os bacmídeos obtidos foram submetidos a reações de PCR, sendo posteriormente fracionados em gel de agarose a 1%. **A.** As amostras P1+3C/Dual/Bac foram amplificadas com *primers* M13(*foward e reverse*) e apresentaram bandas de ~5734 pb (que correspondem às regiões citadas acima). **B.** As amostras VP0+VP3-1/Dual/Bac foram amplificadas com *primers* M13 (*foward e reverse*) e apresentaram bandas de ~5146 pb correspondentes a região que o *primer* amplifica do bacmídeo + parte do vetor pFastBac-Dual (2560 pb) + tamanho do inserto clonado. O bacmídeo do controle positivo pFastBac-Dual-GUS/CAT foi amplificado na PCR com *primers* M13 e a amostra apresentou no gel a banda de ~5340 pb esperada na transposição dessa região para o bacmídeo. M- marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™) em pares de bases (pb); Cl- clones; Colônias azuis- controle negativo da transposição.



Fonte: O Autor (2017).

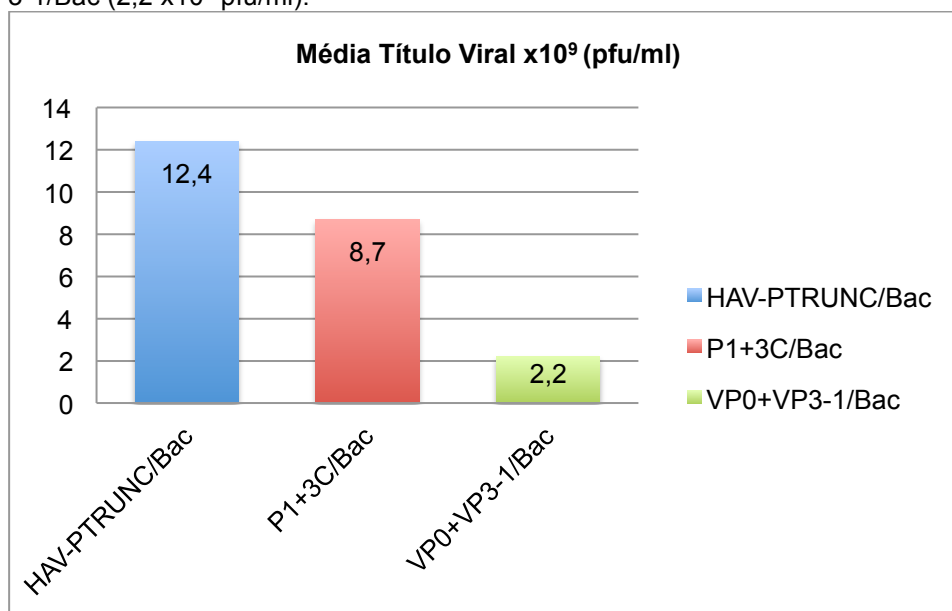
5.5 BACULOVÍRUS RECOMBINANTES

As células Sf9 transfectadas com os bacmídeos recombinantes HAV-PTRUNC/pFastBac1/Bac, P1+3C/Dual/Bac e VP0+VP3-1/Dual/Bac, apresentaram sinais de infecção com baculovírus claros (efeitos citopáticos como aumento nuclear) quando visualizadas em microscópio óptico, cerca de sete dias após a transfecção. A partir dessa observação, o sobrenadante viral foi transferido para placas com novas células no intuito de expandir o estoque de baculovírus P1 para

uma futura titulação. Após 72 horas de infecção o sobrenadante foi coletado e armazenado a 4°C (onde os baculovírus ficam mais estáveis, sem reduzir drasticamente a sua titulação).

A titulação dos vírus recombinantes foi obtida através da técnica de diluição limitante (*end-point dilution*) realizada em triplicata. Os títulos virais dos baculovírus recombinantes foram relativamente altos, com mais de 10^9 pfu/ml, o que já era esperado já que os baculovírus quando cultivados em condições ideais são obtidos em quantidades superiores a 10^8 pfu/ml.

Figura 21. Média dos títulos virais obtidos em ensaios de diluição limitante. Títulos virais realizadas em triplicata. A barra azul corresponde ao título final do vírus HAV-PTRUNC/Bac ($12,4 \times 10^9$ pfu/ml); a vermelha representa o título do vírus P1+3C/Bac ($8,7 \times 10^9$ pfu/ml) e a verde o vírus VP0+VP3-1/Bac ($2,2 \times 10^9$ pfu/ml).



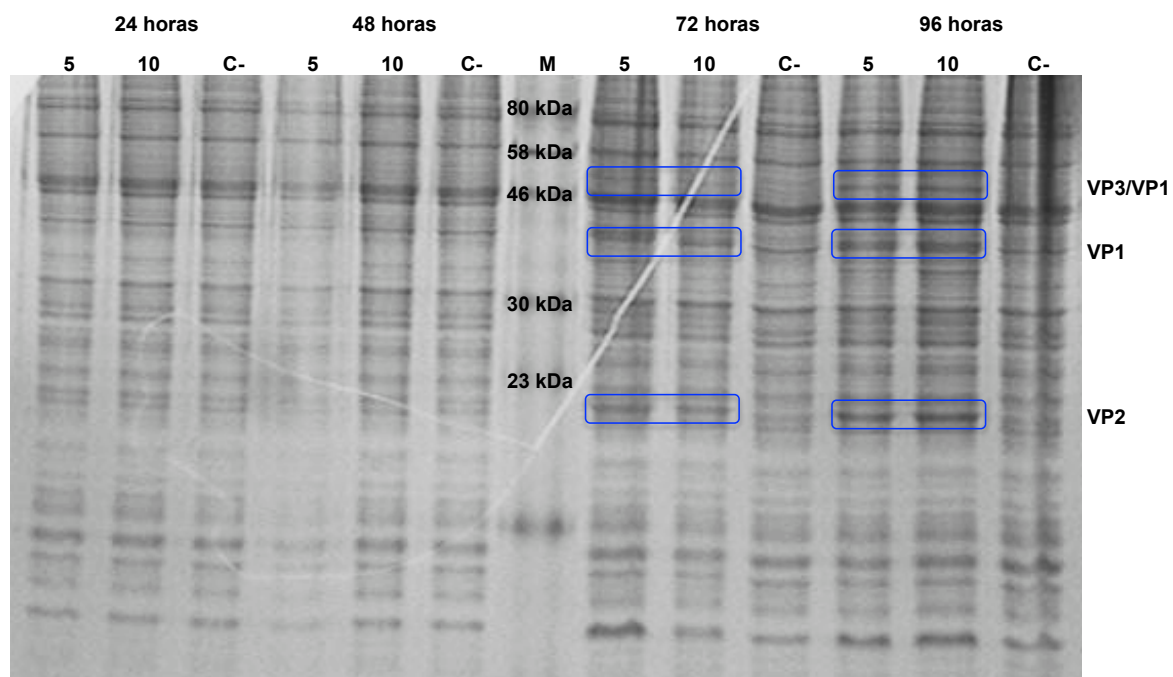
Fonte: O Autor (2017).

Os títulos elevados obtidos mostram uma das vantagens de utilizar o sistema de insetos/baculovírus para expressão de proteínas exógenas, pois os vírus recombinantes foram coletados em 50 ml do sobrenadante da cultura de células infectadas para cada construção. Quantidade suficiente para todo o trabalho que incluiu diversos ensaios de expressão e purificação das proteínas. Mesmo nas condições de expressão em larga escala utilizando MOI de 10, o volume viral utilizado foi relativamente baixo.

5.6 ENSAIOS DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

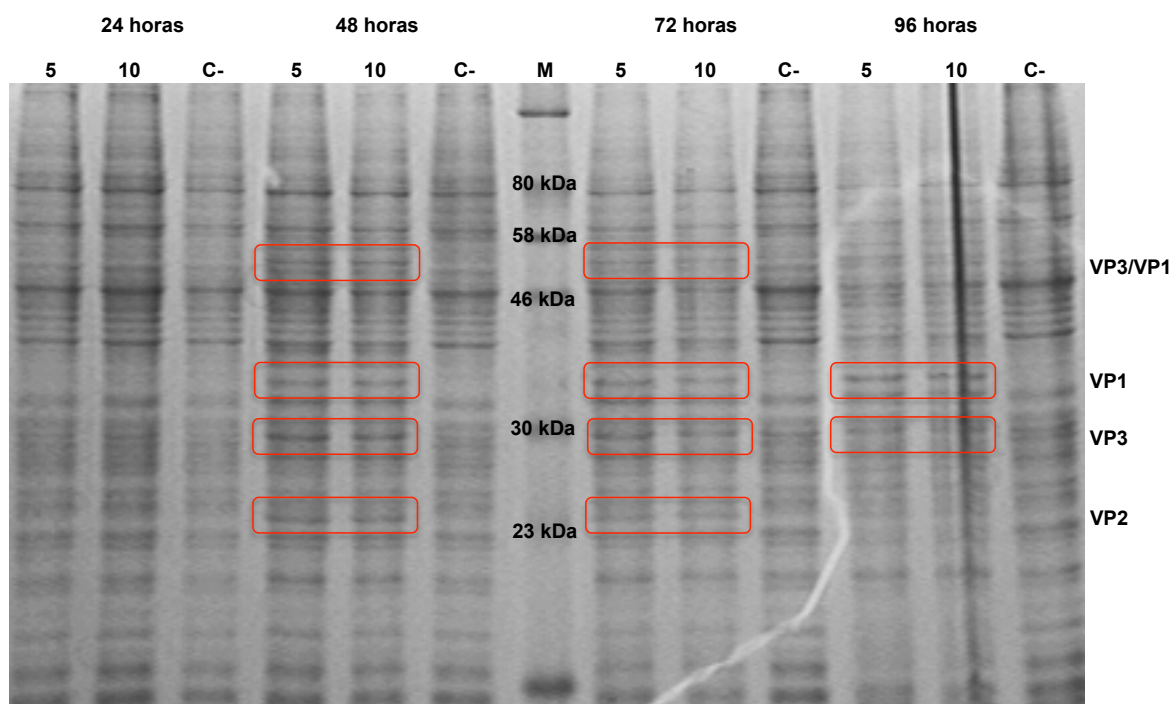
O MOI viral é um fator relevante na quantidade final de proteínas obtidas em sistema de baculovírus/células de insetos, já que ele corresponde à média de partículas infecciosas que infectará uma célula. Sendo assim, a expressão das proteínas de interesse foi testada utilizando os MOIs virais 5 e 10 em tempos distintos de infecção (24, 48, 72, 96 e 120 horas). Em todos os testes realizados, as proteínas do HAV foram expressas e processadas, sendo possível visualizá-las através do fracionamento dos lisados celulares em géis SDS-PAGE. Em geral, a expressão e processamento das proteínas foram identificados 48 horas após a infecção das células, com exceção da estratégia 1, que só apresentou as proteínas processadas a partir de 72 horas da infecção (possivelmente devido ao tamanho da poliproteína gerada por essa construção). Embora não tenham havido diferenças tão significantes quanto ao nível de expressão das construções (com a terceira estratégia tendo sendo um pouco mais eficiente que as duas primeiras), a melhor condição para obtenção das proteínas recombinantes foi a utilização do MOI de 10 com uma infecção de 72 horas. Essa condição apresentou expressão de proteínas, sem degradação e com o processamento adequado. As Figuras 22, 23 e 24 mostram ensaios de expressão utilizando os MOIs 5 e 10 em tempos distintos da infecção, elas correspondem à primeira, segunda e terceira estratégias, respectivamente.

Figura 22. Ensaio de expressão da estratégia 1-HAV-PTRUNC. As células Sf9 foram infectadas com MOIs virais de 5 (5) e 10 (10), sendo coletadas 24, 48, 72 e 96 horas após a infecção. Elas foram lisadas e posteriormente fracionadas em gel SDS-PAGE 15%. Células não-infectadas foram utilizadas como controle negativo (C-). Proteínas VP2 e VP1 do HAV (destacadas em azul). M-marcador de peso molecular (kDa) *ColorPlus™ Prestained Marker (New England Biolabs®)*. Visualização com Azul de Comassie.



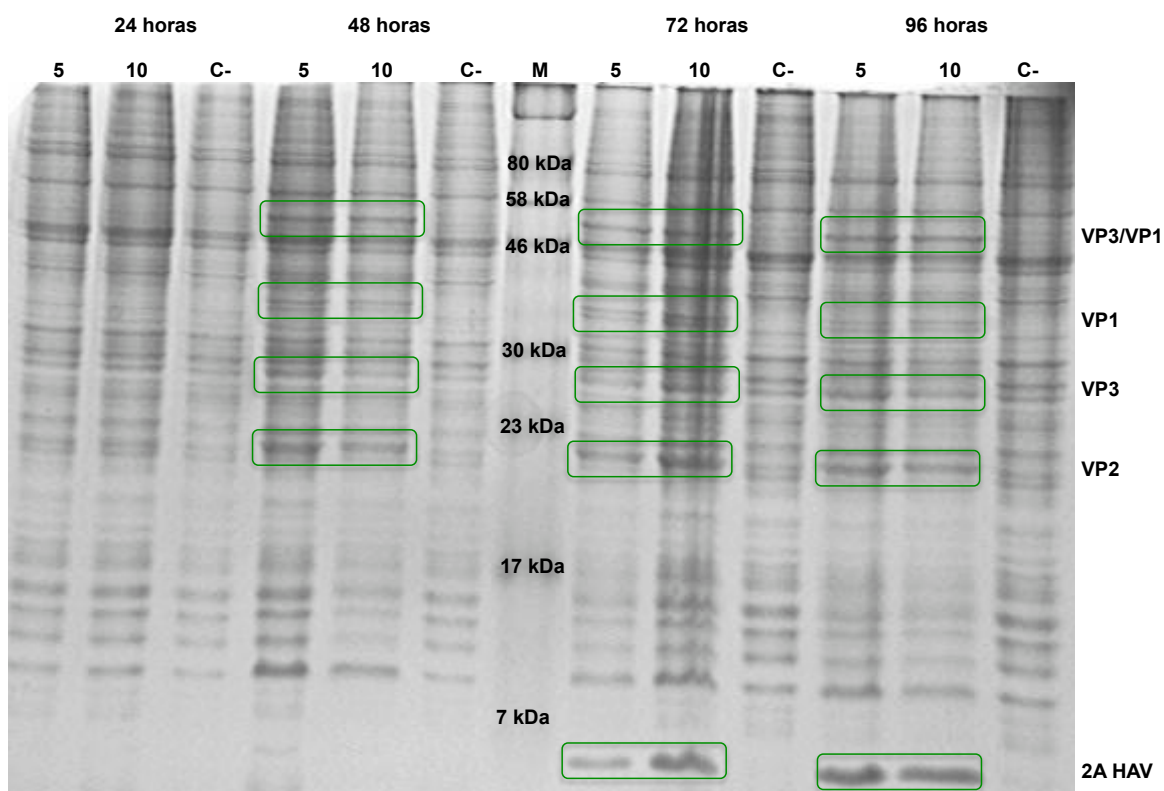
Fonte: O Autor (2017).

Figura 23. Ensaio de expressão da estratégia 2-P1+3C. As células Sf9 foram infectadas com MOIs virais de 5 (5) e 10 (10), sendo coletadas 24, 48, 72 e 96 horas após a infecção. Elas foram lisadas e posteriormente fracionadas em gel SDS-PAGE 15%. Células não-infectadas foram utilizadas como controle negativo (C-). Proteínas VP2, VP3, VP1 e uma poliproteína que corresponderia a VP3/VP1 (destacadas em vermelho). M- marcador de peso molecular (kDa) *ColorPlus™ Prestained Marker* (New England Biolabs®). Visualização com Azul de Comassie.



Fonte: O Autor (2017).

Figura 24. Ensaio de expressão da estratégia 3-VP0+VP3-1. As células Sf9 foram infectadas com MOIs virais de 5 (5) e 10 (10), sendo coletadas 24, 48, 72 e 96 horas após a infecção. Elas foram lisadas e posteriormente fracionadas em gel SDS-PAGE 15%. Células não-infectadas foram utilizadas como controle negativo (C-). Proteínas VP2, VP3, VP1, poliproteína VP3/VP1 e a proteína 2A (destacadas em verde). M- marcador de peso molecular (kDa) *ColorPlus™ Prestained Marker* (New England Biolabs®). Visualização com Azul de Coomassie.

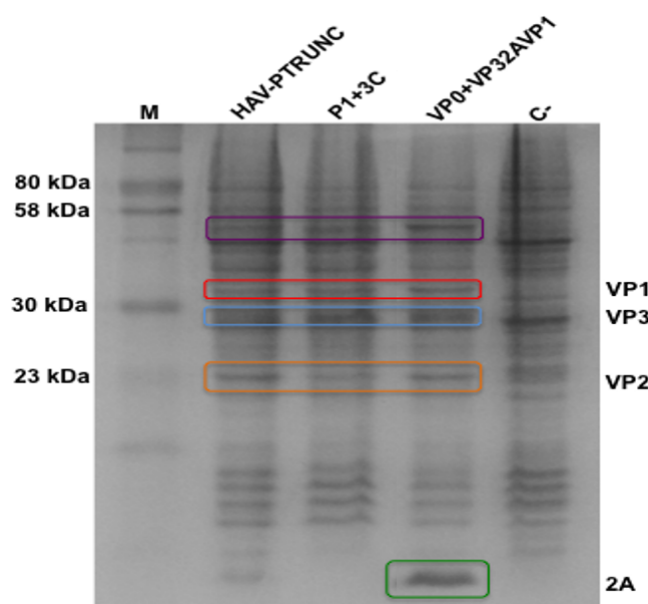


Fonte: O Autor (2017).

A terceira estratégia resultou em quantidades mais elevadas de proteínas expressas, provavelmente, devido à separação dos genes correspondentes às proteínas do capsídeo viral em dois promotores distintos.

A Figura 25 mostra o perfil de expressão das proteínas de HAV em lisados celulares coletados 72 horas após a infecção de células Sf9 com MOI 10, a melhor condição encontrada dos baculovírus recombinantes gerados pelas três estratégias. As proteínas de capsídeo do HAV VP1, VP2 e VP3 foram expressas e processadas com sucesso. O rendimento obtido foi de aproximadamente 1 µg/L de cada uma das proteínas estruturais para 5×10^5 células Sf9 infectadas. Na terceira estratégia, ainda é possível observar a proteína 2A, indicando que a separação dos genes das proteínas estruturais em promotores distintos colaborou para expressão mais efetiva e processamento mais completo das proteínas de interesse.

Figura 25. Expressão e processamento das proteínas do HAV em células Sf9. Os lisados das células Sf9 infectadas com baculovírus recombinantes em um MOI de 10 por 72 horas foram acrescidos de LE2x e fracionados em géis SDS-PAGE 15%. As proteínas de interesse foram expressas e clivadas (em VP1, VP3, VP2 e 2A) como é possível observar na foto acima. M- marcador de peso molecular (kDa) *ColorPlus™ Prestained Marker (New England Biolabs®)*, HAV-PTRUNC – lisado celular da primeira estratégia, P1+3C – lisado celular da segunda estratégia, VP0+VP3-1 – lisado celular da terceira estratégia, C- células Sf9 não infectadas mantidas em cultura pelo mesmo período das células infectadas. Proteína: VP1 (destacada em vermelho ~33 kDa), VP3 (destacada em azul ~27 kDa), VP2 (destacada em alaranjado ~24 kDa) e 2A (destacada em verde ~5 kDa). Visualização com Azul de Coomassie.

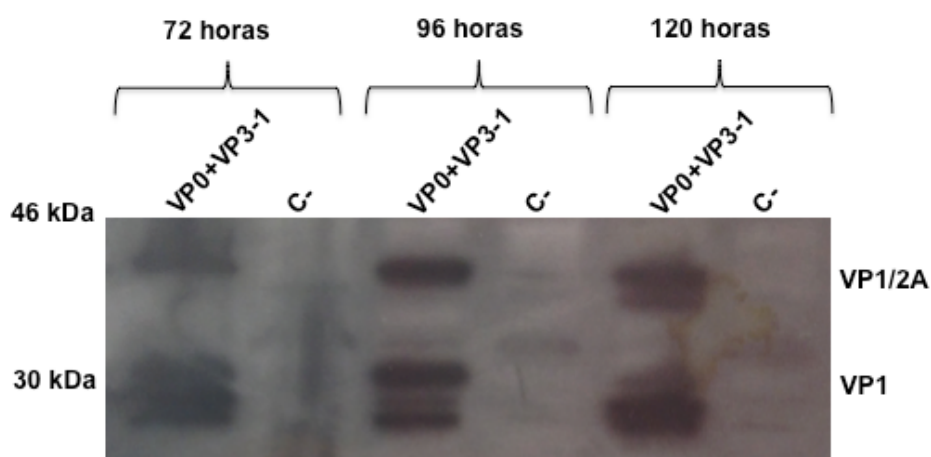


Fonte: O Autor (2017).

A expressão das proteínas também foi avaliada através da imunodetecção com o anticorpo anti-VP1. Quando os testes de *immunoblot* com o anticorpo anti-VP1 foram realizados, apenas as proteínas VP1 da estratégia 3 foram reconhecidas. Isso pode ter ocorrido pelo fato do anticorpo reconhecer uma região da proteína recombinante que não estava exposta, ou apresentava a conformação divergente da normalmente reconhecida em ensaios imunológicos, visto que nos fracionamentos em géis SDS-PAGE foi possível observar que a proteína VP1 foi expressa e processada em todas as estratégias existentes. Os lisados celulares da estratégia VP0+VP3-1 obtidos após 72, 96 e 120 horas de infecção das células Sf9 com MOI 10 de baculovírus, foram transferidos para membrana de PVDF no intuito de verificar o reconhecimento da proteína VP1 pelo anticorpo anti-VP1 ao longo da infecção. Em todas as frações analisadas foi possível observar a proteína no seu tamanho esperado ~33 kDa e na altura de ~40 kDa que corresponderia ao complexo 2AFMDV-VP1-2AHAV (Figura 26). No entanto, ela parece estar sendo degradada com o passar do tempo, fenômeno que pode ter ocorrido pela ação de proteases

celulares que atuam na fase mais tardia da infecção viral. Esse fenômeno pode ser evitado coletando as células infectadas para o processamento com cerca de 72 a 96 horas de infecção.

Figura 26. Análise por *immunoblot* dos lisados de células infectadas com baculovírus da terceira estratégia. Os lisados de células Sf9 infectadas com VP0+VP3-1/Bac e células não-infectadas foram coletados após 72, 96 e 120 horas do início da infecção. Eles fracionados em gel de SDS-PAGE 15%, posteriormente transferido para membrana de PVDF e submetidas a um *immunoblot*. O ensaio resultou no reconhecimento da proteína viral VP1 inicialmente no seu tamanho correto (~33 kDa) e depois apresentando degradação. Também foi reconhecida uma banda de ~40 kDa que corresponderia à proteína VP1 ainda ligada a protease 2A de FMDV e a proteína 2A do HAV.

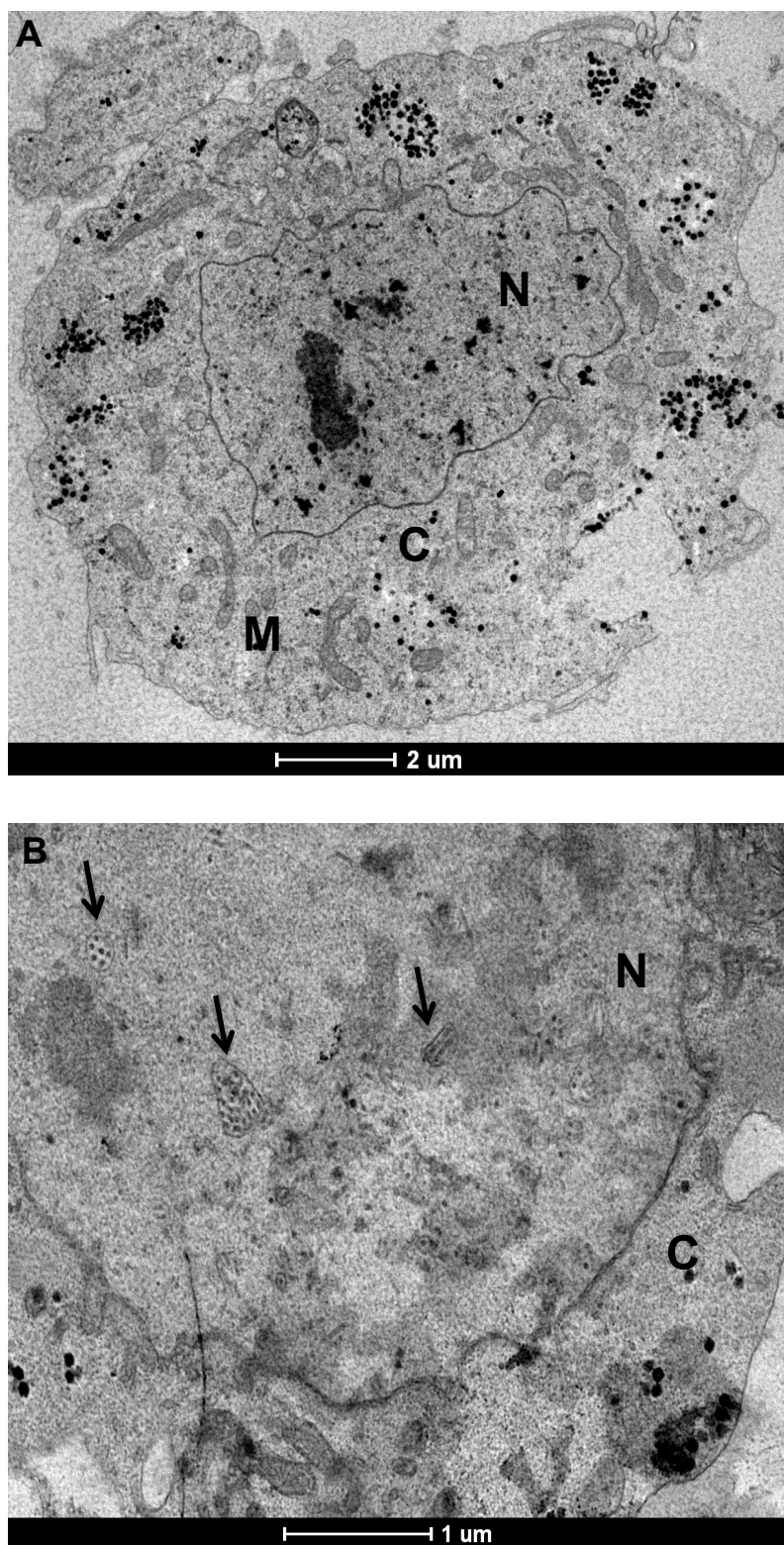


Fonte: O Autor (2017).

5.7 VISUALIZAÇÃO DAS VLPS NO INTERIOR DAS CÉLULAS DE INSETOS

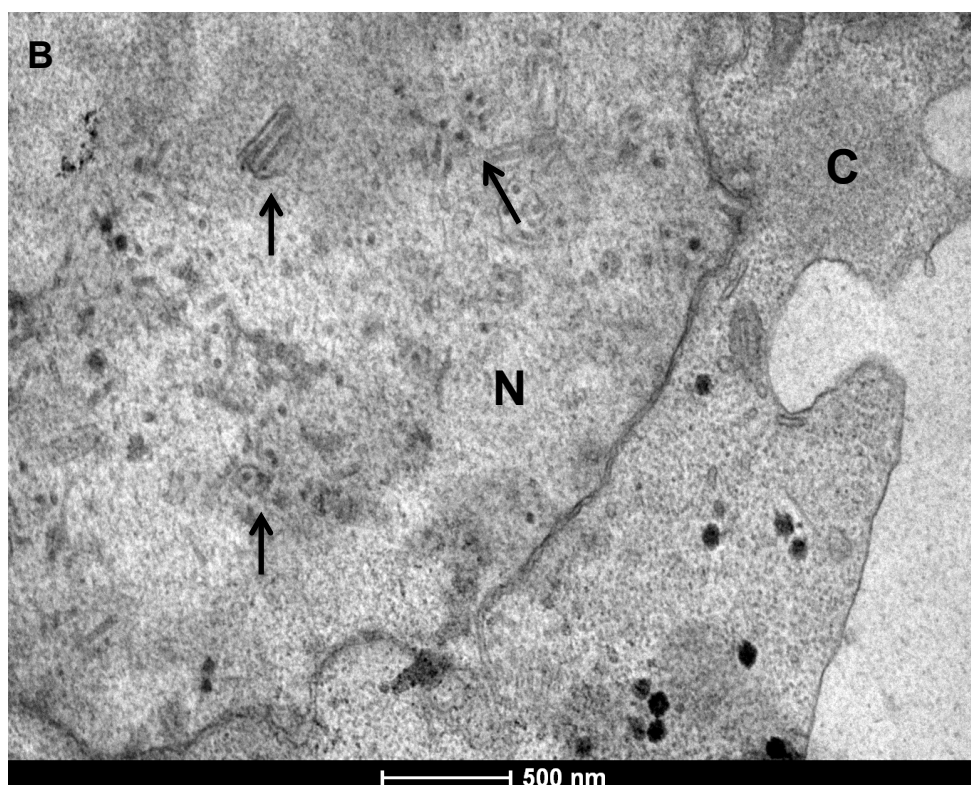
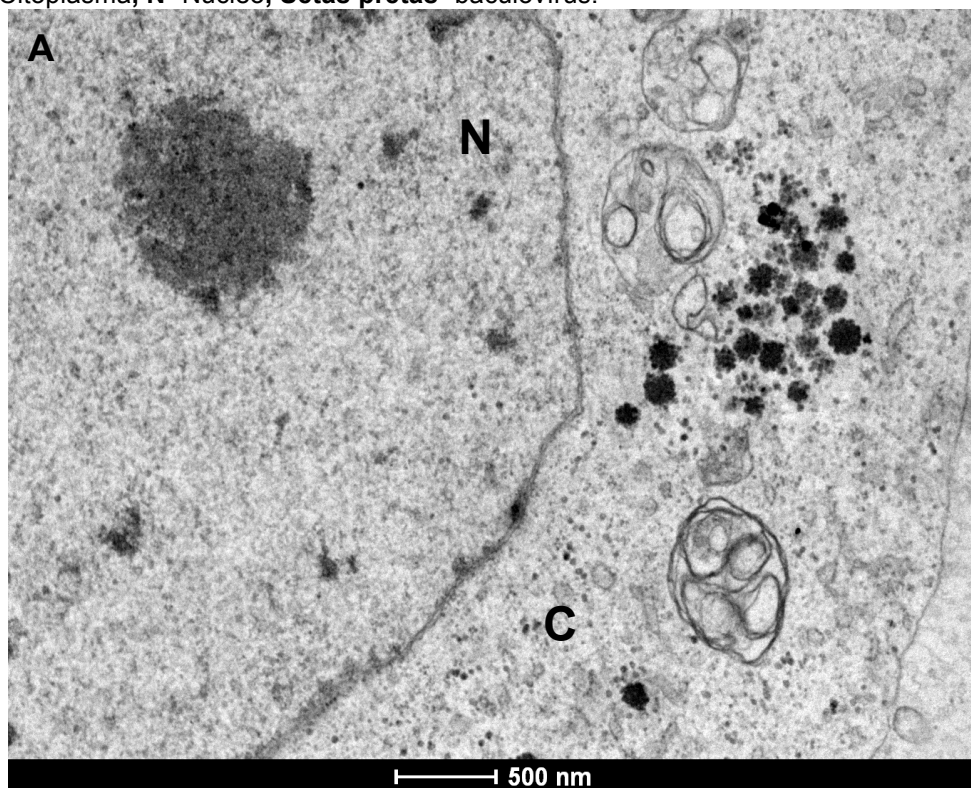
As células de insetos infectadas com baculovírus recombinantes contendo a estratégia 3 (VP0+VP3-1) foram preparadas para análise por microscopia eletrônica de transmissão, com o intuito de verificar a montagem das proteínas, comprovadamente expressas do vírus da hepatite A, em VLPs. Como controle negativo foram utilizadas células Sf9 não-infectadas mantidas nas mesmas condições. A morfologia das células infectadas foi claramente diferente da apresentada por células que não foram incubadas com o vírus. Elas apresentaram o núcleo expandido e no interior dele foi possível visualizar os baculovírus (200 a 450 nm de comprimento e 30 a 100 nm de diâmetro) sendo formados, como pode ser observado nas Figuras 27 e 28. Já a Figura 29 mostra o citoplasma de uma célula infectada, onde foram identificadas as VLPs do HAV. As partículas possuem o tamanho esperado de, aproximadamente, 30 nm e aparentam apresentar simetria icosaédrica, a mesma exibida pelo vírus de interesse.

Figura 27. Morfologia de células Sf9 não-infectadas (A) e infectadas com os baculovírus recombinantes (B). Células Sf9 foram cultivadas e posteriormente infectadas com VP0+VP3-1/BAC, ou não, sendo coletadas 72 horas após a infecção. **C-** Citoplasma, **M-** mitocôndria, **N-** Núcleo, **Setas pretas-** baculovírus.



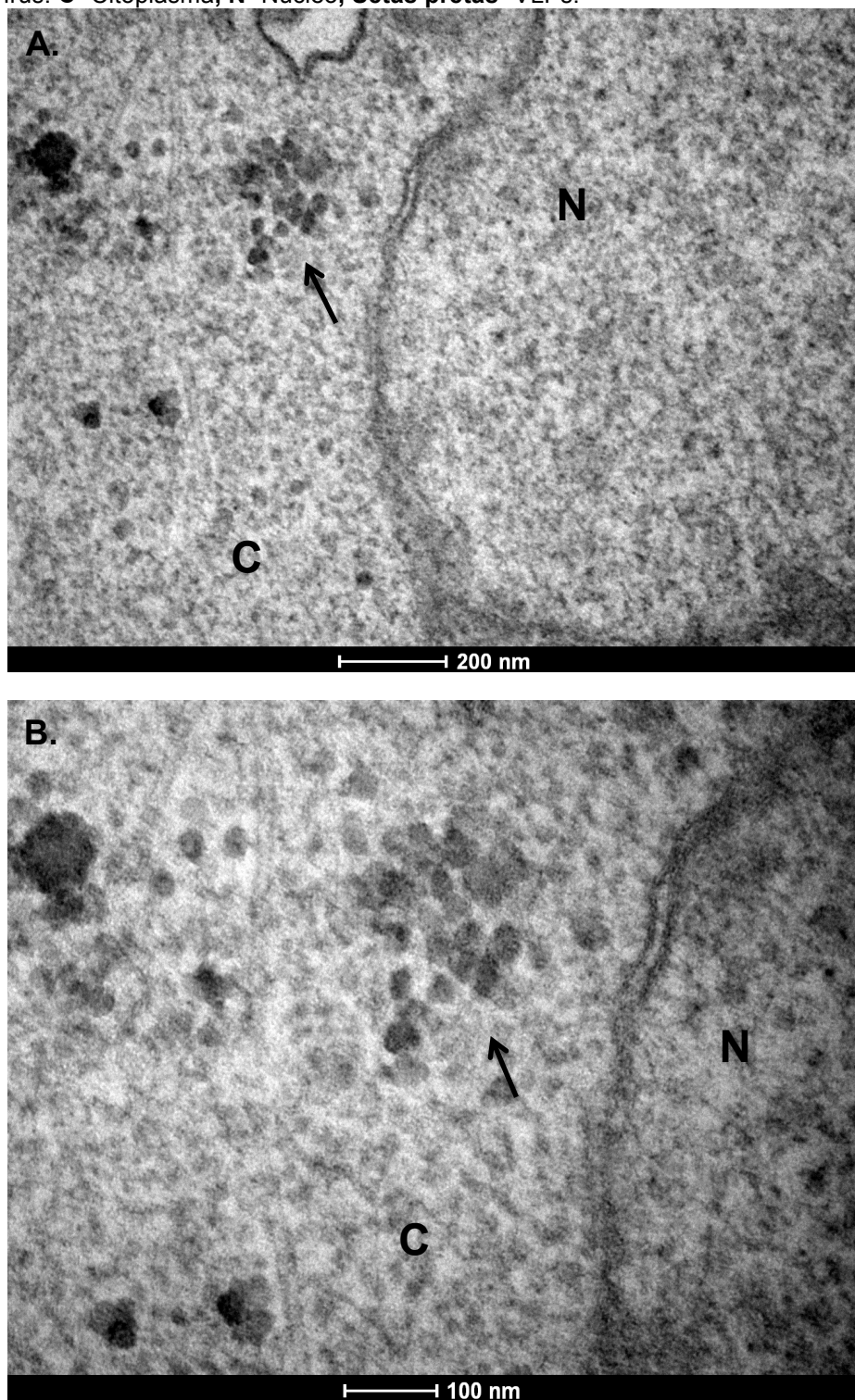
Fonte: O Autor (2017).

Figura 28. Eletromicrografia de células Sf9 não-infectadas (A) e infectadas com baculovírus recombinantes (B). As imagens mostram as diferenças apresentadas nas regiões nucleares e citoplasmáticas de células Sf9 não-infectadas (A) e infectadas com baculovírus recombinantes VP0+VP3-1/Bac (B). A infecção e produção de novos vírions leva ao aumento nuclear, observado em B. C- Citoplasma, N- Núcleo, **Setas pretas**- baculovírus.



Fonte: O Autor (2017).

Figura 29. VLPs do HAV geradas pela infecção de células Sf9 com baculovírus contendo genes da estratégia 3. Eletromicrografia das células de Sf9 infectadas. Foram visualizadas partículas com morfologia semelhante ao do vírus da hepatite A, com tamanho aproximado de 30 nm, localizadas no citoplasma celular. **A e B.** VLPs visualizadas em célula Sf9 infectada com baculovírus. **C-** Citoplasma, **N-** Núcleo, **Setas pretas-** VLPs.

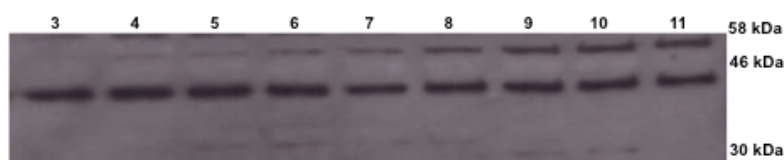


Fonte: O Autor (2017).

5.8 PURIFICAÇÃO DAS PARTÍCULAS SEMELHANTES A VÍRUS

Após o fracionamento do lisado celular obtido de células Sf9 infectadas com baculovírus recombinantes, contendo a construção VP0+VP3-1, as 14 frações obtidas foram analisadas em géis SDS-PAGE e por *immunoblot* com o anticorpo anti-VP1. Não foi possível identificar as proteínas de interesse nos géis corados com Azul de Comassie, provavelmente devido a baixa taxa de recuperação das partículas na técnica. Entretanto, os ensaios imunológicos foram capazes de demonstrar que a proteína VP1 estava presente em todas as frações coletadas, possivelmente em associação com a VP3 (como são encontradas nas partículas virais). As frações que possuem maior quantidade das proteínas associadas foram: 9, 10 e 11, correspondentes aos gradientes de 45 e 50% de sacarose (Figura 30). Mesmo com a identificação da proteína VP1 nas frações obtidas através da purificação, foi possível observar no gel de SDS-PAGE que em todas elas ainda existiam também proteínas de insetos, o que impacta a eficiência da técnica.

Figura 30. Frações 3-11 coletadas na purificação das VLPs do HAV em gradiente de sacarose. As frações coletadas após a purificação das partículas semelhantes a vírus foram submetidas a ensaios de immunoblot com o anticorpo anti-VP1. Houve reconhecimento da proteína VP1-2A em todas as frações obtidas e nas frações 8, 9, 10 e 11, também foram visualizadas bandas correspondentes à ligação entre as proteínas VP1/VP3, indício da presença de partículas formadas por essas proteínas nas regiões coletadas.



Fonte: O Autor (2017).

6 DISCUSSÃO

Em 2007 foi realizada a primeira reunião global para discutir a infecção causada pelo vírus da hepatite A. Nela pesquisadores de 46 países analisaram a mudança nos padrões da epidemiologia da doença e a elevação do número de pessoas com risco de apresentar a forma clínica severa, e consequentemente o aumento da mortalidade causadas pela infecção com o HAV. Nesse encontro os meios para prevenir a hepatite A foram abordados, sendo a vacinação universal uma das alternativas propostas. O custo da vacina contra o HAV ainda é elevado, por isso as estratégias para vacinação devem ser implementadas levando em conta o nível de endemicidade, o desenvolvimento sanitário/socio-econômico e o risco de epidemias causadas pelo vírus em cada local. Já existem testes sorológicos eficazes para a detecção de anticorpos anti-HAV (IgM/IgG), em pessoas com sintomas sugestivos de hepatite A ou em estudos epidemiológicos para avaliar áreas que precisam de campanhas de vacinação. Entretanto, esses testes não são utilizados na maioria dos países onde o HAV é endêmico devido aos seus custos elevados. Além disso, ainda existe uma demanda por testes sorológicos mais sensíveis para avaliar a resposta imune após a vacinação contra o vírus, já que após o processo o nível de anticorpos normalmente é baixo (HENDRICKX *et al.*, 2008).

Até 2014, a vacinação contra o HAV não tinha sido implementada no SUS, sistema de saúde brasileiro, mas a partir desse ano, ela foi disponibilizada e é recomendada para crianças de até 2 anos. Isso torna ainda mais relevante a demanda por kits de diagnóstico nacionais contra a doença, que possuam alta sensibilidade e especificidade, para que sejam realizados estudos epidemiológicos indicando áreas que precisam de um reforço em campanhas de vacinação e locais onde outras faixas etárias devam ser incluídas na população a ser vacinada, como uma tentativa de evitar formas graves da doença. Sendo assim, o presente trabalho foi idealizado na tentativa de obter novos antígenos que possam ser utilizados para a construção de futuros kits diagnósticos (e até protótipos vacinais), contra o vírus da hepatite A, utilizando para isso a tecnologia de geração de partículas semelhantes a vírus.

A possibilidade de gerar VLPs que não possuíssem material genético e dessa forma fossem incapazes de infectar as células hospedeiras, veio como uma alternativa para a construção de vacinas e kits diagnósticos, principalmente para vírus que não crescem bem em cultura de células ou que possuem alta patogenicidade e por isso não podem ser cultivados na maioria dos laboratórios. Já existem vacinas de VLPs consolidadas e liberadas no mercado, como as contra HBV (GenHevacB[®], Recombivax[®] e Engerix[®]), HEV (Hecolin[®]), HPV (Gardasil[®] e Cervarix[®]) e influenza A para humanos (Inflexal[®] V) (SOULIÉ *et al.*, 1991; HERZOG *et al.*, 2009; DONG *et al.*, 2014; OERS *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2016; SANTLEY, 2016) e Circovírus Suíno Tipo 2 (PCV-2) para animais. Além disso, diversas pesquisas utilizando partículas semelhantes a vírus como vacinas ou ferramentas de terapia gênica estão em fase de estudos clínicos para sua aprovação no mercado (norovírus, rotavírus, HCV, HIV, BTV, BPV, SV40...) (ROY *et al.*, 1994; BALL *et al.*, 1999; VANCOTT *et al.*, 2006; ZAMORA *et al.*, 2006; ELMOWALID *et al.*, 2007; TAKAHASHI *et al.*, 2008; VASSILIEVA *et al.*, 2011).

Uma das formas de gerar VLPs é utilizar o sistema de baculovírus/células de insetos. Muitas partículas semelhantes a vírus foram obtidas a partir desse tipo de expressão, principalmente pela relativa facilidade de se expressar proteínas que possuam modificações pós-traducionais e em larga escala. Dentre as partículas geradas através desse sistema de expressão estão: vírus Chikungunya (CHIKV), HPV, Influenza A, calicivírus felino (FCV), papilomavírus bovino (BPV) (DI MARTINO *et al.*, 2007; LÓPEZ-MACÍAS *et al.*, 2011; PUSHKO *et al.*, 2013; WAGNER *et al.*, 2014).

Já foi possível produzir VLPs de alguns vírus da família *Picornaviridae* tais como: FMDV (ROOSIEN *et al.*, 1990; ABRAMS *et al.*, 1995; LI *et al.*, 2008; CAO *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 1999; CAO *et al.*, 2010; MOHANA *et al.*, 2012; PORTA *et al.*, 2013; BATH *et al.*, 2013; GUO *et al.*, 2013); EV71 (CHEN *et al.*, 2006; LIN *et al.*, 2012; KU *et al.*, 2013); poliovírus (URAKAWA *et al.*, 1989; ANSARDI *et al.*, 1991; ROMBAUT & JORE, 1997); CVA16 (LIU *et al.*, 2012); CVB3 (ZHANG *et al.*, 2012); EMCV (JEOUNG *et al.*, 2010); CVDV (KO *et al.*, 2005). A maioria delas foi obtida utilizando o sistema de expressão de baculovírus/células de insetos, provavelmente devido à complexidade dos capsídeos dos vírus pertencentes a essa família. Eles são constituídos por três proteínas, o que requer do sistema de expressão escolhido

a capacidade de expressá-las paralelamente e de editá-las corretamente para que a formação das VLPs siga o processo ocorrido nas partículas virais. As publicações citadas acima serviram de base para a escolha do sistema de expressão utilizado neste trabalho, que pareceu mais adequado para obtenção das partículas de interesse.

Existem trabalhos na literatura que relatam tentativas para a geração de VLPs do HAV. Os pesquisadores Winokur, Rosen e seus colaboradores, fizeram tentativas em células de mamíferos (1991) e de insetos/baculovírus (1993) respectivamente, mas ambos falharam em detectar partículas montadas semelhantes aos vírus. Posteriormente, Beneduce *et al.*, 2002, Kusov *et al.*, 2007 e Ou *et al.*, 2013; utilizaram o genoma completo do vírus da hepatite A, para gerar partículas carreadoras contendo epítomos exógenos, com base na propriedade da proteína 2A de induzir a montagem do capsídeo viral (PROBST *et al.*, 1999). Entretanto, os trabalhos citados acima não tinham como objetivo gerar VLPs do HAV para sua futura utilização em kits diagnósticos ou como protótipos vacinas, o que torna este trabalho o primeiro na literatura a demonstrar possíveis partículas formadas, utilizando apenas proteínas constituintes do capsídeo viral e proteases.

O código genético é quase universal, ou seja, praticamente todos os organismos utilizam os mesmos códons para traduzir aminoácidos específicos, com pouquíssimas exceções. Ele também é redundante, o que faz com que a maioria dos aminoácidos sejam codificados por múltiplos códons sinônimos. Ainda assim, já foi comprovado, que os códons utilizados para a tradução de um aminoácido possuem distribuições distintas nos organismos. Cada organismo parece ter uma “preferência” em utilizar certos códons em relação a outros. Essa diferença é denominada “viés de códons” e ela afeta diretamente os níveis de expressão das proteínas, a montagem das mesmas e a regulação da tradução (QUAX *et al.*, 2015). A partir desses achados, otimizar os códons das sequências de proteínas para os usuais sistemas heterólogos de expressão tornou-se um procedimento relevante, principalmente quando a obtenção das proteínas em larga escala é necessária como, por exemplo, em estudos que possuem kits diagnósticos ou vacinas como finalidade (GUSTAFSSON *et al.*, 2004). A maioria das VLPs expressas atualmente tiveram sua sequência de nucleotídeos alterada (sem que isso modificasse os aminoácidos que eles codificavam), para aumentar o nível de expressão nas células

hospedeiras. A otimização das sequências de genes responsáveis pela formação de capsídeos virais como do HPV 11 e do 16 (proteína L1), do vírus da doença hemorrágica em coelhos, do capsídeo do FMDV, aumentou a expressão das proteínas de interesse e a formação de VLPs em células epiteliais de mamíferos, *Escherichia coli* e *Spodoptera frugiperda* 9, respectivamente (MOSSADEGH *et al.*, 2004; CAO *et al.*, 2010; GAO *et al.*, 2013; BANG *et al.*, 2016).

O vírus da hepatite A possui um genoma com grande quantidade de códons raros para expressão em células de humanos, já que sua estratégia de tradução baseia-se no fato de não competir com a maquinaria da célula hospedeira. Sendo assim, a otimização de códons é uma estratégia relevante quando se expressa proteínas do HAV. Em 2011, Sousa otimizou os códons virais para expressão das proteínas do capsídeo VP1, VP3, da protease 3C, em *Escherichia coli* e em células humanas. As proteínas possuíram um alto nível de expressão em *E. coli*. Nas células eucarióticas sua expressão também foi identificada através de imunofluorescência, embora o autor tenha falhado em detectá-las através de técnicas de *immunoblot* e fracionamento em gel SDS-PAGE (possivelmente devido à baixa eficiência de transfecção obtida nos ensaios). O trabalho foi um dos pioneiros em utilizar a estratégia de alteração de códons do vírus com o objetivo de obter maior nível de expressão das proteínas virais.

Levando em conta esses resultados e a eficiência obtida na expressão das proteínas virais, os genes das estratégias utilizadas na geração das VLPs do HAV passaram pelo processo de otimização da sequência de códons, para obtenção das proteínas de interesse em células de insetos Sf9. Os aminoácidos histidina, cisteína, ácido aspártico, serina, valina, leucina, glicina, arginina, foram encontrados nas sequências originais em códons raros, com mais de 50% de desvio dos utilizados pelo organismo-alvo e através da otimização de códons eles foram reduzidos e substituídos por códons mais frequentes nas células de insetos, utilizadas neste trabalho. Através da otimização, foi possível expressar e processar as poliproteínas em tempo hábil, já que os promotores de baculovírus aos quais os genes estavam sujeitos eram de fase muito tardia de infecção, logo era necessário que as proteínas fossem expressas de forma eficiente e rápida, para que elas pudessem ser processadas antes da coleta das células infectadas.

Uma das principais desvantagens da expressão de poliproteínas que devem ser clivadas para a formação de VLPs em células de insetos é o fato dos promotores comumente utilizados (poliedrina e p10), serem ativados na fase muito tardia da infecção pelo baculovírus (72 a 96 horas após a infecção). Isso faz com que a expressão das proteínas de interesse ocorra perto da apoptose celular, mesmo período no qual as proteases virais começam a ser expressas (NAGGIE & BENTLEY, 1998; IKONOMOU et al., 2003). Quando existem mais de duas proteínas envolvidas na formação do capsídeo viral, isso se torna um obstáculo para obtenção de níveis razoáveis de partículas semelhantes a vírus, devidamente montadas. Diversas alternativas foram geradas na tentativa de maximizar a quantidade de VLPs obtidas por esse sistema, dentre elas, a utilização de baculovírus contendo as proteínas de interesse em dois promotores distintos. Como o capsídeo viral do HAV é constituído por três proteínas e sua formação só ocorre na presença de 5 delas (VP4, VP2, VP3, VP1, 2A), a utilização do vetor bicistrônico pFastBac-Dual (Invitrogen™), foi a escolha para o planejamento das estratégias 2 e 3 utilizadas na pesquisa.

As construções gênicas utilizadas neste trabalho em estratégias distintas, foram baseadas em artigos de pesquisadores que conseguiram obter VLPs de diversos vírus da família *Picornaviridae*. O vírus FMDV tem sido estudado para a produção de vacinas há vários anos devido a sua patogenicidade e por ser altamente contagioso. No início dos anos 90, Rossien e colaboradores já tentaram expressar todo o genoma viral e com isso obter VLPs, através do sistema de baculovírus/células de insetos, e embora eles tenham expresso as proteínas recombinantes, o grupo não conseguiu detectar as partículas formadas por elas. Li e colaboradores expressaram em 2008, as regiões P12A3C do vírus FMDV em larvas de *Bombyx mori* (bicho-da-seda), utilizando baculovírus recombinantes. A construção continha as proteínas necessárias para a formação do capsídeo viral e as proteases 2A e 3C, responsáveis pela clivagem das proteínas. As proteínas foram detectadas por anticorpos, mas o capsídeo formado não foi detectado por microscopia eletrônica. Esse foi um dos trabalhos que inspirou a construção da estratégia 1, contendo todos os genes necessários para a geração final do capsídeo viral. Entretanto, com base na literatura, já era possível prever que as proteínas de interesse seriam expressas e processadas em menor quantidade, já que o gene

correspondente a ela continha 3267 pb e a expressão induzida pelo promotor da poliedrina ocorre cerca de 72 a 96 horas após a infecção das células com os baculovírus, o que resulta no processamento da poliproteína muito próximo da lise das células infectadas.

A construção da estratégia 1 não teve VLPs detectadas pelo sistema de expressão de células de mamíferos, onde ela foi avaliada pela primeira vez, no trabalho de Sousa em 2011. No presente estudo, essa estratégia teve suas proteínas expressas e processadas. Entretanto, o processamento foi tardio se comparado às outras construções, e a expressão foi visivelmente inferior a obtida nas estratégias 2 e 3. Apesar dela conter todos os genes necessários para a formação do capsídeo viral do HAV, seu tamanho e o modo de expressão no sistema escolhido podem não ter favorecido a obtenção de grandes quantidades de proteínas. Por isso ela não foi utilizada nas etapas posteriores de visualização das VLPs no interior da célula de insetos e de purificação das partículas obtidas.

A construção P1+3C foi utilizada para induzir a expressão concomitante de todas as proteínas formadoras do capsídeo viral e da protease 3C. Dessa forma, a protease 3C não teve que se autoclicar da poliproteína para começar o processamento das proteínas estruturais. Além disso, o tamanho de ambos os genes foi reduzido, o que aumentou o nível de expressão de cada um deles. A expressão e o processamento dos peptídeos foram identificados após 48 horas de infecção das células Sf9 por baculovírus, mesmo antes da indução dos promotores virais (que ocorre na fase muito tardia de infecção). Essa estratégia de proteínas estruturais virais clonadas em promotor distinto da protease 3C foi utilizada para gerar VLPs de FMDV em baculovírus (MOHANA *et al.*, 2012; PORTA *et al.*, 2013; BHAT *et al.*, 2013) e de EMCV em células de mamíferos (JEOUNG *et al.*, 2010).

Na terceira estratégia, VP0+VP3-1, os genes das proteínas estruturais foram clonados em promotores distintos, para que o tamanho das poliproteínas expressas e o tempo da sua clivagem fossem reduzidos. Outra modificação relevante foi a substituição da protease 3C do HAV, pelo sítio catalítico da protease 2A do FMDV. Esta protease é conhecida na literatura por sua clivagem eficiente e foi utilizada com sucesso por Cao e colaboradores em 2010 na mesma localização inserida na sequência (entre VP3 e VP1), para obter uma quantidade mais elevada de VLPs do vírus FMDV. As proteínas de interesse foram obtidos a partir de 48 horas da

infecção de células Sf9 com baculovírus e tiveram níveis de expressão mais elevados do que as obtidas nas outras estratégias, sendo possível inclusive detectar a clivagem da proteína 2A do HAV a partir de 72 horas da infecção (evento não identificado nas outras estratégias). Provavelmente a expressão e o processamento dessa proteína ocorreram em níveis mais altos pelo fato do seu gene nessa estratégia ter um tamanho consideravelmente inferior aos que incluíam a 2A nas outras análises. O gene contendo a 2A na terceira estratégia possui 1845 pb enquanto o da construção HAV-PTRUNC tem 3267 pb e o correspondente a P1 inclui 2514 pb. Essa ainda foi a única construção onde a proteína VP1 foi reconhecida no *immunoblot* com anticorpos anti-VP1 produzidos em coelhos, nas outras estratégias não houve reconhecimento. Uma hipótese para o ocorrido seriam os sítios imunogênicos, reconhecidos pelo anticorpo utilizado, não estarem disponíveis para o reconhecimento. Isso pode ter ocorrido pela ligação das proteínas VP1 com a proteína 2A do HAV, que não parece ter sido desfeita através de clivagem nas estratégias 1 e 2. Sendo assim, apenas a terceira estratégia foi utilizada para obter células infectadas e analisar a presença de VLPs por microscopia eletrônica.

A análise de células infectadas e não-infectadas mostrou em mais detalhes os efeitos citopáticos (já visualizados por microscopia óptica – dados não apresentados), após a infecção das Sf9 com o baculovírus. Além disso, foi possível identificar as partículas de baculovírus recombinantes sendo produzidas no núcleo aumentado das células infectadas. Também foram visualizadas partículas semelhantes a vírus acumuladas no citoplasma celular, forte indício da formação das VLPs do HAV, já que as partículas encontradas possuem tamanho (~30 nm) e morfologia (icosaédrica), semelhantes às apresentadas pelo vírus da hepatite A. As amostras de células infectadas e não-infectadas também foram preparadas para imunocitoquímica, no intuito de confirmar a presença das partículas semelhantes a vírus.

Diversos protocolos utilizando como base gradientes de sacarose foram testados com o objetivo de obter as VLPs purificadas, sem contaminações com proteínas celulares do organismo hospedeiro. No entanto, apesar de obter frações com quantidade reduzida de proteínas do hospedeiro e presença confirmada das proteínas virais de interesse (principalmente da VP1, confirmada pelo *immunoblot* com anti-VP1), os métodos aplicados não excluíram por completo a presença de

outras proteínas de Sf9 das amostras obtidas. Sendo assim, uma das limitações encontradas no trabalho foi a obtenção das VLPs purificadas, sem outras proteínas contaminantes. Esse é um dos fatores limitantes da obtenção dessas partículas, algo já identificado e discutido com diversos artigos científicos, como o de Kushnir e colaboradores em 2012. A ausência de tags eficientes que sejam expostas após a montagem das VLPs, e com isso possam ser utilizadas em ensaios de cromatografia de afinidade, é um dos obstáculos que contribuem para a purificação ineficiente dessas partículas.

Os resultados obtidos mostram que a técnica de expressão de proteínas utilizando o sistema baculovírus/células de insetos, é eficiente tanto na expressão, quanto no processamento das proteínas recombinantes. Esse é um fator relevante quando o objetivo é obter partículas semelhantes a vírus, já que a maioria dos vírus de importância para a saúde pública, possuem mais de uma proteína formando o seu capsídeo ou envelope viral. A geração de baculovírus recombinantes é rápida e eficiente, principalmente utilizando o sistema de transposição sítio-específica que possui células de *E. coli* recombinantes. O uso de vetores bicistrônicos contendo promotores fortes de baculovírus é uma forma adequada de expressar diferentes proteínas componentes de partículas virais. Quando as proteínas constituintes do capsídeo viral foram separadas e clonadas em promotores distintos, a expressão/processamento foram mais eficientes e permitiram não só o reconhecimento de uma das proteínas (VP1), pelo anticorpo que se liga a ela, como a visualização das partículas obtidas dentro do citoplasma das células Sf9. Esse dado é a primeira comprovação de VLPs do HAV produzidas em sistema de expressão heterólogo. As células infectadas e o as não-infectadas estão sendo submetidas a ensaios de imunocitoquímica para confirmar, por reconhecimento de anticorpos que as partículas identificadas são as moléculas de interesse. O antígeno produzido vem como uma alternativa viável e segura para a produção de futuras vacinas e kits diagnósticos contra a hepatite A. Ele será testado em ensaios imunoenzimáticos com um banco de soros de pacientes imunizados contra a doença no intuito de verificar sua sensibilidade e especificidade, para que se torne uma alternativa concreta para a erradicação da hepatite A, meta que o sistema de saúde mundial pretende cumprir, juntamente com a eliminação das outras hepatites virais, até 2030 (WHO, 2016).

7 CONCLUSÕES

- A otimização de códons favoreceu a expressão das proteínas heterólogas de interesse em níveis detectáveis, já que os códons raros existentes nas sequências do HAV foram substituídos por códons mais frequentes em células Sf9, sem que os aminoácidos codificados por essas sequências fossem alterados;
- A geração de bacmídeos recombinantes, por transposição sítio-específica, é uma forma rápida e eficiente de obter baculovírus contendo as sequências de interesse no genoma;
- As proteínas do HAV foram expressas e processadas corretamente em células Sf9, mesmo quando dispostas de forma distinta à encontrada no genoma do vírus da hepatite A;
- A utilização de vetor bicistrônico, para expressar paralelamente sequências distintas em Sf9, constitui-se a melhor alternativa para obter níveis mais elevados de múltiplas proteínas recombinantes;
- As VLPs do HAV geradas pela estratégia 3 foram detectadas em células Sf9 infectadas com baculovírus recombinantes.

REFERÊNCIAS

- ABRAMS, C. C. *et al.* Assembly of foot-and-mouth disease virus empty capsids synthesized by a vaccinia virus expression system. **Journal of General Virology**, London, v. 76, p. 3089-3098, 1995.
- AIRENNE, K. J. *et al.* Baculovirus: an insect-derived vector for diverse gene transfer applications. **The American Society of Gene & Cell Therapy**, Milwaukee, p. 739-749, 2013.
- AIRES, K. A. *et al.* Production of human papillomavirus type 16 L1 virus-like particles by recombinant *Lactobacillus casei* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 1, p. 745-752, 2006.
- ANSARDI, D. C. *et al.* Coinfection with recombinant vaccinia viroses expressing poliovirus P1 and P3 proteins results in polyprotein processing and formation of empty capsid structures. **Journal of Virology**, Washington, v. 65, n. 4, p. 2088-2092, 1991.
- BALL, J. M. *et al.* Recombinant Norwalk virus-like particles given orally to volunteers: Phase I study. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 117, n. 1, p. 40-48, 1999.
- BANG, H. B. *et al.* High-level production of human papillomavirus (HPV) type 16 L1 in *Escherichia coli*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 26, n. 2, p. 356-363, 2016.
- BARFORD, D. *et al.* Baculovirus expression.: tackling the complexity challenge. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 23, p. 357-364, 2013.
- BATH, S. A. *et al.* Novel immunogenic baculovirus expressed virus-like particles of foot-and-mouth disease (FMD) virus protect guinea pigs against challenge. **Research in Veterinary Science**, London, v. 95, n. 3, p. 1217-1223, 2013.
- BENEDUCE, F. *et al.* Chimeric hepatitis A virus particles presenting a foreign epitope (HIV gp41) at their surface. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 55, p. 369-377, 2002.
- BERGER, I. & POTERSZMAN, A. Baculovirus expression: old dog, new tricks. **Bioengineered**, v. 6, p. 316-322, 2015.

BISHOP, N. E. & ANDERSON, D. A. RNA-dependent cleavage of VP0 capsid protein in provirions of hepatitis A virus. **Virology**, New York, v. 197, n. 2, p. 616-623, 1993.

BLUM, H. E. History and global burden of viral hepatitis. **Digestive Diseases**, Basel, v. 34, p. 293-302, 2016.

CAO, Y. *et al.* Synthesis of empty capsid-like particles of Asia I foot-and-mouth disease virus in insect cells and their immunogenicity in guinea pigs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 137, n. 2, p. 10-17, 2009.

CAO, Y. *et al.* Formation of virus-like particles from O-type foot-and-mouth disease virus in insect cells using codon-optimized synthetic genes. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 32, n. 9, p. 1223-1229, 2010.

CDC. Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases. 17th ed, Washington, p. 135-148, 2015.

CHEN, H. F. *et al.* Oral immunization of mice using transgenic tomato fruit expressing VP1 protein from enterovirus 71. **Vaccine**, Kidlington, v. 24, n. 15, p. 2944-2951, 2006.

CHUNG, Y.-C. *et al.* Expression, purification and characterization of enterovirus-71 virus-like particles. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 12, n. 6, p. 921-927, 2006.

CHROBOCZEC, J. *et al.* Virus-like particles as vaccine. **Acta Biochimica Polonica**, Warsaw, v. 61, n. 3, p. 531-539, 2014.

CLEM, R. J. & PASSARELLI, A. L. Baculoviruses: sophisticated pathogens of insects. **PLOS Pathogens**, San Francisco, v. 9, n. 11, p. 1-4, 2013.

COHEN, J. I. *et al.* Complete nucleotide sequence of an attenuated hepatitis A virus: comparison with wild-type virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 84, n. 2, p. 2497-2501, 1987.

COSTA-MATTIOLI, M. *et al.* Genetic variability of hepatitis A virus. **Journal of General Virology**, London, v. 84, p. 3191-3201, 2003.

CRISCI, E. *et al.* Virus-like particles: The new frontier of vaccines for animal viral infections. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 148, p. 211-225, 2012.

CUTHBERT, J. A. Hepatitis A: old and new. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n.1, p. 38-58, 2001.

DENTINGER, C. M. Emerging infections: hepatitis A. **American Journal of Nursing** 109, n. 8, p. 29-33, 2009.

DI MARTINO, B. Assembly of feline calicivirus-like particle and its immunogenicity. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 120, p. 173-178, 2007.

DONG, H *et al.* Virus-like particles in picornavirus vaccine development. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 98, p. 4321-4329, 2014.

DOTZAUER, A. & KRAEMER, L. Innate and adaptative immune responses against picornavirus and their counteractions: An overview. **World Journal of Virology**, Pleasanton, v. 1, n. 3, p. 91-107, 2012.

EFFIO, C. L. & HUBBUCH, J. Next generation vaccines and vectors: Designing downstream processes for recombinant protein-based virus-like particles. **Biotechnology Journal**, Weinheim, v. 10, p. 715-727, 2015.

ELMOWALID, G. A. *et al.* Immunization with hepatitis C virus-like particles results in control of hepatitis C virus infections in chimpanzees. **Proceedings of the National Academy of Science of The United States of America**, Washington, v. 104, n. 20, p. 8427-8432, 2007.

FEINSTONE, S. M. *et al.* Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. **Science**, Washington, v. 2, p. 1026-1028, 1973.

FENG, Z. *et al.* A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. **Nature**, London, v. 496, p. 367-371, 2013.

FELBERBAUM, R. S. The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. **Biotechnology Journal**, Weinheim, v. 10, p. 702-714, 2015.

FRIETZE, K. M. *et al.* Engineering virus-like particles as vaccines. **Current Opinion in Virology**, v. 18, p. 44-49, 2016.

GLASGOW, J. & TULLMAN-ERCEK, D. Production and applications of engineered viral capsids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 98, p. 5847-5848, 2014.

GUO, H. C. *et al.* Foot-and-mouth disease virus-like particles produced by a SUMO fusion protein system in *Escherichia coli* induce potente protective immune responses in guinea pigs, swine and cattle. **Veterinary Research**, Paris, v. 44, n. 48, p. 1-13, 2013.

GUSTAFSSON, C. *et al.* Codon bias and heterologous protein expression. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 22, n. 7, p. 346-356, 2004.

HENDRICKX, G. *et al.* Has the time come to control hepatitis A globally? Matching prevention to the changing epidemiology. **Journal of Viral Hepatitis**, Oxford, v. 15, n. 2, p. 1-15, 2008.

HERZOG, C. *et al.* Eleven years of inflexal V-a virossomal adjuvanted influenza vaccine. **Vaccine**, Kidlington, v. 27, p. 4381-4387, 2009.

IKONOMOU, L. *et al.* Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 62, p. 1-20, 2003.

JACOBSEN, K. H. The global prevalence of hepatitis A virus infection and susceptibility: a systematic review. **World Health Organization**, Geneva, 2009.

Jain, N. K. *et al.* Formulation and stabilization of recombinant protein based virus-like particle vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 93, p. 42-55, 2015.

JEONG, S.-H. & LEE, H.-S. Hepatitis A: clinical manifestations and management. **Intervirolgy**, Basel, v. 53, p. 15-19, 2010.

JEOUNG, H. Y. *et al.* Immunogenicity and safety of the virus-like particle of the porcine encephalomyocarditis virus in pig. **Virology Journal**, London, v. 8, p. 170, 2011.

JEWELL, J. E. *et al.* Limited expression of poliovirus by vaccinia virus recombinants due to inhibition of the vector by proteinase 2A. **Journal of Virology**, Washington, v. 64, n. 3, p. 1388-1393, 1990.

JINGPENG G. *et al.* Codon optimization of the rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) capsid gene leads to increased gene expression in *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9) cells. **Journal of Veterinary Science**, Suown, v.14, n. 4, p. 441-447, 2013.

KLEID, D. G. *et al.* Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease: responses in cattle and swine. **Science**, Washington, v. 214, n. 4525, p. 1125-1129, 1981.

KO, Y. J. *et al.* Noninfectious virus-like particle antigen for detection of swine vesicular disease virus antibodies in pigs by enzyme-linked immunosorbent assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 12, n. 8, p. 922-929, 2005.

KU, Z. Q. *et al.* Neutralizing antibodies induced by recombinant virus-like particles of enterovirus 71 genotype C4 inhibit infection at pre- and post-attachment steps. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 2, 2013.

KUI, X. *et al.* The expression, purification, and immunogenicity of a new chimeric virus-like particle. **Viral Immunology**, New York, v. 22, n. 1, p. 49-56, 2009.

KUSHNIR, N. *et al.* Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development. **Vaccine**, Kidlington, v. 31, p. 58-83, 2012.

KUSOV, Y. Y. *et al.* Immunogenicity of a chimeric hepatitis A virus (HAV) carrying the HIV gp41 epitope 2F5. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 71, p. 101-111, 2007.

LEE, C. D. *et al.* Production of FMDV virus-like particles by a SUMO fusion protein approach in *Escherichia coli*. **Journal of Biomedical Science**, Basel, v. 16, p. 1423-1427, 2009.

LEMONS, S. M. & ROBERTSON, B. H. Current perspectives in the virology and molecular biology of hepatitis A virus. **Seminars in virology**, London, v. 4, n. 5, p. 285-295, 1993.

LEMON, S. M. & SHAPIRO, C. N. The value of immunization against hepatitis A. **Infectious Agents and Disease**, New York, v. 3, n. 1, p. 38-49, 1994.

LI, Z. *et al.* Expression of Foot-and-Mouth disease virus capsid proteins in silkworm-baculovirus expression system and its utilization as a subunit vaccine. **Plos One**, San Francisco, v. 3, n. 5, p.1-7, 2008.

LIFE TECHNOLOGIES. **Bac-to-Bac Baculovirus expression system**. Disponível em: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/bactobac_man.pdf. Acesso em: 10 de maio de 2015.

LIN, Y. L. *et al.* Enterovirus type 71 neutralizing antibodies in the serum of macaque monkeys immunized with EV71 virus-like particles. **Vaccine**, Kidlington, v. 30, n. 7, p. 1305-1312, 2012.

LIN, S.-Y. *et al.* Enhanced enterovirus 71 virus-like particle yield from a new baculovirus design. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 112, n. 10, p. 2005-2015, 2015.

LIU, Q. W. *et al.* A virus-like particle vaccine for coxsackievirus A16 potently elicits neutralizing antibodies that protect mice against lethal challenge. **Vaccine**, Kidlington, v. 30, n. 47, p. 6642-6648, 2012.

LIU, F. *et al.* Use of baculovirus expression system for generation of virus-like particles: successes and challenges. **Protein Expression and Purification**, San Diego, v. 90, p. 104-116, 2013.

LIU, J. *et al.* Virus like particle-based vaccines against emerging infectious disease viruses. **Virologica Sinica**, Mainland, v. 31, n. 4, p. 279-287, 2016.

LÓPEZ-MACÍAS, O. *et al.* Safety and immunogenicity of a virus-like particle pandemic influenza A (H1N1) 2009 vaccine in a blinded, randomized, placebo-controlled trial of adults in Mexico. **Vaccine**, Kidlington, v. 29, p. 7826-7834, 2011.

LU, H.-Y. *et al.* Baculovirus as a vaccine vector. **Bioengineered**, v. 3, n. 5, p. 271-274, 2012.

LUA, L. H. L. *et al.* Bioengineering virus-like particles as vaccines. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 111, n. 3, p. 425-440, 2014.

MACHIDA, K. & IMATAKA, H. Production methods for viral particles. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 37, p. 753-760, 2015.

MARTIN, A. & LEMON, S. M. Hepatitis A Virus: from discovery to vaccines. **Hepatology**, Baltimore, v. 43, n. 2, p. 164-172, 2006.

MOHANA, S. B. *et al.* Development of foot-and-mouth disease virus (FMDV) serotype O virus-like-particles (VLPs) vaccine and evaluation of its potency. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 93, n. 6, p. 288-295, 2012.

MORACE, G *et al.* The unique role of domain 2A of the hepatitis A virus precursor polypeptide P1-2A in viral morphogenesis. **BMB reports**, Seoul, p. 678-683, 2008.

MOSSADEGH, N. *et al.* Codon optimization of the human papillomavirus 11 (HPV 11) L1 gene leads to increased gene expression and formation of virus-like particles in mammalian epithelial cells. **Virology**, New York, v. 326, p. 57-66, 2004.

NAGGIE, S. & BENTLEY, W. E. Appearance of protease activities coincides with p10 and polyhedrin-driven protein production in baculovirus expression system: effects on yield. **Biotechnology Progress**, v. 14, p. 227-232, 1998.

NAINAN, O. V. *et al.* Diagnosis of hepatitis A virus infection: a molecular approach. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 19, n. 1, p. 63-79, 2006.

NASKALSKA, A. & PYRC, K. Virus Like Particles as immunogens and universal nanocarriers. **Polish Journal of Microbiology**, Warsaw, v. 64, n. 1, p. 3-13, 2015.

NETTLESHIP, J. E. *et al.* Recent advances in the production of proteins in insect and mammalian cells for structural biology. **Journal of Structural Biology**, Orlando, v. 172, p. 55-65, 2010.

OERS, M. M. Opportunities and challenges for the baculovirus expression system. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 107, p. S3-S15, 2011.

OERS, M. M. *et al.* Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology. **Journal of General Virology**, London, v. 96, p. 6-23, 2015.

O'GRADY, J. Management of acute and fulminant hepatitis A. **Vaccine**, Kidlington, v. 10, n. 1, p. S21-S23, 1992.

OU, X. *et al.* Construction, expression and immunogenicity of a novel anti-hypertension angiotensin II vaccine based on hepatitis A virus-like particle. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, Austin, v. 9, n. 6, p. 1191-1199, 2013.

PHELPS, J. P. *et al.* Expression and self-assembly of cowpea chlorotic mottle virus-like particles in *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 128, n. 2, p. 290-296, 2007.

PORTA, C. *et al.* Efficient production of foot-and-mouth disease virus empty capsids in insect cells following down regulation of 3C protease activity. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 187, n. 2, p. 406-412, 2013.

PROBST, C. *et al.* Intrinsic signals for the assembly of hepatitis A virus particles. Role of structural proteins VP4 and 2A. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 19, p. 4527-4531, 1999.

PUSHKO, P. *et al.* Development of virus-like particle technology from small highly symmetric to large complex virus-like particle structures. **Intervirolgy**, Basel, v. 10, p. 1-25, 2013.

QUAX, T. E. F. *et al.* Codon bias as means to fine-tune gene expression. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 59, p. 149-161, 2015.

RAO, S. *et al.* A review of immunogenicity and tolerability of live attenuated hepatitis A vaccine in children. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, Austin, Artigo disponível online, 2016.

ROMBAUT, B. & JORE, J. P. M. Immunogenic, non-infectious polio subviral particles synthesized in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Virology**, London, v. 78, p. 1829-1832, 1997.

ROOSIEN, J. *et al.* Synthesis of foot-and-mouth disease virus capsid proteins in insect cells using baculovirus expression vectors. **Journal of General Virology**, London, v. 71, p. 1703-1711, 1990.

ROQUE-AFONSO, A. M.; DESBOIS, D.; DUSSAIX, E. Hepatitis A virus: serology and molecular diagnostics. **Future Virology**, v. 5, n. 2, p. 233-242, 2010.

ROSEN, E. *et al.* Synthesis of immunogenic hepatitis A virus particles by recombinant baculoviruses. **Vaccine**, Kidlington, v. 11, n. 7, p. 706-712, 1993.

ROY, P. *et al.* Long-lasting protection of sheep against bluetongue challenge after vaccination with virus-like particles: evidence for homologous and partial heterologous protection. **Vaccine**, Kidlington, v. 12, n. 9, p. 805-811, 1994.

SCHIFF, E. R. Atypical clinical manifestations of hepatitis A. **Vaccine**, Kidlington, v. 10, n. 1, p. 18-20, 1992.

SHIRBAGHAEI, Z. & BOLHASSANI, A. Different applications of virus-like particles in biology and medicine: Vaccination and Delivery Systems. **Biopolymers**, New York, v. 105, n. 3, p. 113-132, 2015.

SOULIÉ, J. C. *et al.* Immunogenicity and safety in newborns of a new recombinant hepatitis B vaccine containing the S and pre-S2 antigens. **Vaccine**, Kidlington, v. 9, p. 545-548, 1991.

SOUSA, R. C. V. Construção e análise da expressão de protótipos vacinais recombinantes contra o vírus da hepatite A. Dissertação apresentada no Mestrado Acadêmico de Saúde Pública do **Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**, Recife, 2011.

STANLEY, M. Preventing cervical cancer and genital warts – How much protection is enough for HPV vaccines? **Journal of Infection**, London, v. 72, p. S23-S28, 2016.

TAKAHASHI, R. U. *et al.* Presentation of functional foreign peptides on the surface of SV40 virus-like particles. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 135, n. 4, p. 385-392, 2008.

TOTSUKA, A. & MORITSUGO, Y. Hepatitis A virus proteins. **Intervirology**, Basel, v. 42, p. 63-68, 1999.

TROVATO, M. & BERARDINIS, P. Novel antigen delivery systems. **World Journal of Virology**, Hong Kong, v. 4, n. 3, p. 156-168, 2015.

TUTHILL, T. J. *et al.* Picornaviruses. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 343, p. 43-89, 2010.

URAKAWA, T. *et al.* Synthesis of immunogenic, but non-infectious, poliovirus particles in insect cells by a baculovirus expression vector. **Journal of General Virology**, London, v. 70, n. 6, p. 1453-1463, 1989.

VANCOTT, J. L. *et al.* Mice develop effective but delayed protective immune responses when immunized as neonates either intranasally with nonliving VP6/LT(R192G) or orally with live rhesus rotavirus vaccine candidates. **Journal of Virology**, Washington, v. 80, n. 10, p. 4949-4961, 2006.

VASSILIEVA, E. V. *et al.* Enhanced mucosal immune responses to HIV virus-like particles containing a membrane-anchored adjuvant. **mBio**, Washington, v. 2, n. 1, 2011.

VAUGHAN, G. *et al.* Hepatitis A Virus: host interactions, molecular epidemiology and evolution. **Infection, Genetics and Evolution**, , v. 21, p. 227-243, 2014.

VITRAL, C. L. *et al.* Epidemiological pattern and mortality rates for hepatitis A in Brazil, 1980-2002 – A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 2, p. 119-127, 2006.

VITRAL, C. L. *et al.* Changing epidemiology of hepatitis A in Brazil: Reassessing immunization policy. **Journal of Viral Hepatitis**, Oxford, v. 15, n. 2, p. 22-25, 2008.

VITRAL, C. L. *et al.* Declining prevalence of hepatitis A virus antibodies among children from low socioeconomic groups reinforces the need for the implementation of hepatitis A vaccination in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 5, p. 652-658, 2012.

WAGNER, J. M. *et al.* Enhanced production of chikungunya virus-like particles using a high-pH adapted *Spodoptera frugiperda* insect cell line. **PLOS One**, Washington, v. 9, n. 4, p. 1-14, 2014.

WALKER, C. M. Reassessing immune control of hepatitis A virus. **Current Opinion in Virology**, Amsterdam, v. 11, p. 7-13, 2015.

WANG, X. *et al.* Hepatitis A virus and the origins of picornaviruses. **Nature**, Washington, v. 517, p. 85-88, 2015.

WASLEY, A. *et al.* Hepatitis A in the era of vaccination. **Epidemiologic Reviews**, Baltimore, v. 28, p. 101-111, 2006.

WESTON, S. R.; MARTIN, P. Serological and molecular testing in viral hepatitis: an update. **Canadian Journal of Gastroenterology**, Oakville, v. 15, n. 3, p. 177-184, 2001.

WHO. Global health sector strategy on viral hepatitis 2016-2021: towards ending viral hepatitis. **World Health Organization**, Geneva, p. 1-56, 2016.

WINOKUR, P. L. *et al.* The hepatitis A virus polyprotein expressed by a recombinant vaccinia virus undergoes proteolytic processing and assembly into virus-like particles. **Journal of Virology**, Washington, v. 65, n. 9, p. 5029-5036, 1991.

WU, D. & GUO, C.-Y. Epidemiology and prevention of hepatitis A in travelers. **Journal of Travel Medicine**, Hamilton, v. 20, n. 6, p. 394-399, 2013.

YAMAJI, H. Suitability and perspectives on using recombinant insect cells for the production of virus-like particles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 98, p. 1963-1970, 2014.

YAN, D. *et al.* The application of virus-like particles as vaccines and biological vehicles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 99, p. 10415-10432, 2015.

ZAMORA, E. *et al.* Papillomavirus-like particles are an effective platform for amyloid-beta immunization in rabbits and transgenic mice. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 177, n. 4, p. 2662-2670, 2006.

ZHANG, L. *et al.* Vaccination with coxsackievirus B3 virus-like particles elicits humoral immune response and protects mice against myocarditis. **Vaccine**, Kidlington, v. 30, n. 13, p. 2301-2308, 2012.

ZHANG, L. *et al.* Biomolecular engineering of virus-like particles aided by computational chemistry methods. **Chemical Society Reviews**, London, v. 44, p. 8608-8618, 2015.

ZHENG, H. *et al.* Comparing live attenuated and inactivated hepatitis A vaccines: An immunogenicity study after on single dose. **Vaccine**, Kidlington, v. 29, p. 9098-9103, 2011.

ZHAO, Q. *et al.* Virus-like particle-based human vaccines: quality assessment based on structural and functional properties. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 31, n. 11, p. 654-663, 2013.

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

APÊNDICE A - Artigo publicado na Revista Brasileira de Saúde Materno-Infantil

CASE REPORTS

Clinical and laboratory diagnosis of congenital Zika virus syndrome and diaphragmatic unilateral palsy: case report

Alex Sandro Rolland Souza ¹
 Marli Tenorio Cordeiro ²
 Jucile do Amaral Meneses ³
 Emanuele Honorato ⁴
 Edward Araujo Júnior ⁵
 Priscila Mayrelle da Silva Castanha ⁶
 Bruna Varginha Ramos Caiado ⁷
 Sílvia de Lourdes Loreto Faquini ⁸
 Orlando Gomes Santos Neto ⁹
 Juliana Araújo de Carvalho Schettini ¹⁰
 Luisa Medeiros de Mello ¹¹
 Ana Catarina Ishigami ¹²
 Rafael Dhalia ¹³

^{1,4,8,9} Centro aos cuidados da mulher . Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP). Rua dos Coelhos, 300. Boa Vista. Recife, PE, Brazil. CEP: 50.070-550. E-mail: alexsrolland@uol.com.br

^{2,6,7,13} Departamento de Virologia. Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães. Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Recife, PE, Brasil.

⁵ Departamento de Obstetrícia. Escola Paulista de Medicina. Universidade Federal de São Paulo (EPM-UNIFESP). São Paulo, SP, Brasil.

¹⁰ Laboratório de Pesquisa Translacional. Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira. Recife, PE, Brasil.

^{3,11,12} Departamento de Neonatologia. Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira. Recife, PE, Brasil.

Abstract

Introduction: several birth defects associated to congenital Zika virus infection have been reported, although the clinical features have not been fully characterized.

Description: this is the first case report on unilateral diaphragmatic paralysis diagnosed on a neonate with congenital Zika confirmed by the examination of the amniotic fluid through polymerase chain reaction (ZIKV RT-PCR) and the examination of cerebrospinal fluid by serological test (IgM ZIKV-ELISA) after birth. The main manifestations detected by intrauterine ultrasound were: microcephaly, ventriculomegaly, intracranial calcifications, enlarged cisterna magna, increased amniotic fluid index and fetal akinesia syndrome. The newborn had acute respiratory failure in the first hours of life, requiring mechanical ventilation. The X-ray of the chest showed unilateral diaphragmatic paralysis and cardiomegaly.

Discussion: diaphragmatic palsy in congenital Zika has not been previously reported, the etiopathogenic mechanisms of this event in congenital Zika virus needs to be elucidated.

Key words Microcephaly, Arbovirus infections, Arthrogryposis, Prenatal ultrasound, Respiratory paralysis

APÊNDICE B - Artigo a ser submetido para a revista *Journal of Viral Hepatitis* (JVH)

Production of HAV virus-like particles by baculovirus/insect cells system

Bruna Varginha Ramos Caiado^{1,4*}; Regina C. Bressan Queiroz Figueiredo²; Renato César Vieira de Sousa¹; Camila Juliet Barbosa Fernandes³; Antônio Fernando da Purificação Junior^{1,4}; Rafael Dhalia^{1,4}

¹Department of Virology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz-PE), Recife, PE, Brazil

²Department of Microbiology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz-PE), Recife, PE, Brazil

³Department of Microbiology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz-PE), Recife, PE, Brazil

⁴Department of Genetics, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil

* Corresponding author:

e-mail: brunacaiado@gmail.com

Abstract

Virus-like particles (VLPs) are structures composed of multiple copies of proteins that mimic the viral particle without carrying the genetic material of the virus. They have emerged as a promising strategy for the generation of antigens for several applications, such as vaccines and diagnostic tests. Hepatitis A is an acute viral disease that still affects thousands of people worldwide annually. Vaccines and diagnostic kits for its prevention and detection are of high cost due to the difficulties in growing the virus in culture medium. Given these limitations, obtaining HAV VLPs has become an attractive alternative for the generation of HAV immunogenic antigens in order to obtain vaccines and diagnostic kits accessible to the areas of greater circulation of the virus. Therefore, three distinct strategies with structural proteins VP0-VP3-VP1-2A from the hepatitis A virus were idealized and optimized for expression in insect cells (*Spodopterafrugiperda* – Sf9), being cloned into monocistronic and bicistronic vectors. The target proteins were expressed and could autocatalytically be cleaved into the individual proteins, using 3C (HAV) and 2A catalytic site from 2A of foot-and-mouth disease virus (FMDV) proteases, as shown by SDS-PAGE and immunoblot analysis. The assembly of VLPs was observed in one of the strategies by electron microscopy. These is the first record, of which we have knowledge, of HAV VLPs assembled from structural proteins in insect cells. HAV antigen could be useful in the design of new vaccines and diagnostic kits, helping the World Health Organization (WHO) achieve its goal of eradicating hepatitis A by 2030.

KEYWORDS: Baculovirus, Codon optimization, Hepatitis A virus, Virus-like particles

INTRODUCTION

Hepatitis A is a viral disease of worldwide occurrence that affects mainly the human liver, being the principal cause of acute hepatitis in the population [1]. It is a consequence of the infection of the cells of the host organism with the A (HAV) hepatitis virus, a picornavirus that possesses as genetic material a positive-sense single-stranded RNA [2]. Since the 90's, vaccines have been approved (with inactivated and attenuated virus) that effectively induce protective immunity against the infectious agent [3]. However, their elevated cost make their utilization unfeasible in undeveloped and under development countries (places that present the highest number of such cases). In this manner, the infection by the Hepatitis A still affects around 1.4 million people every year, which indicates the relevance of studying new, cheaper

vaccine and diagnostic kit strategies to be effectively used in the countries presenting the highest rates of people living in risk zones.

In 2016, the WHO launched a plan for the years 2016-2021 in the attempt of eradicating viral hepatitis in the world [4]. The main strategy used in the case of hepatitis A is the vaccination of populations in the areas where the virus circulates.

The HAV belongs to the *Picornaviridae* family, being the single representative of the *Hepatovirus* gender. Despite sharing similarities with other viruses from the family, it presents some unique characteristics, which place it in a specific gender e.g. I – it does not block the synthesis of the proteins of the host cell and has a genome filled with rare codons; II – it has physical stability (resistant to high temperatures and PH variations); III – via of morphogenesis different than those presented by picornovirus; IV – existence of infectious “eHAV” enveloped forms circulating in the blood of individuals carrying the virus [5,6,7,8].

The HAV genome is made by a single band of a positive-sense, 7.5 kb single-stranded RNA. It contains a single open reading frame (ORF) that codifies all the viral proteins. The ORF is translated as a big polyprotein and processed by the viral 3C protease, which cleaves the P1 – 2A region, precursor of the structural proteins VP0, VP3, VP1, 2A that gather up in order to assemble the capsid, with icosahedral shape and around 27-30 nm, even in the absence of the HAV genome. When the viral RNA is wrapped up by the capsid, the RNA base, as an acceptor of protons, carries out the autocatalysis of the VP0 in the proteins VP2 and VP4. The VP1-2A is also cleaved, more likely by proteases of the host cells, since both the 2A and the VP4 are not found in infectious particles of the HAV. The viral capsid is composed by 60 monomers of the proteins VP1, VP2, e VP3, which have the main antigenic viral regions. Even without being part of the mature capsid, the VP4 and 2A proteins are essential for its formation [8,9].

An assessment that has been increasingly used in studies with the aim of obtaining antigens for vaccines and viral diagnostic tests consists in expressing the proteins of the viral capsid of interest in heterologous expression systems, generating VLPs that have a similar size and shape of that of the virus, but that do not include the viral genome [10,11,12].

These particles can be expressed through several systems, from the simplest ones, such as *Escherichiacoli* cells, to more complex types, such as eukaryotic cells of mammals or free expression systems of cells. The choice of the more adequate strategy is generally based on structure and post-translational modifications of the viral proteins of interest [13,14]. The utilization of baculovirus as a tool has increased in time, as its capacity of cloning sequences makes it ideal for simultaneous expression of multiple structural proteins that gather up in

order to form particles similar to a virus. Besides that, insect cells (host of baculovirus) present post-translational modifications similar to that of mammals, another advantage of the system for the production of VLPs [15].

A large amount of VLPs have been obtained through the use of the expression system baculovirus/ insect cells, including members of the *Picornaviridae* family, such as the foot-and-mouth disease virus (FMDV), enterovirus 71 (EV71), coxsackievirus (CV A16) [16], among other viruses of medical importance, such as hepatitis B (HBV), human papillomavirus (HPV) [17] and chikungunya virus (CHIKV) [18].

There has been attempts of obtaining VLPs from HAV using cell systems of mammals and baculovirus/insects. However, despite observing the expression of the recombinant proteins, neither works were able to detect VLPs formed by the inserted sequences. Winokur and collaborators inserted the ORF and the P1 region of the HAV in the vaccine virus used to infect HeLa cells, but the resulting protein was not processed and the VLPs were not assembled [19]. For its part, Rosen and collaborators were able to express the ORF of the hepatitis A virus using the system of insect baculovirus cells. They managed to detect the polyprotein of 220 kDa and understand that it was able to induce the formation of neutralizing antibodies in mice and that its migration in cesium chloride gradients had a profile similar to that of HAV empty cells, though it was also not possible to visualize the particles [20]. In order to maximize the production of VLPs, bioinformatics tools to optimize the codon usage were used, having as a parameter the Sf9 cells used for expressing heterologous protein. The structural genes of the HAV were organized in different forms, following three strategies for the generation of VLPs. One of them had the catalytic site of the FMDV 2A protease inserted, replacing the 3C protease of the hepatitis A virus. Recombining baculovirus containing the structural proteins of the HAV were generated and the formation of the VLPs was identified through electron microscopy.

MATERIALS AND METHODS

Gene design and optimization

In order to generate HAV VLPs, three different strategies using sequences from HM175 viral strain were defined. The first strategy, named HAV-PTRUNC, includes VP0-VP3-VP1-2A proteins, a spacer DNA and HAV 3C protease. The second strategy (P1+3C) comprises one construction with all structural proteins responsible for HAV viral capsid assembly (VP0-VP3-VP1-2A) and another with 3C protease. On the third strategy (VP0+VP3-1), VP0 was separated from VP3 and VP1 proteins. In addition, the catalytic site of FMDV 2A protease was included between VP3 and VP1. HAV 2A was also included after VP1 sequence. The designed ORFs can be seen in Table 1.

Table 1. Strategies composition for HAV VLPs generation

Strategies	Gene Composition
1- HAV-PTRUNC	ORF1: VP4-VP2-VP3-VP1-2A_Spacer DNA_3C
2- P1+3C	ORF1: P1 (VP4-VP2-VP3-VP1-2A) + ORF2: 3C
3- VP0+VP3-1	ORF1: VP0 (VP4-VP2) + ORF2: VP3-2AFMDV-VP1-2AHAV

They were optimized for expression in insect cells (*Spodoptera frugiperda* 9 – Sf9) using LETO 1.0 (Entelechon[®]) algorithm software. This program is used to optimize codon usage and GC content, it also eliminates polyadenylation sites, splicing sites and RNA secondary structures. For further cloning steps, flanking *NheI/KpnI* restriction sites for HAV-PTRUNC; *KpnI/NheI* for 3C and VP0; *EcoRI/XbaI* for P1 and VP3-1 were introduced. The genes were commercially synthesized by Genearth[®] Gene Synthesis (ThermoFisher Scientific).

Cells and media

Spodoptera frugiperda 9 (Sf9) insect cells were maintained in semi-adherent cultures with Sf-900 II medium (Life Technologies) supplemented with antibiotics at 27 °C.

Generation of transfer plasmids and recombinant baculovirus

The recombinant transfer plasmids were generated using pFastBac 1 and pFastBac-Dual (Invitrogen[™]) vectors, the first one contains polyhedrin promoter, and the second contains two multiple cloning sites (MCS). The gene HAV-PTRUNC coding for P1+3C was treated with *NheI/KpnI* and cloned into pFastBac 1 polyhedrin promoter. The identity of target genes in resulting transfer plasmids were confirmed by restriction enzyme cleavage. Genes fragments coding for P1 and VP3-1, were cleaved with *EcoRI/XbaI* and cloned into the corresponding sites in pFastBac-Dual MCS I under the control of the polyhedron promoter.

After cloning confirmation, 3C and VP0 were cloned into pFastBac-Dual MCS II under the control of the p10 promoter. Finally, three recombinant transfer plasmids were generated.

Recombinant baculovirus HAV-PTRUNC/Bac, P1+3C/Bac and VP0+VP3-1/Bac were subsequently generated using Bac-to-Bac Expression System (InvitrogenTM), according to standard system methods. In brief, transfer plasmids with HAV genes were transformed into chemically competent DH10Bac *Escherichia coli* cells (InvitrogenTM) in which the expression cassettes were transferred from the recombinant plasmids to bacmids that were inside of the cells by site-specific transposition. Bacmids were isolated and verified by (polymerase chain reaction) PCR analysis with M13 primers. After that, they were transfected into Sf9 cells and recombinant virus collected.

Baculovirus stock

Recombinant baculovirus HAV-PTRUNC/Bac, P1+3C/Bac and VP0-VP3-1/Bac were inoculated in 2×10^7 and then in 10^8 Sf9 insect cells to prepare high titer viral stock. The viral titer was then calculated by end-point dilution.

Analysis of HAV proteins expression

Once a viral stock of known titer was obtained for each one of the strategies, Sf9 cells were infected with recombinant baculovirus at a multiplicity of infection (MOI) of 1, 5 and 10, for 24, 48, 72 and 96 hours post-infection to analyze under what conditions the proteins of interest would be expressed and processed, two necessary steps for VLPs assembly. The cells were lysed with buffer (0.1% Triton X-100 in PBS, pH 7.4, 100 ug PMSF/ml and Sigma protease inhibitor 8x) and then separated by 15% SDS-PAGE electrophoresis. Separated proteins were also transferred onto a PVDF membrane for 1 hour at 25 V. The membrane was blocked and then incubated with purified anti-VP1 (1:500) polyclonal antibody produced in rabbit. After several washes with PBS1x/Tween 0,05%, the membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibody (1:10.000). The reaction was visualized with TMB substrate.

Electron microscopy

Sf9 cells were infected with VP0-VP3-1/Bac at MOI 10, harvested 3 days post-infection (dpi), fixed for 72 hours with paraformaldehyde 4% and included in EPON resin.

Cells were ultrathin sectioned for transmission electron microscopy (TEM) analysis. Specimens were viewed using a Tecnai G2 Spirit transmission electron microscope.

VLPs purification

About 10^8 Sf9 cells were infected with VP0+VP3-1/Bac at a MOI 10 and harvested 3 dpi. The cells were lysed with lysis buffer (1% Triton X-100 in PBS, pH 7.4, 100 μ g PMSF/ml and Sigma protease inhibitor 8x). The supernatant was placed on a 30% sucrose cushion and centrifuged 30.000 g for 100 minutes at 4 °C. The supernatant was discarded and the pellet resuspended in PBS 1x. Proteins solution was applied on a sucrose gradient 30-60% (in PBS 1x). The fractions were collected from the upper region of the resulting solution and stored at -80 °C. They were separated by 15% SDS-PAGE electrophoresis and submitted to immunoblot analysis as described above.

RESULTS

Analysis of codon usage

The analysis of LETO 1.0 (Entelechon[®]) showed a discrepancy between the frequency of most codons used by HAV over those used by Sf9 insect cells to express similar amino acids that composed the proteins of interest. Most of them were changed to more frequent codons in Sf9 cells. The size and amount of secondary structures of the messenger RNA can also negatively influence the translation and obtaining of the proteins of interest. The presence of these structures may impair both the slippage of the ribosomes along the mRNA and the access of the anti-codons of the tRNAs to their respective codons. The optimization process also contributed to the reduction of the number and length of these hairpin-like structures, in order to increase the efficiency of protein synthesis.

Generation of recombinant baculovirus

Recombinant bacmids were confirmed with PCR using M13 forward (5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3') and M13 reverse (5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3') primers. This primers flanks the mini-attTn7 site and facilitates PCR analysis. The target genes were inserted in the bacmid after the

transposition, generating fragments in the expected size (5.567, 5.734 and 5146 pb for strategies 1, 2 and 3 respectively).

The recombinant baculovirus named HAV-PTRUNC/Bac, P1+3C/Bac and VP0+VP3-1/Bac were generated and collected seven days after transfection of Sf9 cells. The titers of recombinant virus were measured at $12,4 \times 10^9$, $8,7 \times 10^9$ and $2,2 \times 10^9$ (strategies 1, 2 and 3 respectively) plaque-forming units/ml at the second passage.

Analysis of target protein expression in Sf9 cells

Sf9 cells were infected with recombinant baculovirus from all strategies at MOIs of 1, 5 and 10, and were harvested and analyzed at 24, 48, 72 and 96 hours post-infection to identify if target proteins were expressed and processed. The target proteins were expressed at all tested conditions with the different baculovirus, but higher levels were obtained when cells were infected at MOI 10 and collected after 72 hours post-infection. Construction 1-HAV-PTRUNC generated the lowest levels of target proteins, whereas strategy 3-VP0+VP3-1 resulted in higher levels of protein expression.

The cleavage of HAV structural proteins was visualized in SDS-PAGE gels in all strategies, although it was more evident in strategy 3 where it was possible to visualize even the cleavage of 2A HAV protein (Fig 1). The results indicated that HAV 3C and catalytic site of FMDV 2A proteases were highly active for cis-cleavage of P1, VP0 and VP3-1 precursors into VP4, VP2, VP1 and VP3 structural proteins.

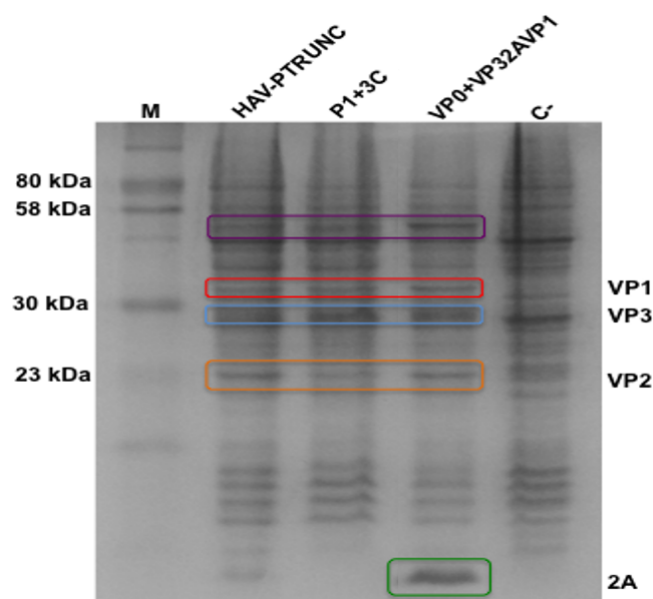


Fig 1. Expression and processing of HAV proteins in insect cells. Lysates from Sf9 cells infected with recombinant baculovirus at a MOI of 10 for 72 hours were fractionated on 15% SDS-PAGE gels. The proteins of interest were expressed and cleaved (in VP1, VP3, VP2 and

2A) as can be seen in the picture above. M- ColorPlus TM Prestained Marker (New England Biolabs®), HAV-PTRUNC-lysate of the first strategy, P1 + 3C-lysate of the second strategy, VP0 + VP3-1 - cell lysate of the third strategy, C- Uninfected Sf9 cells maintained in culture for the same period of the infected cells. Proteins: VP1 (highlighted in red ~ 33 kDa), VP3 (highlighted in blue ~ 27 kDa), VP2 (highlighted in orange ~ 24 kDa) and 2A (highlighted in green ~ 5 kDa).

VP1 protein was also recognized in the third strategy by anti-VP1 polyclonal antibody produced in rabbit (data not shown).

Electron microscopy observation of HAV VLPs

HAV VLPs were observed by electron microscopy in the cytoplasm of Sf9 cells infected with VP0+VP3-1 recombinant baculovirus. Non-infected cells were also analyzed (Fig 2). The VLP particles were spherical with a diameter of approximately 30 nm (Fig 3), which indicated that HAV structural proteins VP0, VP3 and VP1-2^A produced in Sf9 cells could self-assemble into HAV particles.

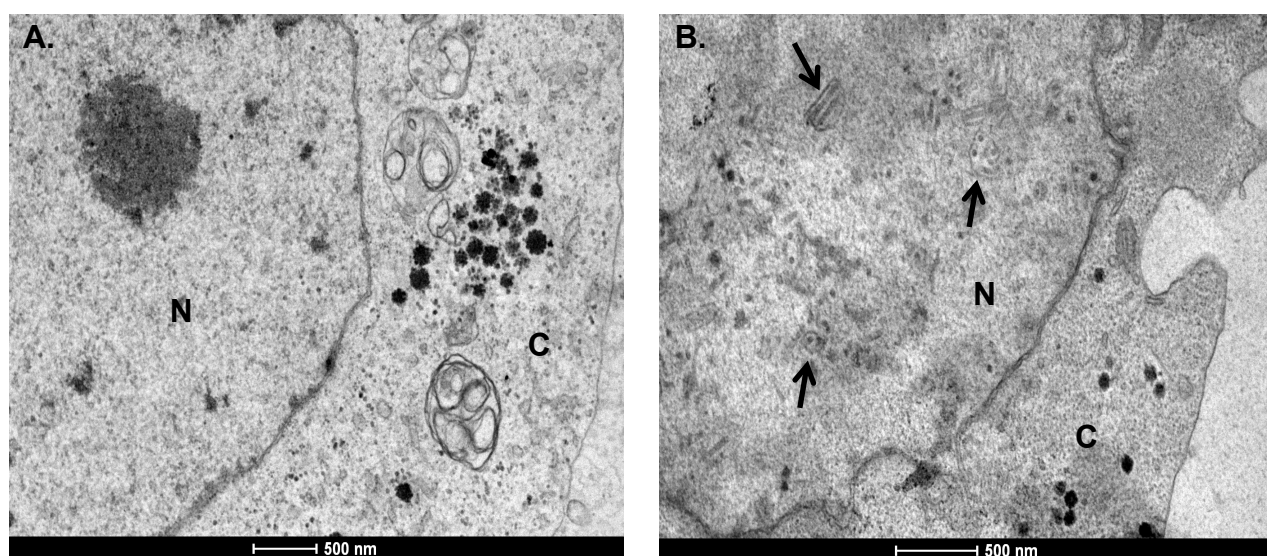


Fig 2. Non-infected (A) and infected (B) Sf9 cells with recombinant baculovirus. A. Non-infected cells. B. Infected cells with VP0+VP3-1/Bac. C- Cytoplasm, N-Nucleus, Black Arrows-Recombinant baculovirus.

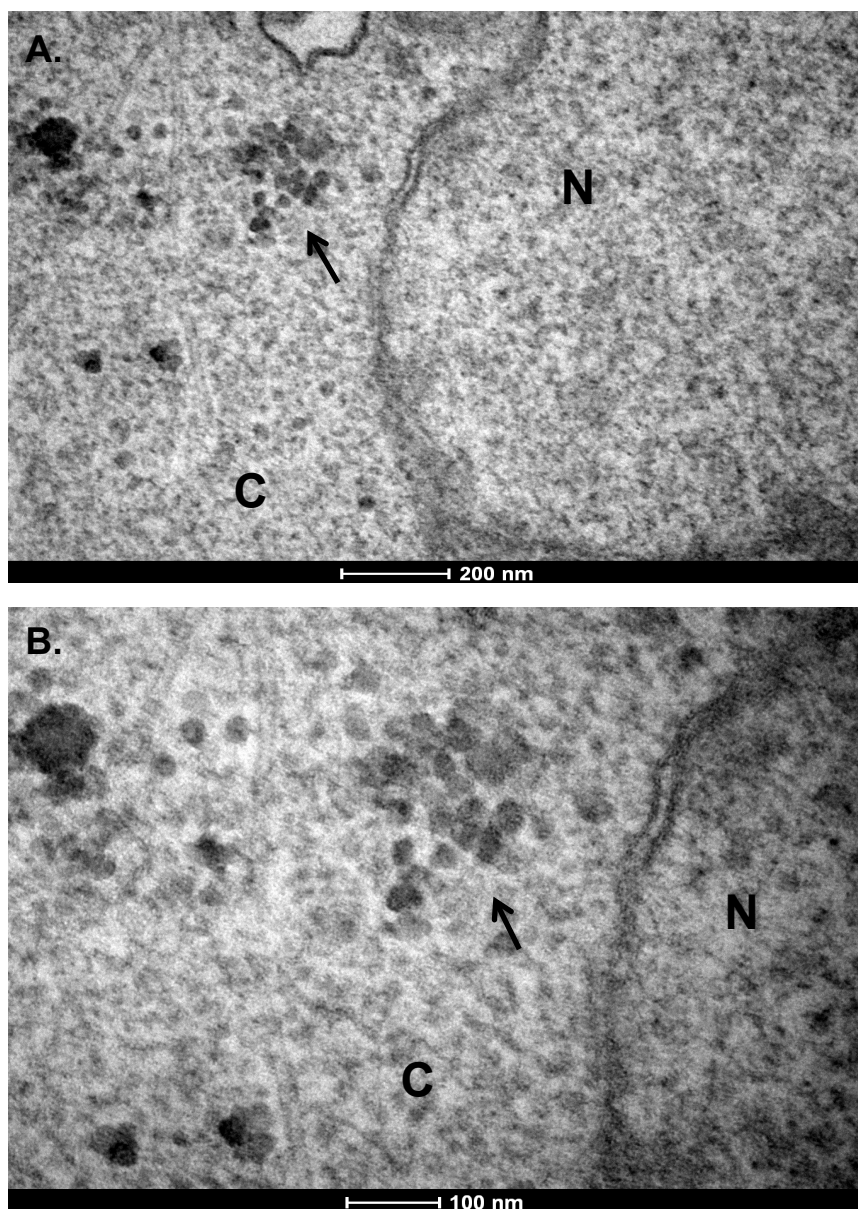


Fig 3. HAV VLPs inside Sf9 infected cells with VP0+VP3-1/Bac. A. VLPs visualized in an Sf9 cell infected with baculovirus at 200 nm increase. B. Particles visualized with an increase of 100 nm. C- Cytoplasm, N-Nucleus, Black Arrows-VLPs.

HAV VLPs purification

VLPs obtained from Sf9 cells infected with VP0+VP3-1 were purified from cells lysates and VP1 protein was recognized in all collected fractions by anti-VP1 antibody. The fractions will be tested with serological panels from patients vaccinated against hepatitis A virus.

DISCUSSION

The hepatitis A virus has a genome with a large number of rare codons, since its translation strategy is based on the fact that it does not compete with host cell machinery. Therefore, codon optimization is a relevant strategy when expressing HAV proteins. The genes of designed strategies for HAV VLPs generation went through codon sequence optimization process in order to obtain the target proteins in Sf9 insect cells. The amino acids histidine, cysteine, aspartic acid, serine, valine, leucine, glycine, arginine were found in the original sequences in rare codons, with more than 50% deviation from those used by the target organism and, through the optimization of codons, they were reduced and replaced by more frequent codons in the insect cells. It was possible to express and process the polyproteins and optimization enabled the visualization of the target proteins in SDS-PAGE gel.

The strategies from this work were based on articles from researchers who were able to obtain VLPs from several viruses of the *Picornaviridae* Family [21,22,23,24]. FMDV virus has been studied for the production of vaccines for several years because of its pathogenicity and because it is highly contagious. In the early 1990s, Rossien *et al.* attempted to express the entire viral genome and thereby obtain VLPs through the baculovirus / insect cell system, and although they expressed the recombinant proteins, they could not detect the VLPs [25]. Li and co-workers expressed in 2008 the P12A3C regions of the FMDV virus in silkworm larvae using recombinant baculovirus. The construct contained the essential proteins for FMDV viral capsid formation and the 2A and 3C proteases responsible for protein cleavage. Proteins were detected by antibodies, but they failed to detect empty capsid particles [26]. This work inspired the construction of strategy 1, containing all the genes necessary for the final generation of HAV capsid. However, based on the literature, it was already possible to predict that the proteins of interest would be expressed and processed at lower levels, since its gene had 3267 bp and the expression induced by the polyhedrin promoter occurs about 72 to 96 hours after baculovirus infection, which results in the processing of the polyprotein very close to the lysis of the infected cells.

In the present study, strategy 1 had its proteins expressed and processed. However, the processing was late compared to the other constructs, and the expression level was lower than that obtained in strategies 2 and 3. Therefore, it was not used in the later stages of visualization of VLPs inside the insect cell and purification of the particles obtained. The P1 + 3C construct was used to induce concomitant expression of all viral capsid proteins and 3C protease. The size of both genes was reduced, which increased the expression level of target

proteins. Expression and processing of the peptides were identified after 48 hours of infection of Sf9 cells by baculovirus, even prior to induction of viral promoters (which occurs in the very late phase of infection). This strategy of viral structural proteins cloned into a promoter other than 3C protease was used to generate FMDV VLPs in baculovirus [21,22,23] and EMCV in mammals [24].

In the third strategy, VP0 + VP3-1, the genes of the structural proteins were cloned into two distinct promoters, so that the size of the polyproteins expressed and the time of their cleavage were reduced. Another relevant modification was the replacement of HAV 3A protease by FMDV 2A protease catalytic site known in the literature for its efficient cleavage and successfully used by Cao et al. in 2010 at the same location inserted in the sequence (between VP3 and VP1), in order to obtain higher amounts of FMDV virus VLPs. The proteins of interest were visualized 48 hours post-infection and had higher expression levels than those obtained in the other strategies. It was possible to detect cleavage of HAV 2A protein after 72 hours of infection (event not visualized in the other strategies). This was the only construct in which VP1 protein was recognized by anti-VP1 antibodies produced in rabbits.

The analysis of infected and uninfected cells showed the cytopathic effects (already visualized by light microscopy), presented after the infection of the Sf9 with the recombinant baculovirus. HAV virus-like particles were observed in the cell cytoplasm. The particles had a similar size (~ 30 nm) and morphology (icosahedral) to those presented by the hepatitis A virus.

The results showed that baculovirus / insect cell system is efficient in the expression and processing of heterologous proteins. This is relevant when it comes to virus-like particles assembly, since most viruses of public health importance have more than one protein composing their capsid or viral envelope. The generation of recombinant baculoviruses site-specific transposition system is fast and efficient. The use of bicistronic vectors containing strong baculovirus promoters is the most appropriate way of expressing proteins when the viral particle is composed of more than one molecule. When the viral capsid proteins were separated and cloned into distinct promoters, the expression/processing was more efficient. This data is the first record of HLA VLPs produced in a heterologous expression system. The produced antigen comes as a viable, safe and economical alternative for the production of future vaccines and diagnostic kits against hepatitis.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank CAPES and CNPq for the financial support. We also thank PDTIS-FIOCRUZ for the use of its facilities.

REFERENCES

1. Vaughan, G. *et al.* (2014). Hepatitis A Virus: Host Interactions, Molecular Epidemiology and Evolution. *Infection, Genetics and Evolution* 21: 227-243.
2. Nainan, O. V. *et al.* (2006). Diagnosis of Hepatitis A Virus Infection: A Molecular Approach. *Clinical Microbiology Reviews* 19 (1): 63-79.
3. Rao, S. *et al.* (2016). A Review of Immunogenicity and Tolerability of Live Attenuated Hepatitis A Vaccine in Children. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. Artigo disponível online.
4. WHO. (2016). Global Health Sector Strategy on Viral Hepatitis 2016-2021: Towards ending viral hepatitis. World Health Organization: 1-56.
5. Lemons, S. M. & Robertson, B. H. (1993). Current perspectives in the virology and molecular biology of hepatitis A virus. *Seminars in virology* 4(5): 285-295.
6. Totsuka A and Moritsugo Y (1999). Hepatitis A virus proteins. *Intervirology* 42: 63-68.
7. Walker, C. M. (2015). Reassessing immune control of hepatitis A virus. *Current Opinion in Virology* 11: 7-13.
8. Wang, X. *et al.* (2015). Hepatitis A virus and the origins of picornaviruses. *Nature* 517: 85-88.
9. Martin, A. & Lemon, S. M. (2006). Hepatitis A Virus: from Discovery to Vaccines. *Hepatology* 43(2): 164-172.
10. Machida, K. & Imataka, H. (2015). Production methods for viral particles. *Biotechnol Lett* 37: 753-760.
11. Yan, D. *et al.* (2015). The application of virus-like particles as vaccines and biological vehicles. *Appl Microbiol Biotechnol* 99: 10415-10432.
12. Frietze, K. M. *et al.* (2016). Engineering virus-like particles as vaccines. *Current Opinion in Virology* 18: 44-49.
13. Naskalska, A. & Pyrc, K. (2015). Virus Like Particles as Immunogens and Universal Nanocarriers. *Polish Journal of Microbiology* 64(1): 3-13.
14. Effio, C. L. & Hubbuch, J. (2015). Next generation vaccines and vectors: Designing downstream processes for recombinant protein-based virus-like particles. *Biotechnology Journal* 10: 715-727.
15. Yamaji, H. (2014). Suitability and perspectives on using recombinant insect cells for the production of virus-like particles. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 1963-1970.
16. Dong, H *et al.* (2014). Virus-like particles in picornavirus vaccine development. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 4321-4329.
17. Oers, M. M. *et al.* (2015). Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology. *Journal of General Virology* 96: 6-23.
18. Wagner, J. M. *et al.* (2014). Enhanced Production of Chikungunya Virus-Like Particles Using a High-pH Adapted *Spodoptera frugiperda* Insect Cell Line. *PLOS One* 9(4): 1-14.
19. Winokur, P. L. *et al.* (1991). The Hepatitis A Virus Polyprotein Expressed by a Recombinant Vaccinia Virus Undergoes Proteolytic Processing and Assembly into Virus-like Particles. *Journal of Virology* 65(9): 5029-5036.
20. Rosen, E. *et al.* (1993). Synthesis of immunogenic hepatitis A virus particles by recombinant baculoviruses. *Vaccine* 11(7): 706-712.

21. Mohana, S. B. *et al.* (2012). Development of foot-and-mouth disease virus (FMDV) serotype O virus-like-particles (VLPs) vaccine and evaluation of its potency. *Antivir Res* 93(6): 288-295.
22. Porta, C. *et al.* (2013). Efficient production of foot-and-mouth disease virus empty capsids in insect cells following down regulation of 3C protease activity. *J Virol Methods* 187(2): 406-412.
23. Bath, S. A. *et al.* (2013). Novel immunogenic baculovirus expressed virus-like particles of foot-and-mouth disease (FMD) virus protect guinea pigs against challenge. *Res Vet Sci* 95(3): 1217-1223.
24. Jeoung, H. Y. *et al.* (2011). Immunogenicity and safety of the virus-like particle of the porcine encephalomyocarditis virus in pig. *Virology Journal* 8: 170.
25. Roosien, J. *et al.* (1990). Synthesis of foot-and-mouth disease virus capsid proteins in insect cells using baculovirus expression vectors. *J Gen Virol* 71: 1703-1711.
26. Li, Z. *et al.* (2008). Expression of Foot-and-Mouth Disease Virus Capsid Proteins in Silkworm-Baculovirus Expression System and Its Utilization as a Subunit Vaccine. *Plos One* 3(5): 1-7.

ANEXO A - Planilha para cálculo do TCID₅₀ e pfu/ml

	A	B	C	D	E	F
1	Diluições	Número de Poços com Células Infectadas	Número de Poços com Células Não Infectadas	Total Células de Infectadas	Total de Células Não Infectadas	% Infectadas
2						
3						
4						
5	0,00001	12	=B10 – B5	=SUM(B5:B8)	=SUM(C5:C5)	=D5/(D5:E5)
6	0,000001	8	=B10 – B6	=SUM(B6:B8)	=SUM(C5:C6)	=D6/(D6:E6)
7	0,0000001	1	=B10 – B7	=SUM(B7:B8)	=SUM(C5:C7)	=D7/(D7:E7)
8	0,00000001	0	=B10 – B8	=SUM(B8:B8)	=SUM(C5:C8)	=D8/(D8:E8)
9						
10	Número de Poços	12				
11	mls/poço	0.01				
12						
13	PD	=(H10-0.5)/(H10-110)				
14	Log TCID	=J10-B13				
15	TCID ₅₀	=10^B14				
16	1/TCID ₅₀	=1/B15				
17	TCID ₅₀ /ml	=B16/B11				
18						
19	pfu/ml	=B17*0.69				

	G	H	I	J
1	Acima 0.5	% Acima 0.5	% Abaixo 0.5	Log Diluição Acima 50%
2				
3				
4				
5	=IF(F5>0.5,"VERDADEIRO","FALSO")	=IF(AND(G5="VERDADEIRO",G6="FALSO"),F5,0)	=IF(AND(G4="VERDADEIRO",G5="FALSO"),F5,0)	=IF(H5>0,LOG(A5),0)
6	=IF(F6>0.5,"VERDADEIRO","FALSO")	=IF(AND(G6="VERDADEIRO",G7="FALSO"),F6,0)	=IF(AND(G5="VERDADEIRO",G6="FALSO"),F6,0)	=IF(H6>0,LOG(A6),0)
7	=IF(F7>0.5,"VERDADEIRO","FALSO")	=IF(AND(G7="VERDADEIRO",G8="FALSO"),F7,0)	=IF(AND(G6="VERDADEIRO",G7="FALSO"),F7,0)	=IF(H7>0,LOG(A7),0)
8	=IF(F8>0.5,"VERDADEIRO","FALSO")	=IF(AND(G8="VERDADEIRO",G9="FALSO"),F8,0)	=IF(AND(G7="VERDADEIRO",G8="FALSO"),F8,0)	=IF(H8>0,LOG(A8),0)
9				
10		=SUM(H5:H8)	=SUM(I5:I8)	=SUM(J5:J8)
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				