UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Clonagem de fragmentos dos genes *gag* e *env* do HIV-1 e HTLV-1,
expressão em *Escherichia coli* das proteínas gp21, p24 e gp46 do
HTLV-1 e imunodeteccção**

Eliza Vieira Davi

Ribeirão Preto

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Clonagem de fragmentos dos genes *gag* e *env* do HIV-1 e HTLV-1,
expressão em *Escherichia coli* das proteínas gp21, p24 e gp46 do
HTLV-1 e imunodeteção**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia para
obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientado: Eliza Vieira Davi

Orientador: Prof.^a Dr.^a. Elisa Maria de
Sousa Russo

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 15/04/2015. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Davi, Eliza Vieira

Clonagem de fragmentos dos genes *gag* e *env* do HIV-1 e HTLV-1, expressão em *Escherichia coli* das proteínas gp21, p24 e gp46 do HTLV-1 e imunodeteção. Ribeirão Preto, 2015

150p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Russo, Elisa Maria de Sousa

1. Proteína recombinante. 2. *Escherichia coli*. 3. Diagnóstico. 4. HTLV-1. 5. HIV-1

Dedico este trabalho aos meus pais, ao meu irmão e ao Thiago.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me sustentar firme no equilíbrio entre o poder da fé e os ensinamentos da ciência;

Aos meus pais Eurípedes e Elizamar que sempre foram meus maiores incentivadores. Obrigada pelo amor, carinho, orações e apoio necessários;

Ao meu irmão Afonso por cuidar tão bem de mim e por ser meu melhor amigo. Minha vida sem ele seria muito mais difícil;

Ao Thiago pela compreensão da minha ausência no dia-a-dia. Obrigada por ouvir meus problemas, enxugar minhas lágrimas e por me proporcionar momentos de paz e felicidade a cada demonstração de amor;

Aos amigos de longa data de Douradoquara e Uberlândia. Obrigada por alimentarem sempre minha vontade de voltar para encontra-los;

Aos grandes amigos que fiz em Ribeirão Preto em especial à Giselle. Obrigada pela companhia, pelo carinho e pela amizade que há de permanecer;

Aos colegas e amigos de laboratório Juliana, Gisele, Nathalia Canicoba, Adriana, Prof^a. Cleni e Jennifer pelos bons momentos de convivência e descontração. Obrigada especialmente ao José Eduardo, João, Henrique, Isabel, Nathalia Indolfo e Leandro pela amizade e carinho e por terem feito esses três anos mais leves e divertidos;

Ao Fillipe, meu grande amigo e “coorientador”, por me ajudar em todas as etapas desse trabalho. Obrigada pelos ensinamentos, pelos bons conselhos e pelo companheirismo e amizade de todas as horas;

À Thais, minha amiga e “minha IC”, pela companhia e ajuda em todos os experimentos, mesmo à noite ou em finais de semana. Obrigada pela amizade e pelas ótimas conversas;

À Luciana Ambrósio, Luiz Miguel e Prof. José César pela ajuda durante o desenvolvimento desse projeto;

À todos do laboratório do Prof. Dr. Sérgio Akira, especialmente à Laís pela imensa ajuda em todas as etapas do trabalho. Muito obrigada pela disponibilidade de sempre em me auxiliar, pelas boas conversas e pelos livros;

À Prof^a. Dr^a. Elisa Maria de Sousa Russo, pela oportunidade, paciência e confiança depositada para realizar esse trabalho. Obrigada pela amizade e pelo carinho de sempre.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para realização desse projeto;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte técnico e financeiro;

A todos aqueles que, embora não citados, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Meu sincero agradecimento.

*"É preciso a certeza de que tudo vai mudar.
É necessário abrir os olhos e perceber que as coisas boas estão dentro de nós,
Onde os sentimentos não precisam de motivos nem os desejos de razão.
O importante é aproveitar o momento e aprender sua duração.
Pois a vida está nos olhos de quem sabe ver ...
Se não houve frutos,
valeu a beleza das flores.
Se não houve flores,
valeu a sombra das folhas.
Se não houve folhas,
valeu a intenção da semente."
Henfil*

RESUMO

Davi, E. V. **Clonagem de fragmentos dos genes *gag* e *env* do HIV-1 e HTLV-1, expressão em *Escherichia coli* das proteínas gp21, p24 e gp46 do HTLV-1 e imunodeteção.** Ribeirão Preto, 2015. 147f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O HIV-1 é o agente etiológico da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e o HTLV-I da leucemia/linfoma de célula T no adulto (ATL) e da paraparesia espástica tropical ou mielopatia associada ao HTLV (HAM/TSP), principalmente. Ambos são retrovírus com genoma RNA e possuem o gene *gag* que codifica as proteínas p24 (HIV-1 e HTLV-1) e p19 (HTLV-1) que formam o capsídeo e a matriz do vírus, respectivamente, e o gene *env* que codifica as proteínas gp41 e gp120 (HIV-1) e gp21 e gp46 (HTLV-1) que compõem o envelope viral. Os primeiros anticorpos produzidos nas infecções por ambos os vírus são destinados a essas proteínas e os diferentes testes diagnósticos disponíveis no mercado usam uma combinação dessas proteínas virais. O diagnóstico precoce é de extrema importância para o controle da epidemia, tratamento dos indivíduos e planejamento dos gastos com saúde pública. Os kits diagnósticos usados em laboratórios clínicos, bancos de sangue e hospitais brasileiros para o diagnóstico destas viroses são na sua maioria de empresas estrangeiras e o Brasil despende milhares de reais importando esses materiais. No Brasil, há a necessidade e incentivo para a produção de sistemas de diagnóstico com tecnologia nacional. Neste trabalho, os genes das proteínas p24, gp41 e gp120 do HIV-1 e p19 do HTLV-1 foram clonados com sucesso em diferentes vetores e em diferentes linhagens de *E. coli*, porém essas proteínas não foram expressas. As proteínas gp21, p24 e gp46 do HTLV-1 foram produzidas em bactérias BL21(DE3) com vetor pET28a(+). Essas três proteínas foram solubilizadas dos corpos de inclusão, purificadas por IMAC e identificadas pelas técnicas de *Western Blotting* e por espectrometria de massas. As proteínas recombinantes gp21, p24 e gp46 foram reconhecidas pelos soros de indivíduos com HTLV-1 e não foram reconhecidas por soros de indivíduos com HIV-1 e saudáveis, o que confere a elas especificidade e grande potencial diagnóstico. Os resultados deste trabalho são os primeiros passos para atingir o objetivo maior de produzir todas as sete proteínas em maior escala e, por fim, chegar a produção de um kit diagnóstico sensível, específico e barato com tecnologia nacional, diminuindo os gastos com a importação destes produtos e fomentando a indústria biotecnológica nacional.

Palavras chave: Proteína recombinante; *Escherichia coli*; Diagnóstico; HTLV-1; HIV-1.

ABSTRACT

Davi, E. V. **Cloning of fragments of gag and env genes of HIV-1 and HTLV-1, expression of the proteins gp21, gp46 and p24 of HTLV-1 in *Escherichia coli* system and immunodetection.** 2015. 147f. Dissertation (Master) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015

HIV-1 is the etiologic agent of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and HTLV-I is the cause of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) and HTLV-I-associated myelopathy or tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). Both are retroviruses with RNA genome and possess the gene *gag* and *env*. The *gag* gene encodes for p24 protein (HTLV-1 and HIV-1) and p19 (HTLV-1) forming the viral capsid and matrix, respectively, and the *env* gene encodes for proteins gp120 and gp41 (HIV-1) and gp21 and gp46 (HTLV-1) making the viral envelope. The first antibodies produced in infections by both viruses are against these proteins and the various diagnostic tests on the market use a combination of those viral proteins. Early diagnosis is extremely important to control the epidemic, treatment of individuals and planning of public health expenditures. The diagnostic kits used in clinical laboratories, blood banks and in Brazilian hospitals for the diagnosis of these viruses are mostly from foreign companies. Brazil spends thousands of *reais* importing these materials. In Brazil, there is a need and incentive for the production of diagnostic systems with national technology. In this study, the genes of p24, gp41 and gp120 of HIV-1 and p19 of HTLV-1 have been successfully cloned in different vectors and different strains of *E. coli*, but these proteins were not expressed. The proteins gp21, gp46 and p24 of HTLV-1 were produced in bacteria BL21 (DE3) with vector pET28a (+). These three proteins were solubilized from inclusion bodies, purified by IMAC and identified by Western blotting techniques and mass spectrometry. The recombinant proteins gp21, p24 and gp46 were recognized by sera from patients with HTLV-1 and were not recognized by sera from individuals with HIV-1 and healthy people, which gives them great specificity and diagnostic potential. These results are the first steps to achieve the ultimate goal of producing all seven proteins on a larger scale and finally get the production of a diagnostic kit sensitive, specific and cheap with national technology, reducing spending on imports of these products and fostering the national biotechnology industry.

Keywords: Recombinant protein; *Escherichia coli*; Diagnosis; HTLV-1; HIV-1.

RESUMEN

Davi, E. V. **Clonación de fragmentos de genes gag y env de HIV-1 y HTLV-1, la expresión de las proteínas gp21, gp46 y p24 del HTLV-1 en *Escherichia coli* y la inmunodetección.** Ribeirão Preto, 2015. 147f. Disertación (Maestrado). Facultad de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

HIV-1 es el agente causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (AIDS) y el HTLV-I de la leucemia, linfoma de células T en adultos (ATL), paraparesia espástica tropical y mielopatía asociada a HTLV (HAM / TSP). Ambos retrovirus son genomas del RNA y poseen el gen *gag* que codifica la proteína p24 (HTLV-1 y HIV-1) y p19 (HTLV-1) que forman la cápside viral de la matriz, además de los genes *env* que codifica la proteína gp120 y gp41 (HIV-1) y gp21 y gp46 (HTLV-1) que componen la envuelta viral. Los anticuerpos producidos en infecciones de los dos virus se asignan a estas proteínas y las diversas pruebas de diagnóstico en el mercado utilizan una combinación de proteínas virales. El diagnóstico precoz es muy importante para controlar la epidemia, tratar a los individuos y planificar los gastos de salud pública. La mayoría de los kits de diagnóstico utilizados en los laboratorios clínicos, bancos de sangre y hospitales brasileños son de empresas extranjeras y Brasil gasta miles de Reales en la importación de estos materiales. En Brasil hay una necesidad, además de incentivos, para la producción de sistemas de diagnóstico con tecnología nacional. En este estudio, los genes de p24, gp41 y gp120 del HIV-1 y p19 del HTLV-1 se han clonado con éxito en diferentes vectores y diferentes cepas de *E. coli*, pero estas proteínas no se expresan. Las proteínas gp21, gp46 y p24 del HTLV-1 fueron producidas en bacterias BL21 (DE3) con el vector pET28a(+). Estas tres proteínas fueron solubilizadas de cuerpos de inclusión, purificado por IMAC e identificado por técnicas de *Western Blotting* y espectrometría de masas. Las proteínas recombinantes de gp21, p24 y gp46 fueron reconocidos por los sueros de pacientes con HTLV-1 y no fueron reconocidos por los sueros de los pacientes con HIV-1, lo que les da una gran especificidad y el potencial de diagnóstico. Estos resultados son los primeros pasos para lograr el objetivo final de la producción de las siete proteínas en mayor escala y finalmente conseguir la producción de un kit de diagnóstico sensible, específico y barato con tecnología nacional, reduciendo el gasto en importaciones de estos productos y fomentar la industria nacional de la biotecnología.

Palabras clave: Proteína recombinante; *Escherichia coli*; Diagnóstico; HTLV-1; HIV-1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A) Organização do genoma do HIV-1. B) Organização da partícula viral madura do HIV-1.	4
Figura 2 - Organização do genoma e da partícula viral do HTLV-1.	15
Figura 3 - Produto de PCR dos vetores pCMVΔR8.91 e pABT4674.	48
Figura 4 - Produto de PCR de colônias de bactérias DH10β transformadas com <i>pGEM® -T Easy</i> ligado aos fragmentos gênicos da p24, gp41 e gp120 do HIV-1..	49
Figura 5 - Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da proteína p24 do HIV-1 e da p24 recombinante do HIV-1.	50
Figura 6 - Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da proteína gp41 do HIV-1 e da gp41 recombinante do HIV-1..	51
Figura 7 - Sequência de aminoácidos obtida através da tradução do gene da gp120 recombinante..	51
Figura 8 - Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da proteína p19 do HTLV-1 e da p19 recombinante.	52
Figura 9 - Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da proteína gp21 do HTLV-1 e da gp21 recombinante.	52
Figura 10 - Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da proteína p19 do HTLV-1 e da p19 recombinante..	53
Figura 11 - Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da proteína gp46 do HTLV-1 e da gp46 recombinante.	53
Figura 12 - Imagem mostrando a digestão e a purificação dos fragmentos gênicos das proteínas p24, gp41 e gp120 do vírus HIV-1.....	55
Figura 13 - Imagem mostrando a digestão e a purificação dos fragmentos gênicos das proteínas p19, gp21, p24 e gp4 do vírus HTLV-1.....	56
Figura 14 - Produto de PCR de colônias de BL21(DE3)plysS contendo os fragmentos gênicos codificantes das proteínas p19, gp21, p24 e gp46 clonados no vetor pAE.....	57
Figura 15 - Gel de poliacrilamida 18% com as amostras do extrato proteico das bactérias BL21(DE3)plysS transformadas com o vetor pAE recombinante.	58
Figura 16 - Produto de PCR de colônia de BL21(DE3)plysS contendo os fragmento gênicos codificante das proteínas de interesse no vetor pET20b(+). E	60
Figura 17 - Produto de PCR de colônia de BL21(DE3) contendo o fragmento gênico codificante das proteínas p24, gp41 e gp120 do HIV-1 no vetor pET20b(+).	61
Figura 18 - Produto de PCR de colônia de BL21(DE3) contendo o fragmento gênico codificante das proteínas p19, gp21, p24 e gp46 do HTLV-1 no vetor pET20b(+).	61
Figura 19 - Extrato proteico das bactérias BL21(DE3) transformadas com o pET20b(+) recombinante contendo os genes das proteínas p24, gp41 e gp120 do vírus HIV-1. G	62
Figura 20 - Extrato proteico das bactérias BL21(DE3) transformadas com o pET20b(+) recombinante contendo os genes das proteínas p19, gp21, p24 e gp46 do vírus HTLV-1... ..	63
Figura 21 - Produto de PCR de colônia de BL21(DE3) contendo o fragmento gênico codificante das proteínas p24, gp41 e gp120 do HIV-1 no vetor pET28a(+).	65
Figura 22 - Produto de PCR de colônia de BL21(DE3) contendo o fragmento gênico codificante das proteínas p19, gp21, p24 e gp46 do HTLV-1 no vetor pET20b(+).	66
Figura 23 - Extrato proteico das bactérias BL21(DE3) transformadas com o pET28a(+) recombinante contendo os genes das proteínas p24, gp41 e gp120 do vírus HIV-1.....	67

Figura 24 - Extrato proteico das bactérias BL21(DE3) transformadas com o pET28a(+) recombinante contendo os genes das proteínas p19, gp21, p24 e gp46 do vírus HTLV-1...	68
Figura 25 - <i>Western Blot</i> utilizando anticorpo anti-gp21 e anti-p24 HTLV-1. As setas indicam as marcações específicas.....	69
Figura 26 - Teste de solubilidade da expressão proteica das bactérias BL21(DE3) transformadas com o pET28a(+) recombinante contendo os genes das proteínas gp21, p24 e gp46 do vírus HTLV-1.....	70
Figura 27 - Produto de PCR de uma colônia de DH10 β contendo o fragmento gênico codificante da gp120 no vetor <i>pGEM®-T Easy</i>	71
Figura 28 - Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da proteína gp120 do HIV-1 e da gp120 recombinante..	72
Figura 29 - Imagem mostrando a digestão e purificação do fragmento gênico da proteína gp120..	73
Figura 30 - Extrato proteico das bactérias Rosetta(DE3) e BL21-CodonPlus transformadas com pET28a(+) recombinante contendo o gene da proteína p19 do vírus HTLV-1.....	74
Figura 31 - Extrato proteico das bactérias Rosetta(DE3) e BL21-CodonPlus transformadas com o pET28a(+) recombinante contendo o gene da proteína p24 do vírus HIV-1.	75
Figura 32 - Produto de PCR de colônia de DH10 β contendo o fragmento gênico codificante das proteínas de interesse no vetor pET32a(+).	76
Figura 33 - Produto de PCR de colônia de BL21(DE3) contendo o fragmento gênico codificante da proteína p24 do HIV-1 no vetor pET32a(+).	77
Figura 34 - Extrato proteico das bactérias BL21(DE3) transformadas com o pET32a(+) recombinante contendo o gene da p24 do vírus HIV-1..	78
Figura 35 - Solubilização da proteína recombinante gp21 dos corpos de inclusão. Eletroforese em gel de poliácridamida 18%.	79
Figura 36 - Solubilização da proteína recombinante p24 dos corpos de inclusão.....	80
Figura 37 - Solubilização da proteína recombinante gp46 dos corpos de inclusão.....	80
Figura 38 - Purificação da proteína recombinante gp21 por IMAC..	81
Figura 39 - Purificação da proteína recombinante p24 do HTLV-1 por IMAC..	82
Figura 40 - Purificação da proteína recombinante gp46 por IMAC.	83
Figura 41 - Imunodeteção das proteínas recombinantes pelos soros de indivíduos saudáveis e infectados pelos vírus HIV-1..	84
Figura 42 - Imunodeteção das proteínas recombinantes pelos soros de indivíduos infectados pelo vírus HTLV-1.....	85
Figura 43 - Gel de poliácridamida 18% corado com <i>Coomassie Blue</i> mostrando as frações proteicas das proteínas gp21 e p24 purificadas e a gp46 desnaturada que foram excisadas e submetidas à espectrometria de massas.....	86
Figura 44 - Resultado da análise por espectrometria de massas <i>Eletrospray Quadrupole-Time of Flight</i> da proteína gp21-1 de 13kDa.	87
Figura 45 - Resultado da análise por espectrometria de massas <i>MALDI- TOF/TOF</i> e <i>Eletrospray Quadrupole-Time of Flight</i> da proteína gp21-2 de 25 kDa.....	88
Figura 46 - Resultado da análise por espectrometria de massas <i>MALDI- TOF/TOF</i> e <i>Eletrospray Quadrupole-Time of Flight</i> da proteína p24-1 de 25 kDa.....	89
Figura 47 - Resultado da análise por espectrometria de massas <i>MALDI- TOF/TOF</i> e <i>Eletrospray Quadrupole-Time of Flight</i> da proteína p24-2 de 50 kDa.....	90
Figura 48 - Análise da digestão da gp46 por tripsina mostrando os peptídeos formados e suas respectivas massas moleculares.	91

Figura 49 - O vetor pCMVΔR8.91 contém as sequências codificadoras do gene gag do HIV-1 e foi usado para obtenção da sequência gênica da p24.	128
Figura 50 - O vetor pAbT4674 contém as sequências codificadoras do gene <i>env</i> do HIV-1 e foi usado para obtenção da sequência gênica da gp41 e da gp120.....	129
Figura 51 - Mapa do vetor pAE.	129
Figura 52 - Mapa do vetor pET20b(+).	130
Figura 53 - Mapa do vetor pET28a(+).	131
Figura 54 - Mapa do vetor pET32a(+).	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genótipos das linhagens bacterianas.....	31
Tabela 2 – Estudo de códons raros	32
Tabela 3 - Sequência dos <i>primers</i> para as proteínas referentes ao HIV-1.....	32
Tabela 4 - Sequência dos <i>primers</i> para as proteínas referentes ao HTLV-1	33
Tabela 5 – Tamanho dos <i>amplicons</i>	33
Tabela 6 – Diluição dos anticorpos	46
Tabela 7 – Porcentagem de identidade entre as sequências gênicas obtidas do sequenciamento e os respectivos genes depositados nos bancos de dados.....	50
Tabela 8 – Aspectos das proteínas recombinantes	54
Tabela 9 – Tamanho calculado das proteínas recombinantes expressas no vetor pET20b(+)	59
Tabela 10 – Tamanho esperado das proteínas recombinantes expressas no vetor pET20b(+)	64

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AP	Fosfatase alcalina
ATL	Leucemia de células T em adultos
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albumina de soro bovino
CDC	<i>Centers for Disease Control</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CRF	<i>Circulating recombinant form</i>
CTA	Centros de Testagem e Aconselhamento
dNTPs	Desoxiribonucleotídeos
ddNTPs	Dideoxinucleotídeos
DO₆₀₀	Densidade ótica lida a 600 nm
DST	Doença sexualmente transmissível
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etileno-diamino tetra-acético
EIA	Ensaio imunoenzimático
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
GLUT-1	Transportador de glicose ubíquo 1
GST	Glutathione-S-transferase
HAM/TSP	Paraparesia espástica tropical ou mielopatia associada ao HTLV-1
HIS₆	Cauda de seis histidinas
HAART	<i>Highly active antirretroviral therapy</i>
HIV-1	Vírus da imunodeficiência do tipo 1
HIV-2	Vírus da imunodeficiência do tipo 2
HSPG	Proteoglicano sulfato de heparan
HTLV-1	Vírus linfotrópico das células T humanas tipo 1
HTLV-2	Vírus linfotrópico das células T humanas tipo 2
ICTVdB	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses Database</i>
Ig	Imunoglobulina

IMAC	Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados
IN	Integrasse
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopirosídeo
LB	Caldo Luria Bertani
LIA	<i>Line immuno-assay</i>
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MOPS	<i>3-morpholinopropane-1-sulfonic acid</i>
MS	Espectrometria de massas
m/z	Massa/carga
NAT	<i>Nucleic acid testing</i>
NRP-1	Neuropilina-1
Ori	Origem de replicação
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PR	Protease
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RT	Transcriptase reversa
PIC	Coquetel de inibidores de proteases
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SLS	N-Laurosilsarcosina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEMED	N, N, N', N' - Tetrametiletilenodiamina
TAE	Tris-acetato-EDTA
TBS-T	Tampão salina Tris com Tween 20
TOF	<i>Time of Flight</i>
UNAIDS	<i>Joint United Nations Program on HIV/AIDS</i>
WIPO	<i>World Intellectual Property Organization</i>
®	Marca registrada
™	<i>“Trademark”</i>

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Resumen	iii
Lista de figuras	iv
Lista de tabelas	vii
Lista de abreviaturas e siglas	viii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 (HIV-1)	1
1.1.1 Histórico, epidemiologia e patologias	1
1.1.2 Partícula viral, organização genômica e proteínas estruturais	3
1.1.3 Ciclo de replicação viral	5
1.1.4 Fases da infecção pelo vírus HIV-1	5
1.1.5 Diagnóstico	7
1.2 Vírus linfotrópico das células T humanas tipo 1 (HTLV-1)	12
1.2.1 Histórico, epidemiologia e patologias	12
1.2.2 Partícula viral, organização genômica e proteínas estruturais	14
1.2.3 Ciclo de replicação viral	15
1.2.4 Diagnóstico	16
1.3 Produção de proteínas recombinantes	19
1.4 Brasil, mercado e patentes	22
2 JUSTIFICATIVA	26
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Fluxograma da metodologia utilizada	28
4.2 Material biológico	28
4.3 Vetores de clonagem e expressão	29
4.4 Bactérias	30
4.5 Estudo de códons raros	31
4.6 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>)	32
4.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	33
4.8 PCR utilizando DNA polimerase de alta fidelidade	34

4.9	Elektroforese em gel de agarose	35
4.10	Inserção dos fragmentos gênicos da p24, gp41 e gp120 do HIV-1 em vetor de clonagem	35
4.11	Preparo de células de <i>E. coli</i> quimiocompetentes	35
4.12	Transformação por choque térmico de células quimiocompetentes	36
4.13	Seleção de colônias transformadas	37
4.14	Extração de DNA plasmidial	37
4.15	Sequenciamento	37
4.16	Digestão dos plasmídeos e purificação dos fragmentos gênicos	38
4.17	Clonagem dos genes das proteínas de interesse nos vetores de expressão	39
4.18	Seleção de colônias em placa <i>Deep well</i>	39
4.19	Expressão das proteínas recombinantes	40
4.20	Protocolo de extração de proteínas da região periplasmática	41
4.21	Solubilização dos corpos de inclusão	42
4.22	Elektroforese em gel de poliacrilamida	43
4.23	Coloração dos géis de poliacrilamida com <i>Coomassie® Brilliant Blue R 250</i>	43
4.24	Purificação da proteína recombinante por Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)	44
4.25	Determinação da concentração de proteína pelo método BCA	45
4.26	Detecção da proteína recombinante por <i>Western blot</i>	45
4.27	Detecção das proteínas recombinantes pelos soros de indivíduos saudáveis e indivíduos com HIV-1 e HTLV-1	46
4.28	Confirmação da identidade da proteína recombinante por espectrometria massas	46
5	RESULTADOS	48
5.1	Obtenção dos fragmentos gênicos codificante das proteínas p24, gp41 e gp120 do HIV-1 por PCR	48
5.2	Clonagem dos fragmentos gênicos codificantes das proteínas p24, gp41 e gp120 do HIV-1 em vetor <i>pGEM®-T Easy</i>	49
5.3	Sequenciamento dos vetores de clonagem recombinantes e análise da tradução dos genes das proteínas de interesse	49
5.4	Digestão e purificação dos fragmentos gênicos das proteínas de interesse	54
5.5	Clonagem e expressão no vetor pAE	57
5.5.1	Clonagem dos fragmentos gênicos das proteínas p19, gp21, p24 e gp46 do HTLV-1 no vetor de expressão pAE	57
5.5.2	Expressão das proteínas p19, gp21, p24 e gp46 do HTLV-1 no vetor pAE em BL21(DE3)plysS	58
5.6	Clonagem e expressão no vetor pET20b(+)	59
5.6.1	Clonagem dos fragmentos gênicos das proteínas de interesse no vetor de expressão pET20b(+)	59

5.6.2	Expressão das proteínas recombinantes clonadas no vetor pET20b(+) em BL21(DE3)plysS.....	59
5.6.3	Expressão das proteínas recombinantes no vetor pET20b(+) em BL21(DE3).....	60
5.7	Clonagem e expressão no vetor pET28a(+)......	64
5.7.1	Clonagem dos fragmentos gênicos das proteínas de interesse no vetor de expressão pET28a(+)	64
5.7.2	Expressão das proteínas recombinantes no vetor pET28a(+) em BL21(DE3)	65
5.8	Clonagem do fragmento gênico da gp120 do HIV-1 amplificado por DNA polimerase de alta fidelidade em <i>pGEM®-T Easy</i> e em pET32a(+).	70
5.9	Transformação de Rosetta(DE3) e BL21-CondonPlus com pET28_p19 do HTLV-1 e pET28_p24 do HIV-1 e seleção de colônias em placa <i>Deep well</i>	73
5.10	Clonagem dos fragmentos gênicos da p24 do HIV-1 e p19 do HTLV-1 em pET32a(+).	76
5.11	Expressão das proteínas recombinantes gp21, p24 e gp46 do vírus HTLV-1	78
5.12	Solubilização das proteínas recombinantes gp21, p24 e gp46 do vírus HTLV-1 formadas em corpos de inclusão.....	79
5.13	Purificação das proteínas recombinantes gp21, p24 e gp46 do vírus HTLV-1 em IMAC.....	81
5.1	Imunodeteção das proteínas recombinantes pelos soros de indivíduos saudáveis e indivíduos com HIV-1 e HTLV-1	83
5.2	Espectrometria de massas das proteínas recombinantes gp21, p24 e gp46 do HTLV-1	85
6	DISCUSSÃO	92
7	CONCLUSÕES	105
8	PERPECTIVAS FUTURAS	106
9	REFERÊNCIAS	107
10	ANEXOS.....	125
	Anexo 1 - Comprovante de aprovação do comitê de ética.....	125
	Anexo 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	126
	Anexo 3 - Vetores	128

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 (HIV-1)

1.1.1 Histórico, epidemiologia e patologias

O vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1) foi identificado como o agente etiológico da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) em 1983, dois anos após a primeira descrição do aparecimento dessa doença. O vírus inicialmente foi nomeado de HTLV-III e, posteriormente, foi renomeado para HIV-1 (BARRE-SINOUSSE et al., 1983; POPOVIC, 1983; LEVY et al., 1984).

Os primeiros casos de AIDS foram conhecidos devido ao agrupamento incomum de doenças como sarcoma de Kaposi e pneumonia causada por *Pneumocystis carinii* em jovens homossexuais do sexo masculino (GOTTLIEB et al., 1981; MASUR et al., 1981; SIEGAL et al., 1981). Subsequentemente, outros grupos incluindo usuários de drogas (GOEDERT, 1984), hemofílicos (*Centers for Disease Control* - CDC, 1982) e crianças (RAQNI et al., 1985) apresentaram AIDS. As observações epidemiológicas sugeriram que a transmissão do agente ocorre por via sexual, por produtos derivados do sangue e de forma vertical. Os primeiros grupos de indivíduos nos quais a AIDS foi descoberta, chamados de grupos de risco, incluíam homossexuais, prostitutas, usuários de drogas e hemofílicos e este fato trouxe um grande estigma ligado à AIDS.

Em 1986, foi identificado o HIV-2 em indivíduos de países do oeste da África. Esse vírus ocasiona doença de melhor prognóstico e é menos transmissível em comparação ao HIV-1. O HIV-1 é o principal agente etiológico da AIDS em todo o mundo (JAFFAR et al., 2004; KANKI; DE COCK, 1994).

A infecção pelo HIV é um problema de saúde mundial. De acordo com o último relatório divulgado pela *Joint United Nations Program on HIV/AIDS* (UNAIDS), em 2013 havia uma média de 35 (33.2–37.2) milhões de pessoas vivendo com HIV. Felizmente, o número de pessoas infectadas continua a diminuir mundialmente, uma vez que a quantidade de pessoas que adquiriram a infecção pelo vírus HIV em 2013 (2,1 milhões em média) foi 38% menor do que em 2001. O número de pessoas que morrem de causas relacionadas à AIDS também vem diminuindo desde meados do

ano 2000. Segundo dados da UNAIDS, foi observado que 1,5 milhões de pessoas morreram em decorrência da AIDS em 2013, mas que esse valor é 35% menor do que o número de mortos em 2005, quando faleceram cerca de 2,5 milhões de pessoas. (UNAIDS, 2014a).

No Brasil, os primeiros casos de AIDS foram identificados em São Paulo em 1982 (DEPARTAMENTO DE DST, AIDS E HEPATITES VIRAIS, 2015a) e desde a década de 80 até junho de 2014 foram notificados 757.042 casos de AIDS, segundo o último boletim epidemiológico sobre AIDS emitido pelo Ministério da Saúde em 2014. O Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais estima que aproximadamente 734 mil pessoas estejam vivendo com HIV/AIDS no Brasil, correspondendo a uma prevalência de 0,4%. Um dos dados mais preocupantes é a constatação do aumento da taxa de detecção do HIV entre os jovens de 15 a 24 anos. De 2004 a 2013 houve um aumento de 53% entre aqueles na faixa etária de 15 a 19 anos e de 22% entre os jovens de 20 a 24 anos. A proporção entre gêneros é de 26,9 casos de homens com HIV por 100.000 habitantes, enquanto entre as mulheres o índice é de 14,1 para cada 100.000 habitantes no ano de 2013 (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO – AIDS/DST, 2014).

Segundo este mesmo boletim epidemiológico, de 1980 a 2013, ocorreram no Brasil 278.306 óbitos tendo como causa básica a AIDS. Uma tendência significativa de queda nos índices de mortalidade é observada nos últimos dez anos no Brasil, que passaram de 6,1 óbitos para cada 100 mil habitantes em 2004 para 5,7 em 2013, representando uma queda de 6,6%. No entanto, essa mesma tendência não se observa em todas as regiões do país, pois apenas as regiões Sudeste e Sul apresentaram tendência significativa de queda. Nas regiões Norte e Nordeste, a tendência apresentada foi de crescimento nos últimos dez anos e no Centro-Oeste houve estabilização nos índices de óbitos (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO – AIDS/DST, 2014).

A previsão para 2030 é que o número de óbitos de pessoas com HIV gire em torno de até 6,5 milhões em todo o mundo (MATHERS; LONCAR, 2006). No entanto, a junta de coordenação do Programa UNAIDS da 35ª reunião ocorrida em 2014 em Genebra, reforça que é possível que a epidemia da AIDS seja controlada até 2030. Para alcançar esse objetivo, o número de novos casos de infecção por HIV e de mortes relacionadas à AIDS deveria diminuir em 90% em relação os índices de 2010.

Porém, essa previsão pode não ocorrer uma vez que, segundo a própria UNAIDS, 19 das 35 milhões de pessoas com HIV não sabem do seu estado sorológico o que contribui para a disseminação do vírus UNAIDS (2014a). Outra razão é a alta taxa de mutação do HIV que leva a formação de novas formas virais recombinantes circulantes (*circulating recombinant forms* - CRFs) que podem ter baixa sensibilidade ao tratamento retroviral e que podem levar ao desenvolvimento da AIDS em menos tempo (BLACKARD et al., 2002; KILLIAN; LEVY, 2011; KOURI et al., 2015; McCUTCHAN, 2000; PEETERS; SHARP, 2000; ROBERTSON et al., 1995). Assim, o diagnóstico precoce e o desenvolvimento de formas ainda mais eficazes de tratamento são necessários para o controle da epidemia de HIV.

1.1.2 Partícula viral, organização genômica e proteínas estruturais

O HIV-1 é um retrovírus citopático e não-oncogênico da Família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e gênero *Lentivirus* (ICTVdB, 2015). Esse vírus tem cerca de 100 nm de diâmetro e seu genoma é constituído de duas fitas simples de RNA com tamanho de aproximadamente 9 kb. A partícula viral é envolvida por um envelope composto por uma bicamada lipídica originária da célula em que se deu a replicação viral e pelas glicoproteínas de superfície (SU, gp120) e transmembranar (TM, gp41). Na face interna do envelope lipídico encontram-se as proteínas de matriz (MA, p17) que envolvem todo o capsídeo viral (CA) que, por sua vez, é formado pelas proteínas p24 (FRANKEL; YOUNG, 1998; FREED, 1998). O capsídeo contém o material genético do vírus associado com as proteínas do nucleocapsídeo (NC, p7), bem como as enzimas protease, transcriptase reversa e integrase (FREED, 2001).

O mapa genético do HIV-1 contém nove genes: *gag*, *pol*, *env*, *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu*. Os genes *gag* e *env* contêm a informação necessária para a produção das proteínas estruturais para novas partículas virais, enquanto os outros sete genes codificam proteínas que regulam a transcrição e a replicação viral. O gene *gag* codifica a proteína precursora Pr55Gag que, quando clivada pela protease viral, dá origem à p17, p24, p7, p6 (proteína C-terminal) e dois peptídeos espaçadores p1 e p2. A proteína p24 promove estabilidade estrutural para a partícula viral e desempenha papel chave na montagem e liberação de novas partículas virais, além de ser importante na infectividade de células alvo (FRANKEL; YOUNG, 1998;

SAKALIAN; HUNTER, 1998; SCARLATA; CARTER, 2003). O gene *pol* codifica para as enzimas transcriptase reversa, protease e integrase (FREED, 2001). O gene *env*, por sua vez, codifica as glicoproteínas gp41 e gp120 que formam o complexo gp120-gp41 cuja função é ligar o vírus à célula e permitir a fusão de suas membranas. Este complexo é formado a partir de um precursor proteico denominado gp160 (EARL; MOSS; DOMS, 1991). A gp41 consiste de longa cauda citoplasmática, uma região hidrofóbica transmembranar e um ectodomínio (extracelular), ao qual está ligada a gp120. A região do ectodomínio contém alguns determinantes funcionais envolvidos na fusão das membranas viral e celular, como duas regiões helicoidais denominadas de HR1 e HR2 (GOMEZ; HOPE, 2005; MONTERO et al., 2008). A gp120 contém seis regiões conservadas separadas por cinco regiões variáveis (designadas de V1 a V5) (POIGNARD et al., 2001).

Figura 1 - A) Organização do genoma do HIV-1. B) Organização da partícula viral madura do HIV-1. Fonte: SCARLATA; CARTER, 2003.

1.1.3 Ciclo de replicação viral

O processo de entrada da partícula viral na célula-alvo consiste numa primeira ligação ao receptor seguida por outra ligação ao co-receptor e, por fim, na fusão das membranas viral e celular permitindo que o capsídeo entre dentro da célula. O vírus HIV-1 infecta preferencialmente linfócitos T CD4+, uma vez que a molécula de CD4 é um dos principais receptores para o vírus. Primeiramente, a gp120 se liga à molécula de CD4 e isso causa uma mudança conformacional nessa proteína que, então, expõe sua alça V3. Essa alça variável se liga a coreceptores, principalmente CCR5 e CXCR4 (CLAPHAM; WEISS, 1997; GOODNOW; COLLMAN, 2006). Neste momento ocorre uma mudança conformacional na gp41 permitindo que suas regiões helicoidais formem um complexo de hélices que completam a fusão entre as membranas viral e celular (GOMEZ; HOPE, 2005). O capsídeo do HIV-1 entra na célula liberando o RNA no citoplasma celular. O RNA é convertido em DNA por meio da ação da transcriptase reversa e é integrado ao cromossomo celular pela ação da integrase, sendo denominado de provírus e pode permanecer em latência por muito tempo (KATZ; SKALKA, 1994).

O provírus servirá como molde para a síntese das estruturas que comporão as novas partículas virais. O RNA viral produzido é transportado para o citoplasma e as glicoproteínas do gene *env* são sintetizadas e transportadas até a membrana plasmática da célula. As proteínas precursoras codificadas a partir do gene *gag* recrutam duas cópias de RNA viral fita simples e se direcionam à membrana plasmática. A montagem desse complexo de RNA e proteínas do gene *gag* induz a membrana a formar brotos. Por fim, ocorre a incorporação das glicoproteínas gp41 e gp120 e a liberação de novas partículas virais por brotamento. Após o brotamento, há a maturação do HIV-1 que é iniciada através do processamento proteolítico da proteína precursora do gene *gag*. Assim, há a formação das proteínas p24 que se organizam para formar o capsídeo (CONNOR; HO, 1992; FREED, 1998; GANSER-PORNILLOS; YEAGER; SUNDQUIST, 2008).

1.1.4 Fases da infecção pelo vírus HIV-1

Para fins didáticos, a infecção pelo HIV-1 pode ser dividida em três fases: a fase aguda, também chamada de soroconversão, a fase assintomática e a fase

sintomática. Na ausência de qualquer intervenção terapêutica, a mediana de progressão da fase aguda até a fase sintomática é de 10 anos (RACHID; SCHECHTER, 2004).

O primeiro estágio da infecção pelo HIV-1, a fase aguda, engloba a fase de eclipse que é o período logo após a infecção. Essa fase de eclipse é caracterizada pelo estabelecimento do vírus no tecido onde foi exposto e a disseminação na circulação em níveis indetectáveis. Além disso, marcadores virais ainda não são identificados em amostras de sangue e pode durar por até sete dias. Depois desse período, há a disseminação pelo tecido linfóide e no sangue. O período denominado de janela imunológica, engloba o período de eclipse (7 dias) e vai até cerca de 20 dias após a infecção quando anticorpos ainda não são detectados. Nesse período de janela imunológica, apenas o RNA viral e o antígeno p24 podem ser detectados. Dessa forma, se um indivíduo fizer os testes para HIV-1 no período da janela imunológica, pode ocorrer um resultado falso-negativo (COHEN et al., 2010; FIEBIG et al., 2003). O evento denominado soroconversão ocorre após o período de janela imunológica e é nessa fase que os anticorpos anti-HIV-1 passam a ser detectados. De acordo com Fiebig et al. (2003), o período de janela imunológica para detecção de anticorpos em um ensaio imunoenzimático que indique a presença de anticorpos da classe IgM é de cerca de 3 semanas.

A próxima fase, que é a fase assintomática, é marcada pela forte interação do HIV-1 aos linfócitos T CD4+ e as constantes e rápidas mutações do vírus, mas que não são capazes de enfraquecer o organismo o suficiente para permitir o aparecimento de doenças oportunistas. Assim, com a montagem da resposta imune, a viremia é suprimida, levando a um período de latência clínica que pode durar muitos anos (BACCHETTI; MOSS, 1989; LEVY, 1993; WONG-STAAL, 1991).

Com o tempo, a viremia retorna porque há um aumento na replicação viral e uma diminuição nas funções imunes (WONG-STAAL, 1991). A fase sintomática inicial é caracterizada pela forte redução dos linfócitos T CD4+ e os sintomas mais comuns são: febre, diarreia, suores noturnos e emagrecimento (DEPARTAMENTO DE DST, AIDS E HEPATITES VIRAIS, 2015c). A fase final da infecção, o início da AIDS clínica, é distinguida pelo aparecimento dos sintomas clínicos que indicam a imunodeficiência, como a contração de doenças microbianas oportunistas, dentre elas a herpes, a

pneumonia, tuberculose, meningite e as micoses (GRANT; ZOLOPA, 2012; NELSON et al., 2011).

1.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico precoce proporciona que o indivíduo com HIV-1 tenha acesso o quanto antes à terapia antirretroviral altamente ativa (*highly active antirretroviral therapy - HAART*), aos cuidados quanto ao aparecimento de doenças oportunistas e atenção para não ocorrer transmissão vertical do vírus. Além disso, a pessoa consciente de seu estado sorológico é informada sobre o risco de infectar outras pessoas, o que pode culminar com um maior controle da epidemia.

Alguns métodos diagnósticos detectam os componentes do vírus no soro dos pacientes, porém os principais exames diagnósticos e os mais utilizados atualmente são testes sorológicos que identificam a presença de anticorpos contra proteínas do vírus HIV (BRANSON, 2000; HAMATAKE et al., 2007; RAVANSHAD et al., 2006).

Os primeiros anticorpos produzidos após a etapa de soroconversão são da classe IgM contra a proteína gp41. Eles surgem aproximadamente 13 dias após a detecção do RNA viral no plasma. Posteriormente, ocorre a mudança de classe de produção de anticorpos para IgG e IgA (TOMARAS et al., 2008). A gp41, que contém várias regiões imunogênicas, pode ser exposta durante a fase de fusão entre a membrana viral e celular e, portanto, desencadear uma forte produção de anticorpos contra ela (MONTERO et al., 2008). Assim, a gp41 é considerada o antígeno mais importante para detecção da infecção por HIV-1 (MAHBOUDI et al., 2006). A proteína p24 é a proteína viral mais abundante e está presente em altos níveis no sangue de indivíduos tanto nos estágios iniciais quanto nas fases mais avançadas da infecção pelo vírus HIV-1 (TANG et al., 2010). Anticorpos contra essa proteína podem ser detectados no soro de indivíduos infectados pelo HIV-1 18 dias após ser detectada a presença do RNA viral (TOMARAS; HAYNES, 2009). Em razão dos altos níveis de p24 circulantes, ocorre uma intensa produção de anticorpos anti-p24. Assim, essa proteína se torna importante marcador de diagnóstico, monitoramento da progressão da doença, triagem de doadores de sangue e avaliação de terapia retroviral (LY et al., 2000; TANG et al., 2010). A glicoproteína do envelope viral gp120 também é importante alvo de anticorpos (POIGNARD et al., 2001) e podem ser detectados no

soro de indivíduos infectados pelo HIV-1 28 dias após ser detectada a presença do RNA viral (TOMARAS; HAYNES, 2009).

Desde os primeiros relatos de casos de AIDS, pesquisadores vêm buscando formas eficazes de diagnóstico. Nas últimas décadas, quatro gerações de imunoensaios foram desenvolvidas. Essas gerações foram definidas de acordo com a evolução das metodologias empregadas, a partir do primeiro ensaio disponível comercialmente, no ano de 1985. Esse primeiro teste foi implantado na triagem dos doadores de sangue e, posteriormente, utilizado como método diagnóstico para os indivíduos de risco com relação à infecção pelo HIV-1 (LEVINSON; DENYS, 1988).

Os ensaios de primeira geração detectam a presença de anticorpos específicos contra proteínas do vírus HIV-1 no soro de forma indireta. Assim, a detecção é feita utilizando um anticorpo secundário anti-IgG humana conjugado. Na fase sólida, os antígenos são originados de um lisado viral de HIV-1 que são obtidos a partir de cultura do HIV em linhagens celulares humanas (BUTTÒ et al., 2010). Estes ensaios são pouco específicos e menos sensíveis, pois detectam apenas IgG e, portanto, apresentam uma janela imunológica de aproximadamente 40 dias após infecção (DEPARTAMENTO DE DST, AIDS E HEPATITES VIRAIS, 2015b).

Os ensaios de segunda geração também têm formato indireto, porém, utilizam proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos derivados de proteínas do HIV-1. Em comparação com os ensaios de primeira geração, os de segunda geração são mais sensíveis e específicos e são capazes de detectar a presença do vírus de 28 a 30 dias após a infecção (DASKALAKIS, 2011; DEPARTAMENTO DE DST, AIDS E HEPATITES VIRAIS, 2015b). Na década de 90 também começaram a ser inseridos antígenos para o vírus HIV-2 (BUTTÒ et al., 2010).

Os testes de terceira geração utilizam antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos dos vírus HIV-1 e HIV-2 tanto na fase sólida quanto sob a forma de conjugado. Estes testes tem um formato chamado de “sandwich” que permite a detecção de diferentes classes de anticorpos, especialmente IgM e IgG. Os antígenos imobilizados na fase sólida são reconhecidos pelos anticorpos. O(s) outro(s) sítios de ligação dos anticorpos permanece(m) livre(s) e posteriormente se ligam também aos mesmos antígenos que estão solúveis e são conjugados. A possibilidade de detectar anticorpos da classe IgM torna esse ensaio mais sensível e são capazes de detectar a presença do HIV em aproximadamente 22 dias após a infecção (BUTTÒ et al., 2010;

DEPARTAMENTO DE DST, AIDS E HEPATITES VIRAIS, 2015b; PANDORI et al., 2009).

Os imunoensaios de quarta geração, por sua vez, detectam simultaneamente o antígeno p24 e anticorpos específicos anti-HIV-1 e anti-HIV-2. Esses testes também têm o formato de “sanduíche” e, portanto, detectam todas as classes de imunoglobulinas. O componente de detecção de antígeno p24 é constituído por um anticorpo monoclonal na fase sólida, para capturar o antígeno p24 presente no soro, e de anticorpos específico contra a proteína p24. Estes testes têm uma janela diagnóstica de aproximadamente 15 dias e, assim, se mostram eficientes na detecção da infecção pelo HIV-1 na fase aguda (DASKALAKIS, 2011; DEPARTAMENTO DE DST, AIDS E HEPATITES VIRAIS, 2015c; GHISETT et al; 2015; WEBER et al., 2002). Exemplos de testes de quarta geração que são muito utilizados são o *VIDAS HIV DUO Ultra* (BioMérieux) e o *HIV Ag/Ab Combo* (Abbott) que são capazes de detectar o antígeno p24 do HIV-1 e anticorpos anti-HIV-1 e anti-HIV-2 simultaneamente (LY et al., 2004; SAVILLE et al., 2001).

Os testes utilizados para detectar a infecção pelo vírus HIV-1 podem ser classificados como ensaios de triagem e ensaios confirmatórios. Os ensaios de triagem são desenvolvidos para detectar todos os indivíduos infectados, enquanto os ensaios confirmatórios são desenvolvidos para identificar os indivíduos que não são infectados, mas tem resultados reativos nos ensaios de triagem. Os testes de triagem possuem um alto grau de sensibilidade, enquanto os testes confirmatórios possuem um alto grau de especificidade (DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO PELO HIV, 2013).

Os diferentes kits comerciais de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) de diferentes gerações disponíveis no mercado possuem na sua composição uma mistura de antígenos e/ou anticorpos do HIV-1 e/ou 2. Os testes usam combinações entre alguns dos componentes como gp160, env-HIV-2, anti-p24 (anticorpo monoclonal) ou p24, gp41, gp36 (HIV-2) e/ou gp120. Exemplos de kits comerciais que combinam estes componentes são: *Vironostika® HIV Uni-Form II Ag/Ab* (BioMérieux), *Genscreen® HIV1/HIV2* (Bio-Rad), *GS HIV Combo Ag/Ab EIA®* (Bio-Rad) (BENTSEN et al., 2011; GALLI et al., 1996; SAAH et al., 1987, TIWARI et al., 2013).

Os testes confirmatórios incluem *imunoblotting* (RAVANSHAD et al., 2006) radioimunoprecipitação e imunofluorescência indireta, testes rápidos e testes

moleculares, cada um com suas respectivas vantagens e desvantagens (FONSECA; ANAND, 1991; SAAH, et al., 1987; SYED et al., 2005). Testes confirmatórios devem ser feitos antes da liberação de resultado positivo de um teste de triagem e o mais usado entre eles é o *Western Blot*. Nesta técnica, existe a possibilidade de se revelar a presença de anticorpos do indivíduo contra proteínas do HIV-1. As principais proteínas utilizadas como antígenos de captura nesses testes são: gp160, gp120, gp41, p66, p51, p31, p55, p24 e p17 (POHLOD; SARAVOLATZ, 1991). Um exemplo de *Western Blot* comercializado é o *Cambridge Biotech HIV-1 Western Blot Kit* (*Maxim Biomedical Corporation*) que é preparado com proteínas obtidas do lisado do vírus HIV-1. Para confirmar a positividade de uma amostra para a infecção pelo vírus HIV-1, a marcação de duas ou mais proteínas deve ocorrer, especialmente a p24, gp41 e gp120/160.

Diversos testes, chamados de testes rápidos, vêm sendo desenvolvidos e avaliados para tornar o processo de identificação e aconselhamento do paciente com HIV mais ágil (BRANSON, 2000; PAVIE et al., 2010). Os testes rápidos são imunoensaios simples, que podem ser realizados em até 30 minutos (DEPARTAMENTO DE DST, AIDS E HEPATITES VIRAIS, 2015b). Estes testes são capazes de detectar anticorpos da classe IgG e IgM contra gp41 e/ou gp120 em fluidos orais, sangue, (plasma ou soro), por antígenos de HIV conjugados com ouro coloidal (DASKALAKIS, 2011). Um exemplo desse tipo de teste é o Teste Rápido - HIV-1/ 2 (Bio-Manguinhos) que contém um coquetel de antígenos para detectar anticorpos para HIV-1/2 em soro, plasma e sangue total. Vem sendo demonstrado que os testes rápidos podem ter um desempenho igual ou melhor que o ELISA para a detecção de anticorpos anti-HIV (FERREIRA JUNIOR et al., 2005) e essa metodologia de testagem utilizando testes rápidos está sendo implantada no Brasil desde 2005. É recomendado que os testes rápidos sejam utilizados em situações especiais tais como: redes de serviço de saúde sem infraestrutura laboratorial ou localizada em regiões de difícil acesso, Centros de Testagem e Aconselhamento (CTA), segmentos populacionais mais vulneráveis, dentre outras (DEPARTAMENTO DE DST, AIDS E HEPATITES VIRAIS, 2015b).

Os testes em linha (*Line immuno-assay* - LIA) também vem sendo utilizados como testes diagnósticos para HIV e têm se mostrado confiáveis, tanto para a detecção de HIV-1, quanto de HIV-2 e com um custo menor do que o *Western Blot*

(FRASEN et al., 1991). Esses testes, que podem ser considerados como uma segunda geração de *Western Blot* contêm proteínas recombinantes ou sintéticas capazes de detectar anticorpos específicos (SCHÜPBACH et al., 2012). O kit *INNO-LIA-HIV I/II Score (Innogenetics)* é um exemplo de teste em linha e contém proteínas recombinantes e sintéticas do HIV-1 (gp120, gp41, p31, p24, e p17) e HIV-2 (gp36 e gp105) que são colocadas sobre uma fita de nylon (TINGUELY et al., 2014).

Os testes moleculares, como a tecnologia de amplificação de ácidos nucleicos (*nucleic acid testing* - NAT), vêm sendo empregados como testes confirmatórios. Essa metodologia é constituída de testes *in vitro* para detecção direta do material genético de agentes infecciosos, tais como o HIV. Amostras sanguíneas positivas para a infecção por esse vírus têm o RNA viral ou provírus detectável 5 a 10 dias após a infecção (FIEBIG et al., 2003). Portanto, a utilização de NAT diminui a janela de detecção da infecção pelo HIV, além disso, baixas cargas virais podem ser detectadas. Porém, esse tipo de teste exige uma infraestrutura laboratorial de alto nível, metodologia laboriosa com vários passos, técnicos treinados, além de ser um teste caro (DASKALAKIS et al., 2011; PRUETT et al., 2015; WEBER et al., 2002).

No Brasil, o Ministério da Saúde preconiza que o diagnóstico sorológico da infecção pelo HIV seja realizado com pelo menos dois testes, um para triagem e um para confirmar o resultado da triagem. A combinação mais utilizada é a de um imunoensaio de triagem seguido pelo *Western Blot*, como teste confirmatório. Atualmente, o Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais (2015b) indica seis fluxogramas diferentes para diagnóstico da infecção pelo HIV: 1) Dois testes rápidos de fabricantes diferentes usados sequencialmente; 2) Um teste rápido utilizando fluido oral seguido por um teste rápido utilizando sangue; 3) Triagem com imunoensaio de 4ª geração e teste molecular como teste complementar; 4) Triagem com imunoensaio de 3ª geração e teste molecular como teste complementar; 5) Triagem com imunoensaio de 3ª geração e *Western Blot*, *imunoblot* ou *imunoblot* rápido como teste complementar; 6) Triagem com imunoensaio de 4ª geração e *Western Blot*, *imunoblot* ou *imunoblot* rápido como teste complementar.

1.2 Vírus linfotrópico das células T humanas tipo 1 (HTLV-1)

1.2.1 Histórico, epidemiologia e patologias

Os indícios iniciais da existência de retrovírus humanos vieram na década de 70 a partir de estudos que descobriram a correlação desses vírus com oncogenes. Esses estudos culminaram na descoberta do primeiro retrovírus humano, o HTLV-1 (POIESZ et al., 1980). Estudos clínicos e epidemiológicos revelaram a incidência altamente incomum de leucemia de células T em adultos (ATL) em algumas ilhas japonesas e que estes padrões epidemiológicos eram sugestivos de um agente leucêmico transmissível (UCHIYAMA et al., 1977). Dessa forma, pela primeira vez, o vírus HTLV-1 foi claramente associado à ATL (UCHIYAMA et al., 1977; YOSHIDA; MIYOSHI; HINUMA, 1981) e, atualmente, é um dos únicos retrovírus conhecidos como agente etiológico de câncer em humanos (BRAOUDAKI; TZORTZATOU-STATHOPOULOU, 2011).

A partir de então, muitos relatos na literatura mostraram que o vírus se associava também com outras doenças humanas além da ATL, sendo a mais notável delas a desordem neurológica crônica conhecida como paraparesia espástica tropical ou mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM/TSP) (GESSAIN et al., 1985; FRANCHINI, 1995; OSAME et al., 1986; RODGERS-JOHNSON et al., 1985). Esse vírus também tem sido associado a outras manifestações patológicas como, por exemplo, manifestações cutâneas não específicas ou relacionadas à supressão imunológica, dermatite infecciosa, manifestações oftalmológicas, artropatias, síndrome de Sjögren e outras (CARNEIRO-PROIETT et al., 2002; LA GRENADE et al., 1990; MANNIS; HISADA; LA GRENADE, 1999; MOCHIZUKI et al., 1992; MURPHY et al., 1997; RIBAS; MELO, 2002).

Poucos anos depois da identificação do HTLV-1, um segundo tipo de vírus linfotrópico T, o HTLV-2, foi isolado dos linfócitos de um paciente com leucemia de células pilosas (KALYANARAMAN et al., 1982). O potencial patogênico do HTLV-2 é mais incerto, mas se acumulam dados indicando associação do HTLV-2 com a HAM/TSP (e/ou com uma síndrome parecida com esta desordem) e com polineuropatias periféricas em pacientes coinfectados pelo HIV, além de outras patologias (HJELLE et al., 1992; PAGE et al., 1990; SILVA et al., 2002).

Na região central da África foram descobertos mais dois tipos desse vírus: o HTLV-3 e o HTLV-4 (MAHIEUX; GESSAIN, 2009), porém ainda não são conhecidas doenças associadas a estes dois vírus (HOSHINO, 2012). Um retrovírus denominado HTLV-5 foi associado a um linfoma de células T cutâneo, mas não houve mais dados que comprovassem esse achado (WELSH, 2011).

No Brasil, a primeira descrição da presença do vírus HTLV-1 data de 1986 em imigrantes japoneses na cidade de Campo Grande (KITAGAWA et al., 1986). Posteriormente, foram identificados casos da presença do vírus em São Paulo, Rio de Janeiro, Região Nordeste e demais regiões brasileiras (CASTRO et al., 1989; CATALAN-SOARES et al., 2005; DE OLIVEIRA et al., 1990; JACOB et al., 2008).

A transmissão do HTLV-1 está intimamente relacionada com fatores biológicos e comportamentais. A transmissão do HTLV-1 ocorre de forma vertical, principalmente através da amamentação, por meio de relação sexual, por transfusão de produtos sanguíneos infectados e pelo compartilhamento de agulhas e seringas contaminadas (MANNS; HISADA; LA GRENADÉ, 1999; VAN DE PERRE; CARTOUX, 1995). Como aproximadamente 90% dos portadores são assintomáticos e suas complicações mais conhecidas e estudadas ocorrem em cerca de apenas 5% dos infectados, a infecção é tradicionalmente relacionada a uma baixa morbidade (DEPARTAMENTO DE DST, AIDS E HEPATITES VIRAIS, 2015c; MATSUOKA et al., 2007).

Estima-se que 15 a 20 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HTLV, principalmente pelo HTLV-1 (CASKEY et al., 2007; GESSAIN, 2011; PROIETTI et al., 2005). A infecção pelo HTLV-I tem sido relatada em praticamente todo o mundo e taxas de infecção em níveis moderados e altos foram encontrados no sul do Japão, no Caribe, na África Central e Ocidental, nas ilhas do Caribe, na Austrália, na Índia, no Sudeste dos Estados Unidos, nas ilhas da Melanésia e em partes da América do Sul (FERREIRA Jr.; PLANELLES; ROSENBLATT, 1997; HOSHINO, 2012).

O Brasil apresenta aproximadamente 2,5 milhões de pessoas infectadas pelo HTLV-I e é considerado o país com maior número absoluto de casos de infecção pelo vírus no mundo (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002; CARNEIRO-PROIETTI et al., 2012; CATALAN-SOARES et al., 2005). Porém, a maior parte dos estudos publicados aborda a prevalência da infecção em indivíduos com ALT ou com HAM/TSP ou em grupos específicos como doadores de sangue, usuários de drogas injetáveis, populações indígenas, dentre outros. Assim, estudos de soroprevalência na

população geral ainda são escassos, no entanto, o HTLV-1 foi encontrado em todos os estados brasileiros onde foi pesquisado (CORTES et al., 1989; GABBAI et al., 1993). A prevalência da infecção por HTLV-1 em doadores de sangue variou de 0,04% a 1,3% dependendo da localização geográfica. Os maiores índices de prevalência do vírus encontram-se nas Regiões Norte e Nordeste (CATALAN-SOARES et al., 2005; GALVÃO-CASTRO et al., 1997; PINTO et al., 2012).

1.2.2 Partícula viral, organização genômica e proteínas estruturais

O HTLV-1 é um retrovírus oncogênico da Família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e gênero *Deltaretrovirus* (ICTVdB, 2015). Ele é um vírus com cerca de 100 nm de diâmetro e apresenta simetria icosaédrica. Sua partícula viral é envolvida por um envelope lipídico composto pelas glicoproteínas de superfície (gp46) e transmembranar (gp21). Na face interna do envelope lipídico encontram-se as proteínas de matriz (MA, p19) que envolvem todo o capsídeo viral (CA) que, por sua vez, é formado pelas proteínas p24. No capsídeo está contido o material genético do vírus (duas fitas idênticas de RNA), associado com as proteínas do nucleocapsídeo (p15), bem como as enzimas protease, transcriptase reversa e integrase (HOSHINO, 2012; JOHNSON; HARROD; FRANCHINI, 2001).

O mapa genético do HTLV-1 contém quatro regiões codificantes principais (*gag*, *pro*, *pol* e *env*). O gene *gag* codifica a proteína precursora p55 que, quando clivada pela protease viral, dá origem à p19, à p24 e à p15. Essas proteínas produzidas pelo gene *gag* são essenciais na montagem e liberação de novas partículas virais e na transmissão do vírus para outras células (LE BLANC et al., 2001; SAKALIAN; HUNTER, 1998). A protease viral é codificada através do gene *pro*, por um quadro de leitura que se estende da região 3' final do *gag* e a 5' final do *pol* e resulta de uma mudança do quadro de leitura ribossomal. O gene *pol* codifica para as enzimas transcriptase reversa e integrase (NAM et al., 1993). O gene *env*, por sua vez, codifica as glicoproteínas gp46 e gp21 (HATTORI et al., 1984). A gp46 desempenha a função de ligação à superfície da célula hospedeira, enquanto a gp21 proporciona a fusão entre as membranas celular e viral (HOSHINO, 2012; OLIERE et al., 2011).

Figura 2 - Organização do genoma e da partícula viral do HTLV-1. Fonte: Adaptado de OLIERE et al., 2011.

1.2.3 Ciclo de replicação viral

As partículas virais atacam principalmente linfócitos T CD4+, T CD8+ e células dendríticas, mas também infectam vários outros tipos celulares como células da glia, células epiteliais e linfócitos B (FRANCHINI, 1995; HANON et al., 2000; KOYANAGI et al., 1993).

O processo de replicação viral requer a fusão das membranas da célula hospedeira e do vírus. Para que isso ocorra, a gp46, primeiramente, interage com o receptor proteoglicano sulfato de heparan (HSPG), permitindo a ligação na superfície celular. Em seguida, há a interação com a neuropilina-1 (NRP-1) provocando uma mudança conformacional na gp21 que, então, expõe seu sítio de ligação ao receptor de fusão, o transportador de glicose ubíquo 1 (GLUT-1). Assim, a ligação da gp21 ao receptor promove a fusão da membrana da célula hospedeira à membrana do vírus (GHEZ et al., 2010; MAJOROVITS, 2008; YASUNAGA; MATSUOKA, 2011).

Depois da fusão, o conteúdo viral é liberado no citoplasma e ocorre o desencapsulamento da partícula viral. O RNA viral é reversamente transcrito em DNA dupla fita pela transcriptase reversa e, em seguida, é levado ao núcleo, onde irá se integrar ao genoma da célula hospedeira com a ajuda da integrase, formando um

provírus estável (HOSHINO, 2012). Após a integração, o provírus é expresso pela maquinaria celular e os produtos de tradução, juntamente com a progênie RNA, são agrupados na célula hospedeira em partículas virais que são, então, liberadas por brotamento. Essas partículas virais levam consigo parte da membrana da célula hospedeira como parte constituinte do seu envelope (YASUNAGA; MATSUOKA, 2011).

1.2.4 Diagnóstico

O diagnóstico da infecção pelo vírus HTLV-1 é importante para a redução da epidemia do vírus, uma vez que o indivíduo sabendo de seu estado sorológico pode diminuir comportamentos que confirmam riscos de transmissão do vírus. Além disso, o diagnóstico precoce da infecção pode permitir um melhor prognóstico desse paciente, apesar de ele ser, a partir de então, um permanente carreador viral. Ao contrário da infecção pelo HIV-1, os indivíduos contaminados pelo HTLV-1 não recebem tratamento antirretroviral devido à ineficiência destes medicamentos frente ao HTLV-1. Portanto, o tratamento do HTLV-1 é restrito às doenças associadas.

A triagem para o HTLV-1 em bancos de sangue no Brasil se tornou obrigatória em novembro de 1993 a partir da Portaria nº 1.376. Testes eficientes e de qualidade para identificação de indivíduos infectados por HTLV-1 são cruciais para prevenção da disseminação desta doença viral, uma vez que estudos demonstram que cerca de 40 a 60% das pessoas transfundidas com componentes sanguíneos celulares infectados contendo o vírus HTLV-1 se tornarão infectadas (PROIETTI et al., 2005).

O primeiro teste imunoenzimático para detectar infecção pelo HTLV-1 foi licenciado em 1988 nos Estados Unidos (CDC, 1988) e, desde então, houve considerável progresso na produção de kits diagnósticos. A evolução do desenvolvimento de testes imunoenzimáticos pode ser dividida em três gerações. Os kits de primeira geração, os primeiros a serem desenvolvidos, utilizavam lisados virais do HTLV-1 como antígenos de captura (ANDERSSON et al., 1999) e tinham baixa sensibilidade. Os de segunda geração melhoraram a detecção incorporando lisados virais do HTLV-II ou, em alguns casos, a proteína gp21 recombinante (JACOB, SANTOS-FORTUNA, CATERINO-DE-ARAUJO, 2008; QIU et al., 2008).

Os kits de terceira geração, por sua vez, foram desenvolvidos de forma que os antígenos de captura fossem proteínas recombinantes e/ou peptídeos sintéticos utilizados individualmente ou em combinação. Estes kits são altamente sensíveis e específicos quando comparados aos que empregavam apenas os lisados virais do HTLV (QIU et al., 2008; VRIELINK et al., 1999). O kit *Ortho® HTLV-I/HTLV-II* (*Ortho Clinical Diagnostics Inc.*) é um exemplo de kit de terceira geração e contém as proteínas gp21 e p24 recombinantes tanto do HTLV-1 quanto do HTLV-2 (VRIELINK et al., 1999). Outro kit de imunodiagnóstico de terceira geração é o *ARCHITECT® rHTLV I/II* (*Abbott*) que é totalmente automatizado e contém a proteína gp21 recombinante do vírus HTLV-2 e a proteína gp46 sintética tanto do HTLV-1 quanto do HTLV-2 (QIU et al., 2008).

Atualmente, o diagnóstico para HTLV é feito em duas etapas: a etapa de triagem e a etapa de confirmação (JACOB et al., 2008). Os testes de triagem são utilizados de forma rotineira para avaliar grandes quantidades de amostra. Os ensaios imunoenzimáticos, como o ELISA, são os principais testes de triagem empregados. No Brasil, a etapa de triagem é realizada com ELISA ou testes de aglutinação (MANNS; HISADA; LA GRENADE, 1999; VRIELINK; REESINK, 2004). Os testes de triagem têm uma maior sensibilidade e podem apresentar reações falso-positivas ou falso-negativas devido à resposta imunológica variável de indivíduo para indivíduo, além de uma possível não detecção se o estágio da infecção pelo vírus encontra-se no período de janela imunológica. O período de janela imunológica para os imunoenaios é de 51 (36-72) dias (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002; MANNS; HISADA; LA GRENADE, 1999; MANUAL TÉCNICO PARA INVESTIGAÇÃO DA TRANSMISSÃO DE DOENÇAS PELO SANGUE, 2004).

Segundo o Manual Técnico para Investigação da Transmissão de Doenças pelo Sangue (2004), se o teste de triagem se mostrar não reativo, a amostra sanguínea não apresenta infecção pelo HTLV. No entanto, se a amostra se mostrar reagente, testes confirmatórios devem ser realizados. Caso haja dúvidas com relação ao resultado obtido, o doador pode ser convocado para realização de um novo teste. Se o teste confirmatório apresentar-se como reagente, a infecção pelo HTLV é confirmada.

No Brasil, para a etapa de confirmação, são utilizados testes de imunofluorescência indireta, Reação em cadeia da polimerase (PCR) e

principalmente, *Western Blot* (CATALAN-SOARES; PROIETTI; CARNEIRO-PROIETTI, 2001). Os kits de *Western Blot* comumente utilizam lisado viral de HTLV-1 com proteínas recombinantes acrescidas para melhorar a sensibilidade (ABRAMS; AKAHATA; JACOBSON, 2011). Os antígenos mais empregados no *Western Blot* são a p24 e a gp46 (VRIELINK; REESINK, 2004). Já é conhecido que nos dois meses que se seguem após a infecção primária pelo HTLV-1, aparecerão os anticorpos contra as proteínas do gene *gag*, anti-p24 e anti-p19. Posteriormente, são identificados anticorpos contra as proteínas do gene *env*, os anticorpos anti-gp21 e anti-gp46 (MANNS et al., 1991). A interpretação das marcações no *Western Blot* deve obedecer a critérios pré-estabelecidos pelo fabricante, sendo, em geral, requerida reatividade para p19 ou p24 e para a gp46 (ABRAMS; AKAHATA; JACOBSON, 2011; CATALAN-SOARES; PROIETTI; CARNEIRO-PROIETTI, 2001). Um exemplo de *Western Blot* bastante utilizado para testes confirmatórios é o *MP Diagnostics HTLV Blot 2.4 (MP Biomedicals)*. Este teste emprega lisado viral acrescido das proteínas recombinantes gp21 e gp46 tanto do HTLV-1 quanto do HTLV-2. Para confirmar a infecção pelo vírus HTLV, o fabricante preconiza o aparecimento de imunorreatividade de forma combinada principalmente para as proteínas p19 e/ou p24, gp21 e gp46.

Testes moleculares, como a NAT, também podem ser utilizados como teste de confirmação e para diferenciação de infecções causadas pelo HTLV-1 ou HTLV-2. Essa metodologia é constituída de testes *in vitro* para detecção direta de material genético de agentes infecciosos, diminui a janela de detecção da infecção. Porém, estes testes moleculares, além de serem laboriosos e demorados, são muito caros e, portanto, são menos utilizados rotineiramente (MANNS; HISADA; LA GRENADE, 1999; VRIELINK; REESINK, 2004).

O imunoensaio de linha como *INNO-LIA™ HTLV I/II (FUJIREBIO)* também tem sido empregado como teste confirmatório (SABINO et al., 1999). Esse ensaio se mostra ainda mais completo pois é capaz de diagnosticar a infecção pelo vírus HTLV e discriminar se é o subtipo 1 ou 2. Os antígenos desse teste são proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos que são purificados e fixados numa membrana de nylon. O teste contém bandas referentes às proteínas p19, p24, gp46 e gp21 que confirmam a infecção pelo vírus e, para identificação de qual subtipo, apresenta as proteínas p19 e gp46 específicas para o HTLV-1 e a gp46 específica para HTLV-2 (THORSTENSSON; ALBERT; ANDERSSON, 2002).

Os kits diagnósticos utilizados nos bancos de sangue nacionais e nos laboratórios de análises clínicas são, na sua maioria, comprados de empresas estrangeiras. Entre as empresas que comercializam conjuntos diagnósticos para HTLV-1 estão a *BioMerioux* (USA), *Murex* (França), *Genelabs* (USA) e *Abbott* (USA) (KAUL et al., 2010; MALM; KJERSTADIUS; ANDERSSON, 2010).

Devido aos altos preços dos kits, novas estratégias para diagnóstico da infecção pelo HTLV-1 devem ser desenvolvidas, principalmente nos países em desenvolvimento como o Brasil. Os kits diagnósticos atualmente disponíveis no mercado e que são utilizados nos laboratórios clínicos e nos bancos de sangue no Brasil, utilizam, na sua maioria, as proteínas recombinantes p19, gp21, p24 e gp46 como seus componentes. Dessa forma, a produção dessas quatro proteínas de forma recombinante é o primeiro passo para o desenvolvimento de kits diagnósticos com tecnologia nacional. Esses kits devem ser baseados em metodologias simples, para fácil manuseio pelo profissional de saúde e sem exigir equipamentos caros, devem ser baratos para se produzir, sensíveis e específicos.

1.3 Produção de proteínas recombinantes

Proteínas são sintetizadas por todas as formas vivas como parte do seu metabolismo natural e desempenham importante papel em vários processos celulares incluindo sinalização celular, resposta imune, adesão e ciclo celular. Com a introdução da tecnologia de DNA recombinante em 1970, proteínas começaram a ser expressas em vários organismos hospedeiros resultando num processo mais rápido e mais fácil em comparação às suas fontes naturais. A produção de proteínas recombinantes é empregada em produtos que têm aplicação em diversas áreas como medicamentos, vacinas e testes diagnósticos (DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

Primeiramente, para gerar uma proteína recombinante é necessária a obtenção da sequência gênica codificante dessa determinada proteína. Após a clonagem dessa sequência em vetores de expressão e a sua introdução num sistema de expressão, a proteína desejada pode ser produzida (DEMAIN; VAISHNAV, 2009). A escolha da célula hospedeira e do correspondente vetor para a expressão depende dos objetivos do estudo. Assim, devem ser levadas em consideração as características da proteína, as taxas de crescimento da célula hospedeira, os níveis de expressão, em qual local

é desejado que a proteína seja expressa, a necessidade de modificações pós-traducionais, a atividade biológica da proteína de interesse, dentre vários outros aspectos (CHOI; KEUM; LEE, 2006; GOEDDEL, 1990).

Os plasmídeos de expressão contêm elementos comuns que são responsáveis por controlar a produção da proteína recombinante. A origem de replicação (Ori) controla a taxa de replicação do plasmídeo e os marcadores de seleção, como os genes de resistência a antibióticos, ajudam na seleção de colônias transformadas (BERLEC; STRUKELJ, 2013; ROSANO; CECCARELLI, 2014). O promotor controla a taxa de transcrição do gene alvo e, para que a produção da proteína recombinante seja satisfatória, ele deve ser forte, apresentar baixo nível de produção basal e ser induzido de forma simples e de maneira rentável com substâncias de baixo custo (MAKRIDES, 1996). O sítio de múltipla clonagem, por sua vez, permite a inserção do gene de interesse. Além disso, o plasmídeo deve conter sequências para o controle da tradução como um sítio de ligação ao ribossomo (sequência de Shine-Dalgarno), uma sequência ATG como iniciador e um códon de parada para terminar a tradução (BERLEC; STRUKELJ, 2013).

O vetor de expressão deve ser cuidadosamente escolhido para que ele incorpore características desejáveis às proteínas recombinantes, como *tags* para facilitar a solubilidade e a purificação. As *tags* de seis histidinas (HIS₆) e *glutathione-S-transferase* (GST), por exemplo, são capazes de melhorar a purificação e a solubilidade das proteínas heterólogas. Componentes presentes no vetor podem também definir para qual local a proteína vai ser dirigida após sua produção, ou seja, para o citoplasma, periplasma ou para o meio extracelular (COSTA et al., 2014; MERGULHÃO; SUMMERS; MONTEIRO, 2005). A separação da *tag* da proteína pode ser necessária devido à possibilidade de ela interferir na estrutura ou na atividade biológica da proteína recombinante. Isso pode ser realizado, dependendo da estrutura do vetor, por clivagem com endoproteases ou exoproteases (WAUGH, 2011). A presença da *tag* pode também ajudar na detecção da expressão proteica heteróloga, como por exemplo utilizando anticorpos anti-His₆ nos testes de *Western Blot* (COSTA et al., 2014).

Existem atualmente diversos sistemas para expressão de proteínas tanto em eucariotos quanto em procariotos. O sistema eucarioto engloba a expressão de proteínas em leveduras, principalmente *Pichia pastoris* e *Saccharomyces cerevisiae*,

plantas e células de mamíferos. No que diz respeito ao sistema procarioto, destaca-se o sistema de expressão em *E. coli* (BALBÁS; LORENCE, 2004).

O sistema de expressão em *E. coli* foi o primeiro a ser utilizado para produzir proteínas recombinantes e tem muitas vantagens quando comparado aos sistemas eucarióticos (BASSO et al., 2013; TERPE, 2006). O sistema de expressão em *E. coli* é um dos mais atraentes devido ao seu rápido crescimento em meios de cultura de baixo custo, facilidade de cultivo, alto potencial de produção, genética bem descrita e a disponibilidade de inúmeros vetores bacterianos e cepas mutantes (BASSO et al., 2013; MAKRIDES, 1996).

Entretanto, o sistema de expressão em *E. coli* apresenta algumas limitações na produção de proteínas complexas devido à falta de maquinaria sofisticada para realizar modificações pós-traducionais como glicosilação, por exemplo. As proteínas podem também ser geradas com conformação inadequada e insolúveis, depositadas em corpos de inclusão. Além disso, algumas linhagens de *E. coli* podem apresentar ação de endotoxinas e proteases, que culminam com a degradação da proteína recombinante expressa (BANEYX e MUJACIC, 2004; COSTA et al., 2014; JEVSEVAR et al., 2005).

As proteínas heterólogas expressas em sistema procarioto podem ser produzidas agregadas em corpos de inclusão. A rápida produção pode não fornecer tempo hábil para o correto dobramento da proteína. Essas proteínas são inativas e estão agregadas por pontes dissulfeto intermoleculares e intramoleculares de forma errônea (COSTA et al., 2014). A conformação da proteína também pode ser prejudicada pelo uso de promotores fortes e altas concentrações de indutores que, apesar de permitir uma alta produção de proteína, em alguns casos, acaba afetando o dobramento correto da proteína (JEVSEVAR et al., 2005).

Algumas estratégias podem ser usadas para evitar a formação dos corpos de inclusão. Uma delas é realizar a expressão em baixas temperaturas, o que resulta na diminuição do grau de transcrição, tradução e redução das forças de interação hidrofóbicas, as quais contribuem para o dobramento errôneo da proteína (JEVSEVAR et al., 2005; CHALMERS et al., 1990; VASINA; BANEYX., 1997). Promotores fracos ou baixas concentrações de indutores também reduzem a taxa de síntese da proteína alvo, alcançado um dobramento adequado da proteína alvo (JEVSEVAR et al., 2005). A coexpressão de chaperonas, que ajudam no correto

enovelamento de proteínas, podem contribuir para a produção de proteínas recombinantes com dobramento correto (KOLAJ et al., 2009; TERPE, 2006).

A formação de corpos de inclusão, entretanto, apresenta algumas importantes vantagens como a facilidade no isolamento, a proteção contra proteólise no citoplasma, além de evitar toxicidade celular, uma vez que algumas proteínas na sua forma nativa podem ser tóxicas para a célula hospedeira (HANNING; MAKRIDES, 1998; MUKHOPADHYAY, 1997; SINGH; PANDA, 2005).

A etapa de purificação deve ser elaborada quando se escolhe o vetor de expressão a ser utilizado, mas padronizações quanto à coluna, as composições dos tampões e pH, além das condições de ligação, lavagem e eluição devem ser padronizadas (COSTA et al., 2014).

Apesar de todos os avanços na tecnologia do DNA recombinante e nas metodologias desenvolvidas para melhorar a produção de proteínas, as condições de expressão exigem várias tentativas e erros. O objetivo de produzir proteínas recombinantes pode ser uma tarefa muito árdua (DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

1.4 Brasil, mercado e patentes

O mercado internacional de produtos para diagnóstico, que engloba equipamentos, insumos, testes *in vitro*, dentre outros, movimentou em 2005 cerca de US\$ 220 bilhões de dólares ao ano (PAIVA, 2009). Só o setor de produção de kits diagnósticos movimenta mundialmente cerca de US\$ 25 bilhões de dólares a cada ano (BRAND, 2014). Esse mercado é concentrado nos países desenvolvidos, em especial nos Estados Unidos e o Brasil é o 11º mercado desses produtos com uma parcela de 1,4% das vendas mundiais (PIERONI; REIS; SOUSA, 2010).

O Brasil apresenta importante dependência tecnológica externa no que diz respeito ao acesso a novos fármacos e medicamentos, equipamentos de saúde, hemoderivados, vacinas e insumos para diagnóstico. A balança comercial do Brasil com relação à materiais e insumos para laboratórios tem notável déficit. Só em 2008 foram movimentados US\$ 37 milhões de dólares exportando produtos brasileiros, enquanto foram despendidos US\$ 700 milhões de dólares na importação de produtos. Além disso, as importações se concentram em produtos inovadores e de alto valor agregado, enquanto as exportações foram, majoritariamente, de materiais de

consumo (PIERONI; REIS; SOUSA, 2010). O déficit comercial no setor de produtos para a saúde, de maneira geral, passou de aproximadamente US\$ 700 milhões de dólares ao ano, no final da década de 1980 (VIANA et al., 2011), para um patamar superior a US\$ 10 bilhões de dólares em 2011 (GADELHA; COSTA, 2012).

O Brasil importa 90% de todos os kits que utiliza nos testes imunológicos para HIV e HTLV (VIANA, 2011). Antunes et al. (2006) afirmam que, segundo dados do Departamento de Informática do SUS (DATASUS), o governo gastou pelo menos 47 milhões de reais com kits diagnósticos para HIV nos anos de 2004 e 2005. Segundo a Fundação Pró-Sangue, são realizadas 4,5 milhões de doações de sangue por ano no Brasil e, conseqüentemente, são gastos milhões de reais por ano com a compra de imunodiagnósticos.

A área de reagentes para diagnóstico tem sido de considerável inovação na última década, especialmente pela busca da redução de erros nos diagnósticos e maior participação no processo decisório sobre o estado de saúde dos indivíduos (GOTTLIEB; WOODCOCK, 2006).

O mercado nacional de produção de insumos diagnósticos se mostra em crescimento em função de fatores econômicos, políticos e epidemiológicos (PAIVA, 2009). No entanto, poucas são as informações disponíveis sobre a indústria de reagentes para diagnóstico em nível nacional, sobre as pesquisas que estão sendo produzidas e seus potenciais e promissores produtos.

A procura de pedidos de patentes em uma busca rápida em português através dos sites Patentes Online, Google Patentes e *World Intellectual Property Organization* (WIPO) mostrou que não havia nenhum pedido de patentes para proteínas recombinantes p19, gp21, p24 e gp46 com finalidade de diagnóstico para HTLV-1. Com relação ao HIV-1, a busca por patentes relacionadas ao HIV-1 no site Patentes Online mostrou 6 resultados e destes, 3 envolviam as proteínas recombinantes p24 e gp41. No Google Patentes essa busca apresentou resultados semelhantes, mostrando que apenas 3 trabalhos envolviam a utilização das proteínas recombinantes p24, gp41 e gp120 com o objetivo de diagnóstico. A busca através do WIPO apresentou uma quantidade maior de resultados quando foi pesquisado sobre proteínas recombinantes utilizadas no diagnóstico do HIV-1. Porém, foram encontrados cerca de 6 resultados que utilizavam as proteínas p24, gp41 e gp120. Estes dados evidenciam a necessidade de esforços para implementar a produção de

proteínas recombinantes para o diagnóstico das infecções pelos vírus HIV-1 e HTLV-1 no Brasil.

No Brasil, o Ministério da Saúde publicou em 2013 a Portaria nº 3.089 que redefine a lista de produtos considerados insumos estratégicos para o país. Na seção da portaria na qual se encontram os dispositivos médicos e dispositivos em geral de apoio a saúde estão incluídos alguns conjuntos diagnósticos para detecção das doenças e insumos para sua produção. Além disso, a Lei nº 12.349 de 2010 e o Decreto nº 7.546 de 2011 abordam que o governo deve ter preferência das suas compras para produtos nacionais em todos os setores em detrimento de produtos estrangeiros. Essas medidas colaboram com o desenvolvimento do complexo industrial de saúde nacional.

O desenvolvimento de produtos biotecnológicos representa um dos principais avanços para os setores da saúde, ciência e tecnologia. O Programa Inova Saúde é uma iniciativa do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação e da FINEP, em cooperação com o Ministério da Saúde, o BNDES e o CNPq, que teve início em abril de 2013, com duração prevista até dezembro de 2017. O fomento e a seleção de Planos de Negócio no âmbito do Inova Saúde se destinará a cadeias produtivas ligadas à quatro linhas temáticas, dentre elas a de “Diagnósticos *in vitro* e por imagem”.

Entre 2011 e 2013, o total de financiamentos aprovados pelo BNDES para o complexo industrial da saúde cresceu 275%. No ano de 2013, foram aprovados R\$ 1,47 bilhões para o setor e, desse total, R\$ 1,22 bilhões (83%) foram destinados aos empreendimentos de biotecnologia (CARRO, 2014). Como mostrado, foi gerado um novo cenário para empresas nacionais trazendo a oportunidade de investimentos nesse novo espaço de atuação, e consequentemente, estimular o desenvolvimento do setor nacional de biotecnologia.

Fica claro que, apesar de haver uma produção estrangeira estabelecida, há uma necessidade e vontade política para que o Brasil se torne autossuficiente ou menos dependente do mercado estrangeiro na produção de insumos para kits diagnósticos.

No Brasil, a pesquisa no setor de biotecnologia é muito promissora e, para o desenvolvimento e produção de produtos nessa área, é necessário estreitar parcerias e cooperações entre o setor público e privado. Assim é possível articular uma futura

produção de produtos biotecnológicos nacional, possibilitando ter uma indústria brasileira forte, inovadora e competitiva com o mercado externo.

2 JUSTIFICATIVA

Através dos programas nacionais de incentivo ao desenvolvimento do setor biotecnológico, da medida de preferência na aquisição de produtos nacionais e do consequente avanço no país nessa área, mostra-se fundamental priorizar pesquisas que possibilitem atender à crescente demanda nacional por esses produtos.

No Brasil, a maioria dos kits utilizados no diagnóstico das infecções pelo HIV-1 e HTLV-1 é importada e o governo despende milhões anualmente para adquiri-los. A produção de sistemas de diagnóstico com tecnologia nacional diminuiria de maneira significativa os gastos com importação e levaria a uma independência ou menor dependência do mercado externo. Por essa razão, novos produtos para a realização do diagnóstico devem ser desenvolvidos, principalmente nos países em desenvolvimento, como o Brasil, para atender os laboratórios clínicos e bancos de sangue públicos e particulares. Esses kits devem ser baseados em metodologias simples, para fácil manuseio pelo profissional de saúde e sem exigir equipamentos caros, devem ser baratos para se produzir, sensíveis e específicos.

Os ensaios diagnósticos para identificação da infecção por HIV-1 e HTLV-1 são continuamente melhorados e novos testes devem ser desenvolvidos para que sejam amplamente disponíveis. A identificação da população portadora dos vírus é de suma importância, pois proporciona aos governos dados para planejamento da política de saúde e tratamento precoce desses indivíduos. Além disso, o diagnóstico precoce possibilita uma melhor prevenção da disseminação destes vírus, uma vez que indivíduos que descobrem o seu estado sorológico adotam um comportamento visando uma diminuição dos riscos de transmissão. Outro aspecto a ser considerado é que a segurança nos bancos de sangue depende de testes sensíveis e específicos.

Expressar as proteínas p24, gp41 e gp120 do HIV-1 e p19, p24, gp21 e gp46 do HTLV-1 e mostrar que elas são efetivamente reconhecidas por soros de indivíduos portadores dos vírus são o primeiro passo para o desenvolvimento de conjuntos diagnósticos com tecnologia brasileira. Isso cria suporte para o maior desenvolvimento da tecnologia nacional na área de produtos biotecnológicos para diagnóstico, fazendo uma maior aproximação entre o conhecimento científico gerado no Brasil e o mercado.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é produzir as proteínas p24, gp41 e gp120 do HIV-1 e p19, p24, gp21 e gp46 do HTLV-1 em sistema de expressão procarioto de maneira que sejam eficientemente reconhecidas por soros de indivíduos infectados.

3.2 Objetivos específicos

- Construir vetores de expressão com os genes codificantes das proteínas heterólogas clonados na sua estrutura;
- Expressar as proteínas de interesse em sistema procarioto;
- Purificar as proteínas expressas em coluna de níquel;
- Confirmar a identidade das proteínas produzidas por meio de espectrometria de massas;
- Testar a reatividades e especificidade do reconhecimento das proteínas de interesse pelos soros de indivíduos com HIV-1, HTLV-1 e de indivíduos saudáveis.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fluxograma da metodologia utilizada

4.2 Material biológico

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FMRP-USP (Processo nº 2485/2008) e os participantes da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1 e Anexo 2).

Para obtenção dos fragmentos gênicos das proteínas de interesse do HIV-1 (p24, gp41 e gp120) usamos como DNA molde, o DNA extraído de amostra de sangue periférico de indivíduos com o vírus HIV-1. A extração de DNA foi realizada utilizando-se o kit comercial *DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen) conforme instruções do fabricante. Também foram empregados dois vetores como DNA molde na PCR. Um dos vetores utilizados foi o vetor lentiviral pCMVΔR8.91 (*Addgene*) (Anexo 3), que contém na sua estrutura o gene *gag*, para a obtenção da sequência gênica da p24. O outro vetor utilizado é denominado pAbT4674 (*ATCC*) (Anexo 3). Este vetor contém as sequências codificadoras dos genes *env* do HIV-1, utilizado para a obtenção da sequência gênica codificante da gp41 e da gp120.

Os fragmentos referentes aos genes das proteínas do HTLV-1 (p19, gp21, p24 e gp46) já estavam clonados em *pCR®2.1TOPO®* (*Invitrogen*) e armazenados em bactérias DH10β (RUSSO-CARBOLANTE et al., 2007).

4.3 Vetores de clonagem e expressão

Os vetores de clonagem utilizados neste trabalho foram os sistemas *pGEM® - T Easy* (*Promega*) e *TOPO®TA Cloning®*. Os vetores de ambos os sistemas são adequados para clonagem de produtos de PCR pois contêm uma timidina (T) na extremidade 3' que se liga de maneira eficiente à adenina (A) na extremidade 3' adicionada pela Taq polimerase aos *amplicons* (SHUMAN, 1994). Esses vetores contêm no seu sítio de clonagem a região codificadora da enzima β-galactosidase, permitindo assim, a seleção dos clones recombinantes por meio de *Blue White Screening*.

Os vetores de expressão utilizados neste trabalho foram o vetor pAE (não comercial), pET20b(+) (*Novagen*), pET28a(+) (*Novagen*) e pET32a(+) (*Novagen*) (Anexo 3).

O plasmídeo não comercial pAE (2800pb), que foi cedido pelo Prof. Dr. Paulo Lee Ho do Instituto Butantan, é um derivado dos vetores pRSET-A (*Invitrogen*) e pET3-His (não comercial) (RAMOS et al., 2004). O vetor pAE, assim como os vetores pET20b(+), pET28a(+) e pET32a(+), tem a expressão do gene da proteína exógena sob o controle do promotor do fago T7, que promove a expressão gênica após indução com IPTG (isopropiltiogalactosídeo). Além disso, esses vetores possibilitam que a

proteína recombinante seja produzida fusionada a seis histidinas, facilitando, assim, a purificação por cromatografia de afinidade a níquel.

O vetor pET20b(+) traz na sua região N-terminal uma sequência sinal *pelB* que direciona a proteína produzida à região periplasmática da bactéria que a produziu. O vetor pET28a(+), por sua vez, apresenta um sítio de clivagem para trombina que é uma ferramenta útil para retirada da *tag* de seis histidinas da região N-terminal. As proteínas expressas no vetor pET32a(+) são fusionadas à uma tioredoxina que é capaz de aumentar a solubilidade e a estabilidade térmica da proteína a ela fusionada (LAVALLIE et al., 1993). Além disso, o pET32a(+), assim como o pET28a(+), possui um sítio de clivagem para trombina.

4.4 Bactérias

As bactérias *E. coli* da linhagem DH10 β foram utilizadas como receptoras dos plasmídeos após a clonagem e para propagação dos mesmos. As linhagens BL21(DE3), BL21(DE3)plysS, Rosetta(DE3) e BL21-CodonPlus, por sua vez, foram utilizadas para a expressão heteróloga das proteínas de interesse.

A designação (DE3) indica que essas bactérias tem o gene que codifica a T7 RNA polimerase que é produzida sob estímulo com IPTG. Além disso, os genes codificantes de algumas proteases nas bactérias BL21(DE3) estão deletados evitando que a proteína exógena seja degradada. A linhagem BL21(DE3)pLysS contém um plasmídeo que codifica a T7 lisozima que inibe a T7 polimerase até que sua expressão seja induzida, controlando os níveis de expressão basal (GOPAL; KUMAR, 2013).

A linhagem Rosetta(DE3) é derivada da linhagem BL21(DE3) e foi projetada para apresentar os genes que codificam os tRNAs para os códons denominados códons raros para bactérias da linhagem BL21(DE3) no plasmídeo pRARE. Esses códons raros codificam para os aminoácidos isoleucina (AUA), arginina (AGG e AGA), leucina (CUA), prolina (CCC) e glicina (GGA). As bactérias BL21-CodonPlus, por sua vez, também são derivadas da linhagem BL21(DE3) e apresentam os genes que codificam os tRNAs para os códons raros de arginina (AGG e AGA), isoleucina (AUA) e leucina (CUA) (GOPAL; KUMAR, 2013).

Tabela 1 – Genótipos das linhagens bacterianas

Linhagem bacteriana	Genótipo
DH10 β	F– <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi80/lacZ\Delta M15 \Delta lacX74$ <i>recA1 endA1 araD139 $\Delta(ara leu)$ 7697 galU galK rpsL</i> <i>nupG λ–</i>
BL21(DE3)	F– <i>ompT hsdSB(rB–, mB–) gal dcm</i> (DE3)
BL21(DE3)plysS	F– <i>ompT hsdSB(rB–, mB–) gal dcm</i> (DE3) pLysS (CamR)
Rosetta(DE3)	F– <i>ompT hsdSB(rB–, mB–) gal dcm</i> pRARE ² (CamR)
BL21-CodonPlus	F– <i>ompT hsdSB(rB–, mB–) gal dcm⁺ endA Hte</i> [argU ileY leuW CamR]

4.5 Estudo de códons raros

A expressão de uma proteína heteróloga em linhagens de *E. coli* como a BL21(DE3) pode não ocorrer devido à diferença entre os códons presentes no gene de interesse e os códons preferencialmente utilizados por essas cepas de *E. coli*. Para quantificar quantos códons raros estão presentes nos genes das proteínas, foi feito um estudo de códons raros através da ferramenta de bioinformática disponível em <http://nihserver.mbi.ucla.edu/RACC/>. Na Tabela 2 é mostrada a porcentagem de códons raros em relação à quantidade de códons totais presentes no gene de cada uma das proteínas.

Tabela 2 – Estudo de códons raros

Proteína	Nº total de códons	Nº de códons raros	% de códons raros
p24 HIV-1	208	21	10,1
gp41	338	41	12,2
gp120	496	48	9,7
p19	91	10	11
gp21	162	19	11,7
p24 HTLV-1	195	15	7,8
gp46	113	13	11,5

4.6 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram desenhados baseados na sequência dos genes que codificam as proteínas p24, gp41 e gp120 do vírus HIV-1. Essas sequências podem ser encontradas no *GenBank* sob o número de acesso K03455. Os *primers* foram desenhados com sítio de restrição para as enzimas *XhoI* (CTCGAG) e *NcoI* (CCATGG) e com a sequência de Shine-Dalgarno (AGGAGG) para auxiliar nos processos de clonagem e expressão, como pode ser visto na Tabela 3.

Tabela 3 - Sequência dos *primers* para as proteínas referentes ao HIV-1

Primer	Sequência
p24 - Forward	5' AGGAGGCTCGAGATGGTAAAAGTAGTAGAAGAGAAG 3'
p24 - Reverse	5' CCATGGCAAACCTCTTGCCTTATGGCC 3'
gp41- Forward	5' AGGAGGCTCGAGATGGCAGTGGGAATAGGAGCTTTG 3'
gp41- Reverse	5' CCATGGAGCCCTGTCTTATTCTTCTA3'
gp120 - Forward	5' AGGAGGCTCGAGATGAGAGTGAAGGAGAAATA3'
gp120 - Reverse	5' CCATGGGGTGGGTGCTACTCCTAATGG 3'

Os *primers* que foram desenhados a partir da sequência dos genes que codificam as proteínas p19, gp21, p24 e gp46 do vírus HTLV-1, estão presentes na Tabela 4. Essas sequências podem ser encontradas no *GenBank* sob número de

acesso J02029. Os *primers* foram desenhados com os sítios de restrição para as enzimas EcoRI (GAATTC) e NdeI (CATATG).

Tabela 4 - Sequência dos *primers* para as proteínas referentes ao HTLV-1

Primer	Sequência
p19 - <i>Forward</i>	5' <u>CATATG</u> ATGGCTACTCAAGCTGATTTG 3'
p19 - <i>Reverse</i>	5' <u>GAATTC</u> TTACAGGTCAGTATCAAACCA 3'
gp21- <i>Forward</i>	5' <u>CATATG</u> ATGAGTGTGGATCCAGCTTG 3'
gp21- <i>Reverse</i>	5' <u>GAATTC</u> ATCTTCACACGTCTTCAGGTT 3'
p24 - <i>Forward</i>	5' <u>CATATG</u> ATGGCGGGACACCTGGCT 3'
p24 - <i>Reverse</i>	5' <u>GAATTC</u> TCAGTTTGAATGCATGGGAG 3'
gp46 - <i>Forward</i>	5' <u>CATATG</u> ATGTACAACATGATGGAGACG 3'
gp46 - <i>Reverse</i>	5' <u>GAATTC</u> CCTCACATGTGTGAGAGGG 3'

A amplificação dos genes das proteínas de interesse utilizando os *primers* mencionados acima leva a formação de *amplicons* cujos tamanhos estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Tamanho dos *amplicons*

Gene das proteínas	Tamanho do <i>amplicon</i>
p24 HIV-1	645 pb
gp41	1037 pb
gp120	1511 pb
p19	288 pb
gp21	501 pb
p24 HTLV-1	600 pb
gp46	355 pb

4.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a realização da PCR foram adicionados os seguintes componentes: tampão da polimerase (*Ludwig Biotec*), 1,5 mmol/L de MgCl₂ (*Ludwig Biotec*), 1,0 µL

de mix de dNTP (10 mmol/L) (*Ludwig Biotec*), 1 μ L de *primer forward* (10 pmol/ μ L) (*Invitrogen*), 1 μ L de *primer reverse* (10 pmol/ μ L) (*Invitrogen*), 2,5 U da enzima Taq polimerase (*Ludwig Biotec*), material genético a ser amplificado e água ultrapura autoclavada suficiente para completar o volume para 25 μ L.

Os fragmentos de DNA foram amplificados por PCR pela ação da enzima Taq DNA polimerase, após a padronização das condições de reação, no termociclador *T100™ Thermal Cycler* (*Bio-Rad*).

As PCR para amplificação dos fragmentos gênicos correspondentes às proteínas de interesse do HIV-1 foram realizadas nas seguintes condições para a p24: 1 ciclo a 94°C por 3 minutos, trinta e cinco ciclos a 94°C por 45 segundos, 52°C por 35 segundos, 72°C por 1 minuto e 30 segundos e, por fim, um período de extensão final a 72°C por 10 minutos. Com relação à gp41 e gp120, as condições da reação foram: 1 ciclo a 94°C por 1 minuto e 30 segundos, trinta e cinco ciclos a 94°C por 40 segundos, 54°C por 40 segundos, 72°C por 40 segundos e uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os fragmentos gênicos correspondentes às proteínas do vírus HTLV-1 amplificados por PCR foram obtidos a partir de um ciclo inicial de desnaturação de 94°C por 1 minuto e 30 segundos, seguindo por 35 ciclos a 94°C por 40 segundos, 54°C por 30 segundos, 72°C por 40 segundos e, por fim, um período de extensão final a 72°C por 10 minutos.

4.8 PCR utilizando DNA polimerase de alta fidelidade

Na PCR com DNA polimerase de alta fidelidade foi utilizado a enzima *Platinum® Taq DNA Polymerase* (*Invitrogen*). A PCR utilizando *Platinum® Taq DNA Polymerase* foi feita conforme instruções do fabricante, cuja amplificação dos fragmentos gênicos foi feita por 1 ciclo de 94°C por 1 minuto, 16 ciclos a 94°C por 15 segundos, 53°C por 30 segundos, 68°C por 30 segundos e, por fim, um período de extensão final a 68°C por 2 minutos.

4.9 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose foi utilizada para as análises dos produtos amplificados por PCR, visualização da digestão dos plasmídeos e para purificação dos fragmentos gênicos de interesse. Os géis de agarose foram feitos a 1% ou 0,5% de agarose (para purificação de fragmentos gênicos) em tampão de corrida TAE (Tris-Base 0,04 mol/L, ácido acético glacial 1 mol/L, EDTA 50 mmol/L, pH 8,0) e a eletroforese realizada em cuba *Easycast Mini* (Thermo Scientific) contendo tampão TAE. As corridas foram com voltagem fixada em 100 V (60 V para a purificação de fragmentos gênicos) e amperagem livre. O tampão de carregamento (azul de bromofenol 0,25% e sacarose 60%) contendo *GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain* (Uniscience) na proporção 1:1000 foi adicionado às amostras a serem analisadas. Foram utilizados marcadores de peso molecular *GeneRuler 1 Kb DNA Ladder* (Thermo Scientific) ou *Ladder 100 pb* (Ludwig Biotec). Os resultados foram visualizados e analisados em Fotodocumentador *Bio-Rad – Modelo Universal HoodII* (Bio-Rad).

4.10 Inserção dos fragmentos gênicos da p24, gp41 e gp120 do HIV-1 em vetor de clonagem

O produto da amplificação do gene da proteína p24 do HIV-1 a partir do vetor pCMVΔR8.91 e dos genes das proteínas gp41 e gp120 a partir do vetor pAbT4674 foram clonados no vetor *pGEM®-T Easy* (Promega), utilizando o tampão *2X Rapid Ligation Buffer* (Tris-HCl 60 mmol/L pH 7,8, MgCl₂ 20 mmol/L, DTT 20 mmol/L, ATP 2mmol/L, polietileno glicol 10%) e enzima T4 DNA Ligase (Promega), seguindo as instruções do fabricante.

Os fragmentos referentes aos genes das proteínas do HTLV-1 (p19, gp21, p24 e gp46) estavam clonados em *pCR®2.1TOPO®*.

4.11 Preparo de células de *E. coli* quimiocompetentes

As cepas de bactérias utilizadas nesse trabalho foram tornadas competentes como descrito a seguir. As bactérias foram plaqueadas em meio Luria-Bertani (LB)

sólido (Tryptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, ágar 1%, pH 7,0) e mantidas a 37°C por 16 horas. Uma colônia isolada desta placa foi selecionada e expandida em 5mL de caldo LB (Tryptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, pH 7,0) em tubo cônico de 50 mL e incubada a 37°C sob agitação a 200 rpm em incubadora de bancada *ES-20 Shaker-incubator Environmental (BioSan)* por 16 horas.

Após incubação, todo o conteúdo do caldo foi inoculado em 50 mL de caldo LB e incubado a 37°C sob agitação até a densidade óptica (DO) entre 0,5 e 0,6 a 600 nm (DO₆₀₀) medida em espectrofotômetro *T70 UV/VIS Spectrometer* (PG Instruments Ltd.). Ao atingir essa DO, o conteúdo foi transferido para um tubo *Falcon* de 50 mL, estéril, previamente imerso em gelo, e centrifugado (4.000 xg a 4°C por 15 minutos). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi ressuspensão gentilmente em 10 mL de Solução R1 (KCl 100 mmol/L, MnCl₄H₂O 50 mmol/L, CaCl₂.2H₂O 10 mmol/L, Glicerol 15% (v/v)). Após um repouso de 15 minutos, a suspensão de células foi novamente centrifugada (4000 xg a 4°C por 12 minutos). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi gentilmente ressuspensão em 2 mL de solução R2 (KCl 10 mmol/L, Na-MOPS 10 mmol/L, CaCl₂.2H₂O 75 mmol/L, Glicerol 15%(v/v)). A suspensão de células competentes foi fracionada em alíquotas de 200 µL que foram armazenadas a -80°C na presença de glicerol.

4.12 Transformação por choque térmico de células quimiocompetentes

As transformações das bactérias competentes foram realizadas por choque térmico de acordo com Sambrook et al. (1989). Primeiramente, as células bacterianas competentes foram retiradas do freezer -80°C e descongeladas em gelo por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado o DNA plasmidial com concentração de 150 ng/µL, aproximadamente, a 100 µL de células competentes. As células foram levadas ao banho-maria a 42°C por 1 minuto e novamente colocadas no gelo por 2 a 3 minutos. Foram adicionados 250 µL do meio de cultura SOC (triptona 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 10 mmol/L, KCl 2,5 mmol/L, MgCl₂ 10 mmol/L, MgSO₄ 10 mmol/L e glicose 20 mmol/L) e feita uma incubação a 37°C por 1 hora sob agitação a 250 rpm em incubadora tipo *shaker*. Todo o conteúdo foi plaqueado em meio de cultura LB sólido

contendo os antibióticos adequados e específicos para a seleção e as placas foram acondicionadas em estufa a 37°C por 16 horas.

4.13 Seleção de colônias transformadas

As colônias de bactérias selecionadas nas placas de LB sólido com antibióticos foram testadas quanto a presença dos plasmídeos recombinantes por meio de PCR. As condições das reações foram as mesmas descritas no item 4.7. Como DNA molde, foi utilizada a própria colônia diluída diretamente na solução de reação.

4.14 Extração de DNA plasmidial

As extrações do DNA plasmidial dos vetores recombinantes, tanto de clonagem quanto de expressão, foram realizadas pelo *AxyPrep™ Plasmid Miniprep Kit* (Axygen Biosciences). Alternativamente, para processos que exigiam quantidades maiores de DNA plasmidial, a extração foi feita empregando-se o kit *QIAfilter Plasmid Midi Kit* (Qiagen), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. As amostras de DNA plasmidial foram quantificadas em espectrofotômetro *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific) a 260 nm.

4.15 Sequenciamento

O sequenciamento dos fragmentos clonados, tanto nos vetores de clonagem quanto nos vetores de expressão, foi feito usando-se o método de terminação de cadeia por dideoxinucleotídeos (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977) no sequenciador automático *MegaBace 1000* (GE Healthcare).

Os *primers* utilizados no sequenciamento dos vetores de clonagem foram o *M13 Forward* (5'- GTA AAA CGA CGC CGC CCA-3') e o *M13 Reverse* (5'- AAC AGC TAT GAC CAT G-3'), enquanto os *primers* usados no sequenciamento dos vetores de expressão foram *PT7 Forward* (5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3') e *PT7 Reverse* (5'- TAG TTA TTG CTC AGC GGT GG -3').

Foi realizada uma reação de PCR utilizando 1 µL de DNA plasmidial juntamente com 3,2 pmol do *primer Forward* e 3,2 pmol do *primer Reverse*, 1,5 µL do tampão da

enzima 10x (Tris 200 mmol/L pH8,4, KCl 500 mmol/L), 0,45 µL de MgCl₂ (50 mmol/L), 0,2 µL da enzima Taq Polimerase (*Invitrogen*) em um volume final de 15 µL. A reação foi amplificada no termociclador a 95°C por 3 minutos e 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 40 segundos, anelamento a 60°C por 40 segundos, extensão a 72°C por 55 segundos e uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

O volume de 1 µL do produto dessa primeira PCR foi utilizado em uma segunda reação. Nesta, foram utilizados 2 µL do Tampão 10x (Tris-HCl 200 mmol/L pH 9,0, MgCl₂ 5 mM), 2µL de *Big Dye* (*Life Technologies*) e 2,5 pmoles de cada oligonucleotídeo M13 e 4 µL de água ultra pura. As amplificações foram feitas em termociclador a 95°C por 1 minuto e 25 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 segundos, anelamento a 51°C por 5 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos. Foi realizada a precipitação do produto de PCR para a eliminação de dNTP e ddNTP não incorporados na reação e enzimas. As amostras foram submetidas à eletroforese capilar no *MegaBace 1000*.

As sequências de DNA são geradas como eletroferogramas e são enviadas a um computador ligado ao *MegaBace 1000*. Esses eletroferogramas foram interpretados pelo software *DNA Sequencing Analyser 4.0* e convertidos em sequências de DNA. As sequências geradas foram analisadas pelo software *Bioedit Sequence Alignment Editor vs7.2.5* (*Hall*) que faz o alinhamento das sequências de nucleotídeos que foram geradas, formando sequências consenso. Em seguida, foram realizadas análises no programa *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool, NCBI*) e no *BLASTX* que analisa a sequência de aminoácidos com a finalidade de procurar e comparar genes e proteínas similares em banco de dados internacionais (*GenBank*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

4.16 Digestão dos plasmídeos e purificação dos fragmentos gênicos

A digestão dos plasmídeos foi realizada para a retirada do fragmento de interesse do vetor de clonagem e para a abertura dos vetores de expressão. As reações de digestão dupla foram preparadas com as enzimas *XhoI* (*Thermo Scientific*) e *NcoI* (*Thermo Scientific*) para os DNAs plasmidiais contendo os fragmentos gênicos codificantes das proteínas do vírus HIV-1. As enzimas *EcoRI* (*Promega*) e *NdeI*

(*Promega*) foram utilizadas na digestão dos DNA plasmidiais recombinados com os genes das proteínas do HTLV-1. As reações foram montadas conforme as instruções dos fabricantes e foram incubadas no termociclador *T100™ Thermal Cycler* (Bio-Rad) por 3 horas a temperatura de 37°C. As enzimas foram inativadas por 20 minutos a temperatura de 65°C ou 20 minutos a temperatura de 80°C, dependendo da enzima. As digestões foram analisadas em eletroforese em gel de agarose.

Os fragmentos correspondentes aos genes das proteínas de interesse foram purificados do gel de agarose 0,5 % empregando-se o *kit Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit* (*GE Helathcare*), segundo as instruções do fabricante.

4.17 Clonagem dos genes das proteínas de interesse nos vetores de expressão

Os vetores de expressão utilizados neste trabalho (pAE, pET20b(+), pET28a(+) e pET32) foram digeridos com as enzimas de restrição específicas para a clonagem dos fragmentos gênicos codificantes das proteínas dos vírus HIV-1 ou HTLV-1, conforme o caso.

Os vetores de expressão digeridos e os fragmentos gênicos das proteínas de interesse purificados foram misturados na proporção aproximada de 10:1 (100 µg inserto/10 µg vetor) com 1 U de enzima T4 DNA ligase (*Invitrogen*) e tampão de ligação 5X (*Invitrogen*). A reação foi realizada em volume final de 20µL, a 16°C por 16 horas.

A reação de ligação foi utilizada para transformar bactérias DH10β que foram utilizadas para propagação e manutenção dos plasmídeos recombinantes. Colônias transformadas foram selecionadas pela resistência ao antibiótico específico de cada vetor. Foi realizada a confirmação da inserção da sequência do gene de interesse por PCR e análise em eletroforese em gel de agarose.

4.18 Seleção de colônias em placa *Deep well*

Foram colocados 1,5 mL de caldo LB acrescido de antibiótico em cada poço da placa *Deep well* de 24 poços juntamente com uma colônia de bactérias de expressão,

individualmente. A placa foi incubada sob agitação a 200 rpm sob temperatura de 30°C por 16 horas. No dia seguinte, 4 µL dessa cultura crescida em cada poço foram colocados em 1,5mL de caldo LB acrescido com os mesmos antibióticos. A placa foi incubada novamente a 200 rpm e 30°C por 3 horas. Após esse período, a cada poço foi adicionado IPTG para uma concentração final de 5 mmol/L e a placa foi deixada sob agitação nas mesmas condições por 16 horas. De cada um dos poços foi retirada uma alíquota de 1 mL que foi analisada em eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) para verificar se houve a produção das proteínas recombinantes. Essa metodologia é empregada para fazer seleção de um número maior de colônias de forma mais rápida.

4.19 Expressão das proteínas recombinantes

Os clones de bactérias de expressão confirmadas por PCR quanto à presença do vetor recombinante foram inoculados em 3 mL de caldo LB com o antibiótico específico e incubadas à 37°C por 16 horas sob agitação a 200 rpm em incubadora *ES-20 Shaker-incubator Environmental*. No dia seguinte, 1mL desse pré-inóculo foi adicionado a 10 mL de caldo LB com antibiótico em tubo cônico de 50 mL estéril e deixado sob agitação constante a 200 rpm e a 37°C. A DO foi medida a 600 nm e, quando atingiu 0,4-0,6, uma alíquota de 1mL da cultura (tempo zero) foi transferida para tubo 1,5 mL e centrifugada a 16.000 xg por 2 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* guardado a -20°C. Após a retirada dessa alíquota, foi adicionado à cultura de bactérias IPTG para uma concentração final de 1 mmol/L para induzir a expressão da proteína recombinante. Foram colhidas amostras de 1 mL em diferentes tempos após a adição de IPTG (30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas e/ou *overnight*) que também foram centrifugadas nas mesmas condições.

Para identificação da expressão da proteína heteróloga, as amostras foram ressuspensas em tampão de amostra para SDS-PAGE (β -mercaptoetanol 2,0%, Tris-HCl pH 6,8 62,5mmol/L, glicerol 10,0%, SDS 2,0%, azul de bromofenol 0,1%).

Para avaliação da solubilidade da proteína recombinante, os *pellets* recolhidos das amostras retiradas em diferentes tempos de indução foram ressuspensos em tampão de lise (KH₂PO₄ 50 mmol/L pH 7,8, NaCl 400 mmol/L, KCl 100mmol/L, glicerol 10%, Imidazol 10 mmol/L, Triton-X100 0,5%), homogeneizados e sonificados. A

sonicação ocorreu em três pulsos de 10 segundos de duração, com intervalo de 10 segundos entre eles, a 50 de amplitude no equipamento *Sonic Dismembrator 150 Digital* (Fisher Scientific). As amostras foram centrifugadas a 16.000 xg por 2 minutos a 4°C e os sobrenadantes (fração de proteínas solúveis) foram separados dos *pellets* (fração de proteínas insolúveis). Ambos foram devidamente identificados e estocados a -20°C. As frações solúveis e insolúveis foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida.

A expressão das proteínas recombinantes também foi realizada em volume maior para os clones de bactérias confirmados como produtores das proteínas de interesse. Essas bactérias foram inoculadas em 10 mL de caldo LB contendo antibiótico e foram incubadas a 37°C por 16 horas sob agitação de 200 rpm. Posteriormente, todo o conteúdo da cultura foi introduzido em 200 mL de caldo LB contendo antibiótico. Essa cultura foi incubada nas mesmas condições anteriores até atingir DO_{600nm} entre 0,4-0,6 quando foi adicionado IPTG para uma concentração final de 1 mmol/L. A cultura foi novamente incubada a 37°C por 6 horas sob agitação de 200 rpm. Após este tempo, a cultura foi centrifugada a 10.000 xg por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi congelado à -20°C.

4.20 Protocolo de extração de proteínas da região periplasmática

Este protocolo de extração de proteínas da região periplasmática foi adaptado do protocolo original descrito em Green e Sambrook (2012) e realizado para a expressão das proteínas recombinantes no pET20b(+). Primeiramente, as bactérias BL21(DE3) foram inoculadas em 50 mL de caldo LB com antibiótico durante toda a noite a 37 °C sob agitação de 200 rpm. No dia seguinte, foi feita a inoculação de 3,5 mL da cultura em 60 mL de caldo LB acrescido de antibiótico e incubado à 37°C até DO_{600nm} de 0,4 a 0,6. O volume de 60 mL da indução foi dividido em 4 alíquotas com 15 mL cada. Como controle da indução, duas alíquotas (Alíquota 1 e Alíquota 3) não foram induzidas por IPTG e foram expandidas durante 2 e 16 horas, respectivamente. A Alíquota 2 e a Alíquota 4 foram induzidas com IPTG a uma concentração final de 0,5 mmol/L e foram incubadas durante 2 e 16 horas, respectivamente. Após os tempos determinados, as amostras foram centrifugadas a 5000 xg por 15 minutos a 4°C. Os *pellets* foram lavados com 8,5 mL de tampão de lise (sacarose 20%; Tris-Cl 30 mmol/L

pH8,0). Foi adicionado EDTA para uma concentração final de 1 mmol/L e deixado a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, as alíquotas foram centrifugadas a 10.000 xg por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspensão em 7,5 mL de tampão de choque osmótico gelado (MgSO₄ 5 mmol/L) e deixado no gelo por 10 minutos. Após o tempo de incubação, as alíquotas foram centrifugadas a 10.000 xg por 10 minutos a 4°C. O *pellet* é composto pelo esferoplasto enquanto o sobrenadante contém as proteínas do periplasma. Foi adicionado 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) para cada 800 µL de sobrenadante e foi deixado no gelo por 30 minutos. Em seguida, essas amostras foram centrifugadas a 16.000 xg por 5 minutos e foi descartado o sobrenadante. O *pellet* foi lavado com 100 µL de acetona pura e as amostras foram novamente centrifugadas 16.000 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* deixado secar. Depois de seco, o *pellet* foi ressuspensão em 50 µL de PBS (NaCl 0,14 mol/L, KCl 2,7 mmol/L, Na₂HPO₄ 8,1 mmol/L, KH₂PO₄ 1,5 mmol/L), agitado no *vortex* e aquecido a 85°C por 3 minutos. Em seguida, as amostras foram estocadas à -20°C até serem analisadas em SDS-PAGE.

4.21 Solubilização dos corpos de inclusão

Para a solubilização das proteínas recombinantes, o sedimento obtido da expressão foi ressuspensão em tampão de ressuspensão (NaCl 50,0 mmol/L, Tris-Cl 50,0 mmol/L, DTT 1mmol/mL, EDTA 0,5 mmol/L, glicerol 5%, pH 8,0). Em seguida, foi adicionado lisozima 20 µg/µL e a mistura incubada em temperatura ambiente por 15 minutos sob agitação. Após essa incubação, foi adicionado um coquetel de inibidores de proteases (PIC, 1 mL para 20 g de sedimento (v/p)) e realizada a sonicação por dez vezes com pulsos de 10 segundos e intervalos de mesmo tempo em banho de gelo. Após a sonicação, foi adicionado Triton-X 100 1% (v/v) e a mistura foi incubada em temperatura ambiente por 15 minutos sob agitação. Em seguida, foi centrifugada a 8.000 xg por 15 minutos a 10°C e o sobrenadante descartado. O sedimento foi lavado com tampão de lavagem (NaCl 50,0 mmol/L, Tris-Cl 50,0 mmol/L, DTT 1mmol/mL, EDTA 0,5 mmol/L, glicerol 5%, Triton X-100 1% pH 8,0) e a amostra centrifugada 8.000 xg por 15 minutos a 10°C. Esse passo de lavagem foi repetido mais 3 vezes. Em seguida, para remoção de resíduos de Triton-X 100, o sedimento

foi ressuspenso novamente em tampão de ressuspensão e centrifugado. Essa última etapa foi repetida por 3 vezes.

O *pellet* foi ressuspenso em tampão de desnaturação (NaCl 50,0 mmol/L, Tris-Cl 50,0 mmol/L, DTT 5 mmol/mL, EDTA 0,5 mmol/L, Glicerol 5%, pH 8,0) para desnaturação dos corpos de inclusão. As amostras foram sonicadas cinco vezes com pulsos de 10 segundos com intervalos de mesmo tempo no gelo entre cada pulso. Em seguida foi adicionado N-Laurilsarcosina (SLS) 30% (v/v) e incubado a temperatura ambiente por 2 horas sob agitação. Essa solução contendo a proteína desnaturada foi congelada à -20°C.

4.22 Eletroforese em gel de poliacrilamida

As amostras da expressão, solubilização e purificação das proteínas de interesse foram ressuspenso em tampão de amostra para SDS-PAGE. Em seguida foram incubadas por 5 minutos a 100°C, aplicadas no gel de poliacrilamida contendo SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) e submetidas à eletroforese.

O gel de empilhamento (Tris-HCl 0,125 M pH 8,6, SDS 0,1%, acrilamida e bis-acrilamida (30-0,8%), TEMED 0,1% e persulfato de amônio 0,1%) foi preparado com 5% de acrilamida e o gel de separação (Tris-HCl 0,56 M pH 8,8, SDS 0,1%, acrilamida e bis-acrilamida (30-0,8%), TEMED 0,1% e persulfato de amônio 0,1%) foi preparado nas concentrações de 15% ou 18% de poliacrilamida, dependendo do tamanho da proteína recombinante.

A eletroforese foi realizada em equipamento *Mini-PROTEAN® Tetra Cell* (Bio-Rad) utilizando tampão de corrida (Tris-Base 25 mmol/L, glicina 250 mmol/L e SDS 0,1%, pH 8,3). A amperagem foi mantida constante em cerca de 20 mA para cada gel por tempo suficiente para separação das frações proteicas.

4.23 Coloração dos géis de poliacrilamida com *Coomassie® Brilliant Blue R 250*

Após a eletroforese, os géis de poliacrilamida foram primeiramente mantidos em solução fixadora (metanol 50% e ácido acético 10%) por 15 minutos. Posteriormente, eles foram corados com solução corante com *Coomassie Blue*

(Coomassie® Brilliant Blue R 250 (BioRad) 0,25%, metanol 50%, ácido acético 10%) por 1h. Em seguida, os géis passaram por uma etapa em solução descolorante (metanol 30%, ácido acético 10%) até apresentarem coloração apenas nas proteínas. A captura das imagens foi realizada pelo equipamento *ChemiDoc™ MP System* (BioRad).

4.24 Purificação da proteína recombinante por Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)

As amostras contendo as proteínas desnaturadas foram submetidas a purificação por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC).

A purificação por IMAC realizada neste trabalho utilizou a coluna *HisTrap™ 1 mL HP* (GE Healthcare) que contém níquel ligado à *Sepharose*. Assim, é possível a purificação das proteínas recombinantes porque elas foram planejadas para serem expressas fusionadas a cauda de seis histidinas (C-Terminal e/ou N-Terminal, dependendo do vetor) que, por sua vez, se ligam à resina devido à sua afinidade pelo níquel. O protocolo de purificação foi realizado conforme estabelecido pelo fabricante.

Simplificadamente, a primeira etapa desse protocolo foi equilibrar a coluna *HisTrap™ 1 mL HP* com tampão de desnaturação ao qual a proteína recombinante estava suspensa. Em seguida, a amostra contendo a proteína recombinante foi introduzida na coluna. Seguiram-se sucessivas lavagens com Tampão de Lavagem 1 (Ureia 8 mol/L, NaH₂PO₄ 100 mmol/L, Tris-Cl 100 mmol/L, Imidazol 50 mmol/L, pH6,3), Tampão de Lavagem 2 (NaH₂PO₄ 50 mmol/L, NaCl 300 mmol/L, Imidazol 100 mmol/L, pH 8,0), Tampão de lavagem 3 (NaH₂PO₄ 50 mmol/L, NaCl 300 mmol/L, Imidazol 50 mmol/L, pH8,0) ou Tampão de Lavagem 4 (NaH₂PO₄ 50 mmol/L, NaCl 300 mmol/L, Imidazol 20 mmol/L, pH8,0). Por fim, foi feita a etapa de eluição da proteína com Tampão de Eluição 1 (NaCl 300 mmol/L, NaH₂PO₄ 50 mmol/L, Imidazol 250 mmol/L, pH8,0) ou Tampão de Eluição 2 (NaCl 300 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, Imidazol 500mM, pH8,0). A combinação dos tampões variou de acordo com a proteína a ser purificada. As amostras com as proteínas purificadas foram submetidas a análise por SDS-PAGE.

4.25 Determinação da concentração de proteína pelo método BCA

A determinação da concentração de proteínas desnaturadas e purificadas foi realizada pelo método BCA (ácido bicinconínico). Foi utilizado o *kit BCA^{TM} Protein Assay* (*Thermo Scientific*), seguindo as recomendações do fabricante. A albumina de soro bovino (BSA) foi utilizada como padrão.

Esse kit realiza detecção da coloração roxa formada devido à quelação de duas moléculas de BCA com um íon cuproso. A estrutura macromolecular da proteína, o número de pontes peptídicas e a presença principalmente de quatro aminoácidos (cisteína, cistina, triptofano e tirosina) são os responsáveis pela formação da cor com BCA. A determinação é realizada pela leitura da absorvância em 562 nm.

4.26 Detecção da proteína recombinante por *Western blot*

Para a detecção e identificação imunológica da proteína recombinante produzida, foram realizados os testes de *Western Blot*. As proteínas separadas por eletroforese em poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*Bio-Rad*). A transferência foi realizada em um sistema de eletrotransferência *Mini Trans-Blot®* (*Bio-Rad*) contendo tampão de transferência (Tris-HCl 0,58% pH 8,4-9,4, metanol 20%, SDS 0,037% e glicina 0,29%). A transferência foi realizada a 350 mA durante 60 minutos.

A membrana de nitrocelulose com as proteínas transferidas foi incubada em TBS-T 1x (Tris-Cl 20 mmol/L, NaCl 500 mmol/L, Tween 20 0,05%) acrescido de 5% de leite em pó desnatado por 2 horas para saturação de sítios de ligação inespecíficos. A membrana bloqueada foi incubada durante toda a noite a 4°C com os anticorpos primários específicos para as proteínas de interesse diluídos conforme Tabela 6. Em seguida, foram realizadas três lavagens consecutivas de 5 minutos cada com a mesma solução de TBS-T sem o leite desnatado. Para a detecção do complexo antígeno-anticorpo, a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina (AP) diluído conforme Tabela 6 em TBS-T acrescido de 5% de leite em pó desnatado. Após a retirada do anticorpo secundário, a membrana foi lavada da mesma forma e foi adicionado a ela o substrato da enzima utilizando-se o

kit Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate (Bio-Rad), de acordo com as instruções do fabricante.

Tabela 6 – Diluição dos anticorpos

Anticorpos	Diluição	Marca
Anti-p19 (<i>Mouse</i>)	1:200	<i>Abcam</i>
Anti-gp21 (<i>Goat</i>)	1:500	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
Anti-p24 HTLV-1 (<i>Mouse</i>)	1:500	<i>Abcam</i>
Anti-gp46 (<i>Mouse</i>)	1:500	<i>Abcam</i>
Anti-p24 HIV-1 (<i>Mouse</i>)	1:400	<i>Abcam</i>
Anti-gp41 (<i>Mouse</i>)	1:500	<i>Abcam</i>
Anti-gp120 (<i>Mouse</i>)	1:500	<i>Abcam</i>
Anti- <i>mouse</i> conjugado com AP	1:2000	<i>Abcam</i>
Anti- <i>goat</i> conjugado com AP	1:2000	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>

4.27 Detecção das proteínas recombinantes pelos soros de indivíduos saudáveis e indivíduos com HIV-1 e HTLV-1

As proteínas recombinantes foram testadas quanto ao seu reconhecimento pelos anticorpos presentes nos soros de indivíduos saudáveis, indivíduos com vírus HIV-1 e indivíduos com HTLV-1. Para isso, o procedimento foi realizado como no item anterior, porém usando-se como anticorpo primário os soros dos indivíduos e como anticorpo secundário o anti-IgG humano conjugado com AP (*Abcam*) diluído de 1:3000.

4.28 Confirmação da identidade da proteína recombinante por espectrometria massas

Para confirmação da identidade das proteínas recombinantes, foi realizada a análise das sequências de aminoácidos por espectrometria de massas realizada nos equipamentos *MALDI-TOF/TOF (Axima Performance, Kratos-Shimadzu)* e *Eletrospray Quadrupole-Time of Flight (Q-TOF-Ultima, Waters)* no Laboratório de

Química de Proteínas do Hemocentro/FMRP em parceria com o Prof. Dr. José Cesar Rosa.

Inicialmente, as proteínas foram separadas por SDS-PAGE e o gel foi incubado por 30 minutos com solução fixadora. Em seguida o gel foi corado com solução corante com *Coomassie Blue* por 16 horas e depois lavado com solução de descorante (Etanol 5%, NaCl 140 mmol/L) 5 vezes de 3 minutos. Em sequência, foram realizadas três lavagens com solução descorante por 15 minutos, 45 minutos e 120 minutos.

As frações proteicas resultantes foram cortadas do gel para digestão com solução de tripsina, lavadas com solução de lavagem (bicarbonato de amônia 1 mol/L pH8,0) e incubadas a temperatura ambiente por 6 horas. No fim desse período, foi trocada a solução de lavagem e incubado a temperatura ambiente por 16 horas, para a remoção do SDS e do corante *Coomassie® Brilliant Blue R 250*. Após esse período, as bandas foram lavadas com acetonitrila 100% e incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e secas em centrífuga a vácuo (*Eppendorf*). As bandas foram rehidratadas com uma solução de tripsina 0,025 µg/µL e após o entumescimento do gel, foi adicionado solução de bicarbonato de amônio 0,1 mol/L e incubado a 37°C por 24 horas. A reação foi interrompida pela adição de ácido fórmico puro e mantida a temperatura ambiente para extração dos peptídeos. As amostras foram conservadas em freezer (-20°C) até o momento da análise por espectrometria de massas.

Os extratos de peptídeos tripsínicos foram misturados à matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico e analisados em espectrômetro de massas *MALDI-TOF/TOF*. Os peptídeos tripsínicos foram também analisados em um espectrômetro de massa do tipo *Eletrospray Quadrupole-Time of Flight*. Os espectros gerados de MS e MS/MS foram coletados em ambos os casos e processados pelo software *Launchpad 2.8* (Kratos-Shimadzu), no caso do *MALDI-TOF/TOF* e pelo software *MassLynx v.4.1* (Waters), em relação ao *Eletrospray Quadrupole-Time of Flight*. A identificação das proteínas foi realizada por submissão dos espectros no formato *mascot generic format* no programa *MASCOT* (www.matrixscience.com) utilizando o banco de dados *nrNCBI*, *SwissProt* e *Micelania*. Somente peptídeos com escore acima de 35 foram considerados para a identificação das proteínas.

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção dos fragmentos gênicos codificante das proteínas p24, gp41 e gp120 do HIV-1 por PCR

Inicialmente, para obtenção dos fragmentos gênicos das proteínas de interesse do HIV-1 (p24, gp41 e gp120) usamos como DNA molde, o DNA genômico extraído de amostra de sangue periférico de pacientes com HIV-1. Entretanto, não conseguimos fazer o isolamento dos genes a partir deste material (dados não mostrados). Como alternativa, os fragmentos gênicos foram amplificados por PCR utilizando como DNA molde para a p24, o DNA plasmidial do vetor pCMVΔR8.91, e para a gp41 e a gp120, o vetor pABT4674. Dessa forma, foi possível amplificar os fragmentos correspondentes aos genes da p24 (HIV-1) de aproximadamente 645 pb, da gp41 de 1037 pb e da gp120 de 1511 pb.

Figura 3 - Produto de PCR dos vetores pCMVΔR8.91 e pABT4674. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed. A) Marcador de peso molecular *GeneRuler 1 Kb DNA Ladder* (*Thermo Scientific*); B) *amplicon* referente ao fragmento gênico da p24 (tamanho esperado: 645 pb); C) *amplicon* referente ao fragmento gênico da gp41 (tamanho esperado: 1037 pb); D) *amplicon* referente ao fragmento gênico da gp120 (tamanho esperado: 1511 pb).

5.2 Clonagem dos fragmentos gênicos codificantes das proteínas p24, gp41 e gp120 do HIV-1 em vetor *pGEM®-T Easy*

Os fragmentos gênicos codificantes das proteínas p24, gp41 e gp120 do vírus HIV-1 foram ligados ao vetor de clonagem *pGEM®-T Easy* e os vetores recombinantes foram utilizados na transformação de bactérias DH10 β . A transformação foi confirmada por PCR e as bactérias foram estocadas a -20°C.

Figura 4 - Produto de PCR de colônias de bactérias DH10 β transformadas com *pGEM®-T Easy* ligado aos fragmentos gênicos da p24, gp41 e gp120 do HIV-1. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com *GelRed*. A) Marcador de peso molecular *GeneRuler 1 Kb DNA Ladder* (*Thermo Scientific*); B), C) e D) *amplicons* referentes ao fragmento codificante da p24 (tamanho esperado: 645 pb); E) marcador de peso molecular *Ladder 100 pb* (*Ludwig Biotec*); F), G) e H) *amplicons* referentes ao fragmento codificante da gp41 (tamanho esperado: 1037 pb); I), J) e K) *amplicons* referentes ao fragmento codificante da gp120 (tamanho esperado: 1511 pb).

5.3 Sequenciamento dos vetores de clonagem recombinantes e análise da tradução dos genes das proteínas de interesse

Os vetores de clonagem *pGEM®-T Easy* e *pCR®2.1TOPO®* contendo os genes das proteínas dos vírus HIV-1 e HTLV-1, respectivamente, foram sequenciados. Após o sequenciamento, foi realizado o alinhamento entre as sequências de DNA obtidas e os respectivos genes depositados nos bancos de dados. Analisando os alinhamentos foi possível notar alguns dissensos entre as sequências. Uma tabela foi organizada mostrando a porcentagem de pares de bases idênticos entre as duas sequências.

Tabela 7 – Porcentagem de identidade entre as sequências gênicas obtidas do sequenciamento e os respectivos genes depositados nos bancos de dados

Proteína	Identidade
p24 HIV-1	99%
gp41	99,9%
gp120	98,3%
p19	99,3%
gp21	98%
p24 HTLV-1	99,5%
gp46	99,4%

Para avaliar se as mudanças no DNA encontradas no gene sequenciado poderiam alterar a sequência de aminoácidos da proteína recombinante, foi realizada a tradução dessas sequências que foi, então, alinhada com a sequência de aminoácidos da proteína.

A tradução da sequência gênica da p24 do vírus HIV-1 mostrou uma identidade de 99% com a proteína p24, apresentando 2 aminoácidos diferentes.

Proteína_p24_HIV_recombinant	MVKVVEEKAFSPEVIPMFSA	SEGATPQDLNTMLNTVGGHQAAMQMLKET
Proteína_p24_HIV	MVKVVEEKAFSPEVIPMFSA	SEGATPQDLNTMLNTVGGHQAAMQMLKET
	*****	*****
Proteína_p24_HIV_recombinant	INEEAAEWDRVHPVHAGPIAPGQMREPRGSDIAGTTSTLQEIQIGWMTNHP	
Proteína_p24_HIV	INEEAAEWDRVHPVHAGPIAPGQMREPRGSDIAGTTSTLQEIQIGWMTNNP	
	*****	*****↑*****
Proteína_p24_HIV_recombinant	PIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEPFRDYVDRFYKTL	
Proteína_p24_HIV	PIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEPFRDYVDRFYKTL	
	*****	*****
Proteína_p24_HIV_recombinant	RAEQASQEVKNWMTETLLVQNANPDCKTILKALGPGATLEEMMTACQGVG	
Proteína_p24_HIV	RAEQASQEVKNWMTETLLVQNANPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVG	
	*****	*****↑*****
Proteína_p24_HIV_recombinant	GPGHKARVL	
Proteína_p24_HIV	GPGHKARVL	
	*****	

Figura 5 - Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da proteína p24 do HIV-1 e da p24 recombinante do HIV-1. * Resíduos totalmente conservados; a seta vermelha indica incompatibilidade entre as sequências de aminoácidos.

O alinhamento da sequência de aminoácidos da gp41 do HIV-1 recombinante, por sua vez, mostrou 100% de identidade com a proteína gp41.

Proteína_gp41	MAVGIGALFLGFLGAAGSTMGAASMTLTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIE
Proteína_gp41_recombinante	MAVGIGALFLGFLGAAGSTMGAASMTLTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIE *****
Proteína_gp41	AQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQQLGIWGC SGKLICTTAVPW
Proteína_gp41_recombinante	AQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQQLGIWGC SGKLICTTAVPW *****
Proteína_gp41	NASWSNKSLEQIWNMTWMEWDREINNYTSLIHSLEESQNQQEKNEQEL
Proteína_gp41_recombinante	NASWSNKSLEQIWNMTWMEWDREINNYTSLIHSLEESQNQQEKNEQEL *****
Proteína_gp41	LELDKWASLWNWFNITNWLWYIKLFIMIVGGLVGLRIVFAVLSVVRVRQ
Proteína_gp41_recombinante	LELDKWASLWNWFNITNWLWYIKLFIMIVGGLVGLRIVFAVLSVVRVRQ *****
Proteína_gp41	GYSPLSFQTHLPIPRGPDRPEGIEEGGERDRDRSIRLVNGSLALIWDDL
Proteína_gp41_recombinante	GYSPLSFQTHLPIPRGPDRPEGIEEGGERDRDRSIRLVNGSLALIWDDL *****
Proteína_gp41	RSLCLFSYHRLRDLIIIIVTRIVELLGRRGWEALKYWNLLQYWSQELKNS
Proteína_gp41_recombinante	RSLCLFSYHRLRDLIIIIVTRIVELLGRRGWEALKYWNLLQYWSQELKNS *****
Proteína_gp41	AVSLLNATAI AEAEGTDRVIEVVQGA YRAIRHIPRRIRQ
Proteína_gp41_recombinante	AVSLLNATAI AEAEGTDRVIEVVQGA YRAIRHIPRRIRQ *****

Figura 6 - Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da proteína gp41 do HIV-1 e da gp41 recombinante do HIV-1. * Resíduos totalmente conservados.

A tradução do gene da gp120 do HIV-1 recombinante mostrou que, apesar da similaridade de 98,3%, as mutações foram capazes de gerar muitas alterações de aminoácidos e formação de *stop codon*.

```
MRVKEKYQHLWRWGWRWGTMLLGMLMICSATEKLWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKA
YDTEVHNVWATHACVPTDPNPQEVVLNVVTENFNMWKNDMVEQMHEDIISLWDQSLKPCV
KLTPLCVSLKCTDLKNDTNTNSSSGRMIMEEMERYRTALSISAQA-EVRCRKNMHFFINL
I-YQ-IMILPAIR-QVVT PQSLHRPVQRYPLSQFPYIIVPRLVLRN-NVIIRRSMEQDHV
QMSAQYNVHMELGQ-YQLNCC-MAV-QKKR--LDLPISQTMLKP--YS-TNL-KLIVQDP
TTIQEKVSVSREDQGEHLLQ-EK-EI-DKHIVTLVEQNGITL-NR-IAN-ENNLEIIQP-
SLSSPQEGT-KIG-RTVLIVEGNFSTVIQHNCLIVLGLIVLGLVKGQITLKEVTQSPSHA
E-NKL-TCGRK-EKQC MPLPSVGKLDVHQILQGCY-QEMVVIATMSPRSSDLEEEI-GTI
GEVNYINIK--KLNHRSSSTH
```

Figura 7 – Sequência de aminoácidos obtida através da tradução do gene da gp120 recombinante. Cinza: Sequência de aminoácidos a partir da 5'-3' Frame 1+; – stop codon.

O alinhamento dos aminoácidos da p19 do HTLV-1 recombinante, por sua vez, mostrou 97,8% de identidade com a proteína p19. Assim, 2 aminoácidos não foram semelhantes com a sequência molde.

Proteína_p19_recombinante	MGQIFSRASPIPRPPRGLAAHHWLNFLQAAYRLEPGPSSYDFHQLKKFL
Proteína_p19	MGQIFSRASPIPRPPRGLAAHHWLNFLQAAYRLEPGPSSYDFHQLKKFL
	*****
Proteína_p19_recombinante	KIALETPVWICPINYSLLASLLPKGYPGRVNEILHILIQT
Proteína_p19	KIALETPARICPINYSLLASLLPKGYPGRVNEILHILIQT
	*****↑*****

Figura 8 - Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da proteína p19 do HTLV-1 e da p19 recombinante. * Resíduos totalmente conservados; a seta vermelha indica incompatibilidade entre as sequências de aminoácidos.

A tradução da sequência gênica da gp21 do HTLV-1 recombinante mostrou que as mutações apresentadas no seu gene foram capazes de gerar 5 mudanças de aminoácidos, dentre elas 1 *stop codon*. A presença desse *stop codon* leva a produção de uma proteína truncada de 13 kDa.

Proteína_gp21	MGAGVAGGITGSMASLASGKSLLEHVDKDISQLTQAIVKNHKNLLKIAQYA
Proteína_gp21_recombinante	MGAGVAGGITGSMASLASGKSLLEHVDKDISQLTQAIVKNHKNLLKIAQYA
	*****
Proteína_gp21	AQNRRGLDLLFWEQGGCKALQEQCRRFPNITNSHVPILQERPPLENRVLT
Proteína_gp21_recombinante	AQNRRGLDLLFWEQGGCKALQECCFLNITNSHVSILQERPPLENRVLT
	*****↑↑*****↑*****
Proteína_gp21	GWGLNWDGLSQWAREALQTGITLVALLLVILAGPCILRQLRHLPSRVR
Proteína_gp21_recombinante	GWGLN-DLGLSQWAREALQTGITLVALLLVMLAGPCILRQLRHLPSRVR
	*****↑*****↑*****
Proteína_gp21	YPHYSLIKPESSL
Proteína_gp21_recombinante	YPHYSLIKPESSL
	*****

Figura 9 - Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da proteína gp21 do HTLV-1 e da gp21 recombinante. * Resíduos totalmente conservados; a seta vermelha indica incompatibilidade entre as sequências de aminoácidos; a seta verde indica formação de *stop codon*.

O alinhamento dos aminoácidos da p24 do HTLV-1 recombinante, por sua vez, mostrou 99,5% de identidade com a proteína p24. Assim, apenas 1 aminoácido não foi semelhante entre as duas sequências.

Proteína_p24_HTLV_recombinan	MKDLQAIKQEVSAAPGSPQFMQTIRLAVQQFDPTAKDLQDLLQYLCSSL
Proteína_p24_HTLV-1	MKDLQAIKQEVSAAPGSPQFMQTIRLAVQQFDPTAKDLQDLLQYLCSSL
	*****
Proteína_p24_HTLV_recombinan	VASLHHQQLDSLISEAETRITSYNPLAGPLRVQANNPQQQLRREYQQL
Proteína_p24_HTLV-1	VASLHHQQLDSLISEAETRITGYNPLAGPLRVQANNPQQQLRREYQQL
	*****↑*****
Proteína_p24_HTLV_recombinan	WLAFAALPGSAKDPASWASILQGLEEYPYHAFVERLNIALDNLPEGTPKD
Proteína_p24_HTLV-1	WLAFAALPGSAKDPASWASILQGLEEYPYHAFVERLNIALDNLPEGTPKD
	*****
Proteína_p24_HTLV_recombinan	PILRLAYSANKECQKLLQARGHTNSPLGDMRLACQWTWPKDKTK
Proteína_p24_HTLV-1	PILRLAYSANKECQKLLQARGHTNSPLGDMRLACQWTWPKDKTK
	*****

Figura 10 - Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da proteína p19 do HTLV-1 e da p19 recombinante. *Resíduos totalmente conservados; a seta vermelha indica incompatibilidade entre as sequências de aminoácidos.

A tradução da sequência gênica da gp46 do vírus HTLV-1 mostrou uma identidade de 99% com a proteína gp46, porém houve a formação de um *stop codon* em substituição ao último aminoácido. Dessa forma, a proteína a ser produzida teria um tamanho de aproximadamente 12 kDa.

Proteína_gp46_recombinante	MVDAPGYDPIWFLNTEPSQLPPTAPPLLPHSNLDHILEPSIPWKSLLTL
Proteína_gp46	MVDAPGYDPIWFLNTEPSQLPPTAPPLLPHSNLDHILEPSIPWKSLLTL
	*****
Proteína_gp46_recombinante	VQLTLQSTNYTCIVCIDRASLSTWHVLYSPNVSPSSSTPLLYPSLALP
Proteína_gp46	VQLTLQSTNYTCIVCIDRASLSTWHVLYSPNVSPSSSTPLLYPSLALP
	*****
Proteína_gp46_recombinante	APHLTLPFNWTCH-
Proteína_gp46	APHLTLPFNWTCHF
	*****↑

Figura 11 - Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da proteína gp46 do HTLV-1 e da gp46 recombinante. * Resíduos totalmente conservados; a seta verde indica formação de *stop codon*.

A Tabela 8 apresenta resumidamente alguns aspectos referentes às proteínas recombinantes. A tabela expõe quantos aminoácidos não foram idênticos entre as sequências de aminoácidos das proteínas de interesse em comparação às proteínas recombinantes, além da identidade (em porcentagem) entre elas. Também é mostrado se houve ou não a formação de *stop codon* e o tamanho aproximado da proteína que seria obtida a partir dessas sequências de aminoácidos.

Tabela 8 – Aspectos das proteínas recombinantes

Proteína	Aminoácidos diferentes	Identidade	Stop codon	Tamanho da proteína
p24 HIV-1	2	99%	Não	23 kDa
gp41	0	100%	Não	37 kDa
gp120	331	33,3%	Sim	18 kDa
p19	2	97,8%	Não	10 kDa
gp21	5	64,8%	Sim	13 kDa
p24 HTLV-1	1	99,5%	Não	21 kDa
gp46	1	99%	Sim	12 kDa

5.4 Digestão e purificação dos fragmentos gênicos das proteínas de interesse

Os DNA plasmidiais dos vetores *pGEM® -T Easy* e *pCR®2.1TOPO®* recombinantes foram extraídos e digeridos. Os insertos correspondentes aos fragmentos gênicos codificantes das proteínas de interesse foram purificados. As Figuras 12 e 13 mostram imagens de géis de agarose com o DNA plasmidial, o DNA digerido e o fragmento gênico purificado das proteínas p24, gp41 e gp120 do HIV-1 e p19, gp21, p24 e gp46 do HTLV-1, respectivamente.

Figura 12 – Imagem mostrando a digestão e a purificação dos fragmentos gênicos das proteínas p24, gp41 e gp120 do vírus HIV-1. Gel de agarose 1% corado com *GelRed*. A) marcador de peso molecular *Ladder 100 pb* (*Ludwig Biotec*); E) e I) marcador de peso molecular *GeneRuler 1 Kb DNA Ladder* (*Thermo Scientific*); B), F) e J) DNA plasmidiais do *pGEM® -T Easy* recombinante; C), G) e K) produtos das digestões dos DNA plasmidiais; D) fragmento do gene da p24 do HIV-1 purificado (tamanho esperado: 645pb); H) fragmento do gene da gp41 purificado (tamanho esperado: 1037pb); L) fragmento do gene da gp120 purificado (tamanho esperado: 1511pb).

Figura 13 – Imagem mostrando a digestão e a purificação dos fragmentos gênicos das proteínas p19, gp21, p24 e gp46 do vírus HTLV-1. Gel de agarose 1% corado com *GelRed*. A), E), I) e M) Marcador de peso molecular *Ladder 100 pb* (*Ludwig Biotec*); B), F), J) e N) DNA plasmidiais do *pCR®2.1TOPO®* recombinante; C), G), K) e O) produtos das digestões dos DNA plasmidiais; D) fragmento do gene da p19 purificado (tamanho esperado: 288 pb); H) fragmento do gene da gp21 purificado (tamanho esperado: 501 pb); L) fragmento do gene da p24 purificado (tamanho esperado: 600 pb); P) fragmento do gene da gp46 purificado (tamanho esperado: 355 pb).

5.5 Clonagem e expressão no vetor pAE

5.5.1 Clonagem dos fragmentos gênicos das proteínas p19, gp21, p24 e gp46 do HTLV-1 no vetor de expressão pAE

Os fragmentos gênicos purificados das proteínas p19, gp21, p24 e gp46 do vírus HTLV-1 foram clonados no vetor de expressão pAE que foi, então, inserido em bactérias DH10 β , conforme metodologia já descrita. As bactérias DH10 β foram testadas por PCR quanto a presença do inserto (dados não mostrados) e aquelas confirmadamente contendo os genes de interesse foram expandidas clonalmente para extração de DNA plasmidial. O DNA plasmidial do vetor pAE recombinante foi extraído e utilizado na transformação de bactérias da linhagem BL21(DE3)plysS. As colônias recombinantes selecionadas por meio de ampicilina (50 μ g/ μ L) e cloranfenicol (34 μ g/mL), presentes na placa de cultura, foram testadas quanto a presença dos genes das proteínas de interesse por PCR. Os *amplicons* dessas reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, como pode visualizado na Figura 14.

Figura 14 - Produto de PCR de colônias de BL21(DE3)plysS contendo os fragmentos gênicos codificantes das proteínas p19, gp21, p24 e gp46 clonados no vetor pAE. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com Gel/Red. A) Marcador de peso molecular *Ladder 100 pb* (Ludwig Biotec); B) *amplicon* referente ao gene da p19 (tamanho esperado: 288 pb); C) *amplicon* referente ao gene da gp21 (tamanho esperado: 501 pb); D) *amplicon* referente ao gene da p24 (tamanho esperado: 600 pb); E) *amplicon* referente ao gene da gp46 (tamanho esperado: 355 pb).

Dessa forma, foi confirmado que essas colônias de bactérias BL21(DE3)plysS continham o vetor de expressão pAE recombinado com os genes das proteínas de interesse.

5.5.2 Expressão das proteínas p19, gp21, p24 e gp46 do HTLV-1 no vetor pAE em BL21(DE3)plysS

As bactérias BL21(DE3)plysS confirmadas quanto à presença do vetor pAE recombinante foram testadas quanto à expressão das proteínas heterólogas. Na indução da expressão em pequena escala dessas bactérias, foram retiradas alíquotas de 1mL antes da indução e 6 horas após a indução com IPTG 1 mmol/L. As alíquotas foram ressuspensas em tampão de SDS-PAGE e aplicadas em gel de poliacrilamida 18%. As proteínas p19, gp21, p24 e gp46 produzidas no vetor pAE apresentariam tamanhos de, aproximadamente, 11 kDa, 13 kDa, 22 kDa e 12 kDa, respectivamente. A Figura 15 mostra que não houve expressão de nenhuma das proteínas de interesse.

Figura 15 - Gel de poliacrilamida 18% com as amostras do extrato proteico das bactérias BL21(DE3)plysS transformadas com o vetor pAE recombinante. A) Marcador de massa molecular *Kaleidoscope™ Prestained Standards* (BioRad); em seguida são apresentadas as amostras de antes da indução (T₀) e 6 horas após a indução com IPTG (6_h) para cada uma das proteínas de interesse. Massa molecular esperada: p19 - 11 kDa, gp21 - 13 kDa, p24 - 22 kDa e gp46 - 12 kDa.

5.6 Clonagem e expressão no vetor pET20b(+)

5.6.1 Clonagem dos fragmentos gênicos das proteínas de interesse no vetor de expressão pET20b(+)

Os fragmentos gênicos codificantes das proteínas p24, gp41 e gp120 do vírus HIV-1 e da p19, gp21, p24 e gp46 do vírus HTLV-1 purificados foram, posteriormente, clonados no vetor de expressão pET20b(+).

Os DNA plasmidiais dos vetores pET20b(+) recombinantes foram sequenciados. Após o sequenciamento, foi realizado o alinhamento entre as sequências de DNA obtidas e as respectivas sequências gênicas depositadas nos bancos de dados. O alinhamento mostrou resultados iguais aos apresentados no alinhamento entre as sequências gênicas do sequenciamento no *pGEM®-T Easy* ou *pCR®2.1TOPO*, conforme Tabela 7.

Assim, a soma das massas moleculares das sequências de aminoácidos das proteínas de interesse, juntamente com a calda de seis histidinas e a sequência *pelB* do vetor pET20b(+), deveria levar à expressão das proteínas de interesse, cujos tamanhos estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9 – Tamanho calculado das proteínas recombinantes expressas no vetor pET20b(+)

Proteína	Tamanho da proteína
p24 HIV-1	26 kDa
gp41	40 kDa
gp120	18 kDa
p19	12 kDa
gp21	13 kDa
p24 HTLV-1	23 kDa
gp46	12 kDa

5.6.2 Expressão das proteínas recombinantes clonadas no vetor pET20b(+) em BL21(DE3)plysS

O DNA plasmidial do vetor pET20b(+) recombinante confirmado no sequenciamento, foi utilizado na transformação de bactérias BL21(DE3)plysS. As

colônias que cresceram em placa LB sólido com ampicilina (50 µg/µL) foram testadas por PCR quanto à presença do inserto (Figura 16). Após a confirmação, as colônias selecionadas foram induzidas à expressão.

Figura 16 - Produto de PCR de colônia de BL21(DE3)plysS contendo os fragmento gênicos codificante das proteínas de interesse no vetor pET20b(+). Eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed. A) e H) Marcador de peso molecular *Ladder 100 pb* (Ludwig Biotec); B), C) e D) *amplicons* referentes ao gene da p19 (tamanho esperado: 288pb); E), F) e G) *amplicons* referentes ao gene da gp46 (tamanho esperado: 355pb); I), J) e K) *amplicons* referentes ao gene da gp21 (tamanho esperado: 501pb); L), M e N) *amplicons* referentes ao gene da p24 (tamanho esperado: 600pb).

Primeiramente, foi feita uma expressão em pequena escala (10 mL) e foram obtidas alíquotas de antes da indução e após 6 horas de indução com IPTG 1 mmol/L. Para identificação das expressões das proteínas heterólogas, as amostras foram ressuspensas em tampão de amostra para SDS-PAGE e corridas em eletroforese. No entanto, nenhuma colônia induzida apresentou aumento de expressão de proteínas de tamanho esperado (dados não mostrados).

5.6.3 Expressão das proteínas recombinantes no vetor pET20b(+) em BL21(DE3)

Mediante o insucesso na expressão proteica nas bactérias BL21(DE3)plysS, o vetor recombinante pET20b(+) foi usado na transformação de bactérias BL21(DE3). As colônias de bactérias BL21(DE3) foram confirmadas quanto a presença do vetor pET20b(+) recombinante por PCR de colônia.

Figura 17 - Produto de PCR de colônia de BL21(DE3) contendo o fragmento gênico codificante das proteínas p24, gp41 e gp120 do HIV-1 no vetor pET20b(+). Eletroforese em gel de agarose 1% corado com *GelRed*. A) Marcador de peso molecular *Ladder 100 pb* (*Ludwig Biotec*); B) *amplicon* referente ao gene da p24 (HIV-1) (tamanho esperado: 645pb); C) e E) marcador de peso molecular *GeneRuler 1 Kb DNA Ladder* (*Thermo Scientific*); D) *amplicon* referente ao gene da gp41 (tamanho esperado: 1037pb); F) *amplicon* referente ao gene da gp120 (tamanho esperado: 1511pb).

Figura 18 - Produto de PCR de colônia de BL21(DE3) contendo o fragmento gênico codificante das proteínas p19, gp21, p24 e gp46 do HTLV-1 no vetor pET20b(+). Eletroforese em gel de agarose 1% corado com *GelRed*. A) C) E) e G) Marcador de peso molecular *Ladder 100 pb* (*Ludwig Biotec*); B) *amplicon* referente ao gene da p19 (tamanho esperado: 288pb); D) *amplicon* referente ao gene da gp21 (tamanho esperado: 501pb); F) *amplicon* referente ao gene da p24 (tamanho esperado: 600pb); H) *amplicon* referente ao gene da gp46 (tamanho esperado: 355pb).

As colônias de BL21(DE3) recombinantes foram induzidas à expressão das proteínas de interesse em pequena escala (10 mL). Foram retiradas uma alíquota de 1mL de cultura antes da indução e outra de mesmo volume após 6 horas de indução. As amostras foram ressuspensas em tampão de amostra para SDS-PAGE e aplicadas em gel de poliacrilamida.

Figura 19 – Extrato proteico das bactérias BL21(DE3) transformadas com o pET20b(+) recombinante contendo os genes das proteínas p24, gp41 e gp120 do vírus HIV-1. Gel de poliacrilamida 18% para p24 e de 15% para gp41 e gp120. A), B) e C) Marcador de massa molecular *Dual Color* (BioRad); em seguida são mostradas as amostras de antes da indução (T_0) e 6 horas após a indução com IPTG (6_h) para cada uma das proteínas de interesse. Massa molecular esperada: p24 - 26 kDa, gp41 - 40 kDa e gp120 - 18 kDa.

Figura 20 – Extrato proteico das bactérias BL21(DE3) transformadas com o pET20b(+) recombinante contendo os genes das proteínas p19, gp21, p24 e gp46 do vírus HTLV-1. Gel de poliacrilamida 18%. A), B), C) e D) Marcador de massa molecular *Dual Color* (BioRad); em seguida são mostradas as amostras de antes da indução (T₀) e 6 horas após a indução com IPTG (6_h) para cada uma das proteínas de interesse. Massa molecular esperada: p19 - 12 kDa, gp21 - 13 kDa, p24 - 23 kDa e gp46 - 12 kDa.

A partir das Figuras 19 e 20 é possível notar que as bactérias BL21(DE3) contendo o vetor pET20b(+) recombinante não foram capazes de produzir as proteínas heterólogas. Como alternativa, foi realizado um protocolo para extração de proteínas da região periplasmática, uma vez que esse vetor contém a sequência *pelB* que direcionaria as proteínas produzidas para essa região. O protocolo de extração foi feito segundo apresentado em Green e Sambrook (2012). Mas, da mesma forma, nenhum aumento de expressão proteica foi notado (dados não apresentados).

5.7 Clonagem e expressão no vetor pET28a(+)

5.7.1 Clonagem dos fragmentos gênicos das proteínas de interesse no vetor de expressão pET28a(+)

Os fragmentos gênicos purificados foram clonados no vetor pET28a(+) nas mesmas condições já descritas. O vetor pET28a(+) recombinante foi usado na transformação, primeiramente, de bactérias DH10 β . As colônias confirmadas quanto à presença do inserto no vetor, foram amplificadas clonalmente para extração de DNA plasmidial. Esse DNA foi, então, sequenciado e usado na transformação de células bacterianas BL21(DE3) para expressão.

Após o sequenciamento, foi realizado o alinhamento entre as sequências de DNA obtidas e as respectivas sequências gênicas depositadas nos bancos de dados. O alinhamento mostrou resultados iguais aos apresentados no alinhamento entre as sequências gênicas obtidas no sequenciamento do *pGEM®-T Easy* ou *pCR®2.1 TOPO* recombinante, conforme Tabela 7.

Assim, a soma das massas moleculares das sequências de aminoácidos das proteínas de interesse, juntamente com a calda de seis histidinas do vetor pET28a(+), deveria levar à expressão das proteínas de interesse, cujos tamanhos estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10 – Tamanho esperado das proteínas recombinantes expressas no vetor pET20b(+)

Proteína	Tamanho da proteína
p24 HIV-1	24 kDa
gp41	38 kDa
gp120	18 kDa
p19	14 kDa
gp21	13 kDa
p24 HTLV-1	25 kDa
gp46	14 kDa

5.7.2 Expressão das proteínas recombinantes no vetor pET28a(+) em BL21(DE3)

Após a confirmação por sequenciamento que os fragmentos gênicos estavam clonados no vetor pET28a(+), as colônias de BL21(DE3) foram transformadas com esses vetores recombinantes. Para a verificação da inserção desses vetores, foi realizada uma PCR de colônia e o *amplicon* foi visualizado em gel de agarose 1%.

Figura 21 - Produto de PCR de colônia de BL21(DE3) contendo o fragmento gênico codificante das proteínas p24, gp41 e gp120 do HIV-1 no vetor pET28a(+). Eletroforese em gel de agarose 1% corado com *GelRed*. A) Marcador de peso molecular *Ladder 100 pb* (*Ludwig Biotec*); B) *amplicon* referente ao gene da p24 (HIV-1) (tamanho esperado: 645 pb); C) e E) marcador de peso molecular *GeneRuler 1 Kb DNA Ladder* (*Thermo Scientific*); D) *amplicon* referente ao gene da gp41 (tamanho esperado: 1037pb); F) *amplicon* referente ao gene da gp120 (tamanho esperado: 1511pb).

Figura 22 - Produto de PCR de colônia de BL21(DE3) contendo o fragmento gênico codificante das proteínas p19, gp21, p24 e gp46 do HTLV-1 no vetor pET20b(+). Eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed. A) C) E) G) Marcador de peso molecular *Ladder 100 pb* (Ludwig Biotec); B) *amplicon* referente ao gene da p19 (tamanho esperado: 288pb); D) *amplicon* referente ao gene da gp21 (tamanho esperado: 501pb); F) *amplicon* referente ao gene da p24 (tamanho esperado: 600pb); H) *amplicon* referente ao gene da gp46 (tamanho esperado: 355pb).

Como pôde ser notado nas Figuras 21 e 22, as colônias de BL21(DE3) apresentaram o fragmento gênico codificante das proteínas de interesse. Essas colônias escolhidas foram, então, induzidas à expressão das proteínas recombinantes. Para visualização da expressão das proteínas expressas, foram retiradas alíquotas antes da indução, 2 horas e 6 horas após adição de IPTG para uma concentração final de 1 mmol/L. Essas alíquotas foram ressuspensas em tampão de amostra para SDS-PAGE e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida.

Figura 23 – Extrato proteico das bactérias BL21(DE3) transformadas com o pET28a(+) recombinante contendo os genes das proteínas p24, gp41 e gp120 do vírus HIV-1. Gel de poliacrilamida 18% para p24 e de 15% para gp41 e gp120. A), B) e C) Marcador de massa molecular *Dual Color* (BioRad); em seguida são mostradas as amostras de antes da indução (T_0), 2 horas (2h) e 6 horas (6h) após a indução com IPTG, para cada uma das proteínas de interesse. Massa molecular esperada: p24 - 24 kDa, gp41 - 38 kDa e gp120 - 18 kDa.

Figura 24 – Extrato proteico das bactérias BL21(DE3) transformadas com o pET28a(+) recombinante contendo os genes das proteínas p19, gp21, p24 e gp46 do vírus HTLV-1. Gel de poliácridamida 18%. A), B), C) e D) Marcador de massa molecular *Dual Color* (BioRad); em seguida são mostradas as amostras de antes da indução (T₀), 2 horas (2_h) e 6 horas (6_h) após a indução com IPTG, para cada uma das proteínas de interesse. Massa molecular esperada: p19 – 14 kDa, gp21 – 13 kDa, p24 - 25 kDa e gp46 - 14 kDa. As setas indicam as proteínas de interesse que foram produzidas.

Através das figuras é possível notar que as bactérias BL21(DE3) com o vetor pET28a(+) recombinante não foram capazes de produzir as proteínas recombinantes p19 do HTLV-1 e p24, gp41 e gp120 do HIV-1. Mesmo não exibindo um aumento de expressão visível em gel de poliácridamida corado com *Coomassie Blue*, essas amostras foram testadas por *Western Blot* utilizando anticorpos específicos e nenhuma marcação pôde ser visualizada na membrana (dados não mostrados).

No entanto, essas bactérias expressaram uma proteína de tamanho semelhante ao esperado para p24 do vírus HTLV-1 (25 kDa). Foi identificado também um aumento de expressão significativa de uma proteína de aproximadamente 13 kDa correspondente a gp21 produzida até o *stop codon*. Além disso, é notado um aumento de expressão de uma proteína de aproximadamente 14 kDa, correspondente a gp46 produzida até onde foi formado o *stop codon*.

Para confirmar a identidade dessas proteínas, foi realizado um *Western Blot* com os anticorpos primários específicos para cada uma delas. De acordo com a Figura 25, no *Western Blot* utilizando um anticorpo anti-gp21 do vírus HTLV-1 ocorreram marcações para a proteína gp21 de mesmo tamanho daquela identificada em SDS-PAGE de 13 kDa, além de outra marcação de aproximadamente 25 kDa. Com relação ao *Western Blot* realizado com anti-p24 do vírus HTLV-1, foram identificadas marcações de 25 kDa e de 50 kDa, aproximadamente. Entretanto, o *Western Blot* realizado para identificação da gp46 não apresentou nenhuma marcação na membrana.

Figura 25 – *Western Blot* utilizando anticorpo anti-gp21 e anti-p24 HTLV-1. As setas indicam as marcações específicas.

Após confirmada a expressão das proteínas gp21, p24 e gp46 do vírus HTLV - 1 e escolhido o tempo de 6 horas após indução com IPTG, foi realizado um teste para avaliar a solubilidade dessas proteínas. Para o teste, foram retiradas alíquotas antes

da indução e 6 horas após a indução com IPTG à 37°C. O teste de solubilidade fornece duas frações, a fração solúvel, onde são encontradas proteínas que se solubilizaram e a fração insolúvel, que são agregados proteicos formando os corpos de inclusão. A Figura 26 apresenta as eletroforeses em gel de poliácridamida com as frações solúveis e insolúveis do teste de solubilidade das proteínas recombinantes.

Figura 26 – Teste de solubilidade da expressão proteica das bactérias BL21(DE3) transformadas com o pET28a(+) recombinante contendo os genes das proteínas gp21, p24 e gp46 do vírus HTLV-1. Gel de poliácridamida 18%. A), B) e C) Marcador de massa molecular *Dual Color* (BioRad); em seguida são mostradas as amostras de antes da indução (T₀) e 6 horas (6_h) após a indução com IPTG com as respectivas frações solúveis (S) e insolúveis (I), para cada uma das proteínas de interesse. Massa molecular esperada: gp21 – 13 kDa, p24 - 25 kDa e gp46 - 14 kDa. As setas indicam as proteínas de interesse que estão presentes na fração insolúvel.

5.8 Clonagem do fragmento gênico da gp120 do HIV-1 amplificado por DNA polimerase de alta fidelidade em *pGEM® -T Easy* e em pET32a(+)

Em razão da grande quantidade de mutações no gene da gp120, que culminaram em várias substituições de aminoácidos, e da sua não expressão, foi feita novamente a clonagem em *pGEM® -T Easy* utilizando a enzima DNA polimerase de alta fidelidade *Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen). O *amplicon* obtido da reação de PCR foi clonado no *pGEM® -T Easy* e utilizado na transformação de bactérias DH10β. A Figura 27 mostra o produto de PCR de colônias de DH10β em gel de agarose, confirmando que essas bactérias foram transformadas com o vetor recombinante.

Figura 27 - Produto de PCR de uma colônia de DH10 β contendo o fragmento gênico codificante da gp120 no vetor *pGEM®-T Easy*. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com *GelRed*. A) Marcador de peso molecular *GeneRuler 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific)*; B) *amplicon* referente ao gene da gp120 (tamanho esperado: 1511pb).

As bactérias DH10 β confirmadas quanto à presença do vetor *pGEM®-T Easy* recombinante foram amplificadas clonalmente para obtenção do DNA plasmidial. Este DNA plasmidial, por sua vez, foi sequenciado e submetido ao alinhamento entre sua sequência de DNA e o gene da gp120 depositado nos bancos de dados. Analisando o alinhamento foi possível notar que houve 99,9% de identidade entre as sequências gênicas.

Para avaliar se a proteína gp120 a ser produzida teria alterações na sua sequência de aminoácidos, foi realizada a tradução do seu gene. A sequência de aminoácidos obtida foi alinhada como a sequência de aminoácidos dessa proteína depositada em banco de dados e o alinhamento mostrou 100% de identidade com a proteína gp120.

Proteína_gp120_M15654.1	MAVGIGALFLGFLGAAGSTMGAASMTLTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIE
Proteína_gp120_pET28_platinu	MAVGIGALFLGFLGAAGSTMGAASMTLTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIE
	*****
Proteína_gp120_M15654.1	AQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPW
Proteína_gp120_pET28_platinu	AQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPW
	*****
Proteína_gp120_M15654.1	NASWSNKSLEQIWNMTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQEL
Proteína_gp120_pET28_platinu	NASWSNKSLEQIWNMTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQEL
	*****
Proteína_gp120_M15654.1	LELDKWASLWNWFNITNWLWYIKLFIMIVGGLVGLRIVFAVLSVNVNRVQ
Proteína_gp120_pET28_platinu	LELDKWASLWNWFNITNWLWYIKLFIMIVGGLVGLRIVFAVLSVNVNRVQ
	*****
Proteína_gp120_M15654.1	GYSPLSFQTHLPIPRGPDREGEIEEGGERDRDRSIRLVNGSLALIWDDL
Proteína_gp120_pET28_platinu	GYSPLSFQTHLPIPRGPDREGEIEEGGERDRDRSIRLVNGSLALIWDDL
	*****
Proteína_gp120_M15654.1	RSLCLFSYHRLRDLILLIVTRIVELLGRRGWEALKYWNLLQYWSQELKNS
Proteína_gp120_pET28_platinu	RSLCLFSYHRLRDLILLIVTRIVELLGRRGWEALKYWNLLQYWSQELKNS
	*****
Proteína_gp120_M15654.1	AVSLLNATAIIVAEGTDRVIEVVQAYRAIRHIPRIRQ
Proteína_gp120_pET28_platinu	AVSLLNATAIIVAEGTDRVIEVVQAYRAIRHIPRIRQ
	*****

Figura 28 - Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da proteína gp120 do HIV-1 e da gp120 recombinante. * Resíduos totalmente conservados.

Com a confirmação da presença do inserto no vetor de clonagem *pGEM® -T Easy*, o DNA plasmidial do vetor recombinante foi submetido à dupla digestão com as enzimas de restrição *XhoI* e *NcoI* para isolamento do inserto. Como pode ser visto na Figura 29, o DNA plasmidial do *pGEM® -T Easy*, quando digerido, apresentou a liberação de um fragmento gênico correspondente ao gene da gp120 com o tamanho esperado de 1511 pb. Esse fragmento foi, então, purificado.

Figura 29 - Imagem mostrando a digestão e purificação do fragmento gênico da proteína gp120. Gel de agarose 1% corado com *GelRed*. A) Marcador de peso molecular *GeneRuler 1 Kb DNA Ladder* (*Thermo Scientific*); B) DNA plasmidial do *pGEM® -T Easy* ligado ao gene da gp120; C) produto da digestão do DNA plasmidial *pGEM® -T Easy* ligado ao gene da gp120 com *XhoI* e *NcoI*; D) fragmento do gene da gp120 purificado (tamanho esperado: 1511pb).

O fragmento codificante da gp120 purificado foi utilizado na clonagem em vetor de expressão pET32a(+) que foi, por sua vez, usado na transformação de bactérias DH10 β . Todas as colônias que cresceram na placa foram testadas quanto à presença do vetor recombinante com o gene da gp120 por meio de PCR, porém nenhuma apresentou amplificação referente ao fragmento codificante dessa proteína (dados não mostrados).

5.9 Transformação de Rosetta(DE3) e BL21-CondonPlus com pET28_p19 do HTLV-1 e pET28_p24 do HIV-1 e seleção de colônias em placa *Deep well*

Como pôde ser notado no sequenciamento dos fragmentos gênicos da p24 do HIV-1 e da p19 do HTLV-1 clonados no vetor pET28a(+), ocorreram poucas mutações nos genes. Essas substituições de bases poderiam causar alteração de dois aminoácidos, tanto na sequência da p24 quanto da p19, mantendo uma identidade de 99% e 97,8%, respectivamente. Mediante este fato e a não expressão das proteínas, esses vetores recombinantes foram utilizados na transformação de outras linhagens bacterianas de expressão.

Foi realizado um estudo de códons raros para avaliar se os genes codificantes das proteínas de interesse continham códons que são raros em BL21(DE3), o que dificultaria a produção das proteínas recombinantes. O gene da p24 do HIV-1 e o gene da p19 apresentam 10,1% e 11% dos seus códons, respectivamente, como sendo códons raros para BL21(DE3).

Dessa forma, bactérias Rosetta(DE3) e BL21-CodonPlus, que apresentam os genes que codificam os tRNAs para os códons raros, foram transformadas com o vetor pET28a(+) ligado ao fragmento codificante das proteínas p19 e p24 HIV-1, denominados, neste caso, de pET28_p19 e pET28_p24. As colônias que se desenvolveram passaram por uma seleção em placa de *Deep well* de 24 poços, conforme metodologia já descrita. As Figuras 30 e 31 apresentam géis de poliacrilamida com o extrato proteico de quatro colônias de Rosetta(DE3) e outras quatro de BL21-CodonPlus para cada uma das proteínas.

Figura 30 – Extrato proteico das bactérias Rosetta(DE3) e BL21-CodonPlus transformadas com pET28a(+)-recombinante contendo o gene da proteína p19 do vírus HTLV-1. Gel de poliacrilamida 18%. A) e F) Marcador de massa molecular *Dual Color* (BioRad); B), C), D) e E) alíquotas do extrato proteico de quatro colônias de Rosetta(DE3); G), H), I) e J) alíquotas do extrato proteico de quatro colônias de BL21-CodonPlus. Tamanho esperado da proteína p19:14 kDa.

Figura 31 – Extrato proteico das bactérias Rosetta(DE3) e BL21-CodonPlus transformadas com o pET28a(+) recombinante contendo o gene da proteína p24 do vírus HIV-1. Gel de poliacrilamida 18%. A) e F) Marcador de massa molecular *Dual Color* (BioRad); B), C), D) e E) alíquotas do extrato proteico de quatro colônias de Rosetta(DE3); G), H), I) e J) alíquotas do extrato proteico de quatro colônias de BL21-CodonPlus. Tamanho esperado da proteína p24: 24 kDa.

Conforme pode ser visto nas figuras acima, tanto as bactérias Rosetta (DE3) quanto as BL21-CodonPlus transformadas com o pET28a(+) com o gene da p19 inserido não foram capazes de expressar a proteína p19. Mesmo diante desse fato, foi realizado um *Western Blot* com anticorpo anti-p19, mas nenhuma marcação foi identificada (dados não mostrados).

Através da observação da Figura 31 é possível notar a expressão de uma proteína de, aproximadamente, 23 kDa que poderia ser a p24 do vírus HIV-1. Para averiguar essa hipótese, foi realizado um *Western Blot* com anticorpo anti-p24, porém nenhuma marcação pôde ser visualizada (dados não mostrados).

Esta fração proteica de 23 kDa foi recortada e analisada por espectrometria de massas. O resultado da espectrometria mostrou que essa não se tratava da p24 do vírus HIV-1 e sim de uma isomerase.

5.10 Clonagem dos fragmentos gênicos da p24 do HIV-1 e p19 do HTLV-1 em pET32a(+)

Em razão do insucesso da expressão das proteínas p24 do HIV-1 e da p19 do HTLV-1, cujos genes se encontravam clonados no vetor pET28a(+), foi realizada a clonagem dos mesmos fragmentos gênicos no vetor pET32a(+).

O gene purificado da p24 foi ligado ao vetor pET32a(+) digerido com as enzimas de restrição *XhoI* e *NcoI*, assim como o fragmento gênico purificado da p19 foi ligado ao pET32a(+) digerido com as enzimas *EcoRI* e *NdeI*. Os vetores recombinantes foram usados na transformação de bactérias DH10 β que, por sua vez, foram testadas por PCR quanto à presença do inserto (Figura 32).

Figura 32 - Produto de PCR de colônia de DH10 β contendo o fragmento gênico codificante das proteínas de interesse no vetor pET32a(+). Eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed. A) e E) Marcador de peso molecular *Ladder 100 pb* (Ludwig Biotec); B), C) e D) amplificação do gene da p19 (tamanho do *amplicon* esperado: 288pb); F), G) e H) amplificação do gene da p24 (tamanho do *amplicon* esperado: 645pb).

Como pode ser verificado na imagem acima, três colônias transformadas com o vetor pET32a(+) recombinante apresentaram a presença do inserto do gene da p19 e da p24. Uma colônia de DH10 β transformada com o vetor recombinante de cada uma das proteínas foi expandida clonalmente para estoque e para extração do DNA plasmidial. Esse DNA plasmidial foi sequenciado e, após o sequenciamento, foi realizado o alinhamento entre as sequências de DNA obtidas e as respectivas sequências gênicas depositadas nos bancos de dados.

O sequenciamento do vetor pET32a(+)_p19 mostrou que o vetor não se ligou ao fragmento gênico da p19. O sequenciamento apresentou apenas nucleotídeos que

se correlacionaram no banco de dados *BLAST* a vetores de expressão (dados não mostrados).

O sequenciamento do vetor pET32a(+)_p24 confirmou a presença do inserto da p24 do HIV-1 e o alinhamento entre as sequências manteve uma identidade de 98,5%. A tradução dessa sequência leva a formação de uma proteína com 99% dos aminoácidos semelhantes aos da proteína p24. Dessa forma, essa sequência de aminoácidos, juntamente com a *tag* de tioredoxina, o sítio de trombina e a calda de seis histidinas do vetor pET32a(+), deveria levar à expressão de uma proteína de aproximadamente 41 kDa.

O DNA plasmidial, cujo sequenciamento confirmou que o gene da p24 do HIV-1 estava clonado no vetor pET32a(+), foi utilizado na transformação de bactérias BL21(DE3). Foi realizada uma PCR com as bactérias BL21(DE3) para confirmar que houve a transformação pelo vetor recombinante.

Figura 33 - Produto de PCR de colônia de BL21(DE3) contendo o fragmento gênico codificante da proteína p24 do HIV-1 no vetor pET32a(+). Eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed. A) Marcador de peso molecular *GeneRuler 1 Kb DNA Ladder* (*Thermo Scientific*); B), C), D) e E) amplificações referentes ao gene da p24 (tamanho esperado: 645 pb).

Essas quatro colônias de BL21(DE3), confirmadas quanto a presença do inserto no vetor pET32a(+) recombinante, foram induzidas a expressar a proteína heteróloga com IPTG para a concentração final de 1 mmol/L. Foram retiradas alíquotas antes da indução, 2 horas e 6 horas após a indução.

Figura 34 – Extrato proteico das bactérias BL21(DE3) transformadas com o pET32a(+) recombinante contendo o gene da p24 do vírus HIV-1. Gel de poliacrilamida 18%. A) e B) Marcador de massa molecular *Kaleidoscope™ Prestained Standards* (BioRad). Foram retiradas alíquotas antes da indução (T₀), duas horas (2_h) e 6 horas após a indução com IPTG (6_h) para as quatro colônias identificadas como Col1, Col2, Col3 e Col4.

Como pode ser visualizado na Figura 34, não houve aumento de expressão de nenhuma proteína do tamanho esperado. Apesar disso, foi realizado um *Western Blot* utilizando anticorpo específico anti-p24 do vírus HIV-1, mas nenhuma marcação foi visualizada (dados não mostrados).

5.11 Expressão das proteínas recombinantes gp21, p24 e gp46 do vírus HTLV-1

A expressão das proteínas recombinantes gp21, p24 e gp46 do vírus HTLV-1 foi feita em bactérias BL21(DE3) confirmadamente transformadas com o vetor pET28-a(+) recombinante num volume de 200 mL.

5.12 Solubilização das proteínas recombinantes gp21, p24 e gp46 do vírus HTLV-1 formadas em corpos de inclusão

Os sedimentos obtidos através da indução da expressão das proteínas gp21, p24 e gp46 do vírus HTLV-1 foram utilizados para o preparo dos corpos de inclusão. Durante todo o processo foram retiradas alíquotas das lavagens para serem submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida.

As soluções contendo as proteínas desnaturadas foram submetidas à análise por SDS-PAGE e destinadas à purificação. As Figuras 35, 36 e 37 mostram as amostras do protocolo para solubilização dos corpos de inclusão das proteínas gp21, p24 e gp46 analisadas por SDS-PAGE.

Figura 35 - Solubilização da proteína recombinante gp21 dos corpos de inclusão. Eletroforese em gel de poliacrilamida 18%. A) Marcador de massa molecular *Kaleidoscope™ Prestained Standards* (BioRad); B) corpos de inclusão em tampão de ressuspensão; C) corpos de inclusão após a primeira lavagem; D) corpos de inclusão após a segunda lavagem; E) corpos de inclusão após a terceira lavagem; F) corpos de inclusão após a primeira ressuspensão para remoção do detergente; G) corpos de inclusão após a terceira ressuspensão para remoção do detergente; H) corpos de inclusão desnaturados. Tamanho esperado da proteína gp21: 13 kDa.

Figura 36 - Solubilização da proteína recombinante p24 dos corpos de inclusão. Eletroforese em gel de poliacrilamida 18%. A) Marcador de massa molecular *Kaleidoscope™ Prestained Standards* (BioRad); B) corpos de inclusão em tampão de ressuspensão; C) corpos de inclusão após a primeira lavagem; D) corpos de inclusão após a segunda lavagem; E) corpos de inclusão após a terceira ressuspensão para remoção do detergente; F) corpos de inclusão desnaturados. Tamanho esperado da proteína p24: 25 kDa.

Figura 37 - Solubilização da proteína recombinante gp46 dos corpos de inclusão. Eletroforese em gel de poliacrilamida 18%. A) Marcador de massa molecular *Kaleidoscope™ Prestained Standards* (BioRad); B) corpos de inclusão em tampão de ressuspensão; C) corpos de inclusão após a primeira lavagem; D) corpos de inclusão após a segunda lavagem; E) corpos de inclusão após a terceira lavagem; F) corpos de inclusão após a primeira ressuspensão para remoção do detergente; G) corpos de inclusão após a segunda ressuspensão para remoção do detergente; H) corpos de inclusão desnaturados. Tamanho esperado da proteína gp46: 14 kDa.

5.13 Purificação das proteínas recombinantes gp21, p24 e gp46 do vírus HTLV-1 em IMAC

As amostras contendo as proteínas desnaturadas, conforme o protocolo de solubilização dos corpos de inclusão, foram submetidas a purificação por IMAC usando-se a coluna *HisTrap™ 1 mL HP*. Para uma purificação mais eficaz, foram utilizados diferentes tampões para cada uma das três proteínas desnaturadas (gp21, p24 e gp46).

Para a gp21 do vírus HTLV-1, a coluna foi equilibrada com o tampão de desnaturação (o mesmo em que a amostra estava diluída). A amostra desnaturada da gp21 foi aplicada e, posteriormente, o Tampão de Lavagem 1 foi introduzido por uma única vez. Em seguida, foram feitas lavagens, porém dessa vez com o Tampão de Lavagem 2. Foi realizada uma primeira tentativa de eluição da amostra utilizando o Tampão de Eluição 1, que contém 250 mmol/L de imidazol, porém este tampão foi incapaz de desligar a proteína da coluna. Foi utilizado, então, o Tampão de Eluição 2, com 500 mmol/L de imidazol, que foi eficiente na eluição da amostra da coluna *HisTrap™*. Alíquotas de cada efluente da coluna foram retiradas para visualização em SDS-PAGE. Na indicação F da Figura 38, é possível notar que foi feita a eluição da proteína gp21 com o tamanho esperado de 13 kDa e de outra proteína de 25 kDa e poucas impurezas.

Figura 38- Purificação da proteína recombinante gp21 por IMAC. Eletroforese em gel de poliacrilamida 18%. A) Marcador de massa molecular *Kaleidoscope™ Prestained Standards* (BioRad); B) efluente da amostra; C) efluente do Tampão de Lavagem 1; D) efluente do Tampão

de Lavagem 2; E) efluente do Tampão de Eluição 1; F), G), H) e I) efluente do Tampão de Eluição 2. Tamanho esperado da proteína gp21: 13 kDa.

A purificação da p24 do HTLV-1 foi realizada da seguinte forma: a coluna foi equilibrada com o tampão de desnaturação e, em seguida, foi introduzida a amostra da p24 desnaturada. O Tampão de Lavagem 1 foi passado pela coluna duas vezes seguido por mais uma lavagem com Tampão de Lavagem 3. A eluição da amostra foi feita utilizando o Tampão de Eluição 1, que mostrou ser capaz de desligar a proteína da coluna. Foi também passado pela coluna, o Tampão de Eluição 2, para averiguar se ele seria mais eficiente na eluição da amostra da coluna *HisTrap*^{TM}. Como pode ser visualizado na Figura 39, a amostra foi desligada da coluna juntamente com mais algumas impurezas. A figura também mostra que além da proteína p24, foi eluída uma proteína de aproximadamente 50 kDa. Alíquotas de cada efluente da coluna foram retiradas para visualização em SDS-PAGE.

Figura 39 - Purificação da proteína recombinante p24 do HTLV-1 por IMAC. Eletroforese em gel de poliacrilamida 18%. A) Marcador de massa molecular *Kaleidoscope*^{TM} *Prestained Standards* (BioRad); B) efluente da amostra; C) efluente do Tampão de Lavagem 1; D) efluente do Tampão de Lavagem 3; E), F), G) e H) efluente do Tampão de Eluição 1; I) e J) efluente do Tampão de Eluição 2. Tamanho esperado da proteína p24: 25 kDa.

Com relação à purificação da gp46 do HTLV-1, diferentes estratégias foram testadas, mas não foi possível purificá-la de forma eficiente em coluna *HisTrap*^{TM}. A Figura 40 é um exemplo de tentativa de purificação. Neste caso, foi usado o tampão de desnaturação seguido pela amostra da gp46 desnaturada, que parece ter passado

pela coluna sem se ligar. A primeira etapa de lavagem foi realizada com o Tampão de Lavagem 1 e a etapa posterior com o Tampão de Lavagem 4. Por fim, foi realizada uma primeira tentativa de eluição da amostra utilizando o Tampão de Eluição 1 seguida pela utilização do Tampão de Eluição 2. Nenhum dos dois tampões eluíram a amostra da coluna *HisTrap™* talvez pela ineficiência da ligação entre a gp46 e a coluna.

Figura 40 - Purificação da proteína recombinante gp46 por IMAC. Eletroforese em gel de poliácridamida 18%. A) Marcador de massa molecular *Kaleidoscope™ Prestained Standards* (BioRad); B) efluente da amostra; C) efluente do Tampão de Lavagem 1; D) efluente do Tampão de Lavagem 4; E) e F) efluente do Tampão de Eluição 1; G), H), I) e J) Efluente do Tampão de Eluição 2. Tamanho esperado da proteína gp46: 14 kDa.

5.1 Imunodeteção das proteínas recombinantes pelos soros de indivíduos saudáveis e indivíduos com HIV-1 e HTLV-1

As proteínas gp21 e p24 do HTLV-1 purificadas e a gp46 do HTLV-1 desnaturada tiveram suas concentrações determinadas através do kit *BCA™ Protein Assay*. Após a determinação das suas concentrações, foram utilizados cerca de 8 µg/µL de proteína das amostras de gp21 e p24 purificadas e 16 µg/µL de proteína da amostra da gp46 desnaturada para realização de cada um dos testes com soros.

As proteínas gp21, p24 e gp46 quando testadas quanto ao reconhecimento pelos soros de indivíduos saudáveis e de indivíduos com o vírus HIV-1, não apresentaram nenhuma marcação na membrana. Mostrando que não houve reações

cruzadas entre os anticorpos presentes nos soros desses indivíduos e as proteínas produzidas.

Figura 41 – Imunodetecção das proteínas recombinantes pelos soros de indivíduos saudáveis e infectados pelos vírus HIV-1. Da esquerda para direita: gel de poliacrilamida 18% corado com *Coomassie Blue* mostrando as frações proteicas referentes as proteínas gp21 e p24 purificadas e a gp46 desnaturada. Em seguida, membranas de nitrocelulose (contendo as mesmas proteínas) que foram incubadas com *pool* de soros de indivíduos saudáveis e com *pool* soros de indivíduos com HIV-1 e não mostraram nenhuma marcação.

As proteínas gp21, p24 e gp46 quando testadas quanto ao reconhecimento pelos soros de indivíduos com HTLV-1 (Soro de Indivíduo 1 e Soro de Indivíduo 2), mostraram considerável marcação na membrana de nitrocelulose, como pode ser verificado na Figura 42.

Figura 42 - Imunodeteção das proteínas recombinantes pelos soros de indivíduos infectados pelo vírus HTLV-1. Da esquerda para direita: gel de poliacrilamida 18% corado com *Coomassie Blue* mostrando as frações proteicas referentes as proteínas gp21 e p24 purificadas e a gp46 desnaturada. Em seguida, membranas de nitrocelulose (contendo as mesmas proteínas) que foram incubadas com soros de indivíduos com HTLV-1 (Indivíduo 1) e (Indivíduo 2) e mostraram marcação correspondente as proteínas gp21, p24 e gp46.

5.2 Espectrometria de massas das proteínas recombinantes gp21, p24 e gp46 do HTLV-1

Para confirmação da identidade das proteínas gp21, p24 e gp46 recombinantes, as proteínas indicadas com a marcação vermelha foram excisadas do gel e submetidas a espectrometria de massas por *MALDI- TOF/TOF* e *Eletrospray Quadrupole-Time of Flight*. A amostra referente à gp21 teve dois fragmentos submetidos à espectrometria de massas: gp21-1 de 13 kDa e gp21-2 de aproximadamente 25 kDa. A amostra correspondente à p24 teve dois fragmentos enviados para análise: p24-1 de 25 kDa e p24-2 de aproximadamente 50 kDa. Por fim, a amostra referente à gp46 teve o fragmento de 14 kDa submetido à espectrometria de massas (Figura 43).

Figura 43 - Gel de poliacrilamida 18% corado com *Coomassie Blue* mostrando as frações proteicas das proteínas gp21 e p24 purificadas e a gp46 desnaturada que foram excisadas e submetidas à espectrometria de massas. Fragmentos submetidos à espectrometria de massas: gp21-1 (13 kDa), gp21-2 (25 kDa), p24-1 (25 kDa), p24 (50 kDa) e gp46 (14 kDa).

Essas proteínas foram digeridas com tripsina e os peptídeos gerados foram analisados nos equipamentos *MALDI- TOF/TOF* e *Eletrospray Quadrupole-Time of Flight* do Centro de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. As Figuras 44, 45, 46 e 47 são os relatórios provenientes da ferramenta de busca *MASCOT* (www.matrixscience.com) utilizando o banco de dados *nrNCBI*, *SwissProt* e *Micelania*. Nas imagens são mostradas as sequências dos peptídeos que foram formados e sua correlação com a proteína do banco de dados, a porcentagem de cobertura e informações sobre o número de *score*, massa e carga. O *score* respeitado para análise dos peptídeos foi de no mínimo 35.

Os dois fragmentos proteicos gp21-1 e gp21-2 foram confirmados como sendo a proteína gp21. No caso da gp21-1, a pesquisa dos peptídeos tripsínicos nos bancos de dados *Micelania* e *nrNCBI* mostrou que houve a cobertura de 23% e 27% da proteína gp21 e de uma glicoproteína de envelope, respectivamente. Organizando os resultados de ambos, foi possível observar que houve a cobertura de 62,8% da sequência de aminoácidos da gp21, uma vez que ela foi produzida até o *stop codon* (Figura 44). Além disso, os *scores* apresentados foram de 365 e 186, confirmando a identidade da gp21.

Figura 44 - Resultado da análise por espectrometria de massas *Eletrospray Quadrupole-Time of Flight* da proteína gp21-1 de 13 kDa. Marcação em azul: sequência de aminoácidos da gp21; Texto em vermelho: peptídeos que corresponderam à gp21; – Stop codon.

Em relação à gp21-2, a pesquisa dos peptídeos obtidos por *MALDI- TOF/TOF* e *Eletrospray Quadrupole-Time of Flight* e analisados no banco de dados *Micelania* mostrou que houve a cobertura de 17% e 23% da proteína gp21, respectivamente. A junção dos dois resultados mostrou que houve a cobertura de 47,7% da sequência de aminoácidos da gp21, considerando que ela foi produzida até o *stop codon*. Os scores obtidos foram de 179 e 62.

Gp21 - 2 (25 kDa)	
MASCOT Search Results Protein View: Gp21 Gp21 Database: MICELANIA Score: 179 Nominal mass (M_r): 18024 Calculated pI: 9.55 Sequence similarity is available as an NCBI BLAST search of Gp21 Search parameters MS data file: Automatically uploaded data Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P. Variable modifications: Oxidation (M) Protein sequence coverage: 17% Matched peptides shown in bold red. 1 MGAGVAGGIT GSM~~SLASGKS~~ LLHEVDKDIS QLTQAIVK~~NH~~ K~~NLL~~KIAQYA 51 AQNR~~R~~GLDLL FWEQGG~~LCKA~~ LQEQCRFPNI TNSHVPILQE RPPLENRVLT 101 GWGLNWDLGL SQWAREALQT GITLVALLLL VILAGPCILR QLRHLP~~SRVR~~ 151 YPHYSLIKPE SSL	MASCOT Search Results Protein View: Gp21 Gp21 Database: MICELANIA Score: 62 Nominal mass (M_r): 18024 Calculated pI: 9.55 Sequence similarity is available as an NCBI BLAST search of Gp21 Search parameters MS data file: 2015-ELISA-FCFRP-GP21-2.pk1 Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P. Variable modifications: Oxidation (M) Protein sequence coverage: 23% Matched peptides shown in bold red. 1 MGAGVAGGIT GSM~~SLASGKS~~ LLHEVDKDIS QLTQAIVK~~NH~~ K~~NLL~~KIAQYA 51 AQNR~~R~~GLDLL FWEQGG~~LCKA~~ LQEQCRFPNI TNSHVPILQE RPPLENRVLT 101 GWGLNWDLGL SQWAREALQT GITLVALLLL VILAGPCILR QLRHLP~~SRVR~~ 151 YPHYSLIKPE SSL
MGAGVAGGITGSM~~SLASGKS~~LLHEVDKDISQLTQAIVK~~NH~~K~~NLL~~KIAQYAAQNRRGLDLLFWEQGGGLCKALQECCFL NITNSHVSILQERPPLENRVLTGWGLN- DLGLSQWAREALQTGITLVALLLLVILAGPCILRQLRHLP~~SRVR~~YPHYSLIKPESSL	

Figura 45 - Resultado da análise por espectrometria de massas MALDI- TOF/TOF e Eletrospray Quadrupole-Time of Flight da proteína gp21-2 de 25 kDa. Marcação em azul: sequência de aminoácidos da gp21; Texto em vermelho: peptídeos que corresponderam à gp21; – Stop codon.

Os dois fragmentos proteicos p24-1 e p24-2 foram confirmados como sendo a proteína p24. Em relação à p24-1, a pesquisa dos peptídeos gerados por MALDI-TOF/TOF e Eletrospray Quadrupole-Time of Flight e analisados no banco de dados SwissProt mostrou que houve a cobertura de 17% da proteína p24 em ambos os casos. Organizando os resultados de ambos, foi possível observar que houve a cobertura de 43,9% da sequência de aminoácidos da p24. Além disso, os valores dos scores foram de 310 e 275.

Figura 46 - Resultado da análise por espectrometria de massas MALDI- TOF/TOF e Eletrospray Quadrupole-Time of Flight da proteína p24-1 de 25 kDa. Marcação em azul: sequência de aminoácidos da p24 do HTLV-1; Texto em vermelho: peptídeos que corresponderam à p24 do HTLV-1.

O fragmento proteico p24-2, por sua vez, teve suas sequências de peptídeos analisadas nos bancos de dados *Micelania* e *SwissProt*. Esta análise mostrou que houve a cobertura de 14% e 13% da proteína p24, respectivamente. A junção dos dois resultados mostrou que houve a cobertura de 29% da sequência de aminoácidos da p24 do vírus HTLV-1. Os valores dos scores obtidos das análises dos peptídeos obtidos por *MALDI- TOF/TOF* e *Eletrospray Quadrupole-Time of Flight* foram de 185 e de 252, respectivamente.

Figura 47 - Resultado da análise por espectrometria de massas MALDI- TOF/TOF e Eletrospray Quadrupole-Time of Flight da proteína p24-2 de 50 kDa. Marcação em azul: sequência de aminoácidos da p24 do HTLV-1; Texto em vermelho: peptídeos que corresponderam à p24 do HTLV-1.

O fragmento proteico correspondente à gp46 de 14 kDa teve suas sequências de peptídeos obtidas tanto por *MALDI- TOF/TOF* quanto por *Eletrospray Quadrupole-Time of Flight* analisadas nos bancos de dados *Micelania*, *SwissProt* e *nrNCBI*. Porém nenhuma correlação entre os peptídeos formados e a proteína gp46 foi encontrada. No entanto, foi observado que a digestão da sequência de aminoácidos da gp46 por tripsina gerava três fragmentos com massa acima de 2500 Da e um peptídeo com massa aproximada de 234 Da que não são identificados por esses equipamentos (Figura 48).

Digestão da gp46 com tripsina	
mass	peptide sequence
5035.5491	ASLSTWHVLYSPNVSPSSS STPLLYPSLALPAPHLTLPF NWITHCF
4943.5116	MVDAPGYDPIWFLNTEPSQL PPTAPPLLPHSNLDHILEPS IPWK
2510.3357	LLTLVQLTLQSTNYTCIVCI DR
234.1448	SK

Figura 48 – Análise da digestão da gp46 por tripsina mostrando os peptídeos formados e suas respectivas massas moleculares.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi proposta a produção das proteínas estruturais p24, gp41 e gp120 do vírus HIV-1 e das proteínas p19, gp21, p24 e gp46 do vírus HTLV-1. Essas proteínas foram escolhidas pela importância que têm na replicação viral, na relação com o sistema imune e porque os primeiros anticorpos produzidos e encontrados durante a infecção são direcionados à elas. Portanto, essas proteínas são importantes na avaliação do diagnóstico e a maioria dos kits de diagnóstico comercializados empregam essas proteínas como antígenos de captura (MANNS et al., 1991; QIU et al., 2008; VRIELINK et al., 1999; VRIELINK; REESINK, 2004).

O sistema de expressão escolhido para a produção das proteínas p24, gp41 e gp120 do vírus HIV-1 e das proteínas p19, gp21, p24 e gp46 do vírus HTLV-1 foi o procarioto. Apesar de outros sistemas utilizados para produção de proteínas heterólogas, a expressão em bactérias *E. coli* se mostra a mais atrativa pela facilidade da cultura dessas bactérias e sua rápida taxa de crescimento, pelos seus substratos que são baratos, pelo bom rendimento de produção e por ser bem caracterizada geneticamente (BANEYX, 1999).

Para obtenção dos fragmentos dos genes das proteínas de interesse do HIV-1 (p24, gp41 e gp120) usamos como DNA molde, o DNA extraído de amostras de sangue periférico de indivíduos com HIV-1. Entretanto, não foi possível fazer o isolamento dos genes a partir deste material. As dificuldades em relação à amplificação dos fragmentos gênicos utilizando o material genético de pacientes com HIV-1 pode ser devido às mutações do provírus e/ou ao uso de medicamentos retrovirais da terapia antirretroviral altamente ativa (HAART). O vírus HIV-1 é um vírus instável que sofre mutações com muita facilidade gerando formas virais recombinantes cujos DNA se encontram modificados (McCUTCHAN, 2000; PEETERS; SHARP, 2000). A grande variabilidade genética do vírus HIV-1 é devida a vários mecanismos, dentre eles: as pressões de seleção feitas pelo sistema imune do próprio hospedeiro, a falta de uma atividade corretiva da transcriptase reversa, gerando mutações, e a recombinação entre duas estirpes de vírus replicantes dentro de uma única célula num determinado indivíduo (BLACKARD et al., 2002; ROBERTSON et al., 1995; ROBERTSON et al., 2000). Assim, talvez esse DNA com mutações não tenha permitido a ligação dos *primers* e, conseqüentemente, não tenha ocorrido a amplificação do gene das proteínas de interesse. Além disso, a HAART

promove a supressão viral e, conseqüentemente, uma baixa carga viral (COHEN et al., 2008). Não tínhamos disponibilidade de pacientes sem tratamento ou de casos novos como era nossa intenção no início do projeto. O Hospital das Clínicas da FMRP é um hospital terciário de maior complexidade e os pacientes que chegam ao ambulatório já estão em tratamento, muitas vezes por um longo período.

Objetivando a obtenção das sequências de interesse dos genes das proteínas do HIV-1 (p24, gp41 e gp120), foram utilizados dois vetores como DNA molde na PCR. Um dos vetores utilizados foi o vetor pCMVΔR8.91 que contém na sua estrutura o gene *gag*, para a obtenção da sequência gênica da p24. O outro vetor é o pAbT4674, que contém o gene *env* para a obtenção das sequências da gp41 e da gp120. Dessa forma, através da otimização e padronização da PCR, foi possível amplificar os fragmentos correspondentes aos genes da p24 (HIV-1) de aproximadamente 645 pb, da gp41 de 1037 pb e da gp120 de 1511 pb. Essas sequências foram clonadas no vetor intermediário *pGEM® -T Easy*. Os fragmentos referentes aos genes do HTLV-1 (p19, gp21, p24 e gp46) já estavam clonados no vetor *pCR®2.1TOPO®*.

O sequenciamento dos vetores *pCR®2.1TOPO®* e *pGEM® -T Easy* recombinantes foi realizado mostrando que houve a clonagem dos fragmentos gênicos codificantes das proteínas de interesse. O alinhamento entre as sequências de DNA obtidas no sequenciamento dos vetores *pCR®2.1TOPO®* e *pGEM® -T Easy* recombinantes e os respectivos genes depositados nos bancos de dados mostrou grande similaridade genética entre elas, com identidade superior à 98%. As mutações apresentadas podem ter ocorrido porque, para a amplificação dos genes, foi utilizada a enzima Taq DNA polimerase comum. Essa enzima tem a desvantagem de ter uma fidelidade relativamente baixa devido à ausência de um mecanismo de revisão e correção (DUNNING; TALMUD; HUMPHRIES, 1988; ECKERT; KUNKEL, 1991). Além disso, as amplificações dos genes das proteínas do HTLV-1 usaram como DNA molde amostras de indivíduos com o vírus. O HTLV-1, assim como outros retrovírus, está sujeito a mutações no seu DNA, mesmo que em menores proporções, devido à ação da transcriptase reversa que é uma enzima que também promove altas taxas de erros (PRESTON; DOUGHERTY, 1996).

Para avaliar se as mudanças encontradas no gene sequenciado poderiam alterar as sequências de aminoácidos das proteínas recombinantes, foram realizadas as traduções dessas sequências que foram, então, alinhadas com as sequências de

aminoácidos das proteínas. Os alinhamentos mostraram que todas as proteínas a serem produzidas tinham identidade acima de 97,8% com as proteínas de interesse. Com exceção das proteínas gp120 do vírus HIV-1 e da gp21 e gp46 do vírus HTLV-1 recombinantes que apresentaram alterações de aminoácidos e formação de *stop codon* e, portanto, uma menor identidade. No caso da gp21 e da gp46, essas substituições de aminoácidos não prejudicariam o reconhecimento da proteína pelo seu anticorpo, uma vez que os principais epítomos foram preservados. Vale salientar que não seria necessária uma identidade de 100% entre as sequências de aminoácidos, mas sim que essas proteínas recombinantes, apesar de alguns aminoácidos trocados, serem reconhecidas especificamente por soros de indivíduos com os vírus.

Os fragmentos gênicos codificantes das proteínas do vírus HTLV-1 foram clonados de forma bem sucedida no vetor pAE, o primeiro vetor de expressão utilizado neste trabalho. Esse vetor foi construído para permitir a fusão da proteína a ser produzida com uma *tag* de seis histidinas, facilitando a purificação por cromatografia de afinidade a níquel (RAMOS et al., 2004). O vetor pAE recombinante foi utilizado na transformação de bactérias da linhagem BL21(DE3)plysS para expressão das proteínas heterólogas. Essa linhagem bacteriana contém um plasmídeo que codifica a T7 lisozima que inibe a T7 polimerase até que sua expressão seja induzida, controlando os níveis de expressão basal (GOPAL; KUMAR, 2013). Porém, não foi observado nenhum aumento de expressão das proteínas de interesse. Apenas a expressão de uma proteína de aproximadamente 24 kDa que pode ser visualizada na amostra de 6 horas após a indução. Porém, essa proteína foi visualizada em todas as alíquotas das induções das quatro proteínas do HTLV-1 e provavelmente deve ser uma proteína do próprio metabolismo da *E. coli*.

Como não houve expressão das proteínas heterólogas utilizando o vetor pAE, os fragmentos gênicos purificados codificantes das proteínas de interesse, tanto do HIV-1 quanto HTLV-1, foram clonados no vetor de expressão pET20b(+). Esse vetor contém a sequência *pelB* que direciona as proteínas recombinantes para a região periplasmática, que é a região entre as membranas interna e externa da bactéria. A expressão na região periplasmática apresenta algumas vantagens, tais como, o enovelamento apropriado da proteína e menor ocorrência de proteólise. Proteínas que são tóxicas para a célula podem causar menos danos quando exportadas para essa

região e algumas proteínas que são degradadas no citoplasma podem ser estáveis no periplasma (HANNIG; MAKRIDES, 1998; TALMADGE; GILBERT, 1982). A clonagem foi bem sucedida e o sequenciamento do vetor recombinante foi realizado. O vetor pET20b(+) recombinante foi utilizado na transformação de bactérias BL21(DE3)plysS e BL21(DE3) que foram, então, induzidas a expressão. No entanto, não foi observada expressão de nenhuma proteína de interesse. A não produção das proteínas recombinantes nesse vetor pode ser explicada pela principal desvantagem da expressão periplasmática que é o significativo baixo nível de expressão. Além disso, segundo Choi e Lee (2004) proteínas mal dobradas no periplasma não são acumuladas e são rapidamente degradadas por uma protease denominada DegP.

Como não houve expressão das proteínas de interesse no vetor pET20b(+), os fragmentos gênicos purificados codificantes das proteínas de interesse de ambos os vírus foram clonados no vetor pET28a(+). Esse vetor possui duas regiões codificantes para cauda de seis histidinas, uma região C-terminal e ou outra N-terminal, possibilitando que a proteína de interesse seja mais facilmente purificada. Células de bactérias da linhagem BL21(DE3) foram transformadas com esses vetores recombinantes e induzidas à expressão. Assim como ocorreu nas tentativas de expressão em pET20b(+), as três proteínas do vírus HIV-1 e a p19 do HTLV-1 não mostraram aumento de expressão no vetor pET28a(+) em BL21(DE3). Para averiguar se as proteínas estavam sendo expressas, mesmo que em pequenas quantidades, as amostras foram testadas por *Western Blot* com anticorpo específico para cada uma das proteínas, porém, nenhuma marcação pode ser visualizada na membrana. O resultado negativo do *Western Blot* confirmou que essas proteínas de fato não estavam sendo expressas.

No entanto, foi observado um aumento de expressão das proteínas gp21, p24 e gp46 do HTLV-1 e, para confirmar a identidade dessas proteínas, foi realizado um *Western Blot* com os anticorpos primários específicos para cada uma das proteínas. O *Western Blot* utilizando anticorpo anti-gp21 do vírus HTLV-1 apresentou marcações para a proteína gp21 de 13 kDa, além de outra marcação de aproximadamente 25 kDa. Com relação ao *Western Blot* realizado com anti-p24 do vírus HTLV-1, foram identificadas marcações específicas de 25 kDa e de 50 kDa aproximadamente. Essas marcações referentes a proteínas com o dobro da massa molecular esperada são explicadas pelo fato de que a expressão de proteínas heterólogas de forma rápida e

com fortes estímulos pode levar à formação de corpos de inclusão que, em muitos casos, pode levar a produção da proteína recombinante na forma de dímeros ou multímeros (MUKHOPADHYAY, 1997). Isso pode ter ocorrido na produção da gp21, p24 e gp46, como pôde ser confirmado através do *Western Blot* e, posteriormente, da espectrometria de massas, como explicado adiante.

O *Western Blot* realizado para identificação da gp46 não apresentou nenhuma marcação na membrana. Não foi possível fazer uma titulação para determinar a sensibilidade do anticorpo empregado. A falta de detecção pode ter ocorrido por baixa concentração da proteína gp46, inferior ao limite de detecção do anticorpo. Os *Western Blot* realizados neste trabalho utilizaram membranas de nitrocelulose. Porém, é conhecido que proteínas podem se ligar com diferentes eficiências aos variados tipos de membranas, como nylon, PVDF (*polyvinylidene fluoride*) e nitrocelulose. Além disso, os epítomos das proteínas podem ser melhor preservados dependendo do tipo de membrana utilizada (KURIEN; SCOFIELD, 2003; STOTT, 1999). Assim, talvez se a gp46 for fixada em membrana de outro material o anticorpo seja capaz de reconhecê-la.

Mediante a falta de sucesso na expressão das proteínas p19 do vírus HTLV-1 e das proteínas p24, gp41 e gp120 do vírus HIV-1, foram testadas algumas alternativas para tentar obter a produção dessas proteínas.

A primeira dessas alternativas foi a tentativa de clonar novamente o fragmento da gp120 no vetor *pGEM® -T Easy*. Essa medida foi tomada porque, provavelmente, as proteínas não estavam sendo produzidas pela quantidade de nucleotídeos mutados no seu gene. Essas mutações, que culminaram na formação de sequências errôneas de aminoácidos e também com a formação de *stop códons*, poderiam estar comprometendo a produção dessas proteínas. Assim, para evitar a incorporação de nucleotídeos errados durante a amplificação dos fragmentos a partir do vetor pAbT4674, foi utilizada a enzima a *Platinum® Taq DNA Polymerase*. Esse sistema é uma mistura de enzimas contendo Taq DNA Polimerase e uma outra polimerase com atividades exonuclease no sentido 3'-5'. Esta atividade exonuclease é importante para a amplificação de fragmentos a serem expressos, uma vez que diminui a taxa de incorporação de nucleotídeos incorretos (AREZI et al., 2003; BINLADEN et al., 2006). O *amplicon* foi eficientemente clonado no *pGEM® -T Easy* e o vetor recombinante foi sequenciado e alinhado com a sequência gênica da gp120. O alinhamento mostrou

que não houve nenhuma mutação nos amplificadores e que a tradução dessa sequência geraria proteínas iguais ao esperado. Neste caso, foi optado por tentar a clonagem num vetor até então não testado nos experimentos anteriores, o vetor pET32a(+). Porém, apesar de várias tentativas, a clonagem do fragmento gênico no vetor pET32a(+) não foi bem sucedida. Ravanshad et al. (2006) produziram essa proteína utilizando o vetor pET32a(+) e se mostrou sensível e específica na distinção entre soros de indivíduos com ou sem HIV-1. Assim, outras tentativas devem ser ainda realizadas para dar continuidade à expressão da gp120.

A segunda alternativa foi com relação à produção da p19 do HTLV-1 e da p24 do HIV-1. Como já mencionado anteriormente, os genes dessas proteínas foram clonados com sucesso no vetor pET28a(+), porém as proteínas não foram expressas em bactérias BL21(DE3). Diante desse fato, analisamos a quantidade de códons raros para BL21(DE3) presentes nos genes de ambas as proteínas. A análise mostrou que o gene da p24 do HIV-1 e o gene da p19 apresentam aproximadamente 10% e 11% dos seus códons, respectivamente, como sendo códons raros para *E. coli*. Os principais códons raros para *E. coli* são os que codificam para os aminoácidos arginina (AGG, AGA e CGA), leucina (CUA), isoleucina (AUA), prolina (CCC) e glicina (GGA) (KANE, 1995; MAKRIDES, 1996; WU et al., 2004). A presença de códons raros limita a expressão da proteína heteróloga pela baixa quantidade de tRNA para esses códons nas bactérias hospedeiras. Assim, níveis reduzidos de tradução culminam com baixos níveis de expressão da proteína heteróloga (KANE, 1995; ANGOV, 2011).

Por esse motivo, os vetores recombinantes pET28a(+) contendo os insertos da p19 do HTLV-1 e da p24 do HIV-1 foram usados na transformação das bactérias Rosetta(DE3) e BL21-CodonPlus. Essas bactérias apresentam os genes que codificam os tRNAs para os códons raros de arginina, leucina, isoleucina e prolina, além de serem capazes de aumentar os níveis de expressão em alguns casos (GOPAL; KUMAR, 2013; TEGEL et al., 2010). As colônias de bactérias transformadas foram testadas quanto a expressão por meio de um sistema de seleção em placa *Deep well*. O que foi observado é que, novamente, a expressão da p19 não pode ser notada, nem mesmo através da realização de *Western Blot* com anticorpo específico.

Com relação à p24 do HIV-1, a seleção em placa *Deep well* mostrou que na maioria das bactérias testadas houve a expressão de uma proteína de aproximadamente 23 kDa que poderia ser a p24. Para averiguar essa hipótese, foi

realizado um *Western Blot* com anticorpo anti-p24, porém nenhuma marcação pôde ser visualizada. Apesar desse resultado, esta fração proteica foi excisada e analisada por espectrometria de massas. O resultado da espectrometria mostrou que os peptídeos gerados não correspondem à p24 do HIV-1. Assim, a proteína que se mostrou presente na expressão, tanto de Rosetta(DE3) quanto de BL21-CodonPlus transformadas com o vetor recombinante pET28a(+), não corresponde à p24 do vírus HIV-1.

A não obtenção da expressão das proteínas p19 do HTLV-1 e da p24 do HIV-1 através do vetor pET28a(+) em bactérias BL21(DE3), Rosetta(DE3) e BL21-CodonPlus é de difícil entendimento. Porém, o que pode ter ocorrido é que as proteínas não foram produzidas pela instabilidade de seus RNAm que poderiam estar sendo degradados antes de serem traduzidos. Uma alternativa seria utilizar os vetores recombinantes em bactérias da linhagem BL21 Star. Essas bactérias têm uma mutação no gene que codifica a RNase E (*rne131*) o que pode melhorar a estabilidade dos RNAm e potencialmente aumentar a expressão proteica (GREEN; SANBROOK, 2012). No caso da p19, o que se sabe é que proteínas pequenas são muitas vezes difíceis de serem produzidas em *E. coli* porque elas podem não ser dobradas corretamente e são frequentemente alvos da ação proteolítica (JANSSON et al., 1989; MURBY; UHLÉN; STAHL, 1996). Uma alternativa seria expressá-la fusionada a proteínas maiores, como ocorreria na clonagem do seu gene no vetor pET32a(+). Esse vetor proporciona que a proteína seja produzida com uma *tag* de tioredoxina. Além disso, talvez a p19 esteja sendo produzida, mas não visualizada no gel. A expressão da p19 não foi visualizada mediante coloração com *Coomassie Brilliant Blue R-250*. No entanto, a coloração com sais de prata pode ser mais eficiente na identificação dessa proteína, uma vez que essa coloração é cerca de 100 a 1000 vezes mais sensível (WINKLER et al., 2007).

Diante da não expressão da p19 do vírus HTLV-1 e da p24 do HIV-1, a terceira alternativa foi clonar o fragmento gênico purificado dessas proteínas no vetor pET32a(+). O DNA plasmidial do vetor pET32a(+) recombinante foi extraído, sequenciado e alinhado com as sequências gênicas das proteínas. O sequenciamento mostrou que o fragmento gênico da p19 não foi clonado no pET32a(+), apesar de que a PCR realizada das colônias mostrou a amplificação de um fragmento gênico de tamanho esperado. Dessa forma, uma nova clonagem do gene da p19 no pET32a(+)

deve ser realizada para averiguar se esse vetor será capaz de produzi-la. Com relação à p24, foi verificado através do sequenciamento que o inserto foi clonado de forma bem sucedida no vetor pET32a(+) e o alinhamento entre as sequências manteve uma identidade de 98,5%. A tradução dessa sequência levaria a formação de uma proteína com 99% dos aminoácidos semelhantes aos da proteína p24. Porém, as bactérias BL21(DE3) com o vetor pET32a(+) recombinante não foram capazes de produzir a proteína p24 recombinante. Ravanshad et al. (2006) produziram essa proteína nessas mesmas condições e, portanto, novas tentativas devem ser feitas para expressão da p24 do vírus HIV-1.

Diversas tentativas para a expressão de proteínas do HIV-1 e HTLV-1 já foram realizadas por outros grupos de pesquisa e muitos deles conseguiram expressar as proteínas p24, gp41, gp120 e p19 usando diferentes sistemas de expressão, linhagens de bactérias, vetores e estratégias de clonagem. Como por exemplo, a expressão das proteínas p19, p24 e gp41 individualmente (RAVANSHAD et al., 2006; SATO et al., 1992; SOUTSCHEK; HOFLACHER; MOTZ, 1990; MARIN et al., 2005) ou a fusão de fragmentos de gp41 e gp120 (SOHN et al., 1996). Portanto, mais experimentos e tentativas ainda devem ser realizadas para obtenção da expressão dessas quatro proteínas.

As proteínas p19 do vírus HTLV-1 e p24, gp41 e gp120 do vírus HIV-1 não foram expressas e este trabalho teve continuidade para expressão, purificação e imunodeteção das proteínas gp21, p24 e gp46 do HTLV-1.

A partir da identificação da expressão das proteínas gp21, p24 e gp46 e da escolha de melhor tempo de expressão de 6 horas, foi realizado o teste de solubilidade dessas proteínas. O teste de solubilidade fornece duas frações, a fração solúvel, onde são encontradas proteínas que se solubilizaram e a fração insolúvel que são proteínas que não são solúveis e que estão agregadas em forma de corpos de inclusão. O resultado deste teste mostrou que as três proteínas estavam sendo produzidas, em sua grande maioria, de forma insolúvel. A formação de corpos de inclusão é uma frequente consequência da produção de proteínas em altos níveis na região citoplasmática. Os corpos de inclusão ocorrem devido à síntese rápida da proteína num curto espaço de tempo não fornecendo tempo hábil para o enovelamento correto da proteína recém-produzida (MUKHOPADHYAY, 1997). Além disso, o uso de promotores fortes, como o T7 presente no vetor pET28a(+) e altas concentrações de

indutores permitem uma grande produção de proteínas que, algumas vezes, pode exceder 50% do total das proteínas bacterianas. Nestas condições, o dobramento correto da proteína é prejudicado (BANEYX; MUJACIC, 2004).

Para solubilização das proteínas gp21, p24 e gp46, uma expressão em escala piloto foi realizada e o sedimento de bactérias foi processado de modo a promover a solubilização dos corpos de inclusão. Muitas vezes essa solubilização é dificultada pela formação de pontes dissulfeto intermoleculares de maneira inapropriada (CLARK, 1998; MUKHOPADHYAY, 1997). Por essa razão, durante o preparo dos corpos de inclusão, o sedimento foi ressuspenso em tampão de ressuspensão contendo DTT (Ditiotreitol). Essa substância foi empregada com o objetivo de fazer a redução das pontes dissulfeto intra e intermoleculares das proteínas recombinantes mantendo os resíduos de cisteína no seu estado reduzido (VALLEJO; RINAS, 2004).

Os agentes caotrópicos ou detergentes são importante adjuvantes para desestabilizar as interações hidrofóbicas dos agregados de proteínas. A adição dos detergentes Triton X-100 no tampão de lavagem e N-laurilsarcosina no tampão de desnaturação atuaram promovendo a remoção de debris celulares, separando as proteínas possivelmente agregadas às membranas celulares e impedindo a formação de agregados da proteína desnaturada (FILIP et al., 1973; WINGFIELD, 2002). A N-laurilsarcosina também aumenta a solubilidade dos corpos de inclusão (FRANKEL; SOHN; LEINWAND, 1991; TSUMOTO et al., 2003).

Os corpos de inclusão de proteínas heterólogas representam cerca de 50% do total das proteínas celulares (BANEYX; MUJACIC, 2004; MUKHOPADHYAY, 1997; SINGH; PANDA, 2005). Devido à sua elevada concentração e da formação agregada, os corpos de inclusão podem ser isolados a partir das proteínas celulares em forma purificada, como ocorreu no caso da gp46. O procedimento de solubilização dos corpos de inclusão promoveu isolamento desses agregados e limpeza das outras proteínas celulares em menor quantidade, culminando com a solubilização da gp46 de forma quase pura.

A escolha de realizar a purificação em condição desnaturante é que a conformação nativa das proteínas, com suas pontes dissulfeto, poderia esconder a cauda de histidina. Isso impediria a interação desta com o níquel presente na resina da coluna *HisTrap^{TM}* e resultaria em baixos níveis de proteínas purificadas. Assim, a

coluna *HisTrap*^{TM} é normalmente mais efetiva em condições desnaturantes do que em condições nativas (HWANG; PAN; SYKES, 2014).

A gp21 e a p24 do vírus HTLV-1, enquanto solubilizadas no tampão de desnaturação, apresentavam-se quase como um único fragmento de 13 kDa e 25 kDa, respectivamente, pois os agentes redutores presentes no tampão as mantinham na forma desnaturada. Após as etapas de lavagem e a eluição das proteínas da coluna *HisTrap*^{TM} com tampão sem agente desnaturante, foi verificado que as proteínas recombinantes apresentavam-se como um fragmento de massa molecular esperada e um fragmento proteico com o dobro desse tamanho. Assim, a amostra da gp21 purificada apresentou um fragmento de 25 kDa, enquanto era esperado apenas uma fração proteica de 13 kDa. O mesmo ocorreu com a p24, pois embora um dos fragmentos apresentasse o tamanho esperado de 25 kDa, o outro continha o dobro de sua massa molecular, ou seja, 50 kDa. Mediante essa observação, foi proposto que essas proteínas recombinantes produzidas poderiam estar formando homodímeros. É bem descrito que a proteína p24 do HIV-1 é capaz de formar dímero (GAMBLE et al., 1997; MOMANY et al., 1996) e talvez o mesmo poderia estar ocorrendo com a p24 do HTLV-1, uma vez que são muito semelhantes.

Utilizando a ferramenta de bioinformática *Zhang Lab* da Universidade de Michigan (disponível em <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/COTH/>), foi possível notar que tanto a gp21 quanto a p24 do vírus HTLV-1 são capazes de formar homodímeros. Assim, mesmo as amostras sendo misturadas ao tampão de amostra para SDS-PAGE contendo β -mercaptoetanol, que é também um agente redutor, e fervidas antes da aplicação no gel, não foi possível reduzir todas as pontes dissulfeto pois, dependendo da proteína alvo, nem todos os agentes desnaturantes são eficazes (HWANG; PAN; SYKES, 2014).

A purificação da gp46, por sua vez não ocorreu de forma bem sucedida e modificações quanto às condições de ligação, composição e pH dos tampões ainda devem ser realizadas. Uma opção seria a realização de diálise após a solubilização dos corpos de inclusão, pois o DTT e o EDTA podem interferir na ligação da resina às histidinas (CHEUNG; WONG; NG, 2012; GREEN; SANBROOK, 2012; HENGEN, 1995; FRANKEN et al., 2000).

A análise da identidade dessas proteínas por espectrometria de massas, mostrou que os dois fragmentos proteicos presentes na amostra da gp21 purificada

identificados como gp21-1 e gp21-2 são realmente esta proteína. Assim como as duas frações de proteínas presentes na amostra da p24 purificada chamadas de p24-1, p24-2 correspondem à p24. Os peptídeos gerados na espectrometria de massas foram semelhantes aos fragmentos preditos das proteínas de interesse em pelo menos 29%, o que garante a identidade dessas proteínas recombinantes produzidas.

Os valores de m/z (massa/carga) dos fragmentos preditos das proteínas são comparados com os fragmentos proteicos experimentais. A probabilidade de o valor de m/z de um fragmento obtido teoricamente coincidir, de maneira randômica, com o valor de m/z de um fragmento obtido experimentalmente é calculada e expressa num valor de *score*. Assim, quanto maior for o valor obtido, menor é a probabilidade de que este resultado seja fruto do acaso (CARRILHO et al., 2008). Valores de *score* acima de 60 são indícios confiáveis de que se trata da proteína pesquisada (THIEDE et al., 2005). Com relação às proteínas analisadas gp21-1, gp21-2, p24-1 e p24-2, o *score* de correlação entre os fragmentos experimentais e os fragmentos proteicos preditos variaram de 62 à 365, corroborando ainda mais pra certificação de que se tratam das proteínas de interesse.

A espectrometria de massas por *MALDI TOF/ TOF* e *Eletrospray Quadrupole-Time of Flight* necessita que a proteína de interesse seja clivada em um conjunto de peptídeos para que possa ser analisada. Neste caso, foi utilizada a tripsina que digeriu a amostra formando uma mistura de peptídeos tripsínicos. A tripsina é uma protease que cliva as ligações peptídicas na extremidade C-terminal dos resíduos de arginina (R) e de lisina (K) (VANDERMARLIERE; MUELLER; MARTENS, 2013). Foi observado que a digestão do fragmento correspondente à gp46 formava somente três peptídeos com massa molecular acima de 2500 Da e um peptídeo pequeno de apenas de 234 Da. A acurácia dos resultados de espectrometria de massas é muitas vezes difícil para peptídeos com massa acima de 2500 Da (THIEDE et al., 2005) e também para peptídeos com tamanho aproximado de 200 Da, variando de acordo com a calibração dos equipamentos. Dessa forma, os peptídeos da gp46 obtidos após a digestão com tripsina não puderam ser identificados pelos equipamentos e, conseqüentemente, não houve nenhuma correlação encontrada nos bancos de dados *Micelania*, *SwissProt* e *nrNCBI*. Portanto, a não identificação de peptídeos da gp46 por espectrometria de massas nessas condições não nos permite afirmar que a proteína produzida de 14 kDa não é a gp46 do vírus HTLV-1. Para realmente confirmar

a identidade dessa proteína, uma nova espectrometria de massas deve ser realizada utilizando outra protease para a geração de fragmentos proteicos que possam ser detectados pelos equipamentos. Um exemplo de enzima que poderia ser empregada é a termolisina, que cliva as proteínas em resíduos de aminoácidos hidrofóbicos como isoleucina (I), leucina (L), valina (V), alanina (A), metionina (M) e fenilalanina (F) (FONTANA, 1987). Segundo análise feita na ferramenta de bioinformática *Expasy/PeptideMass*, a termolisina é capaz de digerir a sequência proteica da gp46 em 10 peptídeos com massa molecular entre 593 a 1460 Da, tamanho ideal para serem identificados pelos equipamentos de espectrometria de massas.

Foi realizado um teste para avaliar se as proteínas gp21, p24 e gp46 presentes na membrana de nitrocelulose seriam reconhecidas por soros de indivíduos com HTLV-1. Em ambos os soros testados houve a marcação da membrana. O primeiro soro foi capaz de identificar as proteínas gp21-1, p24-1 e gp46. Além disso, foram observadas duas marcações inesperadas de aproximadamente 25 kDa que podem ser dímeros da gp46. O segundo soro mostrou uma marcação nas proteínas gp21-1, gp21-2, p24-1, p24-2 e gp46. Porém, também foram marcadas algumas proteínas de tamanho inesperado como uma de aproximadamente 18 kDa que pode ser alguma degradação da proteína p24. Novamente, foi identificada uma proteína de 25 kDa e outra de aproximadamente 50 kDa na amostra da gp46.

O próximo teste avaliou se as mesmas proteínas imobilizadas na membrana de nitrocelulose poderiam também ser reconhecidas por um *pool* de soros de indivíduos saudáveis ou por um *pool* de soros de indivíduos com HIV-1. O HTLV-1 e o HIV-1 são retrovírus muito semelhantes e a possibilidade de reações cruzadas poderia acontecer (DOCK et al., 1988), mas o que foi observado é que não ocorreu nenhuma marcação. Esse resultado é um importante indício da especificidade do reconhecimento dessas proteínas pelos soros de indivíduos com HTLV-1 e que as proteínas gp21, p24 e gp46 recombinantes produzidas demonstraram grande potencial diagnóstico para a infecção por esse vírus. No entanto, mais testes com um número maior de indivíduos devem ser realizados para que se possa ter resultados estatisticamente relevantes. Essas proteínas devem ser testadas em soros de indivíduos com outras doenças infecciosas e autoimunes. Existem poucos estudos abordando reações cruzadas ou falso-positivas para HTLV-1, porém para afirmar a especificidade das proteínas recombinantes gp21, p24 e gp46 para a detecção de HTLV-1 seria conveniente testá-

las com soros de pacientes com HTLV-2, hepatite C e B, malária, lúpus eritematoso sistêmico e até mesmo indivíduos vacinados por influenza (JACOB et al., 2008; LEVINE et al., 1988; MACKENZIE et al., 1992; PERRON et al., 1991; SCHREIBER et al., 1996, YAO et al., 2006).

A expressão das proteínas recombinantes gp21, p24 e gp46 já foi realizada por outros grupos de pesquisa, porém as metodologias e os insumos para desenvolvimento de kits diagnósticos mais sensíveis e específicos devem ser sempre aprimorados (ABBASZADEGAN et al., 2008; COATES et al., 1990; KIYOKAWA et al., 1984; LILLEHOJ et al., 1990; MARIN et al., 2005; VARMA et al., 1995). A expressão da proteína gp46 recombinante, por exemplo, ocorreu de forma bem sucedida e o seu reconhecimento de forma específica pelos soros de indivíduos com HTLV-1 é um resultado importante e pode ser interessante para o melhoramento de produtos que já estão no mercado. O *ARCHITECT® rHTLVII* (Abbott), por exemplo, contém a proteína gp46 na sua forma sintética indicando que, por motivos desconhecidos, existe alguma dificuldade quanto ao uso dessa proteína obtida de forma recombinante, uma vez que seria uma alternativa mais barata de obtê-la (BRAND, 2014).

A produção de proteínas recombinantes dos vírus HIV-1 e HTLV-1 com o objetivo de utilizá-las como antígenos de captura em kits diagnósticos é uma linha de pesquisa recentemente iniciada em nosso laboratório. Portanto, os resultados deste trabalho são os primeiros passos para atingir o objetivo maior de produzir as proteínas em maior escala e, por fim, chegar a produção de um kit diagnóstico sensível, específico e barato.

7 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados permitem concluir que as bactérias BL21(DE3) transformadas com os vetores pET28a(+) recombinantes produziram as proteínas gp21, p24 e gp46 do vírus HTLV-1 com sucesso nas condições descritas neste trabalho. As proteínas recombinantes gp21 e p24 do vírus HTLV-1 foram reconhecidas pelos seus respectivos anticorpos, purificadas por IMAC e tiveram sua identidade confirmada por espectrometria de massas. Por fim, as proteínas recombinantes gp21, p24 e gp46 do vírus HTLV-1 foram reconhecidas especificamente pelos soros de indivíduos com HTLV-1 e não foram reconhecidas por soros de indivíduos saudáveis e com HIV-1, o que confere a elas especificidade e grande potencial diagnóstico.

8 PERPESCTIVAS FUTURAS

A continuidade do trabalho abrangerá:

- Novas tentativas para clonagem, expressão e imunodeteção das proteínas p19 do HTLV-1 e p24, gp41 e gp120 do HIV-1;
- Estratégias para melhorar as etapas de solubilização e purificação das proteínas gp21, p24 e gp46 do HTLV-1;
- O aumento do número de soros de indivíduos com HTLV-1 testados contra as proteínas gp21, p24 e gp46 do HTLV-1 para conseguir resultados estatisticamente relevantes;
- Testes de imunodeteção das proteínas gp21, p24 e gp46 do HTLV-1 pelos soros de indivíduos com outras doenças infecciosas e até mesmo doenças autoimunes para confirmar a especificidade dessas proteínas.
- A realização de cálculos de rendimento de produção visando o desenvolvimento do bioprocesso para produzir as proteínas gp21, p24 e gp46 do HTLV-1 em maior escala em biorreatores de bancada.

9 REFERÊNCIAS

- ABBASZADEGAN, M. R. et al. Truncated MTA-1: A Pitfall in ELISA-Based Immunoassay of HTLV-1 Infection. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2008, n. 846371, p. 1-4, 2008.
- ABRAMS, A.; AKAHATA, Y.; JACOBSON, S. The Prevalence and Significance of HTLV-I/II Seroindeterminate Western Blot Patterns. **Viruses**, v.3, p. 1320-1331, 2011.
- ANDERSSON, S. et al. Comparative evaluation of 14 immunoassays for detection of antibodies to the human T-lymphotropic virus types I and II using panels of sera from Sweden and West Africa. **Transfusion**, v. 39, n. 8, p.845-851, 1999.
- ANGOV, E. Codon usage: Nature's roadmap to expression and folding of proteins. *Biotechnology Journal*, v. 6, p. 650–659, 2011.
- ANTUNES, A. et al. Identificação das Competências Nacionais, dos Principais Gastos Governamentais por Estados da Federação, das Empresas Importadoras e Prospecção Tecnológica em Patentes sobre Kits Diagnósticos para Doenças Transmissíveis – Controle de Sangue. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos-Ciência, Tecnologia e Inovação, 2006.
- AREZI et al. Amplification efficiency of thermostable DNA polymerases. **Analytical Biochemistry**, v. 321, 226–235, 2003.
- BACCHETTI, P.; MOSS, A. R. Incubation period of AIDS in San Francisco. **Nature**, v. 338, n. 6212, p. 251-3, 1989.
- BALBÁS, P.; LORENCE, A. **Recombinant Gene Expression**. 2nd ed. New Jersey: Humanas Presse, 2004.
- BANEYX, F. Recombinant protein expression. In *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 411-421, 1999.
- BANEYX F, MUJACIC M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia Coli*. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1399-408, 2004.
- BARRE-SINOUSSE, F. et al. Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, p. 868-871, 1993.
- BASSO, A. M. M.; GROSSI DE SÁ, M. F.; PELEGRINI, P. B. Biopharmaceutical and Biosimilar Products in Brazil: From Political To Biotechnological Overview. **Journal of Bioequivalence & Bioavailability**, v. 5, p. 060-066, 2013.

BERLEC, A.; STRUKELJ, B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 3, p. 257-74, 2013.

BENTSEN et al. Performance evaluation of the Bio-Rad Laboratories GS HIV Combo Ag/Ab EIA, a 4th generation HIV assay for the simultaneous detection of HIV p24 antigen and antibodies to HIV-1 (groups M and O) and HIV-2 in human serum or plasma. **Journal of Clinical Virology**, v. 52S, p. S57– S61, 2011.

BINLADEN, J. Assessing the Fidelity of Ancient DNA Sequences Amplified From Nuclear Genes. **Genetics**, v. 172, p. 733–741, 2006.

BLACKARD, J. T. et al. Human Immunodeficiency Virus Superinfection and Recombination: Current State of Knowledge and Potential Clinical Consequences. **Clinical infectious diseases**, v. 34, n. 8, p.1108-14, 2002.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO – AIDS/DST. Disponível em: < http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2014/56677/boletim_2014_1_pdf_60254.pdf >. Acesso em: 19 Fev. 2015.

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

BRANSON, B. M. Rapid Tests for HIV Antibody. **AIDS Reviews**, v. 2, p. 76-83, 2000.

BRAOUDAKI, M; TZORTZATOU-STATHOPOULOU, F. Tumorigenesis related to retroviral infections. **Journal of infection in developing countries**, v. 5, n. 11, p. 751-758, 2011.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. Decreto nº 7.546, de 2 de agosto de 2011. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2011/Decreto/D7546.htm >. Acesso em: 20 Jan. 2015.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. Lei nº12.349 de 15 de dezembro de 2010. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2010/Lei/L12349.htm. Acesso em: 20 Jan. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 3.089 de 11 de dezembro de 2013. Disponível em: < http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2013/prt3089_11_12_2013.html >. Acesso em: 20 Jan. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 1376 de 19 de novembro de 1993. Disponível em: <
http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs_leis/ps/ps29.pdf>. Acesso em: 24 Fev. 2015.

BUTTÒ, S. et al. Laboratory diagnostics for HIV infection. **Annali dell'Istituto superiore di sanita**, v. 46, n. 1, p. 24-33, 2010.

CARNEIRO-PROIETTI, A. B. et al. Infection and disease caused by the human T cell lymphotropic viruses type I and II in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 5, p. 499-508, 2002.

CARNEIRO-PROIETTI, A. B. et al. Human T-Lymphotropic Virus Type 1 and Type 2 Seroprevalence, Incidence, and Residual Transfusion Risk Among Blood Donors in Brazil During 2007–2009. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 28, n. 10, p. 1265-1272, 2012.

CARRILHO, E. et al. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 669-675, 2008.

CARRO, R. Laboratórios apostam em biotecnologia. **Brasil Econômico**, p. 10-11, 2014. Disponível em: <
<http://brasileconomico.epaper.grupodia.com.br/contents/paper139034665354.pdf>>. Acesso em 22 Jan. 2015.

CASKEY, M. F. et al. Clinical Manifestations Associated with HTLV Type I Infection: A Cross-Sectional Study. **AIDS research and human retroviruses**, v. 23, n. 3, p. 365–371, 2007.

CASTRO, L. H. M. et al. HTLV-I Associated Myelopathy In Brazil. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 47, n. 4, p. 501-502, 1989.

CATALAN-SOARES, B. C.; PROIETTI, F. A.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F. Os vírus linfotrópicos de células T humanos (HTLV) na ultima década (1990-2000). **Revista brasileira de Epidemiologia**, v. 4, n.2 p. 81-95, 2001.

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

Centers for Disease Control (CDC). Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)-United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 31, n. 37, p. 507-8, 513-4, 1982.

Centers for Disease Control (CDC). Current Trends Licensure of Screening Tests for Antibody to Human T-Lymphotropic Virus Type I. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 37, n. 48, p. 736-740,745-747, 1988. Disponível em:

<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001311.htm>. Acesso em: 15 Dez. 2014.

CHALMERS, J. J. et al. Effect of temperature on *Escherichia Coli* overproducing β -lactamase or human epidermal growth factor. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 1, p.104-111, 1990.

CHEUNG, R. C. F.; WONG, J. H.; NG, T. B. Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 96, p. 1411–1420, 2012.

CHOI, J. H.; LEE, S. Y. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 64, p. 625–635, 2004.

CHOI, J. H.; KEUM, K. C.; LEE, S. Y. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 876 – 885, 2006.

CLAPHAM, P. R.; WEISS, R. A. Immunodeficiency viruses. Spoilt for choice of co-receptors. **Nature**, v.388, n. 6639, p. 230-231, 1997.

CLARK, E. B. Refolding of recombinant proteins. **Current Opinion in Biotechnology**, n. 9, p. 157-163, 1998.

COATES et al. Serological Evaluation of *Escherichia coli*-Expressed Human T-Cell Leukemia Virus Type I *env*, *gag* p24, and *tax* Proteins. **Journal of clinical microbiology**, v. 28, n. 6, p. 1139-1142, 1990.

COHEN, M. S. et al. The spread, treatment, and prevention of HIV-1: evolution of a global pandemic. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1244-1254, 2008.

COHEN, M. S. et al. The Detection of Acute HIV Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, p. S270-S277, 2010.

CONNOR, R. I.; HO, D. D. Etiology of AIDS: biology of human retroviruses. In: Devita VT. Editor. **AIDS etiology, diagnosis, treatment and prevention**. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, p. 13-85, 1992.

CORTES, E. et al. HIV-1, HIV-2, and HTLV-I infection in high-risk groups in Brazil. **The New England journal of medicine**, v. 320, n. 15, p. 953-8, 1989.

COSTA, S. et al. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 63, p. 1-20, 2014.

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

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

DE OLIVEIRA, M. S. et al. Adult T-cell leukaemia/lymphoma in Brazil and its relation to HTLV-I. **Lancet**, v. 336, n. 8721, p. 987-90, 1990

DEPARTAMENTO DE DST, AIDS E HEPATITES VIRAIS. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pagina/historia-da-aids>. Acesso em: 12 Fev. 2015a.

DEPARTAMENTO DE DST, AIDS E HEPATITES VIRAIS. Disponível em: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2014/56532/p_manual_tecnico_hiv_2014_final_pdf_p_31450.pdf. Acesso em: 20 Fev. 2015b.

DEPARTAMENTO DE DST, AIDS E HEPATITES VIRAIS. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/publicacao/2014/guia-de-manejo-clinico-da-infeccao-pelo-htlv-0>. Acesso em: 12 Fev. 2015c.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO PELO HIV. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/publicacao/consenso-recomendacoes-para-terapia-antirretroviral-em-adultos-infectados-pelo-hiv-2008>. Acesso em: 15 Jan. 2013.

DOCK, L. N. et al. Evaluation of atypical human immunodeficiency virus immunoblot reactivity in blood donors. **Transfusion**, v. 28, n. 5, 1988.

DUNNING, A. M.; TALMUD, P., HUMPHRIES, S. E. Errors in the polymerase chain reaction. **Nucleic acids research**, v. 16, n. 21, p. 10393, 1988.

EARL, P. L; MOSS, B.; DOMS, R. W. Folding, interaction with GRP78-BiP, assembly, and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. **Journal of Virology**, v. 65, n. 4, p. 2047-55, 1991.

ECKERT, C. A.; KUNKEL, T. A. DNA Polymerase Fidelity and the Polymerase Chain Reaction. **PCR methods and applications**, v. 1, n. 1, p. 17-24, 1991.

FERREIRA Jr., O. C; PLANELLES, V.; ROSENBLATT, J. D. Human T-cell leukemia viruses: epidemiology, biology, and pathogenesis. **Blood Reviews**, v.11, p. 91-104, 1997.

FERREIRA JUNIOR, O. C. et al. Evaluation of rapid tests for anti-HIV detection in Brazil. **AIDS**, v. 19 (suppl 4), p. S70–S75, 2005.

FIEBIG, E. W. et al. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. **AIDS**, v. 17, n. 13, 1871–1879, 2003.

FILIP, C. et al. Solubilization of the Cytoplasmic Membrane of *Escherichia coli* by the Ionic Detergent Sodium-Lauryl Sarcosinate. **Journal of Bacteriology**, v. 115, n. 3, p. 717-722, 1973.

FONSECA, K.; ANAND, C. M. Predicting Human Immunodeficiency Virus Type 1-Positive Sera by Using Two Enzyme Immunoassay Kits in a Parallel Testing Format. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 11, p. 2507-2512, 1991.

FONTANA, A. Structure and stability of thermophilic enzymes. Studies on thermolysin. **Biophysical Chemistry**, v. 29, p.181-193, 1988.

FRANCHINI, G. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. **Blood**, v. 86, p. 3619-3639, 1995.

FRANKEL, S.; SOHN, R.; LEINWAND, L. The use of sarkosyl in generating soluble protein after bacterial expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 4, p. 1192-1196, 1991.

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

FRANKEN, K. L. M. C. et al. Purification of His-Tagged Proteins by Immobilized Chelate Affinity Chromatography: The Benefits from the Use of Organic Solvent. **Protein Expression and Purification**, v. 18, p. 95–99, 2000.

FRASEN, K. et al. Evaluation of a line immunoassay for simultaneous confirmation of antibodies to HIV-1 and HIV-2. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 10, n. 11, p. 939-946, 1991.

FREED, E. O. HIV-1 Gag Proteins: Diverse Functions in the Virus Life Cycle. **Virology**, v. 251, p. 1-15, 1998.

FREED, E. O. HIV-1 Replication. **Somatic Cell and Molecular Genetics**, v. 26, n. 1/6, p. 13-33, 2001.

GABBAI, A.A. et al. Selectivity of human T-lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) and HTLV-2 infection among different populations in Brazil. **American Journal of Tropical Medical Hygiene**, v. 49, p. 664-671, 1993.

GADELHA, C. A. G; COSTA, L. S. Saúde e desenvolvimento no Brasil: avanços e desafios. **Revista de Saúde Pública**, v.46, p. 13-20, 2012.

GALLI, R. A. et al. Performance Characteristics of Recombinant Enzyme Immunoassay To Detect Antibodies to Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) and HIV-2 and To Measure Early Antibody Responses in Seroconverting Patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 999–1002, 1996.

GALVÃO-CASTRO, B. et al. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. **Transfusion**, V. 37, n. 2, p. 242-3, 1997.

GAMBLE, T. R. et al. Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. **Science**, v. 278, p. 849-853, 1997.

GANSER-PORNILLOS, B.; YEAGER, M.; SUNDQUIST, W. I. The structural biology of HIV assembly. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 18, p. 203–217, 2008.

GESSAIN, A. et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-1 in patients with tropical spastic paraparesis. **Lancet**, v. 11, p. 407-409, 1985.

GESSAIN, A. Human retrovirus HTLV-1: descriptive and molecular epidemiology, origin, evolution, diagnosis and associated diseases. **Bulletin de la Société de pathologie exotique**, v. 104, p. 167–180, 2011.

GHEZ, D. et al. Current concepts regarding the HTLV-1 receptor complex. **Retrovirology**, v. 7, n. 99, p. 1-11, 2010.

GHISETT, V. et al. Acute HIV infection: Improved algorithms for HIV testing. **Journal of Clinical Virology**, v. 63, p. 51–52, 2015.

GOEDDEL, D. V. Systems for heterologous gene expression. **Methods of Enzymology**, v. 185, p. 3-7, 1990.

GOEDERT, J. J. Recreational drugs: relationship to AIDS. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 437, p. 192-199, 1984.

GOMEZ, C.; HOPE, T. J. The ins and outs of HIV replication. **Cellular Microbiology**, v. 7, n.5, p. 621–626, 2005.

GOODNOW, M. M.; COLLMAN, R. G. HIV-1 coreceptor preference is distinct from target cell tropism: a dual-parameter nomenclature to define viral phenotypes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, p. 965-972, 2006.

GOPAL, G. J.; KUMAR, A. Strategies for the Production of Recombinant Protein in Escherichia coli. **The protein journal**, v. 32, p. 419–425, 2013.

GOTTLIEB, M. S. et al. Pneumocystis carinii Pneumonia and Mucosal Candidiasis in Previously Healthy Homosexual Men — Evidence of a New Acquired Cellular Immunodeficiency. **New England Journal of Medicine**, v. 305, n. 24, p. 1425-31, 1981.

GOTTLIEB, S.; WOODCOCK, J. A regulatory perspective on in vitro diagnostics. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 8, 2006.

GRANT, P. M.; ZOLOPA, A. R. When to Start ART in the Setting of Acute AIDS-Related. **Current HIV/AIDS reports.**, v. 9, p. 251–258, 2012.

GREEN, M. J; SANBROOK, R. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** 4th Edition. New York, 2012.

HAMATAKE et al. A simple competitive RT-PCR assay for quantitation of HIV-1 subtype B and non-B RNA in plasma. **Journal of Virological Methods**, v. 142, p. 113-117, 2007.

HANNING, G.; MAKRIDES, S. C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in Escherichia coli. **Trends Biotechnology**, v.16, n. 2, p. 54-60, 1998.

HANON, E. et al. High frequency of viral protein expression in human T cell lymphotropic virus type 1-infected peripheral blood mononuclear cells. **AIDS research and human retroviruses**, v. 16, n. 16, p. 711-5, 2000.

HATTORI, S. et al. Identification of gag and env gene products of human T-cell leukemia virus (HTLV). **Virology**, v. 136, n. 2, p. 338-47, 1984.

HENGGEN, P. N. Purification of His-Tag fusion proteins from Escherichia coli. **Methods and reagents**, v. 20, p. 285-286, 1995.

HJELLE, B. et al. Chronic neurodegenerative disease associated with HTLV-II infection. **The Lancet**, v. 339, p. 645-646, 1992.

HOSHINO, H. Cellular factors involved in HTLV-1 entry and pathogenicity. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 2-12, 2012.

HWANG, P. M.; PAN, J. S.; SYKES, B. D. Targeted expression, purification, and cleavage of fusion proteins from inclusion bodies in Escherichia coli. **FEBS Letters**, v. 588, p. 247–252, 2014.

ICTVdB. The Universal Vírus Database. Disponível em: <<http://ictvonline.org/>>. Acesso em: 11 Jan. 2013.

JACOB, F. et al. Serological patterns and temporal trends of HTLV-1/2 infection in high-risk populations attending Public Health Units in Sao Paulo, Brazil. **Journal of Clinical Virology**, v. 42, p. 149–155, 2008.

JACOB, F.; SANTOS-FORTUNA, E.; CATERINO-DE-ARAUJO, A. Algoritmo de testes sorológicos de triagem para infecção por HTLV-1/2 usado no Instituto Adolfo Lutz. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 5, n. 49, p. 2008.

JAFFAR, S. et al. The natural history of HIV-1 and HIV-2 infections in adults in Africa: a literature review. **Bull World Health Organ**, v. 82, p. 462–469, 2004.

JANSSON, B. et al. A dual-affinity gene fusion system to express small recombinant proteins in a soluble form: expression and characterization of protein A deletion mutants. **Protein Engineering**, v. 2, n. 6, p. 555-561, 1989.

JEVSEVAR, S.; GABERC-POREKAR, V.; FONDA, I.; et al. Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 2, p. 632-639, 2005.

JOHNSON, J. M.; HARROD, R.; FRANCHINI, G. Molecular biology and pathogenesis of the human T-cell leukaemia/lymphotropic virus Type-1 (HTLV-1). **Viruses and cancer**, v. 82, p. 135-147, 2001.

KANE, J. F. Effects of rare codon clusters on gene expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, p. 494-500, 1995.

KALYANARAMAN, V. S. et al. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science**, v. 218, p. 571-3, 1982.

KANKI, P. J.; DE COCK, K. M. Epidemiology and transmission of HIV-2. **AIDS**, v. 8 (Suppl 1), p. S85–S93, 1994.

KATZ, R. A.; SKALKA, A. M. The retroviral enzymes. **Annual review of biochemistry**, v. 63, p. 133-173, 1994.

KAUL, D. R. et al. Donor screening for human T-cell lymphotropic virus 1/2: changing paradigms for changing testing capacity. **American journal of transplantation**, v. 10, n. 2, p. 207-13, 2010.

KILLIAN, M. S.; LEVY, J. A. HIV/AIDS: 30 years of progress and future challenges. **European journal of immunology**, v. 41, p. 3401-3411, 2011.

KITAGAWA et al. Antibodies to HTLV-I in Japanese Immigrants in Brazil. **The Journal of the American Medical Association**, v. 256, n. 17, p. 2342, 1986.

KIYOKAWA, T. et al. Envelope proteins of human T-cell leukemia virus: Expression in *Escherichia coli* and its application to studies of *env* gene functions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, V. 81, p. 6202-6206, 1984.

KOLAJ, O. et al. Use of folding modulators to improve heterologous protein production in *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, v. 8, n. 9, p. 1-17, 2009.

KOURI, V. et al. CRF19_cpx is an Evolutionary fit HIV-1 Variant Strongly Associated With Rapid Progression to AIDS in Cuba. **EBioMedicine**, 2015.

KOYANAGI, Y. et al. In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. **Virology**, v. 196, n. 1, p. 25-33, 1993.

KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. Protein blotting: a review. **Journal of Immunological Methods**, v. 274, p. 1 – 15, 2003.

LA GRENADE, L. et al. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. **Lancet**, v. 336, p.1345-1347, 1990.

LAVALLIE, E. R. et al. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm. **Biotechnology**, v. 11, p.187-193, 1993.

LE BLANC et al. HTLV-1 structural proteins. **Virus Research**, v. 78, p. 5–16, 2001.

LEVINE P. H. et al. Geographic distribution of HTLV-I and identification of a new high risk population. **International Journal of Cancer**, v. 42, p. 7-12, 1988.

LEVINSON, S. S.; DENYS, G. A. Strengths and weaknesses in methods for identifying the causative agent(s) of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, v. 26, n. 4, p. 277-302, 1988.

LEVY A. J. et al. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. **Science**, v.225, p. 840-842, 1984.

LEVY A. J. Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection. **Microbiological Reviews**, v. 57, n. 1, P. 183-289, 1993.

LILLEHOJ, E. P. et al. Development and Evaluation of a Human T-Cell Leukemia Virus Type I Serologic Confirmatory Assay Incorporating a Recombinant Envelope Polypeptide. **Journal of clinical microbiology**, v. 28, n. 12, p. 2653-2658, 1990.

LY, D. L. et al. Evaluation of the sensitivity and specificity of six HIV combined p24 antigen and antibody assays. **Journal of Virological Methods**, v. 122, p. 185–194, 2004.

LY, T. D. et al. Contribution of Combined Detection Assays of p24 Antigen and Anti-Human Immunodeficiency Virus (HIV) Antibodies in Diagnosis of Primary HIV Infection by Routine Testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2459-2461, 2000.

MACKENZIE, W. R. et al. Multiple False-positive Serologic Tests for HIV, HTLV-1, and Hepatitis C Following Influenza Vaccination, 1991. **Journal of the American Medical Association**, v. 268, n. 8, p. 1015-7, 1992.

MAHBOUDI, F. et al. A serological screening assay of human immunodeficiency virus type 1 antibodies based on recombinant protein p24–gp41 as a fusion protein expressed in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 125, p. 295–303, 2006.

MAHIEUX, R.; GESSAIN, A. The human HTLV-3 and HTLV-4 retroviruses: new members of the HTLV family. **Pathologie-biologie**, v. 57, p.161–166, 2009.

MAJOROVITS, E. Human T-Lymphotropic Virus-1 Visualized at the Virological Synapse by Electron Tomography. **PLoS ONE**, v. 3, n. 5, p. 1-10, 2008.

MAKRIDES, S. C. Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in *Escherichia coli*. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 3, p. 512–538, 1996.

MALM, K; KJERSTADIUS, T; ANDERSSON, S. Evaluation of a new screening assay for HTLV-1 and -2 antibodies for large-scale use. **Journal of medical virology**, v. 82, n. 9, p. 1606-11, 2010.

MANNS, A. et al. Detection of Early Human T-cell Lymphotropic Virus Type I Antibody Patterns During Seroconversion Among Transfusion Recipients. **Blood**, v. 77, n. 4, p. 896- 905, 1991.

MANNS, A.; HISADA, M.; LA GRENADE, L. Human T-lymphotropic virus type I infection. **The Lancet**, v. 353, p. 1951-1958, 1999.

MANUAL TÉCNICO PARA INVESTIGAÇÃO DA TRANSMISSÃO DE DOENÇAS PELO SANGUE. Disponível em: <
http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/sangue/hemovigilancia/manual_doenca.pdf
>. Acesso em: 21 de Fev. 2015.

MARIN, M. H. et al. Study of the peptide length and amino acid specific substitution in the antigenic activity of the chimeric synthetic peptides, containing the p19 core and gp46 envelope proteins of the HTLV-I virus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 336, p. 983–986, 2005.

MASUR, H. et al. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. **New England Journal of Medicine**, v. 305, n. 24, p. 1431-1438, 1981.

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

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

McCUTCHAN, F. E. Understanding the genetic diversity of HIV-1. **AIDS**, v. 14 (Suppl 3), p. 31-44, 2000.

MERGULHÃO, F. J. M.; SUMMERS, D. K.; MONTEIRO, G. A. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. **Biotechnology Advances**, v. 23, p. 177 – 202, 2005.

MOCHIZUKI, M. et al. Uveitis associated with human T lymphotropic virus type I: seroepidemiologic, clinical, and virologic studies. **The Journal of infectious diseases**, v. 166, n. 4, p. 943-4, 1992.

MOMANY, C. et al. Crystal structure of dimeric HIV-1 capsid protein. **Nature Structural Biology**, v. 3, p. 763-770, 1996.

MONTERO, M. et al. The Membrane-Proximal External Region of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope: Dominant Site of Antibody Neutralization and Target for Vaccine Design. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 1, p. 54–84, 2008.

MUKHOPADHYAY, A. Inclusion Bodies and Purification of Proteins in Biologically Active Forms. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 56, p. 61-109, 1997.

MURBY, M.; UHLÉN, M; STAHL, S. Upstream Strategies to Minimize Proteolytic Degradation upon Recombinant Production in *Escherichia coli*. **Protein Expression And Purification**, v. 7, p.129–136, 1996.

MURPHY, E. L. et al. Increased Prevalence of Infectious Diseases and Other Adverse Outcomes in Human T Lymphotropic Virus Types I– and II–Infected Blood Donors. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 176, p. 1468–75, 1997.

NAM, S. H. et al. Characterization of Ribosomal Frameshifting for Expression of pol Gene Products of Human T-Cell Leukemia Virus Type I. **Journal of Virology**, v. 67, n. 1, p.196-203, 1993.

NELSON, M. et al. British HIV Association and British Infection Association guidelines for the treatment of opportunistic infection in HIV-seropositive individuals. **HIV Medicine**, v. 12 Suppl 2, p. 100-140, 2011.

OLIERE, S. et al. Modulation of innate immune responses during human T-cell leukemia virus (HTLV-1) pathogenesis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 22, p. 197–210, 2011.

OSAME, M. et al. HTLV-1 associated myelopathy, a new clinical entity. **Lancet**, v. 1, p. 1031-2, 1986.

PAGE, J. B. et al. HTLV-I/II seropositivity and death from AIDS among HIV-1 seropositive intravenous drug users. **Lancet**, v. 335, n.8703, p. 1439-41, 1990.

PAIVA, L. B. **Análise estratégica da indústria brasileira de reagentes para diagnóstico e das potencialidades do instituto de tecnologia em**

imunobiológicos frente aos desafios da saúde no Brasil. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Imunobiológicos), Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

PANDORI, M. W. et al. Assessment of the ability of a fourth-generation immunoassay for human immunodeficiency virus (HIV) antibody and p24 antigen to detect both acute and recent HIV infections in a high-risk setting. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 8, p. 2639-2642, 2009.

PAVIE, J. et al.. Sensitivity of Five Rapid HIV Tests on Oral Fluid or Finger-Stick Whole Blood: A Real-Time Comparison in a Healthcare Setting. **Plos One**, v. 5, n. 7, p. e11581, 2010.

PEETERS, M.; SHARP, P. M. Genetic diversity of HIV-1: the moving target. **AIDS**, v. 14 (Suppl 3), p. 129-40, 2000.

PERRON, H. et al. Antibody to reverse transcriptase of human retroviruses in multiple sclerosis. **Acta psychiatrica et neurologica Scandinavica**, v. 84, p. 507-513, 1991.

PIERONI, J. P.; REIS, C.; SOUSA, J. O. B. A indústria de equipamentos e materiais médicos, hospitalares e odontológicos: uma proposta de atuação do BNDES. **BNDES Setorial**, v. 31, p.185-226, 2010.

PINTO, M. T. et al. Human T-lymphotropic virus type I and type II infections and correlation with risk factors in blood donors from São Paulo, Brazil. **Transfusion**. v. 35, n. 3, p. 258-63, 1995.

POHLOD, D; SARAVOLATZ, L. Comparison of Five commercial Western Blot kits for Detection of Human Immunodeficiency Virus 1. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 10, p. 453-457, 1991.

POPOVIC, M. et al. Detection, Isolation, and Continuous Production of Cytopathic Retroviruses (HTLV-111) from Patients with AIDS and Pre-AIDS. **Science**, v.224, p. 497- 500, 1983.

POIGNARD, P. W. et al. GP120: Biologic Aspects of Structural Features. **Annual Reviews of Immunology**, v. 19, p. 253-274, 2001.

POIESZ, B. J. et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, p. 7415-9, 1980.

PRESTON, B. D.; DOUGHERTY, J. P. Mechanisms of retroviral mutation. **Trends in microbiology**, v. 4. n. 1. p. 16-21, 1996.

PROIETTI, F. A. et al. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. **Oncogene**, v.24, p. 6058–6068, 2005.

PROFY, A. T. et al. Epitopes recognized by the neutralizing antibodies of an HIV-1-infected individual. **Journal of Immunology**, v. 144, n. 12, p. 4641-7, 1990.

PRUETT, C. R. et al. The Use of Rapid Diagnostic Tests for Transfusion Infectious Screening in Africa: A Literature Review. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 29, n. 1, p. 35-44, 2015.

QIU, X. et al. Evaluation of a New, Fully Automated Immunoassay for Detection of HTLV-I and HTLV-II Antibodies. **Journal of Medical Virology**, v. 80, p. 484–493, 2008.

RACHID, M.; SCHECHTER, M. **Manual de HIV/AIDS**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 2005.

RAMOS, C. R. R. et al. A high-copy T7 Escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1103-1109, 2004.

RAQNI, M. V. et al. Acquired immunodeficiency syndrome in the child of a haemophiliac. **Lancet**, v.1, n. 8421, p. 133-5, 1985.

RAVANSHAD, M. *et al.* Evaluation of a new dot blot assay for confirmation of human immunodeficiency virus type 1 and 2 infections using recombinant p24, gp41, gp120 and gp36 antigens. **Saudi medical journal**, v. 27, n. 1, p. 31-36, 2006.

RIBAS, J. G. R; MELO, G. C. N. Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 377-384, 2002.

ROBERTSON, D. L. et al. Recombination in HIV-1. **Nature**, v. 374, p.124–6, 1995.

ROBERTSON, D. L. *et al.* HIV-1 nomenclature proposal. **Science**, v. 288, n. 5463, p. 55-6, 2000.

RODGERS-JOHNSON, P. et al. HTLV-I and HTLV-III antibodies and tropical spastic paraparesis. **Lancet**, v. 2, p. 1247-1249, 1985.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 172, p. 1-17, 2014.

RUSSO-CARBOLANTE, E. M. S. et al. Clonagem e expressão da glicoproteína transmembrana do vírus linfotrófico de células T humanas em sistema procarioto.

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 40, n. 3, p. 277-281, 2007.

SAAH, A. J. et al. Detection of early antibodies in human immunodeficiency virus infection by enzymelinked immunosorbent assay, Western blot, and radioimmunoprecipitation. **Journal of clinical microbiology**, v. 25, n. 9, p. 1605-1610, 1987.

SABINO, E. C. et al. Evaluation of the INNO-LIA HTLV I/II assay for confirmation of human Tcell leukemia virus-reactive sera in blood bank donations. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p.1324-8, 1999.

SAKALIAN, M; HUNTER, E. Molecular Events in the Assembly of Retrovirus Particles. **Advances in experimental medicine and biology**, n. 440, p. 329-39, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harb Lab Press, p. 20–25, 1989.

SANGER, F; NICKLEN, S; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SAVILLE, R. D. et al. Fourth-Generation Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Simultaneous Detection of Human Immunodeficiency Virus Antigen and Antibody. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 7, p. 2518–2524, 2001.

SATO, A. et al. Human sera from varicella-zoster virus (VZV) infections cross-react with human T cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1): common epitopes in VZV gene 22 protein and HTLV-1 p19 gag protein. **The Journal of General Virology**, v. 73, n. 11, p. 2969-2973, 1992.

SCARLATA, S.; CARTER, C. Role of HIV-1 Gag domains in viral assembly. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1614, p. 62 – 72, 2003.

SCHREIBER, G. B. et al. The risk of transfusion-transmitted viral infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 334, p. 1685-1690, 1996.

SHUMAN, S. Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 32678-32684, 1994.

SCHÜPBACH, J. et al. Diagnostic performance of line-immunoassay based algorithms for incident HIV-1 infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, n. 88, p. 1-15, 2012.

SIEGAL, F. P. et al. Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. **New England Journal of Medicine**, v. 305, n. 24, p. 1439-1444, 1981.

SILVA, E. A. et al. HTLV-II Infection Associated With A Chronic Neurodegenerative Disease: Clinical and Molecular Analysis. **Journal of Medical Virology**, v. 66, p. 253-257, 2002.

SINGH, S. M.; PANDA, A. K. Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 4, p. 303–310, 2005.

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

SOUTSCHEK, E.; HOFLACHER, B.; MOTZ, M. Purification of a recombinantly produced transmembrane protein (gp41) of HIV I. **Journal of Chromatography**, v. 521, p. 267-277, 1990.

STOTT, D. I. Immunoblotting and dot blotting. **Journal of Immunological Methods**, v. 119, p.153-187, 1989.

SYED, I. H. et al. HIV-1 western blot assay: What determines an indeterminate status? **Indian Journal of Medical Sciences**, v. 59, p. 443-450, 2005.

TALMADGE, K.; GILBERT, W. Cellular location affects protein stability in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, p. 1830-1833, 1982.

TANG, S. et al. Characterization of Immune Responses to Capsid Protein p24 of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Implications for Detection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 8, p. 1244–1251, 2010.

TEGEL, H. et al. Increased levels of recombinant human proteins with the *Escherichia coli* strain Rosetta(DE3). **Protein Expression and Purification**, v. 69, p. 159–167, 2010.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 211–223, 2006.

THIEDE, B. et al. Peptide mass fingerprinting. **Methods**, v. 35, p. 237–247, 2005.

THORSTENSSON, R.; ALBERT, J.; ANDERSSON, S. Strategies for diagnosis of HTLV-I and -II. **Transfusion Complications**, v. 42, p. 780-791, 2002.

TINGUELY, C. et al. Comparison of a conventional HIV 1/2 line immunoassay with a rapid confirmatory HIV 1/2 assay. **Journal of Virological Methods**, v. 206, p. 1–4, 2014.

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

TOMARAS, G. D. et al. Initial B-Cell Responses to Transmitted Human Immunodeficiency Virus Type 1: Virion-Binding Immunoglobulin M (IgM) and IgG Antibodies Followed by Plasma Anti-gp41 Antibodies with Ineffective Control of Initial Viremia. **Journal of Virology**, v. 82, n. 24, p. 12449–12463, 2008.

TOMARAS, G. D.; HAYNES, B. F. HIV-1-specific antibody responses during acute and chronic HIV-1 infection. **Current opinion in HIV and AIDS**, v. 4, n. 5, p. 373–379, 2009.

TSUMOTO, K. et al. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. **Protein Expression and Purification**, v. 28, p.1–8, 2003.

UCHIYAMA, T. et al. Adult T-cell leukemia: Clinical and Hematologic Features of 16 cases. **Blood**, v. 50, n. 3, 1977.

UNAIDS. Global Statistics. Disponível em: <http://www.unaids.org/sites/default/files/en/media/unaids/contentassets/documents/factsheet/2014/20140716_FactSheet_en.pdf>. Acesso em: 19 Fev. 2014a.

VALLEJO, L. F.; RINAS, U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. **Microbial Cell Factories**, v. 3, p. 1–11, 2004.

VANDERMARLIERE, E.; MUELLER, M; MARTENS, L. Getting Intimate With Trypsin, **The Leading Protease In Proteomics**, v. 32, n. 6, p. 453–465, 2013.

VAN DE PERRE, P.; CARTOUX, M. Retroviral transmission and breast-feeding. **Clinical microbiology and infection**, v. 1, p. 6-12, 1995.

VARMA, M. et al. Enhanced Specificity of Truncated Transmembrane Protein for Serologic Confirmation of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 Infections by Western Blot (Immunoblot) Assay Containing Recombinant Envelope Glycoproteins. **Journal of clinical microbiology**, v. 33, n. 12, p. 3239–3244, 1995.

VIANA, I. F. T. **Produção e validação de antígenos recombinantes dos vírus HIV1/2 e HTLV1/2 para o desenvolvimento de kits de diagnostico através de microarranjos líquidos**. Dissertação (Mestrado em genética), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

VIANA, A. L. D. et al. Saúde, desenvolvimento e inovação tecnológica: nova perspectiva de abordagem e de investigação. **Lua Nova**, v. 83, p. 41-77, 2011.

VRIELINK, H. et al. Comparision of four HTLV-I and HTLV-I + II ELISAs. **Vox Sanguinis**, n. 76, p. 187-91, 1999.

VRIELINK, H; REESINK, H. W. HTLV-I/II Prevalence in Different Geographic Locations. **Transfusion Medicine Reviews**, v.18, n. 1, p. 46-57, 2004.

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

WEBER, B. et al. Multicenter Evaluation of a New Automated Fourth-Generation Human Immunodeficiency Virus Screening Assay with a Sensitive Antigen Detection Module and High Specificity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 1938–1946, 2002.

WELSH, J. S. Contagious cancer. **Oncologist**, v. 16, p. 1-4, 2011.

WINGFIELD, P. T. Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from *Escherichia coli*. In: **Current Protocols in Protein Science**, p. 631-645, 2002.

WINKLER, C, et al. Silver- and Coomassie-staining protocols: detection limits and compatibility with ESI MS. **Electrophoresis**, v. 28, n. 12, p. 2095-9, 2007.

WONG-STAAAL, F. The AIDS Virus: What We Know and What We Can Do About It. **Biomedical Science**, v. 155, p. 481-487, 1991.

WU, X. et al. Codon optimization reveals critical factors for high level expression of two rare codon genes in *Escherichia coli*: RNA stability and secondary structure but not tRNA abundance. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 313, p. 89–96, 2004.

YASUNAGA, J; MATSUOKA, M. Molecular mechanisms of HTLV-1 infection and pathogenesis. **International journal of hematology**, v. 94, p. 435–442, 2011.

YAO, K. et al. Human T Lymphotropic Virus Types I and II Western Blot Seroindeterminate Status and Its Association with Exposure to Prototype HTLV-I. **The Journal of Infectious Diseases**, v.193, n. 3, p. 427-437, 2006.

YOSHIDA, M.; MIYOSHI, I.; HINUMA, Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, p. 2031-2035, 1982.

10 ANEXOS

Anexo 1 - Comprovante de aprovação do comitê de ética.

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO www.hcrp.fmrp.usp.br	
Ribeirão Preto, 18 de novembro de 2008		
Ofício nº 4163/2008 CEP/MGV		
<u>PROCESSO HCRP nº 2485/2008</u>		
Prezada Doutora:		
O Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP e da FMRP-USP, informa a Vossa Senhoria que o trabalho intitulado “PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS RECOMBINANTES ANTIGÊNICOS DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV-1) EM SISTEMA HETERÓLOGO”, analisado na 275ª Reunião Ordinária realizada em 13/10/2008 e considerado <u>APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</u>, será acompanhado por este Comitê de Ética em Pesquisa.		
Portanto, não havia necessidade de ter enviado o referido projeto para análise pela CONEP.		
<u>Lembramos a Vossa Senhoria que devem ser encaminhados a este Comitê, relatórios semestral e final da pesquisa.</u>		
Atenciosamente.		
 DR^a. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP e da FMRP-USP		
Ilustríssima Senhora DR^a. ELISA MARIA DE SOUSA RUSSO CARBOLANTE Fundação HEMOCENTRO de Ribeirão Preto		

Anexo 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido.

FUNDAÇÃO HEMOCENTRO DE RIBEIRÃO PRETO

Projeto de pesquisa: Produção de proteínas e peptídeos recombinantes antigênicos do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) em sistema heterólogo

Pesquisadores: Dra Elisa Maria de Sousa Russo Carbolante, Dra Virgínia Picanço e Castro, Dra Alcyoni Artioli Machado, Dra Dimas Tadeu Covas

Endereço: Rua Tenente Catão Roxo nº 2501 Monte Alegre Ribeirão Preto – SP

Telefone: (16) 2101-9300 Ramal 9697

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Estamos fazendo uma pesquisa que necessita de sangue de pessoas infectadas com o vírus HIV. Gostaríamos que o senhor(a) participasse desta pesquisa. Para isso precisaríamos de somente 5 mL de sangue do senhor(a), o tubinho pequeno usado na colheita de sangue que normalmente se faz para os exames. A colheita do sangue também é igual àquela que é feita para os exames de laboratório. Será colhido por punção da veia do braço do senhor(a) com uso de material totalmente descartável. Não há risco algum para o senhor(a) de pegar nenhuma doença, o material é totalmente descartável e é uma punção simples, e o senhor(a) sentirá apenas a picada da agulha, um desconforto muito bem tolerado pela maioria das pessoas.

Nós precisamos de sangue de pacientes porque o vírus não é encontrado livremente, ele está sempre nas pessoas. O sangue é a fonte de maior quantidade de vírus. O que pretendemos com este estudo é conseguir copiar pedaços do DNA do vírus, através de métodos de laboratório que envolvem técnicas chamadas de Biologia Molecular. O objetivo de se copiar o DNA do vírus é para poder fazer proteínas que parecem aquelas do vírus. Essas proteínas poderão ser empregadas nos testes para o diagnóstico de novos pacientes. Caso isso seja feito, os testes podem ficar bem mais baratos porque o que temos hoje são testes importados. Os testes sendo mais baratos podem permitir que um número maior de pessoas faça o teste. Desse modo, o(a) senhor(o) poderá ajudar para que mais pessoas sejam diagnosticadas precocemente e assim, elas poderão tomar medidas para não transmitir a doença além de se tratarem adequadamente.

De maneira alguma, o seu nome será usado ou revelado a ninguém. O(a) senhor(a) não tem obrigação nenhuma de participar, caso não queira, não tem problema, essa pesquisa é completamente independente do tratamento ou atendimento do(a) senhor(a) aqui. Além disso, se em qualquer momento o senhor(a) não quiser mais participar, tem todo o direito, é só entrar em contato conosco e dizer que não quer participar mais e retirar o consentimento.

Suspenderemos a pesquisa caso não consigamos a amplificação do DNA proviral presente no sangue dos indivíduos participantes, por problemas técnicos e metodológicos. A suspensão do recrutamento acontecerá quando cinco indivíduos concondem em participar da pesquisa.

Caso concorde em participar e daqui a algum tempo quiser saber como está a pesquisa, pode nos procurar que daremos os esclarecimentos que o(a) senhor(a) desejar. O(a) senhor(a) não terá gasto algum para participar e se o senhor por acaso tenha tido algum gasto para estar aqui exclusivamente para participar da nossa pesquisa, como por exemplo, o transporte, nos apresente o ticket que nós o reembolsaremos.

FUNDAÇÃO HEMOCENTRO DE RIBEIRÃO PRETO

“Eu fui devidamente esclarecido sobre a pesquisa intitulada: Produção de proteínas e peptídeos recombinantes antigênicos do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) em sistema heterólogo.

Declaro a minha decisão em participar. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, o procedimento a ser realizado, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer hora, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido. A minha assinatura neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE dará autorização aos pesquisadores para utilizarem os dados obtidos quando se fizer necessário, incluindo a divulgação dos mesmos, sempre preservando minha privacidade.

Assino o presente documento em duas vias de igual teor e forma, ficando uma em minha posse.”

_____, ____ de ____ de ____
(Local) (dia) (mês) (ano)

Nome e Assinatura do sujeito da pesquisa: _____

Nome e Assinatura do pesquisador responsável: _____

Anexo 3 - Vetores

Figura 49 – O vetor pCMVΔR8.91 contém as sequências codificadoras do gene gag do HIV-1 e foi usado para obtenção da sequência gênica da p24.

pET-20b(+) sequence landmarks

T7 promoter	353-369
T7 transcription start	352
<i>pelB</i> coding sequence	224-289
Multiple cloning sites (<i>Nco</i> I - <i>Xho</i> I)	158-225
His*Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
pBR322 origin	1500
<i>bla</i> coding sequence	2261-3118
<i>f1</i> origin	3250-3705

Figura 52 – Mapa do vetor pET20b(+).

pET-28a-c(+) Vectors

TB074 12/98

	Cat. No.
pET-28a DNA	69864-3
pET-28b DNA	69865-3
pET-28c DNA	69866-3

The pET-28a-c(+) vectors carry an N-terminal His•Tag®/thrombin/T7•Tag® configuration plus an optional C-terminal His•Tag sequence. Unique sites are shown on the circle map. Note that the sequence is numbered by the pBR322 convention, so the T7 expression region is reversed on the circular map. The cloning/expression region of the coding strand transcribed by T7 RNA polymerase is shown below. The f1 origin is oriented so that infection with helper phage will produce virions containing single-stranded DNA that corresponds to the coding strand. Therefore, single-stranded sequencing should be performed using the T7 terminator primer (Cat. No. 69337-3).

pET-28a(+) sequence landmarks

T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His•Tag coding sequence	270-287
T7•Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites (<i>Bam</i> H I - <i>Xho</i> I)	158-203
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lac</i> I coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
f1 origin	4903-5358

The maps for pET-28b(+) and pET-28c(+) are the same as pET-28a(+) (shown) with the following exceptions: pET-28b(+) is a 5368bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-28c(+) is a 5367bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 198.

Figura 53 – Mapa do vetor pET28a(+).

pET-32a-c(+) Vectors

TB122 12/98

pET-32a DNA	69015-3
pET-32b DNA	69016-3
pET-32c DNA	69017-3

The pET-32 series is designed for cloning and high-level expression of peptide sequences fused with the 109aa Trx•Tag™ thioredoxin protein (1). Cloning sites are available for producing fusion proteins also containing cleavable His•Tag® and S•Tag™ sequences for detection and purification. Unique sites are shown on the circle map. Note that the sequence is numbered by the pBR322 convention, so the T7 expression region is reversed on the circle map. The cloning/expression region of the coding strand transcribed by T7 RNA polymerase is shown below. The f1 origin is oriented so that infection with helper phage will produce virions containing single-stranded DNA that corresponds to the coding strand. Therefore, single-stranded sequencing should be performed using the T7 terminator primer (Cat. No. 69337-3).

1. LaVallie, E.R., DiBiasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F. and McCoy, J.M. (1993) *BioTechnology* 11, 187-193.

pET-32a(+) sequence landmarks

T7 promoter	764-780
T7 transcription start	763
Trx•Tag coding sequence	366-692
His•Tag coding sequence	327-344
S•Tag coding sequence	249-293
Multiple cloning sites	
(Nco I - Xho I)	158-217
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
lacI coding sequence	1171-2250
pBR322 origin	3684
bla coding sequence	4445-5302
f1 origin	5434-5889

The maps for pET-32b(+) and pET-32c(+) are the same as pET-32a(+) (shown) with the following exceptions: pET-32b(+) is a 5899bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*HI at 198. pET-32c(+) is a 5901bp plasmid; add 1bp to each site beyond *Bam*HI at 198 except for *Eco*R V, which cuts at 209.

pET-32a-c(+) cloning/expression region

Figura 54 – Mapa do vetor pET32a(+).