

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

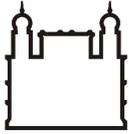
MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS

**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DE ENVELOPE E DO VÍRUS DA FEBRE
AMARELA EM *Leishmania tarentolae***

MICHEL GOMES CHAGAS

RIO DE JANEIRO

2013



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia
em Imunobiológicos
Bio-Manguinhos

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

MICHEL GOMES CHAGAS

**Expressão da Proteína de Envelope E do Vírus da Febre Amarela em
*Leishmania tarentolae***

Dissertação apresentada ao Instituto de
Tecnologia em Imunobiológicos como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Tecnologia de Imunobiológicos

RIO DE JANEIRO

2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas / ICICT / FIOCRUZ - RJ

C433 Chagas, Michel Gomes

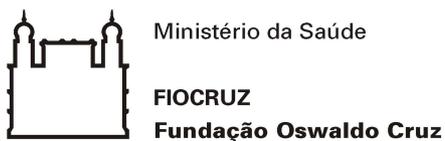
Expressão da proteína de envelope e do vírus da febre amarela em *Leishmania tarentolae* / Michel Gomes Chagas. – Rio de Janeiro, 2013.
xvii,90 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Pós-Graduação em Tecnologia de Imunobiológicos, 2013.
Bibliografia: f. 75-82

1. Proteína recombinante. 2. Vírus da febre amarela. 3. *Leishmania tarentolae*. 4. Sistemas de expressão. 5. Proteína E. I. Título.

CDD 616.91854

Trabalho realizado no Laboratório de Tecnologia Recombinante, no Instituto de Tecnologia de Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz, sob a orientação do Dr. Marco Alberto Medeiros.



INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

MICHEL GOMES CHAGAS

Expressão da proteína de Envelope E do Vírus da Febre Amarela em
Leishmania tarentolae

ORIENTADOR: Dr. Marco Alberto Medeiros

Dissertação defendida em 23 de Maio de 2013

Examinadores:

Dr. Renato Porrozzzi de Almeida (Presidente)
Intituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Dra. Verônica Salerno Pinto
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Dr. Douglas McIntosh
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)

Rio de Janeiro

2013

A minha querida mãe.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe Fabiane de Moura Gomes, por toda a ajuda prestada durante os longos anos de estudo e aperfeiçoamento acadêmico. Além do incentivo e apoio moral manteve os seus esforços, arcando com todos os custos para minha formação frente às adversidades. Lembro-me sempre de minha mãe dizendo que queria ter um filho doutor. Falta pouco.

Agradeço ao Nelson Corrêa Pereira, um grande amigo que se revelou um verdadeiro referencial a ser alcançado, proporcionando estabilidade para que pudesse desenvolver meu potencial desde muito antes da graduação.

Agradeço a Fundação Oswaldo Cruz e a Bio-Manguinhos pela oportunidade e condições oferecidas de cursar em uma das mais respeitadas instituições de ensino e pesquisa do mundo.

Agradeço a coordenação, Sheila Farage e José Antônio Pinto, ao secretariado, Zaíra Antunes Prado, e a comissão de pós-graduação do curso de mestrado profissional em tecnologia de imunobiológicos pelo bom regimento do curso nesses últimos dois anos e pela agilidade na resolução dos entraves surgidos no caminho.

Agradeço ao Dr. Marco Alberto Medeiros por me aceitar como seu aluno de mestrado e me presentear com um projeto com o qual tanto me identifiquei. Aprendi muito sob sua orientação, e me sinto a vontade em expressar minha gratidão por todo o tempo disposto ao me ajudar no projeto. Relevando minhas falhas como aluno, sempre procurou me ajudar da melhor forma possível fazendo tudo que estava ao seu alcance.

Agradeço a Maria Luiza Borges de Azevedo por todos os ensinamentos passados e por sempre estar ao meu lado nas dificuldades enfrentadas com os trabalhos experimentais. Para mim transformou-se na figura de uma mãe, a “mãe científica”. Sempre muito paciente e carinhosa nunca deixou de acreditar em mim, trazendo-me vozes de apoio e estímulo.

Agradeço a toda equipe e amigos do Laboratório de Tecnologia Recombinante, dividida entre o pavilhão Rocha Lima e Rock feller, pelo bom convívio. Aos alunos e funcionários do LATER expresso toda minha gratidão, pois todos sem exceção tiveram sua participação no presente trabalho. Agradeço a Aline Martins, Aline de Almeida, Ana

Carolina, Ana Paula, Camila Borges, Carlos Otávio, Carolina Lessa, Claudio Marcos, Cristiane Pinheiro, Daniel Tait, Eliane Barbosa, Eneida Santos, Gabriela Santos, Maria da Glória, Maria Luiza, Haroldo Cid, João de Mello, José Procópio, Lucas de Almeida, Luiz Vidal, Marina Rosa, Rafael Lowson e a Renata Fajardo por me permitirem fazer parte desta grande família.

Agradeço aos meus colegas da turma MPTI 2011 com os quais permaneci por muito tempo e com os quais também compartilhei muitos bons momentos. Agradeço especialmente as minhas colegas de turma Anna Érika, Diana Praia e a Ingrid Medeiros, com as quais tive maior convívio no dia a dia, pelas horas de apoio e momentos de descontração.

Agradeço Dr. Claudia Masini d Avila Levy, amiga e pesquisadora da Fundação Oswaldo Cruz, e aos seus alunos Bianca e Vitor, pela ajuda e conselhos a respeito desta dissertação, e por cederem alíquotas de sua coleção de oligonucleotídeos para que pudessem ser realizados alguns dos experimentos deste trabalho.

Agradeço a Dr. Leila Mendonça Lima, pesquisadora da Fundação Oswaldo Cruz e aos seus alunos pelo auxílio prestado no experimento *Western Blotting*, e pelas sugestões e esclarecimentos envolvendo o trabalho.

Agradeço a todos que, de uma maneira ou de outra, contribuíram na realização deste projeto.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE GRÁFICOS	x
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Vírus da Febre Amarela.....	1
1.1.1 – Histórico	1
1.1.2 – Classificação e Morfologia.....	5
1.1.4 – Manifestações Clínicas.....	8
1.1.5 – Epidemiologia.....	8
1.1.6 – Diagnóstico.....	13
1.1.7 – Prevenção e Controle.....	13
1.2 – Sistemas de Expressão.....	16
1.3 – Sistema de Expressão em <i>L. tarentolae</i>	18
1.4 – Expressão Gênica em Tripanossomatídeos.....	22
2 – OBJETIVOS	26
2.1 – Objetivos Específicos	26
3 – MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 – Cultivo da <i>L. tarentolae</i>	27
3.2 – Desenho dos Oligonucleotídeos	27
3.3 – Extração do RNA Viral	29
3.4 – RT-PCR e Purificação do Fragmento do Gene <i>E</i>	29
3.5 – Clonagem no Vetor de Transferência pLEXSY-hyg2.....	29
3.6 – Propagação da Construção pLEXSY/gene <i>E</i>	31
3.7 – Transfecção e Seleção das Células Hospedeiras.....	32

3.8 – Extração de DNA e PCR Diagnóstico dos Clones de <i>L. tarentolae</i>	33
3.9 – Sequenciamento.....	36
3.10 – Avaliação da Presença de Transcrito por RT-PCR.....	36
3.11 – Indução da Expressão e Purificação da Proteína E do Vírus da Febre Amarela Produzida em <i>Escherichia coli</i>	38
3.12 – Formulação da Vacina para Imunização e Obtenção do Soro Policlonal Contra a Proteína E produzida em <i>E. coli</i>	40
3.13 – Titulação do Soro Policlonal	41
3.14 – Cultivo Celular Para Expressão da Proteína E em <i>L. tarentolae</i>	42
3.15 – Avaliação da Expressão da Proteína Recombinante por SDS-PAGE	43
3.16 – Avaliação da Expressão da Proteína Recombinante por Immunoblotting.....	44
4 – RESULTADOS	45
4.1 – RT - PCR do gene <i>E</i>	45
4.2 – Clonagem no Vetor de Transferência pLEXSY-hyg2	45
4.3 – Seleção dos Clones Recombinantes Bacterianos.....	46
4.4 – Digestão com <i>SwaI</i>	48
4.5 – Seleção dos Clones Recombinantes de <i>L. tarentolae</i>	49
4.6 – PCR Diagnóstico	50
4.7 – Sequenciamento dos Clones Bacterianos e Eucariotos.....	53
4.8 – Detecção de Transcritos por RT-PCR	56
4.9 – Expressão e Purificação da Proteína E de <i>E. coli</i>	60
4.10 – Titulação e Padronização do Soro Imune Policlonal	62
4.11 – Avaliação da expressão da Proteína Recombinante Por SDS-PAGE.....	63
4.12 – Avaliação da Expressão da Proteína Recombinante Por Immunoblotting	65
5 – DISCUSSÃO	67
6 – CONCLUSÃO	74
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
8 – ANEXO 1	83
9 - ANEXO 2	84
10 - ANEXO 3	87

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ACRV** – Área com Recomendação de Vacina
- ASRV** – Área sem Recomendação de Vacina
- bla** – Gene de Resistência para β -Lactâmicos
- CS** – Sequência Conservada
- DEPC** – Dietilpirocarbonato
- EDTA** – Ácido Etilenodiaminotetracético
- EGFP** – Proteína de Fluorescência Verde, do inglês *Enhanced Green Fluorescent Protein*
- Fiocruz** – Fundação Oswaldo Cruz
- H1** – Região de Alfa Hélice 1
- H2** – Região de Alfa Hélice 2
- H6** – Sequência de Seis Histidinas Consecutivas
- hyg** – Gene de Resistência para Higromicina
- IL-12** – Interleucina 12
- LATER** – Laboratório de Tecnologia Recombinante
- LATEV** – Laboratório de Tecnologia Viroológica
- MPTI** – Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos
- NS1** – Proteína não Estrutural 1
- NS2A** – Proteína não Estrutural 2A
- NS2B** – Proteína não Estrutural 2B
- NS3** – Proteína não Estrutural 3
- NS4A** – Proteína não Estrutural 4A
- NS4B** – Proteína não Estrutural 4B
- NS5** – Proteína não Estrutural 5
- OPAS** – Organização Panamericana da Saúde
- ORF** – Fase de Leitura Aberta, do inglês *Open Reading Frame*
- OriC** – Origem de Replicação de *Escherichia coli*

PCFAD – Programa de Controle de Febre Amarela e Dengue

RE – Retículo Endoplasmático

SP – Peptídeo Sinal

ssu – Sub Unidade Menor, do inglês *Small Sub Unity*

TAE – Tampão Tris Acetado com Ácido Etilenodiaminatetracético

TM1 – Seguimento Transmembranar 1

TM2 – Seguimento Transmembranar 2

VDTEC – Vice Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico

γ -**INF** – Interferon Gama

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Sumário das proteínas já expressas em <i>L. tarentolae</i>	22
Tabela 3.1 – Sequência dos oligonucleotídeos utilizados.....	28
Tabela 3.2 – Sumário da reação de PCR diagnóstico.....	35
Tabela 4.1 – Valores da dosagem pelo método BCA da proteína E purificada de <i>E.coli</i>	61

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.1- Cobertura vacinal da febre amarela (World Health Organization/WHO).....	14
Gráfico 4.1- Curva padrão obtida por regressão linear que mostra a concentração de BSA versus a leitura da densidade ótica a 562nm. Dados obtidos na dosagem da proteína E produzida em <i>E.coli</i>	61
Gráfico 4.2- Perfil proliferativo das células selvagens e do clone #2.2 de <i>L. tarentolae</i> na presença e na ausência do antibiótico de seleção higromicina. Selvagem: células selvagens cultivadas na ausência do antibiótico. sel+hyg: células selvagen cultivadas na presença do antibiótico higromicina a 10 μ g/ml. #2.2: células do clone #2.2 cultivadas na ausência do antibiótico higromicina. #2.2+hyg: células do clone #2.2 cultivadas na presença do antibiótico higromicina a 10 μ g/ml.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1- Partícula viral do vírus da febre amarela. Vírion imaturo (intracelular) e maduro (extracelular). Nucleocapsídeo icosaédrico contendo a fita simples de RNA de polaridade positiva, com as proteínas E e pré-M/M inseridas no envelope lipídico (Adaptado de Gardner CL & Ryman KD, 2010).....	5
--	---

- Figura 1.2- Organização do genoma do vírus da febre amarela. A fita de RNA de polaridade positiva codifica 10 proteínas virais. Proteínas estruturais: C, pré-M e E. Proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. Sítio de clivagem por protease de origem viral (▼); sítio de clivagem por protease de origem celular (◆) (Sampath A & Padmanabhan R, 2009).....6
- Figura 1.3- Esquema preditivo da estrutura do monômero da proteína E dos *Flavivírus* (Allison SL et al. 1999).....7
- Figura 1.4- Ciclo de transmissão silvestre e ciclo de transmissão urbana na América do Sul e na África (Barrett ADT & Higgs S 2007).....9
- Figura 1.5- Zona endêmica para febre amarela. A região demarcada em amarelo representa as áreas com risco de transmissão da doença na África (A) e na América do Sul (B) (Gardner CL & Ryman KD, 2010).....10
- Figura 1.6- Classificação dos estados brasileiros quanto a área endêmica, de transição, indene ou de risco potencial para infecção do vírus da febre amarela (Centro de Vigilância Epidemiológica/2012).....11
- Figura 1.7- Zonas demarcadas de acordo com a recomendação da vacina contra o vírus da febre amarela (Ministério da Saúde, 2009).....12
- Figura 1.8- Comparação dos perfis de N-glicosilação nos diferentes sistemas de expressão de proteína recombinante (Jena Bioscience, 2012).....17
- Figura 1.9- Representação esquemática da morfologia dos tripanossomatídeos (adaptado de Docampo et al. 2005).....18
- Figura 1.10- Morfologia celular das formas evolutivas dos tripanossomatídeos (adaptado de Sousa, 2000).....19
- Figura 1.11- Representação esquemática simplificada da regulação gênica pós transcricional em tripanossomatídeos (Jena Bioscience, 2012).....25
- Figura 3.1- Mapa do vetor pLEXSY-hyg2 com os sítios de clonagem. A região *Stuffer* de 1Kpb deve ser substituída pelo gene de interesse. 5'*ssu* e 3'*ssu* são as regiões para a recombinação homóloga no gene para a sub-unidade menor (18S) do ribossomo no cromossomo hospedeiro. *Utr1*, *utr2* e *utr3* são regiões intergênicas otimizadas não codificantes que servem de sinal para *splicing* pós transcrição. SP representa a região de peptídeo sinal. H6 é região codificante para a cauda de seis histidinas. Origem de replicação de *E. coli* (Ori E.c). Marcadores de resistência para os antibióticos higromicina (*hyg*) e β-lactâmico (*bla*)......30
- Figura 4.1- Eletroforese em gel de agarose 1% com os produtos da amplificação do fragmento do gene *E* do vírus da febre amarela por RT-PCR. Linha 1: padrão 1Kb DNA ladder (Invitrogen Cat# 15615-016). Linha 2: controle positivo da amplificação. Linha 3: controle negativo da reação de amplificação. Linha 4: produto do RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para o fragmento do gene *E*.....45

Figura 4.2- Eletroforese em gel de agarose 1% com os fragmentos do vetor pLEXSY-hyg2 obtidos após digestão com as enzimas *KpnI* e *XbaI*. (a) Digestão primária com a enzima *KpnI*. Linha 1: padrão 1Kb DNA ladder (Invitrogen). Linha 2: plasmídeo não digerido com *KpnI*. Linha 3: vetor pLEXSY-hyg2 linearizado pela digestão. (b) Digestão secundária com a enzima *XbaI*. Linha 1: padrão 1Kb DNA ladder (Invitrogen). Linha 2: plasmídeo não digerido. Linha 3: vetor pLEXSY-hyg2 digerido *KpnI* e *XbaI*.....46

Figura 4.3- Eletroforese em gel de agarose 1% com os produtos da reação de PCR das colônias de *E. coli* TOP 10 possivelmente recombinantes utilizando-se os oligonucleotídeos específicos para o gene *E forward* Prot E FV e *reverse* Prot E FV. Tanto em (a) como em (b), linha 1: padrão 1Kb DNA ladder (Invitrogen), linha 2: controle negativo com uma colônia de *E. coli* TOP 10 recombinante para a proteína VP1 do vírus da hepatite A, linha 3: controle positivo fragmento do gene *E* purificado. As demais linhas representam produto da reação da PCR dos possíveis clones recombinantes. As linhas apontadas com as setas indicam um resultado negativo de determinada colônia em placa.....47

Figura 4.4- Eletroforese em gel de agarose 1% com os produtos das reações de digestão com *NcoI*. Linha 1: padrão 1Kb DNA ladder (Invitrogen). Linha 2: controle negativo com digestão do plasmídeo pLEXSY-hyg2 circular sem o inseto do gene *E*. Linha 3, linha 4 e linha 5 plasmídeos digeridos dos clones recombinantes #2, #3 e #4 respectivamente.....48

Figura 4.5- Eletroforese em gel de agarose 1% com o resultado da digestão da construção pLEXSY/gene *E*, extraída dos clones recombinantes, com a enzima de restrição *SwaI*. Linha 1: padrão 1Kb DNA ladder (Invitrogen). Linha 2, linha 3 e linha 4 representam respectivamente as digestão das construções extraídas de três clones diferentes #2, #3 e #4.....49

Figura 4.6- Eletroforese em gel de agarose 1% com o produto das reações de PCR diagnóstico nº1(a) e nº2 (b). Tanto em (a) como em (b), linha 1: padrão 1Kb DNA ladder (Invitrogen), linha 2: controle negativo onde o DNA foi substituído por água, linha 3: controle negativo com produto da reação com o material extraído da célula selvagem, linhas 4, 5, 6 e 7 representam os produtos das reações com o material genômico dos clones #pLEXSY linear, #2, #3 e #4 respectivamente, linhas 8 a 15 representam os produtos das reações com o material plasmidial extraído dos clones #2.1 ao #2.8 e #pLEXSY circular respectivamente.....51

Figura 4.7- Eletroforese em gel de agarose 1% com o produto reação de PCR diagnóstico nº3. Linha 1: padrão 1Kb DNA ladder (Invitrogen). Linha 2: controle negativo onde o DNA foi substituído por água. Linha3: controle negativo com produto da reação com o material extraído da célula selvagem. Linhas 4, 5, 6 e 7 representam os produtos das reações com o material genômico dos clones #pLEXSY linear, #2, #3 e #4 respectivamente. Linhas 8 a 15 representam os produtos das reações com o material plasmidial extraído dos clones #2.1 ao #2.8 e #pLEXSY circular respectivamente.....51

Figura 4.8- Eletroforese em gel de agarose 1% com o produto da reação de PCR diagnóstico nº4. Linha 1: padrão 1Kb DNA ladder (Invitrogen). Linha 2: controle negativo onde o DNA foi substituído por água. Linha3: controle negativo com produto da reação com o material extraído da célula selvagem. Linha 4: controle positivo com o fragmento do gene *E* clonado. Linhas 5, 6 e 7 representam os produtos das reações com o material genômico dos clones #2,

#3 e #4 respectivamente. Linhas 8 a 14 representam os produtos das reações com o material plasmidial extraído dos clones #2.1 ao #2.8 respectivamente.....52

Figura 4.9- Eletroforese em gel de agarose 1% com o produto da reação de PCR diagnóstico nº5. Linha 1: padrão 1Kb DNA ladder (Invitrogen). Linha 2: controle negativo onde o DNA foi substituído por água. Linha3: controle negativo com produto da reação com o material extraído da célula selvagem. Linha 4: representa o produto da reação com o material genômico do clone #pLEXSY linear. Linhas 5: representa o produto da reação com o material plasmidial do clone #pLEXSY circular. Linhas 6, 7 e 8 representam os produtos das reações com o material genômico dos clones #2, #3 e #4 respectivamente. Linhas 9 a 15 representam os produtos das reações com o material plasmidial extraído dos clones #2.1 ao #2.8 respectivamente.....53

Figura 4.10- Alinhamento entre as sequências de aminoácidos do gene *E* do vírus vacinal da febre amarela 17DD proveniente do LATEV e da sequência de referência YF17066 depositada no *Gene Bank*, bem como dos genes resultantes do processo de clonagem nos clones bacterianos.....54

Figura 4.11- Alinhamento entre as sequências de aminoácidos do gene *E* do vírus vacinal da febre amarela 17DD proveniente do LATEV e da sequência de referência YF17066 depositada no *Gene Bank*, bem como dos genes resultantes do processo de clonagem nos clones de *L. tarentolae*.....55

Figura 4.12- Eletroforese em gel de agarose com os produto da amplificação da reação de PCR a partir do molde de cDNA obtido do RT-PCR usando o RNA celular total das células selvagens e dos clones #2.1 ao #2.8 de *L. tarentolae* digerido com DNase. (a) Produto da reação com os oligonucleotídeos *forward* MinAB e *reverse* Prot E FV. Linha 1: padrão 1Kb DNA ladder (Invitrogen). Linha 2: controle negativo onde o material genético foi substituído por água. Linhas 3, 4 e 5: produto da reação como material genético obtido das células selvagens nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente. Linhas 6, 7 e 8: produto da reação como material genético obtido do clone #2.1 nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente. Linhas 9, 10 e 11: produto da reação como material genético obtido do clone #2.2 nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente. Linhas 12, 13 e 14: produto da reação como material genético obtido do clone #2.3 nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente. Linhas 15, 16 e 17: produto da reação como material genético obtido do clone #2.4 nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente. Linhas 18, 19 e 20: produto da reação como material genético obtido do clone #2.5 nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente. Linhas 21, 22 e 23: produto da reação como material genético obtido do clone #2.6 nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente. Linhas 24, 25 e 26: produto da reação como material genético obtido do clone #2.8 nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente. (b) Produto da reação com os oligonucleotídeos *forward* Prot E FV e *reverse* Prot E FV. Linha 1: padrão 1Kb DNA ladder (Invitrogen). Linha 2: controle positivo onde o material genético utilizado foi o fragmento de gene *E* clonado. Linha 3: controle negativo onde o material genético foi substituído por água. Linhas 4 a 27: produto das reações de amplificação do material genético obtido das células selvagens e dos clone recombinantes #2.1 ao #2.8 conforme descrito em (a).....57

Figura 4.13- Digestão do plasmídeo pLEXSY-hyg2 com a enzima DNase I. Linha 1: padrão 1Kb DNA ladder (Invitrogen). Linha 2: produto da digestão do DNA plasmidial com a enzima. Linha 3: amostra do plasmídeo não exposto a ação da enzima.....58

Figura 4.14- Eletroforese em gel de agarose 1% com os produtos das reações de amplificação do PCR utilizando os produtos das digestões com a enzima DNase do RNA celular total extraídos dos clones #2.1 ao #2.8 e células selvagens. Linha 1: padrão 1Kb DNA ladder (Invitrogen). Linha 2: controle positivo com fragmento do gene *E* clonado. Linha 3: controle negativo onde o DNA foi substituído por água. Linhas 4, 5 e 6: produto da reação como material genético obtido das células selvagens nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente. Linhas 7, 8 e 9: produto da reação como material genético obtido do clone #2.1 nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente. Linhas 10, 11 e 12: produto da reação como material genético obtido do clone #2.2 nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente. Linhas 13, 14 e 15: produto da reação como material genético obtido do clone #2.3 nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente. Linhas 16, 17 e 18: produto da reação como material genético obtido do clone #2.4 nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente. Linhas 19, 20 e 21: produto da reação como material genético obtido do clone #2.5 nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente. Linhas 22, 23 e 24: produto da reação como material genético obtido do clone #2.6 nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente. Linhas 25, 26 e 27: produto da reação como material genético obtido do clone #2.8 nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente.....59

Figura 4.15- Produto da amplificação da reação de PCR para avaliação do oligonucleotídeos MinAB. Linha1: padrão 100pb DNA Ladder (Invitrogen Cat# 15628-019). Linha 2: controle negativo onde o material genético foi substituído por água e contendo os oligonucleotídeos *forward* MinAB e *reverse* R8S. Linha3: produto a amplificação da reação com os oligonucleotídeos *forward* MinAB e *reverse* R8S. Linha 4: controle negativo onde o material genético foi substituído por água e contendo os oligonucleotídeos *forward* F8S e *reverse* R8S. Linha 5: produto a amplificação da reação com os oligonucleotídeos *forward* F8S e *reverse* R8S.....59

Figura 4.16- SDS-PAGE com as frações coletadas na purificação da proteína E de *E.coli*. Linha 1: padrão de peso molecular Bench Mark (Invitrogen Cat# 10747-012). Linha 2: lisado celular de *E.coli* antes da indução da expressão (F1). Linha 3: lisado celular de *E. coli* após indução da expressão (F2). Linha 4: *Flow Through* (F3). Linha 5: eluato da 1ª lavagem com o tampão nº1 (F4). Linha 6: eluato da 2ª lavagem com o tampão nº1 (F5). Linha 7: eluato da 1ª lavagem com o tampão nº2 (F6). Linha 8: eluato da 2ª lavagem com o tampão nº2 (F7). Linha 9: eluato da 1ª lavagem com o tampão nº3 (F8). Linha 10: eluato da 2ª lavagem com o tampão nº3 (F9). Linha 11: padrão de peso molecular Bench Mark (Invitrogen Cat# 10747-012). Linha 12: eluato da 1ª lavagem com o tampão nº4 (F10). Linha 13: eluato da 2ª lavagem com o tampão nº4 (F11). Linha 14: eluato da 1ª lavagem com o tampão nº5 (F12). Linha 15: eluato da 2ª lavagem com o tampão nº5 (F13). Linha 16: eluato da 1ª lavagem com o tampão nº6 (F14). Linha 17: eluato da 2ª lavagem com o tampão nº6 (F15). Linha 18: eluato da 1ª lavagem com o tampão nº7 (F16). Linha 19: eluato da 2ª lavagem com o tampão nº7 (F17). Linha 20: eluato da 3ª lavagem com o tampão nº7 (F18).....60

Figura 4.17- *Western Blotting* com 2µg da proteína E purificada de *E.coli*. Linha 1: Padrão de peso molecular Magic Mark XP *Western Blotting* Protein Standard (Invitrogen Cat# LC5602). Linha 2: Controle positivo com 2µg de proteína E de um extrato de cultura de células infectadas pelo vírus vacinal da febre amarela 17DD revelado com o soro na diluição 1:2.000. Linha 3: proteína E de *E.coli* revelado com o soro na diluição 1:8.000. Linha 4: proteína E de *E.coli* revelado com o soro na diluição 1:32.000. Linha5: proteína E de *E.coli* revelado com o soro na diluição 1:128.000. Linha 6: proteína E de *E.coli* revelado com o soro na diluição 1:512.000.....62

Figura 4.18- *Dot Blotting* com diferentes concentrações da proteína E de *E. coli* em cada linha, e diferentes diluições do soro policlonal em cada coluna. Cada coluna possui sete concentrações diferentes da proteína (250ng a 3ng), e cada uma das colunas foi submetida a uma diluição diferente do soro (1:2.000 a 1:512.000). O controle do soro pré-imune está representado como "Ctrl pré-imune". A coluna "His-tag" foi incubada com uma diluição de um anticorpo anti cauda de histidina "Anti-His6x" (Invitrogen Cat# 372900) na diluição 1:100.....63

Figura 4.19- SDS-PAGE com as amostras de sobrenadante de cultura (a) e *pellets* lisados centrifugados (b) de células de *L. tarentolae* selvagens e do clone #2.2. Tanto em (a) como em (b), linha 1: padrão de peso molecular Bench Mark (Invitrogen Cat# 10747-012). Linha 2: 2µg da proteína E purificada de *E. coli*. Linha 3: 2µg do extrato E33/1215 de cultura de células infectadas com o vírus vacinal 17DD. Linha4: 20 µg de proteínas totais das células selvagens incubadas em PBS Glucose 1%. Linha 5: 20µg de proteínas totais das células selvagens incubadas em RPMI. Linha 6: 20µg de proteínas totais das células do clone #2.2 incubadas em PBS Glucose 1%. Linha 7: 20µg de proteínas totais das células do clone #2.2 incubadas em RPMI.....64

Figura 4.20- Resultado do *Western Blotting* revelado com o substrato luminescente "SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate" (Thermo Scientific Cat# 34080) utilizando-se amostras de sobrenadante de cultura de células selvagens e do clone #2.2 cultivadas em PBS Glucose 1% e RPMI (b) e (c), e de amostras de *pellets* lisados de células selvagens e do clone #2.2 cultivados em PBS Glucose 1% e RPMI (e) e (f). Os filmes ficaram expostos à luminescência durante os tempos de 20min (b) e (e) e 1h (c) e (f). As membranas (a) e (d) representam a avaliação da qualidade da reação de transferência do *Western Blotting*. Na linha superior (a), (b) e (c) se encontram os resultados obtidos a partir do gel onde foram corridas as amostras de sobrenadantes, enquanto que na linha inferior (d), (e) e (f) se encontram os resultados obtidos a partir do gel onde foram corridas as amostras de *pellets* lisados.....66

RESUMO

Os tripanossomatídeos apresentam-se como potencial alternativa para expressão de proteínas heterólogas. O sistema de expressão baseado em *L. tarentolae* possui uma série de vantagens dentre os sistemas comumente utilizados, incluindo a capacidade de realizar modificações pós traducionais promovendo um padrão de glicosilação mais próximo ao realizado em proteínas sintetizadas por células de mamíferos. Além disso, esse protozoário é facilmente cultivável em meios de baixo custo obtendo-se altas densidades celulares em um curto espaço de tempo, e a possibilidade de secreção da proteína recombinante para o meio de cultura. O objetivo do trabalho é avaliar o potencial desta plataforma de expressão de proteínas recombinantes em *L. tarentolae* utilizando a proteína E do vírus vacinal da febre amarela 17DD como modelo experimental, para então estabelecer essa ferramenta de expressão no Laboratório de Tecnologia Recombinante. A partir do RNA viral da cepa vacinal, o gene de interesse foi amplificado por RT-PCR, clonado e propagado em *E.coli* TOP10 no vetor bifuncional pLEXSY-hyg2. Após a transfecção as células de *L. tarentolae* recombinantes foram obtidas através da seleção clonal em meio sólido seletivo com o antibiótico higromicina e confirmados por PCR e sequenciamento nucleotídico. As sequências nucleotídicas traduzidas em aminoácidos dos clones selecionados demonstraram uma identidade de 100% com a sequência molde do vírus vacinal. Obteve-se um anti soro policlonal a partir da proteína E recombinante produzida em *E.coli* BL21 DE3 Star. O soro foi caracterizado e demonstrou título de até 512.000, e embora gerado a partir de uma proteína recombinante foi capaz de reconhecer a proteína em sua forma nativa em um extrato de cultura de células infectadas com o vírus vacinal. A expressão da proteína E foi avaliada em amostras de sobrenadantes de cultura, em RPMI e PBS Glucose, e *pellets* celulares lisados de *L. tarentolae* por SDS-PAGE e *Western Blotting*. Contudo, os dados da expressão foram negativos. Ao se avaliar por RT-PCR o processamento pós-transcricional das moléculas de RNAm observou-se que os transcritos não possuíam a inserção da sequência *spliced leader* (SL) necessária para a tradução. Esses dados corroboram com os resultados negativos obtidos por SDS-PAGE e *Western Blotting*. Investigações futuras devem ser realizadas como o sequenciamento das regiões UTRs para verificação da presença das sequências necessárias para o fornecimento do sinal para a reação de *trans-splicing*.

ABSTRACT

The trypanosomatids are an alternative for heterologous protein expression. The *L. tarantolae*-based expression system has greater advantages compared to other commonly used platforms, including post-translational modifications on the target protein, such as a glycosylation pattern more similar to mammalian cells. Furthermore, these protozoans are easily cultivated in low cost mediums, providing high cell density in short period of time and allowing the secretion of the recombinant protein to the extracellular environment. The main goal of the present study was to evaluate the *L. tarantolae* expression platform using the 17DD Yellow Fever E protein as an experimental model and then apply the system as a new expression tool at LATER. The E gene was amplified by RT-PCR from the viral RNA, cloned and then propagated in *E. coli* TOP10 using the pLEXSY-hyg2 bifunctional vector. After transfection, *L. tarantolae* recombinant cells were obtained by clonal selection in selective solid medium with hygromycin antibiotic and confirmed by PCR and nucleotide sequencing analysis. The sequences obtained were translated into aminoacids and showed 100% identity with the template virus strain. Polyclonal antiserum was obtained from a purified recombinant E protein produced in *E. coli* BL21 DE 3 Star. The serum reached titles up to 512,000 and reacted with the native protein from virus-infected cell extract. The E protein production in *L. tarantolae* was evaluated in both the culture supernatant and lysed cell pellets by SDS-PAGE and Western Blotting. However, the expression results were negative. The analysis of the post-transcriptional process by RT PCR showed that the mRNA did not have the spliced leader (SL) sequence, which is needed for translation. The sequencing analysis of the UTR, which is important for signaling the correct trans-splicing sites, represents an important aspect for protein expression in *L. tarantolae* and will be assessed in further studies.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Vírus da Febre Amarela

1.1.1 – Histórico

O vírus da febre amarela é denominado de arbovírus (Arthropod-borne viruses), devido a sua transmissão se dar através da picada de um vetor artrópode. Das arboviroses que afetam humanos 13 são causadas por vírus da Família *Flaviviridae* Gênero *Flavivirus*, o qual inclui o vírus da febre amarela (Machado CM et al. 2009).

O primeiro relato de epidemia de uma doença semelhante à febre amarela é de um manuscrito da sociedade Maia de 1648, em Yucatan no México. A maioria dos pesquisadores concorda que a febre amarela se originou na África, se espalhando pelo mundo através das grandes navegações que mantinham rotas comerciais. Na Europa a doença já havia se manifestado antes dos anos 1700, mas foi em 1730 na Península Ibérica que se deu a primeira epidemia causando a morte de 2.200 pessoas. Nos séculos XVIII e XIX os Estados Unidos foram acometidos repetidas vezes por epidemias devastadoras, para onde a doença era levada através de navios procedentes das índias Ocidentais e do Caribe (Vasconcelos PF, 2003; Gardner CL & Ryman KD, 2010; Ministério da Saúde, 2012b).

A febre amarela foi o principal problema de saúde pública já enfrentado pelo Brasil, tanto pelo alto índice de letalidade como pelo desconhecimento da sua profilaxia e tratamento. No Brasil a primeira epidemia de febre amarela ocorreu em Recife/PE, quando ela se instalou no litoral brasileiro em 1685. Essa epidemia se repetiu na Bahia em 1686, onde se detectou a presença do vetor artrópode *Aedes aegypti* no local e logo depois se alastrou pelo interior do país. A primeira campanha sanitária foi posta em prática no Recife/PE em 1691, levando ao controle da doença que reapareceu em Salvador/BA e no Rio de Janeiro em 1849. Apesar das medidas de controle a propagação do vetor *A. aegypti* por todo território nacional levou a ocorrência de epidemias em quase todas as províncias do império entre 1848 e 1899 (Ministério da Saúde, 1999; Post PR et al. 2001; Vasconcelos PF, 2003).

A transmissão pelo mosquito foi proposta desde 1848, porém, somente em 1881 graças aos esforços do médico cubano Carlos Finlay foi comprovado que o *Stegomyia fasciata*, também conhecido como *A. aegypti*, era o transmissor da febre amarela. Em 1901 esse dado foi novamente constatado pelo médico norte americano Walter Reed, integrante da comissão de febre amarela do exército dos Estados Unidos (Monath TP, 1991; de Almeida, 2011). Walter Reed também foi capaz de mostrar que o mosquito *A. aegypti* podia transmitir a doença após um período de incubação de doze dias no corpo do inseto (Downs GW, 1968).

Estas descobertas trouxeram grandes benefícios para a população em geral, visto que a partir delas foi possível estabelecer um rígido controle ao inseto transmissor. Esse conhecimento possibilitou que William Crawford Gorgas, um médico general do exército dos Estados Unidos, promovesse a erradicação da doença em Havana (Cuba) e no Panamá ao fim do mesmo ano de 1901. Essas mesmas medidas também foram adotadas no Rio de Janeiro pelo médico sanitariaista Oswaldo Cruz, fundador do Instituto Soroterápico Nacional que no ano de 1903 ficou conhecido como Instituto Oswaldo Cruz, levando a eliminação da doença na capital federal, RJ, em 1909 (Downs GW, 1968). Entre 1928 e 1929 uma nova epidemia de febre amarela que aplacou o Rio de Janeiro, levou o Professor Clementino Fraga a organizar nova campanha contra a doença, cuja base era o combate ao mosquito na sua fase aquática (Ministério da Saúde, 1999; Post PR et al. 2001; Vasconcelos PF, 2003; Codeço CT et al. 2007).

Em 1898 o médico Adolpho Lutz observou casos de febre amarela silvestre no interior do Estado de São Paulo na ausência de larvas ou adultos do *Stegomyia*, e no ano seguinte o médico sanitariaista fundador do Instituto Butantã no estado de São Paulo, Emílio Marcondes Ribas, informou sobre uma epidemia no interior de São Paulo, em plena mata virgem, também sem a presença do *Stegomyia*. Em 1920 foi diagnosticado o primeiro caso de febre amarela silvestre no Brasil no município de Bom Conselho do Papa Caça/PE, fazendo com que a febre amarela deixa-se então de ser considerada apenas uma doença urbana. Johannes Bauer e posteriormente Cornelius Philip mostraram que a doença também poderia ser transmitida por outros mosquitos que não o *A. aegypti*, como por exemplo, um mosquito que é amplamente encontrado nas matas brasileiras, o *Aedes scapularis*. Essa ampla variedade de vetores transmissores também foi observada por Nelson Davis e Raymond Shannon, integrantes da Fundação Rockefeller no Brasil, ao realizar estudos com o *A. scapularis*. Fred Soper nos anos de 1930 definiu o conceito epidemiológico de “febre amarela silvestre”

quando surtos da doença ocorriam em áreas rurais e áreas de floresta e que não estavam relacionados ao mosquito *A. aegypti* (Downs GW, 1968).

Em 1927 Adrian Stokes, Mahaffy e Bauer isolaram o vírus da cepa Asibi após inocularem o sangue de um paciente com a doença em macaco rhesus (Stokes A et al. 2001). Foi demonstrado que a doença poderia ser transmitida de macaco para macaco através da inoculação do sangue contaminado e de animal para animal pela picada do *A. aegypti*. Temendo o rápido avanço da doença o governo brasileiro assinou um convênio com a Fundação Rockefeller em 1931 garantindo a extensão do Serviço de Febre Amarela a todo o território brasileiro, adotando-se sempre medidas de controle visando o combate às larvas do *A. aegypti* mediante a utilização de petróleo (Ministério da Saúde, 1999).

Por volta de 1937 Max Theiler e Hugh Smith, do Laboratório de Febre Amarela da Fundação Rockefeller em Nova York, conseguiram atenuar a cepa Asibi por 176 passagens sucessivas em cultura de células de cérebro de camundongos e ovos embrionados de galinhas. O resultado foi a perda do vicerotropismo e competência vetorial, ou seja, perda da capacidade de ser transmitido pelo vetor artrópode, sem comprometimento da sua capacidade em induzir resposta imune protetora em macacos e humanos (Theiler & Smith, 2000; Post PR et al. 2001; de Almeida, 2011). A cepa atenuada foi denominada de 17D e nessa mesma época ela foi utilizada para o primeiro programa de vacinação em massa, possibilitando o controle da doença em áreas endêmicas de febre amarela (Downs GW, 1968; Post PR et al. 2001; Vasconcelos PF, 2003; Codeço CT et al. 2007; de Almeida, 2011).

Nos 30 anos que se seguiram, não foi registrado nenhum caso da doença nos grupos vacinados. Apesar de não haver uma concordância sobre o assunto, devido apenas 30 anos desde a primeira vacinação, acreditava-se que esta vacina desenvolvida induzia uma resposta imune protetora no hospedeiro que perdurasse para o resto de sua vida com apenas uma única dose (Downs GW, 1968; Vasconcelos PF, 2003).

Em 1938 estudos relacionados ao vetor da doença mostraram que os mosquitos silvestres *Haemagogus capricornii* e *Haemagogus leucocelaenus* podem ser transmissores da febre amarela silvestre. Posteriormente comprovou-se que *Haemagogus spegazzinii*, *A. scapularis*, *Aedes fluviatilis* e *Sabethes cloropterus* poderiam também ser transmissores silvestres. Na América Latina a transmissão da forma urbana da doença se dá através da picada do mosquito *A. aegypti*, devido a sua presença predominante no ambiente urbano.

Quanto à forma silvestre são considerados como os principais vetores transmissores os mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*, apesar de outros insetos também do gênero *Aedes* como *Aedes albopictus* e *A. scapularis* serem capazes de transmitir a doença em zonas rurais. Em contraste com o cenário observado na América Latina são descritos no continente africano apenas os insetos pertencentes ao gênero *Aedes* como transmissores tanto da forma urbana como da forma silvestre (Barrett ADT & Higgs S, 2007).

Após a proposta de erradicação do vetor *A. aegypti* em 1940 foram detectados dois anos depois em 1942 os três últimos casos de febre amarela urbana no Brasil em Sena Madureira/Acre. Anos depois foi declarada a erradicação do *A. aegypti* de todo o território nacional na XV Conferência Sanitária Panamericana de 1958, corroborando com a recomendação de 1950 da Organização Panamericana da Saúde (OPAS) de erradicar o *A. aegypti* de todo o continente (Ministério da Saúde, 1999).

Infelizmente, após apenas 9 anos houve a reintrodução do mosquito no país em 1967 a partir da cidade de Belém/PA, e anos mais tarde essa reentrada do vetor levou a uma epidemia silvestre no Estado de Goiás que atingiu 36 municípios. Em 1986 foi encontrado pela primeira vez no Brasil o *A. albopictus* no terreno da Universidade Rural do Estado do Rio de Janeiro, município de Itaguaí. Em 1998 *A. albopictus* se espalhou para 1.465 municípios de 13 estados brasileiros, adaptando-se ao ambiente urbano e muitas vezes ocupando os mesmos criadouros do *A. aegypti*. Com o passar dos anos foi crescente o número de registros da presença dos vetores em quase todos os estados brasileiros, bem como o número de surtos em regiões de mata nos estados do Maranhão, Amazonas e Pará nos anos de 1993/94, 1996 e 1998 respectivamente, caracterizando o ciclo silvestre da doença em diferentes estados do país (Ministério da Saúde, 1999; Vasconcelos PF, 2003).

Da cepa Asibi 17D, se originaram duas sub-cepas, que são utilizadas nos dias de hoje para a produção dos lotes de vacinas aplicadas nos programas de vacinação em massa. A vacina produzida a partir da sub-cepa 17D-204, de origem francesa e utilizada pelo Instituto Pasteur em Dakar no Senegal e pela empresa Sanofi Pasteur, embora esteja relacionada a um número elevado de casos de encefalite infantil é largamente utilizada nas ex colônias francesas na África. A sub-cepa 17DD é utilizada apenas por Bio-Manguinhos, Fiocruz, na produção de sua vacina. Bio-Manguinhos, junto do instituto Pasteur em Dakar, e a Sanofi Pasteur são os 3 fabricantes mundiais da vacina contra a febre amarela (Post PR et al. 2001; Vasconcelos PF, 2003; Gardner CL & Ryman KD, 2010).

1.1.2 – Classificação e Morfologia

O vírus da febre amarela pertence à Família *Flaviviridae* e ao Gênero *Flavivirus*. A partícula viral deste gênero mede aproximadamente de 40 a 60nm de diâmetro, possui capsídeo proteico de simetria icosaédrica formado por proteína C e é envolvido por um envelope lipídico onde são inseridas as espículas virais, a glicoproteína pré-M precursora da glicoproteína de membrana M, e a glicoproteína de envelope E (**Fig.1.1**) (Machado CM et al. 2009; Gardner CL & Ryman KD, 2010).

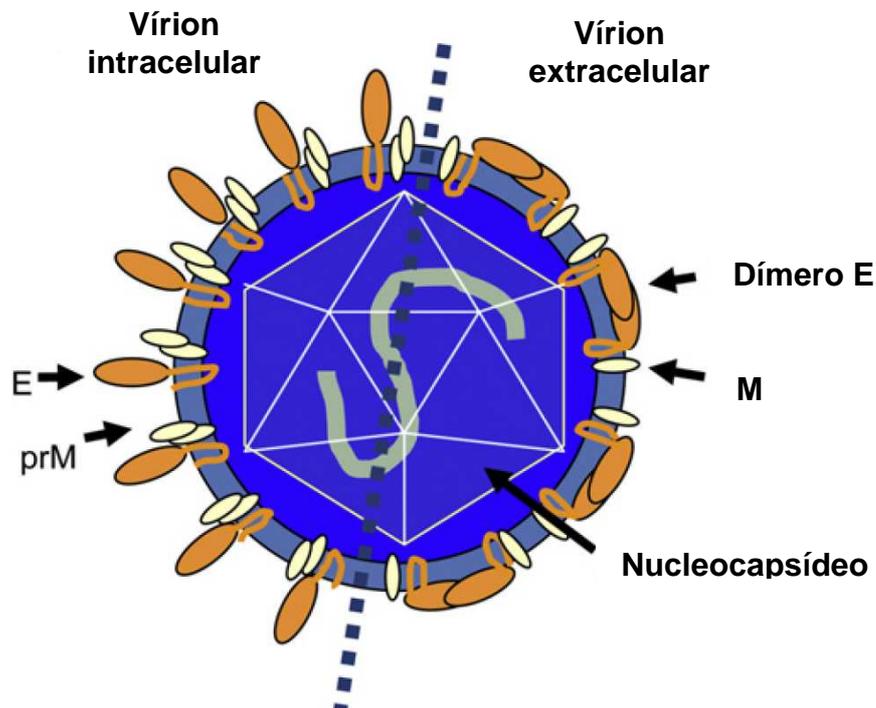


Figura 1.1- Partícula viral do vírus da febre amarela. Vírion imaturo (intracelular) e maduro (extracelular). Nucleocapsídeo icosaédrico contendo a fita simples de RNA de polaridade positiva, com as proteínas E e pré-M/M inseridas no envelope lipídico (Adaptado de Gardner CL & Ryman KD, 2010).

O genoma dos *Flavivirus* é constituído por uma fita simples de RNA com polaridade positiva de aproximadamente 11Kpb. Este genoma possui apenas uma única fase de leitura aberta (*Open reading frame* - ORF) com um total de 10.233 nucleotídeos que codificam as proteínas virais sendo flanqueado por duas regiões não codificantes (*Untranslated region* - UTR) de tamanho variável. A UTR de maior tamanho é a que se localiza na região 3' com cerca de 400 a 700 nucleotídeos, desprovida de cauda poliadenilada, e a menor UTR na região 5' possui cerca de 100 nucleotídeos com uma estrutura Cap. Estas regiões não codificantes são importantes para a regulação da replicação do genoma viral, fornecendo o sinal para as enzimas replicativas na transcrição e tradução (Bryant JE et al. 2005; Lindenbach DB et al. 2007).

O processamento da poliproteína viral é realizado por proteases virais e celulares para gerar um total de 10 proteínas virais (**Fig.1.2**). As proteínas virais C, pré-M e E, são as chamadas proteínas estruturais, mas além destas o RNA viral codifica ainda mais sete proteínas não estruturais, são elas: NS1, NS2A e NS2B, NS3, NS4A e NS4B, NS5. As proteínas não estruturais são responsáveis pelas atividades regulatórias e de expressão do vírus, incluindo replicação, virulência e patogenicidade (Chambers TJ et al. 1990).

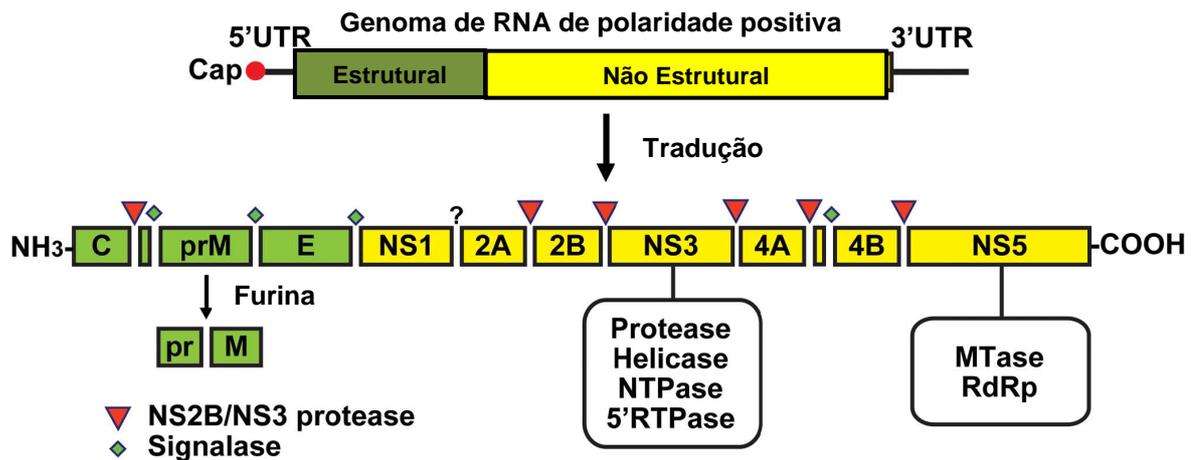


Figura 1.2- Organização do genoma do vírus da febre amarela. A fita de RNA de polaridade positiva codifica 10 proteínas virais. Proteínas estruturais: C, pré-M e E. Proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. Sítio de clivagem por protease de origem viral (▼); sítio de clivagem por protease de origem celular (◆) (Sampath A & Padmanabhan R, 2009).

A proteína C (11KDa), está associada com o empacotamento do genoma viral e formação do nucleocapsídeo (Chambers TJ et al. 1990; Lindenbach DB et al. 2007). A proteína M (8KDa) é traduzida como o precursor pré-M (26KDa), a qual é processada durante o período de maturação viral. A proteína pré-M forma um complexo com a proteína E, e dessa forma protege o peptídeo de fusão de modificações irreversíveis em compartimentos ácidos durante o transporte dos vírions até a superfície celular. As proteínas pré-M e M são encontradas em vírions intracelulares e extracelulares, respectivamente (**Fig.1.1**) (Chambers TJ et al. 1990; Mukhopadhyay S et al. 2005). A proteína E representa a maior proteína do envelope do vírus da febre amarela (53-54KDa), possuindo atividade hemaglutinante, epítomos do tipo específico, peptídeo de fusão e sítio de ligação ao receptor celular, além de constituir o principal alvo de anticorpos neutralizantes e também ser uma proteína de membrana do tipo 1 que se apresenta como homodímeros na partícula viral madura. Cada monômero é constituído por três domínios externos (ectodomínio): O domínio I corresponde à região central do ectodomínio da proteína E com epítomos do subcomplexo e tipo específico, também é o domínio onde se encontra a porção glicosilada da proteína em um resíduo de

aminoácido asparagina; O domínio II, que se projeta na superfície viral apresenta epítomos de reação cruzada; O domínio III localiza-se na porção C-terminal da proteína e é responsável pela ligação a receptores celulares. O domínio III possui estrutura semelhante à imunoglobulina e tem relação com a virulência e ligação de anticorpos neutralizantes. O peptídeo de fusão está localizado no domínio II e os anticorpos neutralizantes e do tipo específico são produzidos contra o domínio III (**Fig.1.3**) (Ryman KD et al. 1997; Allison SL et al. 1999; Volk DE et al. 2009).

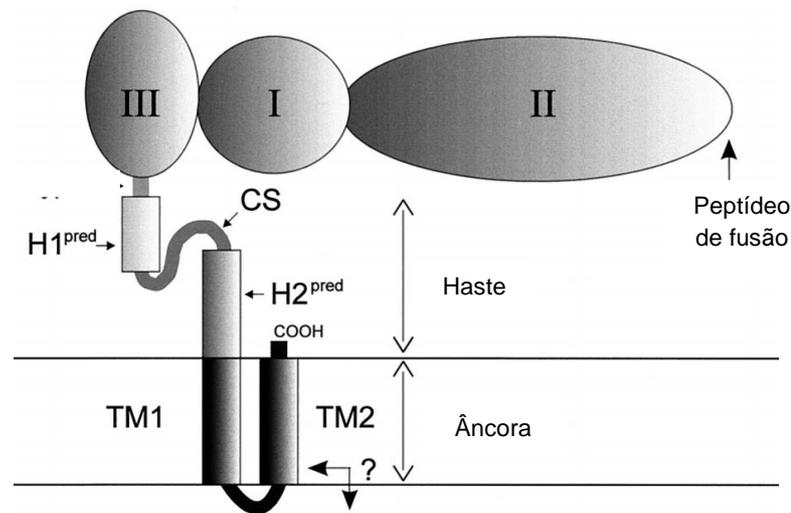


Figura 1.3- Esquema preditivo da estrutura do monômero da proteína E dos *Flavivírus* (Allison SL et al. 1999).

A região haste-âncora localiza-se na extremidade C-terminal do ectodomínio de cada monômero da proteína E. Essa região acomoda a proteína E na membrana do retículo endoplasmático (RE) e é composta pelos últimos 100 aminoácidos de toda a molécula. Essa região inclui duas estruturas alfa hélices (H1 e H2) na região de haste, e uma região conservada (CS) separando essas hélices. Há ainda dois segmentos transmembranares (TM1 e TM2) na porção âncora. A estrutura em alfa hélice H1 parece estar associada com a formação dos trímeros de proteína E; H2 é importante para a estabilidade de dímeros pré-M/E; CS é altamente conservada entre os *Flavivírus*, no entanto sua função não é bem definida; TM1 também contribui para a estabilidade do heterodímeros pré-M/E e TM2 serve como sequência sinal para a proteína não estrutural NS1. Interações entre TM1 e TM2 são importantes na formação do envelope viral (**Fig.1.3**) (Allison SL et al. 1999; Bonaldo MC et al. 2007).

A proteína E do vírus da febre amarela é sabidamente a proteína mais imunogênica do vírus. Ela desempenha um papel muito importante na indução da produção de anticorpos neutralizantes, e também já foi descrito que a mesma possui epítomos conservados dentre

vários isolados capazes de levar a ativação da resposta celular por células de linfócitos T da imunidade adaptativa após a vacinação (Co MDT et al. 2002; Barret ADT & Teuwen DE, 2009; Luiza-Silva M et al. 2011; Mansfield KL et al. 2011).

1.1.4 – Manifestações Clínicas

O período de incubação varia de três a seis dias, e observa-se que a maioria das pessoas infectadas por esse vírus apresenta infecção subclínica. Quando os sintomas ocorrem, aparecem de forma súbita, como febre alta, mal-estar, cefaleia, dor muscular, cansaço e calafrios, podendo também apresentar diarreia e vômito. A maioria dos pacientes melhora após quatro dias com recuperação total. No entanto, em aproximadamente 15% dos pacientes, depois desse período de remissão os sintomas reaparecem evoluindo para uma forma grave da doença. Esses pacientes apresentam febre alta, dor epigástrica, diarreia e vômito que pode ser hemorrágico, conhecido como vômito negro, além de outras manifestações hemorrágicas como a equimose, epistaxe e gengivorragia. Os pacientes têm alterações das funções hepáticas devido ao funcionamento inadequado do fígado, além de comprometimento renal com diminuição do volume urinário que evolui para a anúria total seguida de coma. Nos casos graves 50% dos pacientes evoluem para o óbito e o restante se recupera totalmente sem sequelas (Machado CM et al. 2009).

1.1.5 – Epidemiologia

O vírus é mantido na natureza através de dois ciclos: silvestre (transmissão horizontal macaco-mosquito-macaco) e urbano (transmissão horizontal homem-mosquito-homem). No ciclo silvestre a transmissão é feita por intermédio de mosquitos principalmente do gênero *Haemagogus*, e o vírus é mantido pela infecção de macacos e através da transmissão transovariana no próprio mosquito. O homem susceptível pode ser infectado ao penetrar em áreas de florestas e tornar-se uma fonte de infecção para o mosquito *A. aegypti*, vetor encontrado em áreas metropolitanas, ao retornar às áreas urbanas. Dessa forma, com a infecção do mosquito tem-se a manutenção urbana do vírus através da transmissão mosquito-homem. Embora o mosquito *A. albopictus* possa ser um transmissor potencial do vírus da febre amarela, ele não tem sido descrito como vetor. Tanto o *A. aegypti* quanto o *A. albopictus* proliferam-se dentro ou nas proximidades de habitações em recipientes contendo água limpa e possuem o hábito de picar durante o dia (**Fig.1.4**) (Barrett ADT & Higgs S, 2007).

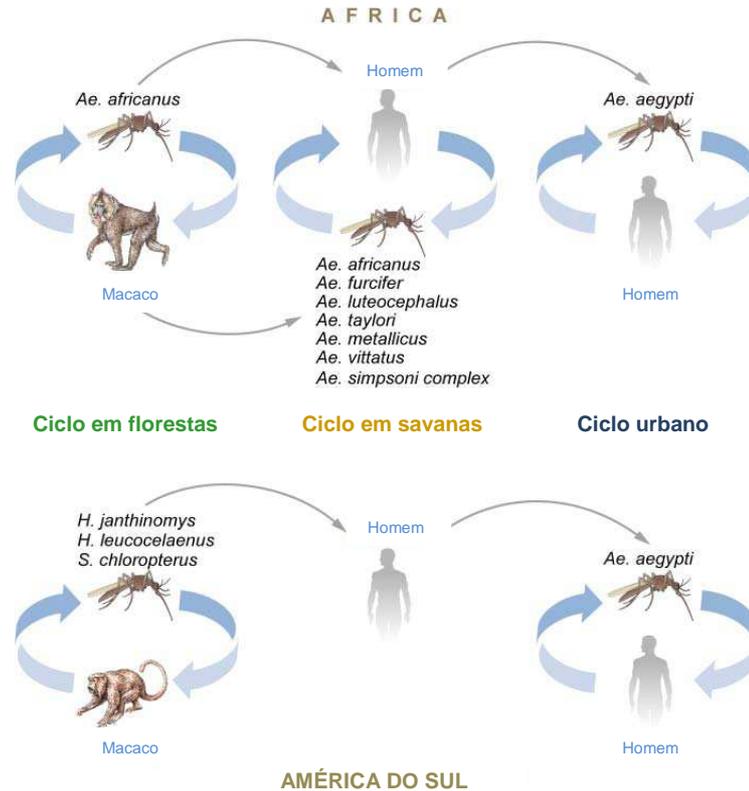


Figura 1.4- Ciclo de transmissão silvestre e ciclo de transmissão urbana na América do Sul e na África (Barrett ADT & Higgs S, 2007).

A doença tem caráter sazonal, ocorrendo com maior frequência entre os meses de janeiro e abril, quando fatores ambientais como índices pluviométricos e temperatura ideal propiciam o aumento da densidade vetorial. Ela acomete com maior frequência o sexo masculino e a faixa etária acima dos 15 anos em função da maior exposição profissional, relacionada à penetração em zonas silvestres da área endêmica de febre amarela. Outro grupo de risco são as pessoas não vacinadas que residem próximas aos ambientes silvestres onde circula o vírus, além de turistas e migrantes que adentram estes ambientes (Barrett ADT & Higgs S, 2007).

A forma silvestre é endêmica nas regiões tropicais da África e das Américas. Em geral apresenta-se sob a forma de surtos com intervalos de 5 a 7 anos, alternados por períodos com menor número de registros. Na população humana o aparecimento de casos é precedido de epizootias. No Brasil, a partir do desaparecimento da forma urbana em 1942, só há ocorrência de casos de febre amarela silvestre. Até 1999 os focos endêmicos estavam situados nos estados das regiões Norte, Centro-Oeste e área pré-amazônica do estado do Maranhão, além de registros esporádicos na parte oeste de Minas Gerais (Ministério da Saúde, 2009).

Na África, onde tem maior disseminação, a doença é endêmica em 34 países. Na América do Sul, nos últimos 20 anos, sua ocorrência tem sido registrada em sete países: Brasil, Bolívia, Equador, Guiana Francesa, Peru e Venezuela (Fig1.5) (Machado CM et al. 2009).



Figura 1.5- Zona endêmica para febre amarela. A região demarcada em amarelo representa as áreas com risco de transmissão da doença na África (A) e na América do Sul (B) (Gardner CL & Ryman KD, 2010).

Com o desaparecimento da modalidade urbana da doença e a manutenção de epizootias e casos humanos silvestres, estudos anteriores à década de 70 tornaram possível definir três áreas epidemiologicamente distintas no Brasil, com risco de transmissão da doença, que foram sendo modificadas a partir de 1997: endêmicas ou enzoóticas, que são áreas que sempre apresentaram circulação viral, seja pela ocorrência de epizootias ou pela ocorrência de casos humanos (regiões Norte e Centro-Oeste e estado do Maranhão); epizoóticas ou de transição, que são áreas com evidência de circulação viral esporádica em período mais recente (ocorrendo entre vetores, em epizootias, ou podendo haver casos humanos em forma de surtos esporádicos), abrangendo uma faixa que vai da região centro-sul do Piauí, oeste da Bahia, Minas Gerais, oeste de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul; e área indene, que corresponde à área onde não há circulação comprovada do vírus da febre amarela e abrange estados da região Nordeste, Sudeste e Sul (**Fig.1.6**) (Romanos MTV, 2008).



Figura 1.6- Classificação dos estados brasileiros quanto a área endêmica, de transição, indene ou de risco potencial para infecção do vírus da febre amarela (Centro de Vigilância Epidemiológica, 2012).

Nos surtos ocorridos no período de 2000 a 2008 observou-se uma expansão da circulação viral no sentido leste e sul do país, detectando-se sua presença em áreas silenciosas há várias décadas. Em outubro de 2008 procedeu-se a uma nova delimitação a qual levou em consideração vários fatores: evidências da circulação viral, ecossistemas (bacias hidrográficas vegetação), corredores ecológicos, trânsito de pessoas, tráfico de animais silvestres, critérios de ordem operacional e organização da rede de serviços de saúde, que facilitassem procedimentos operacionais e logísticos nos municípios. Dessa forma foram redefinidas duas áreas no País: a) área com recomendação de vacina (ACRV), correspondendo àquelas anteriormente denominadas endêmica e de transição, com a inclusão do sul de Minas Gerais até então considerado “área indene de risco potencial”; b) área sem recomendação de vacina (ASRV), correspondendo basicamente às “áreas indenés” incluindo também o sul da Bahia e norte do Espírito Santo que antes eram consideradas “áreas indenés de risco potencial” (Fig.1.7) (Ministério da Saúde, 2009).

Nos últimos 20 anos foram notificados 587 casos de febre amarela silvestre, com 259 mortes. O maior número de registros de casos foi em Minas Gerais, 104, seguido pelo Maranhão, 90, Goiás 88, Pará 84 e Amazonas 43 (Ministério da Saúde, 2012a).

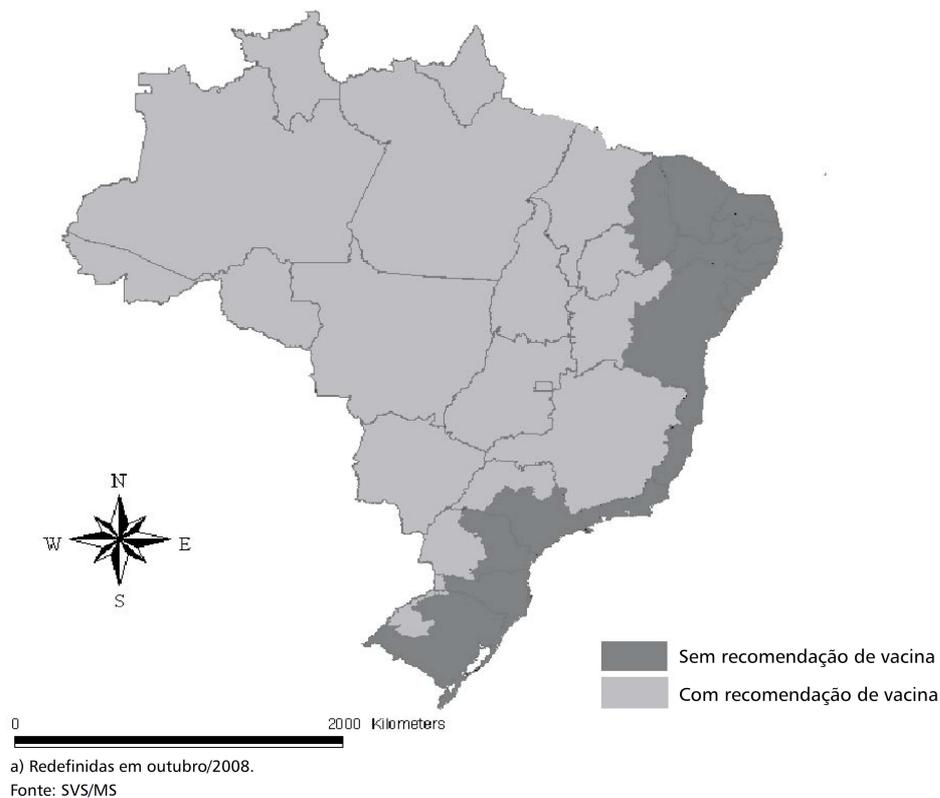


Figura 1.7- Zonas demarcadas de acordo com a recomendação da vacina contra o vírus da febre amarela (Ministério da Saúde, 2009).

1.1.6 – Diagnóstico

A confirmação do diagnóstico da febre amarela é importante não só em relação às medidas de saúde pública, mas também em relação a vigilância epidemiológica para diferenciação de outras infecções com manifestações clínicas semelhantes, tais como aquelas observadas na malária, leptospirose, hepatite, febre maculosa brasileira e febres hemorrágicas. O diagnóstico para febre amarela pode ser feito através do isolamento e identificação viral por métodos virológicos, pesquisa de anticorpos e detecção do ácido nucléico (Vasconcelos PF, 2003; Lindenbach DB et al. 2007).

O material de escolha para o isolamento viral é o sangue ou soro do paciente, coletado até o quarto dia da doença. O sangue ou soro podem ser inoculados em cultura de célula de animais ou em cultura de células de mosquito, observando-se então o efeito citopático ou ainda, em camundongos recém-nascidos e intratoracicamente em mosquitos. A identificação pode ainda ser feita por meio de testes sorológicos como testes de neutralização (TN), inibição da hemaglutinação (HI), fixação do complemento (FC), imunofluorescência (IF) e ensaio imunoenzimático (EIA). Para a detecção molecular pode ser utilizada a técnica de transcrição reversa (RT-PCR) associada à reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir do RNA viral obtido do sangue de pacientes (Vasconcelos PF, 2003; Romanos MTV, 2008).

1.1.7 – Prevenção e Controle

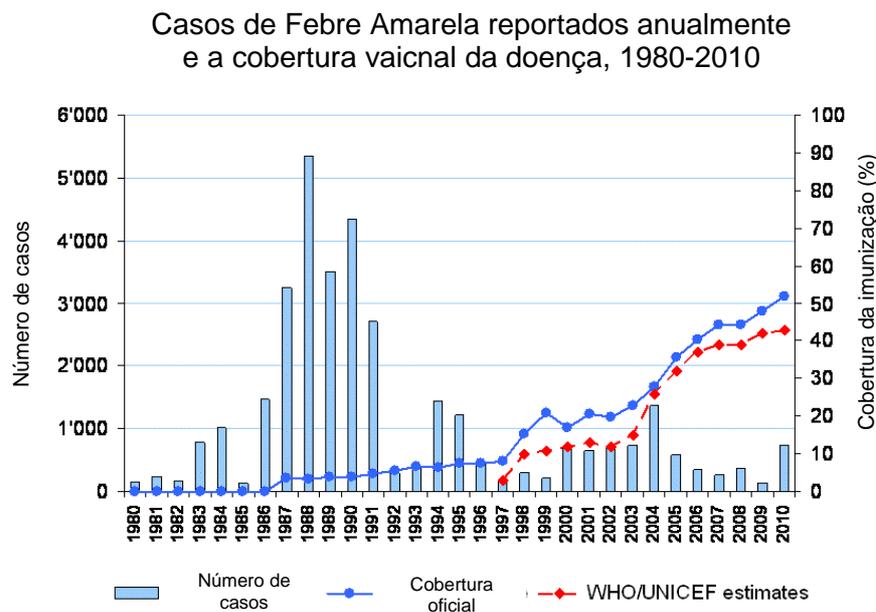
A febre amarela faz parte da lista de doenças de notificação compulsória, e como tal qualquer caso suspeito deve ser imediatamente notificado à autoridade sanitária local, estadual ou nacional e esta deverá notificar os organismos internacionais. Posteriormente, havendo confirmação laboratorial, a notificação do caso é confirmada e a autoridade nacional ratifica a autoridade sanitária internacional (Vasconcelos PF, 2003).

Ainda não há tratamento para pacientes com febre amarela e nem mesmo drogas antivirais específicas, por isso a melhor opção para o combate a essa doença continua sendo a prevenção, com políticas de vacinação em massa (Gardner CL & Ryman KD, 2010).

A atual vacina contra a febre amarela é proveniente da cepa 17D, obtida por atenuação do vírus por passagens seriadas cultivada em ovos embrionados de galinha livres de agentes patogênicos. Essa vacina é comumente citada como sendo a vacina viral atenuada mais segura e eficiente já desenvolvida (Barrett ADT, 1997; Post PR et al. 2001; Vasconcelos PF, 2003;

Monath TP, 2005). Desde o início de sua utilização até os dias de hoje ela se mostrou extremamente eficaz e benéfica para a população em geral levando a uma inversão no quadro mundial de infecção pelo vírus da febre amarela (**Gráfico 1.1**) (WHO, 2011).

A vacina contra a febre amarela tem sido usada na prevenção desde 1937 com mais de 500 milhões de doses já administradas. Entretanto, casos raros de eventos adversos neurotrópicos e vicerotrópicos pós vacinação levantam questionamentos quanto a segurança da vacina (Engel et al. 2006; Lindsey NP et al. 2008). Problemáticas importantes devem ser levadas em consideração, como a tecnologia de produção da vacina que vem sendo aplicada a partir de ovos embrionados sem modificação no processo de produção desde 1945. Esta estratégia de replicação acarreta desvantagens como o pequeno número de doses produzidas por ovo. Além disso, devido ao seu potencial de risco às adversidades pós imunização a vacina é contra indicada para crianças menores de 6 meses (Gardner CL & Ryman KD, 2010).



Source: WHO/IVB database, 2011
193 WHO Member States. Data as of September 2011

Date of slide: 04 October 2011



Gráfico 1.1- Cobertura vacinal da febre amarela (World Health Organization/ WHO, 2011).

No Brasil, até 2007, a vacina contra a febre amarela foi associada a quatro casos de eventos adversos fatais. Esses casos foram resultantes, muito provavelmente, da influência de características imunológicas individuais nas respostas desenvolvidas em cada um dos vacinados, levando a uma maior susceptibilidade ao vírus e severidade da doença (Codeço CT et al., 2007). Em 2001 Galler et al reportou dois casos fatais onde se observou que o vírus

recuperado das vítimas mantinha sua estabilidade genética e o fenótipo de atenuação. Essas descobertas mostraram-se contrastantes a outros casos anteriormente descritos (Chan et al. 2001; Martin et al. 2001; Vasconcelos et al. 2001), nos quais o vírus isolado apresentava modificações em dois aminoácidos do gene da glicoproteína E e uma acentuada neurovirulência quando testado em primatas não humanos. A compilação dos dados referentes às descobertas realizadas por Galler, Chan, Martin e Vasconcelos sustenta a hipótese de que fatores genéticos individuais dos hospedeiros estejam relacionados no desenvolvimento dos eventos adversos relatados (Galler et al. 2001; Marchevsky et al. 2003).

Devido aos fatos apresentados de que a atual vacina 17D está associada a recentes e graves eventos adversos discuti-se agora na comunidade científica e órgãos de saúde pública a necessidade de melhorias desta vacina (Vasconcelos PF et al. 2001; Barrett ADT & Teuwen DE, 2009; Gardner CL & Ryman KD, 2010).

A vacina é recomendada para pessoas residentes em áreas endêmicas ou que para lá viajam. Ela é capaz de induzir a formação de anticorpos protetores dentro de sete a dez dias com duração de pelo menos 45 anos, e com uma taxa de soro conversão de 95%. Entretanto, a Organização Mundial da Saúde preconiza o reforço da atual vacina a cada 10 anos (Barrett ADT & Teuwen DE, 2009). Ela é contra indicada em grupos com condições especiais como imunodeficiência, pessoas recém-transplantadas, pessoas que sofrem imunodepressão secundária devido a neoplasias, quimioterapia, radioterapia e corticoterapia, história de reação anafilática relacionada a ovo de galinha e seus derivados, além de contra indicação relativa em qualquer fase de gestação. Podem-se observar reações pós-vacinais em 5 a 10% dos vacinados até 10 dias após a aplicação da vacina, com um quadro de febre baixa, cefaleia e mialgia. Em pessoas alérgicas a ovo podem ocorrer reações de hipersensibilidade imediata com exantema, urticária e broncoespasmos (Romanos MTV, 2008).

O controle deve ser feito pela eliminação dos vetores artrópodes empregando medidas tais como evitar picada de mosquito com o uso de mosquiteiros, repelentes e telas protetoras, eliminar os locais de procriação de mosquitos através da vedação de depósitos de água como caixas-d'água, tanques, tinas, poços e fossas, evitar o acúmulo de lixo para evitar os possíveis criadouros de mosquito, fazer o controle químico com a utilização de larvicidas e campanhas de educação em saúde informando às comunidades sobre as doenças transmitidas por mosquitos bem como as medidas adequadas para combatê-las (Romanos MTV, 2008).

A vigilância epidemiológica da febre amarela é um dos componentes do Programa de Controle de Febre Amarela e Dengue (PCFAD), cujo objetivo é manter erradicada a febre amarela urbana e evitar surtos de febre amarela silvestre. No Brasil a situação é extremamente preocupante pelo risco de reurbanização da doença considerando que todas as Unidades Federadas que fazem parte da área endêmica para febre amarela silvestre têm a presença do *A. aegypti* (Ministério da Saúde, 1999; Massad E et al. 2001; Vasconcelos PF, 2002; Martins MÂ et al. 2007).

A abordagem de vacina atenuada ou inativada é, às vezes, limitante por induzir eventos adversos em alguns casos ou por não conferir uma eficiente proteção imune. Considerando que proteínas são capazes de induzir uma resposta imune por anticorpos protetores e a facilidade de serem produzidas em quantidades suficientes e com baixo custo, o desenvolvimento e utilização de vacinas baseadas em proteínas recombinantes do patógeno em questão se torna uma alternativa viável no combate a doenças (Breitling R et al. 2002; Basile G & Peticca M, 2009).

1.2 – Sistemas de Expressão

A expressão de proteína heteróloga em microrganismos usando recombinação genética ainda está em intenso uso e desenvolvimento na biotecnologia moderna, sendo possível produzir proteínas bioativas em meios de cultura relativamente baratos. Sistemas hospedeiros para expressão de genes heterólogos possuem suas respectivas particularidades, vantagens e desvantagens. Somado a isso o crescente conhecimento do genoma de diferentes patógenos e a eficiência de sistemas de expressão para preparo de grandes quantidades de proteínas citoplasmáticas, intracelulares e membranares, facilitam o potencial uso de proteínas recombinantes no desenvolvimento de vacinas, reagentes para o diagnóstico e biofármacos (Breitling R et al. 2002; Sodoyer R, 2004; Basile G & Peticca M, 2009).

O critério na escolha do melhor sistema depende das aplicações e qualidade desejada da proteína de interesse. Em um sistema de expressão procariótico, apesar de ser uma opção de baixo custo, não é possível alcançar modificações pós traducionais (N- ou O-glicosilação, fosforilação, adição de pontes dissulfeto, modificação de moléculas de ácidos graxos) geralmente necessários para o correto empacotamento da estrutura secundária, terciária e quaternária da proteína de interesse. Obviamente estas modificações podem afetar a

bioatividade, função, estrutura, solubilidade, estabilidade, meia-vida, resistência a ação de proteases e compartimentalização da molécula recombinante (Yin J et al. 2007).

No caso dos sistemas de expressão eucarióticos as leveduras apresentam maiores vantagens, pois os eventos pós traducionais realizados pelo fungo garantem maior estabilidade da proteína. Entretanto, o padrão de glicosilação realizado por leveduras difere do existente em células de mamífero. A expressão no sistema de baculovírus também apresenta grande diferença no padrão de glicosilação realizado em células de inseto quando comparado com mamífero, quanto ao tamanho de oligossacarídeos e no perfil de manose adicionado à molécula final (**Fig.1.8**) (Yin J et al. 2007).

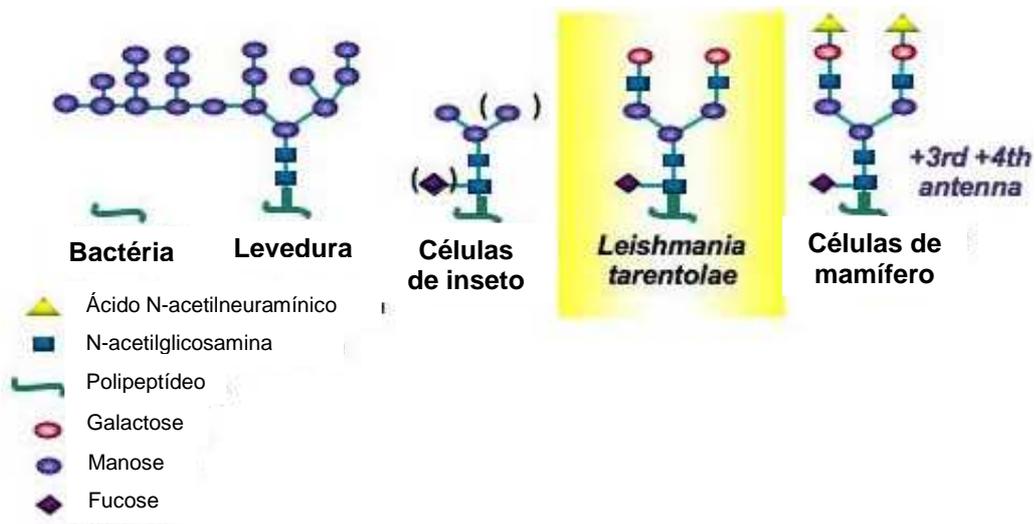


Figura 1.8- Comparação dos perfis de N-glicosilação nos diferentes sistemas de expressão de proteína recombinante (Jena Bioscience, 2012).

Algumas desvantagens de certos sistemas não podem ser totalmente evitadas, sendo necessário levar em consideração as características biológicas e o propósito do produto expresso ao se escolher o sistema para expressão. Por exemplo, sistemas de expressão em células eucarióticas são candidatas ideais para estudos da função biológica de proteínas ou em preparação de vacinas. Em contraste, sistemas de células procarióticas podem fornecer antígenos recombinantes suficientes para diagnóstico ou para estudos estruturais de proteínas que não necessitem de modificações pós traducionais (Sodoyer R, 2004; Yin J et al. 2007).

Com o maior entendimento da maquinaria da expressão gênica e sua regulação, bem como o desenvolvimento no campo da biotecnologia, é possível que cada vez mais genes sejam utilizados incorporados aos diferentes sistemas de expressão, da mesma forma outros

sistemas também podem emergir dessa tecnologia. Um bom exemplo dessa novidade é o caso do sistema de expressão utilizando o protozoário *Leishmania tarentolae*.

1.3 – Sistema de Expressão em *L. tarentolae*

O protozoário *L. tarentolae* pertence à Família Trypanosomatidae e à Ordem Kinetoplastida do Sub-Reino Protozoa. Esta ordem foi proposta para agrupar exclusivamente os protozoários flagelados que possuem uma mitocôndria única e ramificada que percorre todo corpo celular e cujo DNA está organizado em maxi e mini círculos. Essa organização do DNA forma uma rede de cadeias circulares concatenadas e compactas denominada cinetoplasto (**Fig.1.9**) (Lake JA et al. 1988).

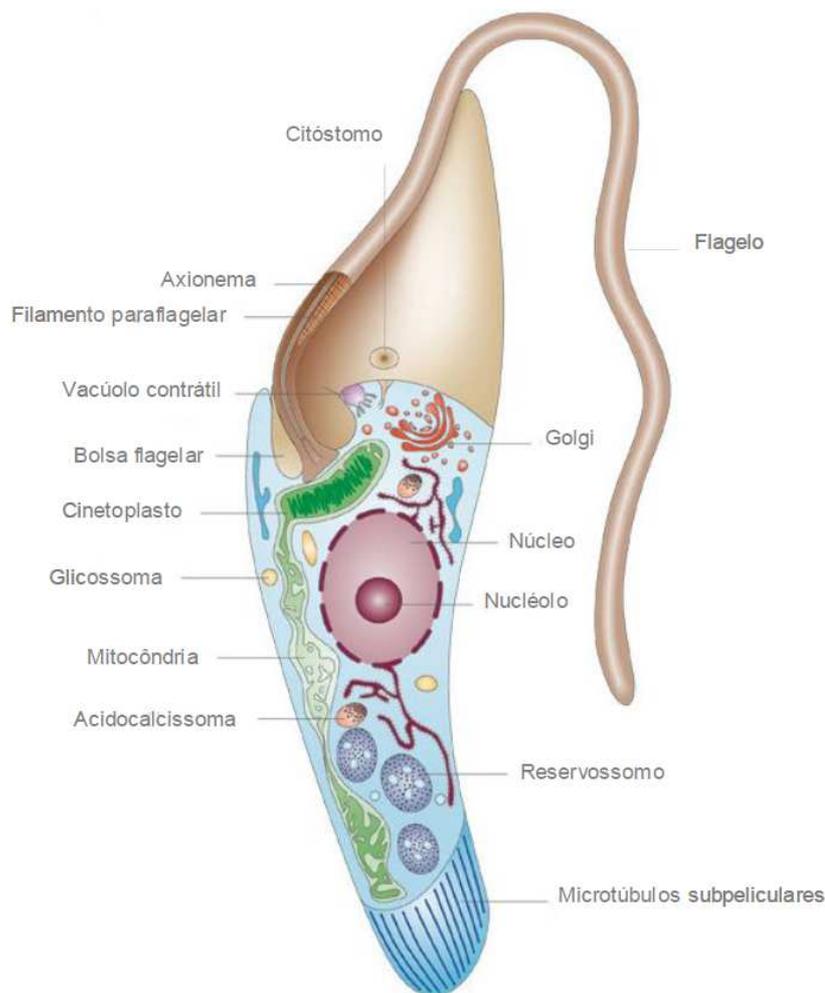


Figura 1.9- Representação esquemática da morfologia dos tripanossomatídeos (adaptado de Docampo et al. 2005).

A partir de características como a forma do corpo celular, a presença ou ausência de membrana ondulante e de flagelo extracelular, local de emergência do flagelo e posição do

complexo flagelo-bolsa flagelar-cinetoplasto em relação ao núcleo é possível distinguir oito tipos morfológicos diferentes dentre os tripanossomatídeos: promastigota, paramastigota, opistomastigota, coanomastigota, amastigota, esferomastigota, tripomastigota e epimastigota (**Fig.1.10**) (Hoare CA & Wallace FG, 1966; Vickerman K & Preston TM, 1976; Vickerman K, 1990, 1994; Maslov DA, 2013).

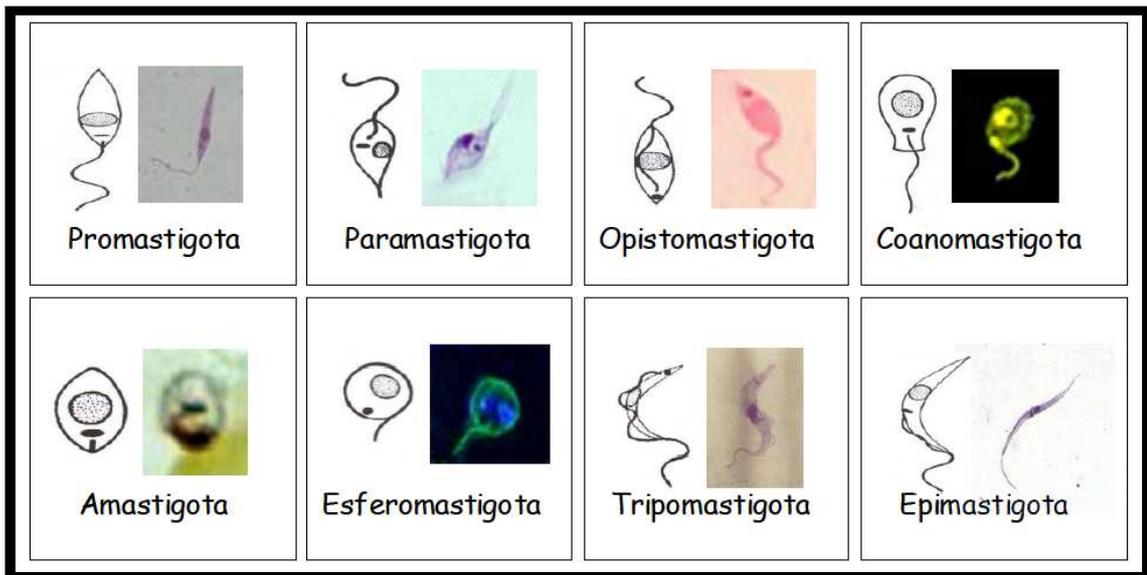


Figura 1.10- Morfologia celular das formas evolutivas dos tripanossomatídeos (adaptado de Sousa, 2000).

O tripanossomatídeo *L. tarentolae* é um parasita não patogênico ao homem, isolado do réptil *Tarentolae annularis* e assim como vários outros membros dessa família possui uma rápida proliferação celular com necessidades nutricionais relativamente simples. Esses tripanossomatídeos também são ricos em glicoproteínas de superfície, podendo até ultrapassar 10% do total de proteínas celulares e tem sido utilizados como um novo sistema de expressão eucarioto (Ferguson MA, 1997; Fritsche C et al. 2007). As estruturas de oligossacarídeos de suas glicoproteínas são muito similares às dos glicoconjugados de mamíferos, diferindo apenas na ausência de ácido siálico em glicoproteínas processadas pelo parasito. Essa semelhança, muito provavelmente, é devido ao seu estilo de vida parasitário (Parodi AJ, 1993). Somado a isso, o avanço da tecnologia e disponibilidade dos métodos de engenharia genética em combinação com os avançados processos pós traducionais nesses organismos bem como, a facilidade de expansão do cultivo em larga escala tornam os membros da Família Trypanosomatidae alvos potenciais para aplicações biotecnológicas (Breitling R et al. 2002).

O grupo de Breitling et al (2002) foi o primeiro a estabelecer este sistema utilizando *L. tarentolae*. Foi desenvolvido um vetor de expressão capaz de mediar a produção de altos níveis de proteína heteróloga tanto intracelular como secretadas. Com o objetivo de se avaliar o potencial desse sistema em promover as devidas modificações nas proteínas, como o padrão de glicosilação e o empacotamento da molécula após o processo de tradução, foi utilizado como modelo a proteína eritropoetina humana. A proteína recombinante purificada do sobrenadante se mostrou biologicamente ativa, processada em sua forma nativa e devidamente glicosilada na porção N-terminal. Diferentemente do observado em cultura de células de mamífero, a glicosilação se mostrou reprodutivamente homogênea. A eritropoetina humana produzida em *L. tarentolae* também foi clivada corretamente no sítio de seu peptídeo sinal sendo secretada com sucesso para o meio extracelular. O mesmo grupo demonstrou a eficiência e aplicabilidade desse sistema de expressão para outras proteínas citoplasmática tais como a T7 RNA polimerase, Cu/Zn superóxido dismutase e para proteína associada à membrana GTPase Rab7. Todas essas proteínas foram expressas conservando as mesmas qualidades inerentes as suas atividades biológicas. No mesmo trabalho, se comprovou os altos níveis de expressão intracelular obtidos utilizando-se uma proteína fluorescente EGFP como modelo, estabelecendo-se uma relação direta entre o numero de cópias do gene integrado no genoma do parasito e a intensidade da fluorescência emitida (Breitling R et al. 2002).

Embora o grupo de Breitling tenha estabelecido o sistema com a *L. tarentolae* em 2002, avaliando as características físico-químicas e biológicas das moléculas resultantes, essa não foi a primeira vez em que tripanossomatídeos foram utilizados para expressão de moléculas heterólogas. A integração de uma proteína fluorescente ao cromossomo de um tripanossomatídeo, no caso *Leishmania mexicana* e *Leishmania major*, já tinha sido demonstrada no ano de 2000 (Misslitz A et al. 2000). Misslitz e colaboradores demonstraram que genes de uma proteína fluorescente e para a β -galactosidase eram expressos de forma estável e uniforme nas formas amastigotas e promastigotas de ambas as espécies, ressaltando sua aplicabilidade para a detecção do parasito em modelos de infecção em macrófagos e animais murinos. Outro exemplo é o *Trypanosoma cruzi*, que já foi utilizado em expressão de IL-12 de mamífero (La Flamme AC et al. 1995). A *L. major* também já foi usada para a expressão de γ -IFN de camundongos murinos em estudos de infecção *in vivo* em modelo animal (Tobin JF et al. 1993) e da enzima transialidase do *T. cruzi* em estudo sobre a sobrevivência intracelular do parasito (Belen CM et al. 2000). Em outra espécie, a *Leishmania*

donovani, foi expressa a enzima tripanotiona redutase de *T. cruzi*, com um de seus domínios mutados, também em um estudo de infecção de murino (Tovar J et al. 1998).

Em muitos trabalhos posteriores ao do grupo de Breitling (2002) foi confirmada a promissora utilização do protozoário *L. tarentolae* como sistema de expressão de proteínas heterólogas conforme sumário apresentado na tabela 1.1. Observou-se que estas eram, em sua maioria, biologicamente ativas e corretamente processadas e glicosiladas, o que reflete uma importante alternativa de isolamento de proteínas em sua forma nativa. Recentemente *L. tarentolae* também foi utilizada na expressão da proteína viral E7 do HPV (Salehi M et al. 2012), enzimas como a acetilserotonina metiltransferase (Ben-Abdallah M et al. 2011) e no precursor da proteína alfa amiloide, cuja deficiência está relacionada ao Mal de Alzheimer (Klatt S et al. 2013).

Os dados desses trabalhos comprovaram mais uma vez que os eventos pós traducionais em *L. tarentolae* se aproximam expressivamente dos padrões de glicosilação e enovelamento de proteínas que ocorrem em processos pós traducionais em células de mamíferos quando comparados a outras células usadas como plataformas de expressão. Sendo assim, o sistema em *L. tarentolae* apresenta todas as vantagens dos sistemas de expressão mais tradicionais, sobrepondo as desvantagens de cada um deles. Isso se deve ao fato deste tripanossomatídeo ser capaz de promover importantes modificações na molécula após o evento de tradução e apresentar uma expressiva proliferação em meios de cultura de baixo custo. O refinamento da molécula sintetizada por estas células expõe as vantagens inerentes a este sistema, tornando-se promissora a produção de altos níveis de proteínas recombinantes utilizando-se esta estratégia.

Tendo em vista a importância de moléculas recombinantes em aplicações terapêuticas e profiláticas em vacinas, biofármacos e diagnósticos (Sodoyer R, 2004), bem como ao promover um maior entendimento da biologia de organismos em estudos estruturais, o presente trabalho se propõe a avaliar o potencial da plataforma de expressão de proteínas heterólogas em *L. tarentolae* utilizando como modelo a proteína E do vírus vacinal da febre amarela 17DD.

Tabela 1.1 - Sumário das proteínas já expressas em *L. tarentolae*.

Proteína	Origem	Associado à Célula	Secretado	Referência
E7	Vírus HPV	+		Salehi M et al. 2012
Serotonina Transferase	Humana	+		Ben-Abdallah M et al. 2011
Gag	Vírus HIV-1	+		Brenton M et al. 2007
Eritropoietina	Humana		+	Breitling R et al. 2002
EGFP	----	+		Breitling R et al. 2002; Kushnir S et al. 2005; Niculae A et al. 2006; Fritsche C et al. 2007; Foldynová-Trantirková S et al. 2009; Bolhassani A et al. 2011
Precursor alfa amiloide	Humana		+	Klatt S et al. 2013
Clorofenicol acetiltransferase	Homóloga	+		Orlando TC et al. 2007
Cu/Zn Superóxido dismutase	Humana	+		Breitling R et al. 2002; Gazdag EM et al. 2010
Lamina-322	Humana		+	Phan, HP et al. 2009
Ativado tecidual plasminogênico	Humana		+	Soleimani M et al. 2007; Hemayatkar M et al. 2010
Luciferase	---	+		Lang T et al. 2005; de La Llave E et al. 2011.
Convertase	Mamífero		+	Basak, A et al. 2008
Hidroxinitrila liase	Vegetal	+		Dadashpour M et al. 2011
Fator VII de coagulação	Humana	+		Mirzaahmadi S et al. 2011

1.4 – Expressão Gênica em Tripanossomatídeos

O processo pelo qual uma molécula de RNA é sintetizada a partir de um molde de DNA é conhecido como transcrição e é realizado pela enzima RNA polimerase em conjunto a muitos outros fatores de transcrição que auxiliam a enzima no processo. Todas as células procarióticas e eucarióticas devem produzir constantemente moléculas de RNA que estejam envolvidas em processos vitais como reprodução, crescimento, reparo e regulação de metabolismo. As células eucarióticas possuem três diferentes classes de RNA polimerases nucleares, polimerase I, II, e III. Cada uma delas é responsável pela síntese de um diferente

tipo de RNA. Basicamente a polimerase I está envolvida na produção das moléculas das subunidades do RNA ribossomal (RNAr), a polimerase II participa na geração de RNA mensageiro (RNAm) passível de tradução e a polimerase III sintetiza moléculas como RNA transportador (RNAt). A maioria dos organismos controla a expressão de seus genes no início da transcrição, entretanto a regulação gênica também pode ser alcançada durante o processamento do RNA ou no momento da tradução. Estudos a respeito da expressão gênica em eucariotos têm focado principalmente em animais, fungos e plantas, enquanto os dados sobre protozoários e parasitas carecem de maiores informações (Martínez-Calvillo S, et al. 2010).

O genoma dos tripanossomatídeos é organizado em grandes grupamentos policitrônicos (PGC – *polycistronic gene cluster*), possuindo sequencialmente de dez a centenas de genes codificantes de proteínas em uma única fita de DNA. Os genes de um mesmo PGC possuem a mesma orientação e diferentemente da maioria dos eucariotos são cotranscritos em uma única molécula policitrônica. Normalmente estes genes não codificam para proteínas de funções correlacionadas, ao contrário do que se observa nos grupamentos policitrônicos em procariotos (Campbell DA et al. 2003).

Como consequência da transcrição policitrônica todos os genes que fazem parte do PCG são transcritos igualmente em uma molécula de RNAm primário, contudo, o RNAm secundário maduro dos genes adjacentes se apresentam em diferentes níveis dentro da célula dependendo do seu estágio no ciclo celular e no ciclo de vida. Essa diferença observada é devida ao fato do controle genético dos tripanossomatídeos ser principalmente a nível pós transcricional. As sequências intergênicas não codificantes (UTRs – *untranslated region*) presentes no RNAm primário desempenham importante papel na expressão dos genes pois elas possuem as corretas sinalizações para o processamento da molécula. Corroborando com os estudos moleculares nos tripanossomatídeos um crescente número de trabalhos relatam que a abundância de RNAm e proteína nem sempre está correlacionada, e que há um rígido controle em eventos transcricionais e pós transcricionais nesses parasitos (Martínez-Calvillo S et al. 2010).

Os tripanossomatídeos são alvos de muitos estudos e atraem a atenção de parasitologistas não somente por conta de sua relevância médica, mas também por apresentarem características únicas no controle da sua expressão gênica. Dentre algumas destas características incomuns se encontram a transcrição do RNA mensageiro em um

precursor policistrônico, o processamento deste precursor por reações de *trans-splicing*, e a transcrição de genes codificantes de proteínas pela RNA polimerase I. O transcrito primário de RNAm não é capaz de sofrer o processo de tradução, e para que a tradução nesses microorganismos ocorra a molécula do transcrito primário deve ser processada e sofrer modificações, transformando-se em moléculas de RNAm individuais monocistrônicas. As moléculas de RNAm monocistrônico sistetizadas e passíveis de tradução são possuidoras da região *spliced-leader* e da cauda poli A, completando-se assim os sinais exigidos para a tradução em proteínas. Como resultado uma grande quantidade de RNAm é produzida a partir de uma única iniciação de transcrição (Mayer MG & Floeter-Winter LM, 2005).

Devido aos transcritos primários serem policistrônicos, a clivagem do pré-RNAm deve ocorrer no núcleo produzindo moléculas de RNAm monocistrônicas através de uma reação de transesterificação chamada de *trans-splicing*. Essas reações de clivagens estão ligadas a adição de duas estruturas na molécula de RNAm madura. Na extremidade 5' do RNAm é inserido um exon de RNA não codificante, também conhecido como *spliced leader* (SL) ou mini-exon, de 39 nucleotídeos com a sua extremidade 5' possuindo uma estrutura Cap (**Fig.1.11**). Ao contrário do que acontece no processo de transcrição nos demais eucariotos, no qual as enzimas necessárias para adicionar a extremidade Cap estão associadas a RNA polimerase II, nos tripanossomatídeos a sequência SL adicionada na reação de *trans-splicing* já possui a estrutura Cap na sua extremidade 5'. Enquanto que na extremidade 5' do RNAm maduro a reação de *trans-splicing* se encarrega de adicionar o mini-exon, na extremidade 3' é adicionada uma cauda poliadenilada. Estudos com vários tripanossomatídeos mostram que a adição da SL e a poliadenilação não são eventos independentes, e que ao invés disso eles são estritamente associados e fazem parte de um mecanismo que ocorre simultaneamente ou imediatamente após a transcrição. A adição do SL necessita de um dinucleotídeo AG antecedido de uma região rica em bases pirimídicas como sinal para o sítio de adição. Esta sinalização está compreendida nas regiões intergênicas não codificantes (UTRs) (Clayton CE, 2002; Teixeira SM & daRocha WD, 2003).

O tamanho da região rica em pirimidinas bem como a distância do dinucleotídeo AG se mostraram importantes para a eficiência do processo de *trans-splicing* (Curotto de Lafaille MA et al. 1992, Benz C et al. 2005, Siegel TN et al. 2005). Apesar de não haver sinais dedicados para a poliadenilação sabe-se que o seu sítio é regido pela localização do sítio de inserção da sequência SL no gene presente a *downstream* no transcrito primário

policistrônico. Dependendo da espécie a região para inserção cauda poli A pode variar de 100 à 400 nucleotídeos a frente do sítio do SL (Clayton CE, 2002; Teixeira SM & daRocha WD, 2003).

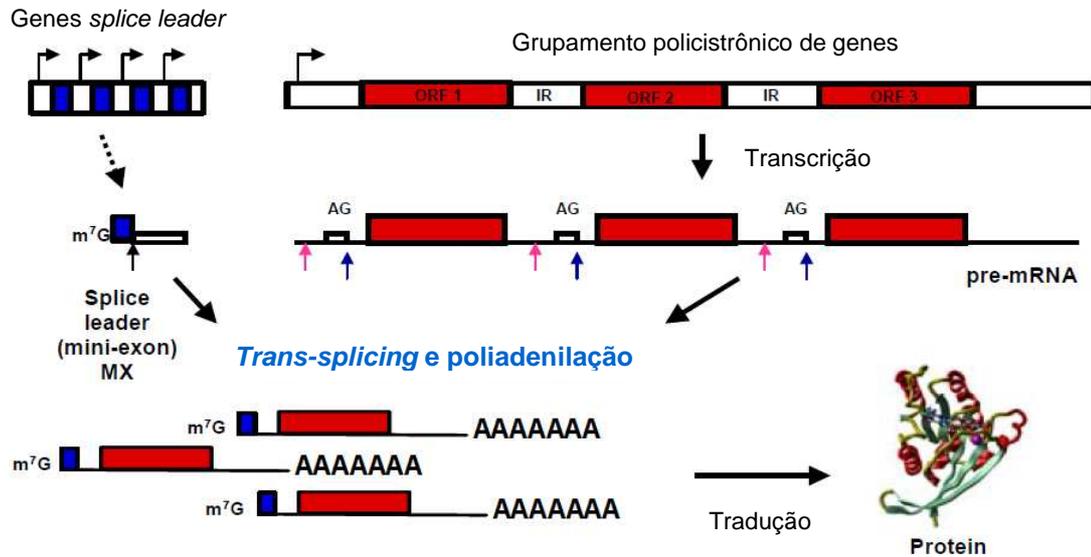


Figura 1.11- Representação esquemática simplificada da regulação gênica pós transcricional em tripanossomatídeos (Jena Bioscience, 2012).

2 – OBJETIVOS

O projeto visa demonstrar o potencial do sistema de expressão em *L. tarentolae*, para a produção de proteínas recombinantes, tendo como modelo a proteína E do vírus vacinal da febre amarela 17DD, para então estabelecer essa ferramenta de expressão no Laboratório de Tecnologia Recombinante.

2.1 – Objetivos Específicos

- Amplificar e clonar o gene *E* do vírus da febre amarela 17DD no vetor de expressão pLEXSY-hyg2;
- Detectar e avaliar a inserção do gene clonado na célula hospedeira recombinante;
- Sequenciar e analisar a identidade da sequência do gene da proteína E do vírus da febre amarela 17DD recombinante no vetor e no genoma de *L. tarentolae*;
- Induzir a expressão e purificar a proteína E recombinante do vírus da febre amarela 17DD produzida em *Escherichia coli*;
- Induzir em animais de experimentação a produção de um soro imune policlonal que seja capaz de reconhecer a proteína E nativa e recombinante do vírus da febre amarela 17DD;
- Expressar e avaliar a expressão da proteína em *L. tarentolae*;
- Utilizar a proteína recombinante E do vírus da febre amarela 17DD produzida em *E. coli* como parâmetro comparativo no estudo de expressão em *L. tarentolae*.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Cultivo da *L. tarentolae*

As células de *L. tarentolae* “host P10”, provenientes da empresa Jena Bioscience (<http://www.jenabioscience.com/>) foram mantidas em meio Grace’s contendo 10µg/mL de streptomomicina e 10U/mL de penicilina, suplementado com 1% de soro fetal bovino. O cultivo foi a 27 °C em garrafas de cultura de 10mL, com dois repiques semanais de 2 a 10% de inoculo do cultivo anterior conforme o necessário.

As células já transfectadas com o gene de interesse foram cultivadas sob as mesmas condições que as não transfectadas, com exceção da adição de 10µg/mL do antibiótico higromicina ao meio de cultura.

Para a criopreservação as células foram cultivadas em 10mL de meio de cultura até atingir-se a densidade de 1×10^8 células/mL, para então serem centrifugadas a 1.500g/10min. Após a centrifugação o sobrenadante do meio foi retirado e o tubo com o *pellet* foi imerso em gelo. Com as células em gelo foi adicionado ao tubo o meio de congelamento, composto de meio Grace’s com 30% de soro fetal bovino e 10% de DMSO estéril. As células foram ressuspendidas delicadamente neste meio com o auxílio de uma pipeta e transferidas para criotubos de 1,8mL. Os criotubos foram incubados imersos em gelo por uma hora. Após uma hora os criotubos foram incubados por 24h no freezer -20°C para só depois serem transferidos para o freezer -70°C, onde foram armazenados.

3.2 – Desenho dos Oligonucleotídeos

Para amplificação do gene *E* do vírus vacinal da febre amarela 17DD, oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados para amplificar a região de interesse, o oligonucleotídeo *forward* Prot E FV e o *reverse* Prot E FV (**Tabela 3.1**). Ambos os oligonucleotídeos possuem os sítios para as enzimas de restrição, *Xba*I e *Kpn*I. Esse fragmento do genoma viral flanqueado pelos oligonucleotídeos vai desde o nucleotídeo na posição 974 ao 2.299, totalizando 1.326 pares de base. Em sua totalidade o gene *E* do vírus da febre amarela vai desde o nucleotídeo na posição 974 até o nucleotídeo na posição 2.452,

contudo os últimos 153 nucleotídeos correspondentes à região da proteína que fica ancorada no envelope viral foram removidos na estratégia de clonagem do presente trabalho.

Tabela 3.1 – Sequência dos oligonucleotídeos utilizados.

Nome	Sequência 5'- 3'	Local de anelamento	Posição de anelamento	Enzima de restrição	Aplicação
Prot E FV <i>Forward</i>	CATCTAGACGCTCACTGCATTGGAATTAC	Genoma da cepa vacinal 17DD do vírus da febre amarela	974-993	<i>Xba</i> I	Amplificação do gene <i>E</i> por RT-PCR
Prot E FV <i>Reverse</i>	CAGGTACCAAAGGCAGGCCAAACACC	Genoma da cepa vacinal 17DD do vírus da febre amarela	2.281-2.299	<i>Kpn</i> I	Amplificação do gene <i>E</i> por RT-PCR
P1442 <i>Forward</i>	CCGACTGCAACAAGGTGTAG	Vetor pLEXY	80pb na frente do códon de iniciação ATG	----	Sequenciamento diagnóstico
A264 <i>Reverse</i>	CATCTATAGAGAAGTACACGTAAAAG	Vetor pLEXY	80pb após o códon de terminação	----	Sequenciamento diagnóstico
F3001 <i>Forward</i>	GATCTGGTTGATTCTGCCAGTAG	Porção 5' do <i>locus ssu</i> do cromossomo de <i>L. tarentolae</i>	----	----	PCR diagnóstico
A1715 <i>Reverse</i>	TATTCGTTGTCAGATGGCGCAC	Região <i>utr1</i> do vetor pLEXY-hyg2	----	----	PCR diagnóstico
A3804 <i>Forward</i>	CCGATGGCTGTGTAGAAGTACTCG	Gene <i>hyg</i> do vetor pLEXY-hyg2	----	----	PCR diagnóstico
F3002 <i>Reverse</i>	CTGCAGGTTACCTACAGCTAC	Porção 3' do <i>locus ssu</i> do cromossomo de <i>L. tarentolae</i>	----	----	PCR diagnóstico
MinAB <i>Forward</i>	AGATTTTGAAGCGCGCAGGCGC	Região Mini-exon	72-95	----	Deteção de transcritos
F8S <i>Forward</i>	CAGCAGCCACAAGGTCGAGAAG	Região 5' do gene 8S	498-520	----	Deteção de transcritos
R8S <i>Reverse</i>	GGTAGAACTGAAGCTCCGCACC	Região 3' do gene 8S	613-634	----	Deteção de transcritos
LF6 <i>Forward*</i>	GCTGAAGAGAACGAAGGGGA	Genoma da cepa vacinal 17DD do vírus da febre amarela	1.220-1.239	----	Sequenciamento diagnóstico
LF7 <i>Reverse*</i>	TCCCCTTCGTTCTTTCAGC	Genoma da cepa vacinal 17DD do vírus da febre amarela	1.220-1.239	----	Sequenciamento diagnóstico
LF8 <i>Reverse*</i>	GTGTCCTTTGTAACCCTCATTGC	Genoma da cepa vacinal 17DD do vírus da febre amarela	1.754-1.776	----	Sequenciamento diagnóstico
LF9 <i>Forward*</i>	GCGGGGTGTGGAGAGAG	Genoma da cepa vacinal 17DD do vírus da febre amarela	1.638-1.654	----	Sequenciamento diagnóstico
LF10 <i>Forward*</i>	TGGAGGGTTCTTCACTTCGG	Genoma da cepa vacinal 17DD do vírus da febre amarela	2.242-2.261	----	Sequenciamento diagnóstico
LF11 <i>Reverse*</i>	CCGAAGTGAAGAACCCTCCA	Genoma da cepa vacinal 17DD do vírus da febre amarela	2.242-2.261	----	Sequenciamento diagnóstico
LF53 <i>Forward*</i>	AAACACCATCTAACAGGAATAACCG	Genoma da cepa vacinal 17DD do vírus da febre amarela	10.354-10.378	----	Amplificação no RT-PCR
LF54 <i>Reverse*</i>	AGTGGTTTTGTGTTTGCATCCA	Genoma da cepa vacinal 17DD do vírus da febre amarela	10.840-10.862	----	Amplificação no RT-PCR

* Oligonucleotídeos desenvolvidos na Vice Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico (VDTEC), no Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER), em Bio-Manguinhos, e fazem parte de uma coleção de oligonucleotídeos utilizada para o sequenciamento do genoma viral da cepa vacinal 17DD do vírus da febre amarela.

3.3 – Extração do RNA Viral

O RNA viral da cepa vacinal 17DD foi obtido utilizando-se o kit “Kit QIAamp Viral RNA Mini” (QIAGEN Cat# 52904). A extração foi realizada a partir de uma vacina experimental produzida em cultura de células no Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV), em Bio-Manguinhos Fiocruz e sequenciada no Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER). A extração foi realizada de acordo com as orientações fornecidas pelo fabricante do kit.

3.4 – RT-PCR e Purificação do Fragmento do Gene *E*

A partir da fita molde de RNA viral da cepa vacinal 17DD foi realizado um RT-PCR a fim de amplificar o gene *E* do vírus da febre amarela com oligonucleotídeos específicos, o *forward* Prot E FV e o *reverse* Prot E FV (**Tabela 3.1**). O fragmento amplificado com 1.326pb foi flanqueado com os sítios de restrição para as enzimas *Xba*I e *Kpn*I. Como controle positivo da reação foram utilizados oligonucleotídeos específicos LF53 e LF54 (**Tabela 3.1**), desenvolvidos na Vice Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico (VDTEC) no Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) em Bio-Manguinhos, para amplificar um fragmento de 500pb. Para a reação de RT-PCR foi utilizado o kit “Super Script III One-step RT-PCR” (Invitrogen Cat# 12574-018), de acordo com as recomendações do fabricante. A programação no termociclador foi estabelecida para 55°C por 30min, 94°C por 2min, e mais 40 ciclos de: 94°C por 15seg para a desnaturação das fitas, 55°C por 30seg para o anelamento dos oligonucleotídeos e 68°C por 3min para a reação de extensão da polimerase. Ao fim de todos os ciclos, mais uma etapa de extensão adicional, de 68°C por 7min, foi realizada. Os produtos da reação foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% (Sambrook J & Russel DW, 2001) corado com “GelRed Nucleic Acid Stain” (Biotium Cat# 41001), seguindo as orientações do fabricante, e fotografado sob luz ultravioleta.

A banda correspondente ao gene de interesse de 1.326pb foi excisada do gel e o segmento de DNA nela contido foi extraído e purificado com o kit “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega Cat# A9282), seguindo as orientações do fabricante.

3.5 – Clonagem no Vetor de Transferência pLEXSY-hyg2

O vetor plasmidial escolhido para a realização deste trabalho foi o pLEXSY-hyg2 (Jena Bioscience) (**Fig.3.1**). O vetor bifuncional foi utilizado tanto para os passos de

clonagem quanto para os passos de expressão na célula hospedeira *L. tarentolae*. Ele possui o marcador de resistência para o antibiótico higromicina (*hyg*) e para antibióticos da classe dos β -lactâmicos (*bla*), bem como as sequências para o peptídeo sinal (SP), provinda do gene para a enzima fosfatase ácida de *L. mexicana* (*lmsap1*), e para a cauda de seis histidinas (H6) que serão incorporadas à proteína resultante. A sequência do peptídeo sinal permite o direcionamento da proteína sintetizada para o meio extracelular, facilitando a purificação da proteína a partir do sobrenadante de cultura. A sequência de seis histidinas facilita a posterior purificação da proteína, bem como a identificação por anticorpos específicos anti-histidina.

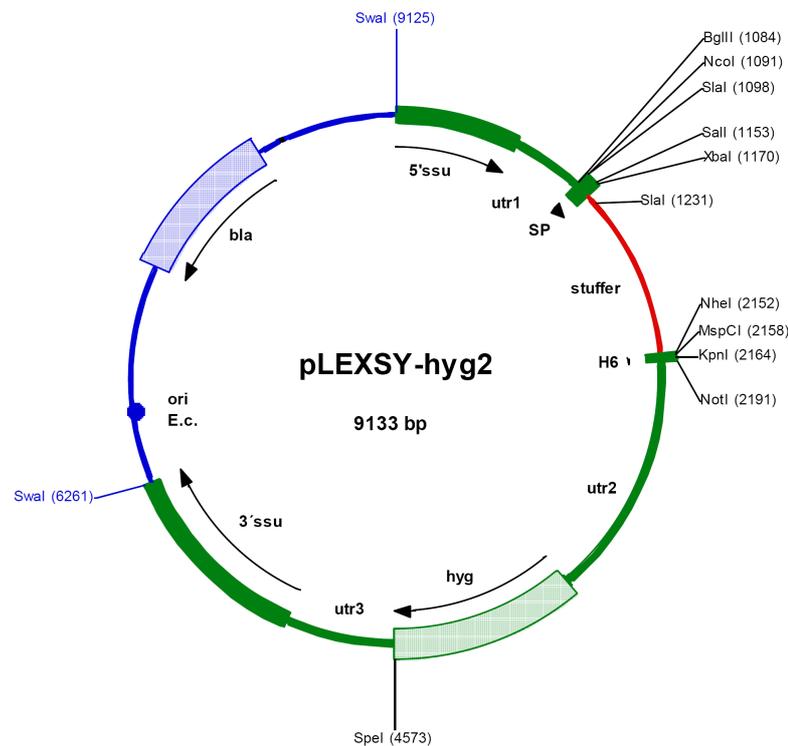


Figura 3.1- Mapa do vetor pLEXSy-hyg2 com os sítios de clonagem. A região *Stuffer* de 1Kpb deve ser substituída pelo gene de interesse. “5’ssu” e “3’ssu” são as regiões para a recombinação homóloga no gene para a sub-unidade menor (18S) do ribossomo no cromossomo hospedeiro. As regiões *utr1*, *utr2* e *utr3* são regiões intergênicas otimizadas não codificantes que servem de sinal para *splicing* pós transcrição. “SP” representa a região de peptídeo sinal e “H6” é região codificante para a cauda de seis histidinas. A região “ori E.c” representa a origem de replicação de *E. coli* e os marcadores de resistência para os antibióticos higromicina e β -lactâmico são representados como “*hyg*” e “*bla*” respectivamente.

Para gerar altos níveis de transcritos, o cassete de expressão foi projetado para se inserir no gene da sub-unidade menor (18S) do RNA ribossomal (RNAr) de *L. tarentolae*, o qual é fortemente transcrito pela RNA polimerase I. Para isso o cassete de expressão é flanqueado por dois fragmentos provenientes do gene da sub-unidade menor 18S do RNA ribossomal (5’ssu e 3’ssu), permitindo assim a posterior recombinação homóloga das duas extremidades.

Nos tripanossomatídeos o RNAm é transcrito sob a forma de um precursor policistrônico que ao término da transcrição é processado em moléculas individuais de RNA através de *splicing*. A regulação gênica ocorre principalmente após a transcrição através de regiões intergênicas não codificantes (UTRs - *untranslated regions*) que sinalizam para o correto sítio de *splicing*. Assim sendo, a escolha da devida UTR é crucial para a construção de um vetor eficiente. Tendo isso em vista e sabendo que os genes para as calmodulinas A, B e C, da própria *L. tarentolae* são dispostos em tandem, as suas regiões intergênicas não codificantes foram mapeadas e então clonadas nas extremidades 3' e 5' do vetor pLEXSY. Com essa medida foi possível obter para o gene de interesse e para o gene do antibiótico de resistência a correta sinalização para o *splicing* após a sua transcrição (Breitling R et al. 2002).

A região *Stuffer* não possui nenhuma funcionalidade a não ser dar lugar, ao longo dos passos da clonagem, ao inserto gênico que se deseja clonar. Para isso, utilizando-se as enzimas de restrição *XbaI* e *KpnI*, 3µg do fragmento do gene *E*, bem como 4µg do vetor pLEXSY-hyg2 foram digeridos pelo período de 3 horas a 37°C. Após a digestão do vetor o mesmo foi purificado da região *Stuffer* através de uma corrida eletroforética em gel de agarose 1%, e a banda de 8,13Kpb correspondente ao vetor linearizado foi purificada a partir do gel com o kit “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega Cat# A9282), seguindo as orientações do fabricante. O produto da digestão do fragmento do gene *E* também foi purificado utilizando o mesmo kit, porém não a partir do gel e sim do produto da digestão.

O vetor e o fragmento do gene *E* foram ligados em uma reação catalisada pela enzima T4 ligase obedecendo-se a proporção de cinco partes do fragmento gênico para cada uma parte do vetor, em um volume final de 20µL. A reação foi incubada a 14°C por um período de 16 horas.

3.6 – Propagação da Construção pLEXSY/gene *E*

O produto da reação de ligação foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli* TOP 10 (Invitrogen), por eletroporação no aparelho “Gene Pulser” (Bio-Rad) sob os seguintes parâmetros: voltagem de 2,5KV; capacitância de 25µF e resistência de 200Ω. Após a eletroporação as células foram incubadas a 28°C, sob a agitação de 200rpm por 1 hora e plaqueadas confluentemente em meio sólido LB contendo 100µg/mL de ampicilina e incubadas durante a noite a 27°C.

A seleção dos recombinantes foi realizada por PCR direto das colônias, utilizando-se os oligonucleotídeos específicos para o gene *E*, *forward* Prot E FV e o *reverse* Prot E FV (**Tabela 3.1**). Os clones positivos foram cultivados em meio LB com 100µg/mL de ampicilina durante a noite a 28°C sob agitação de 200rpm para a extração do DNA plasmidial utilizando o kit “Kit Plasmid Midi” (QIAGEN Cat# 12145), seguindo as orientações do fabricante. Os plasmídeos resultantes também foram testados quanto ao perfil de restrição com a enzima *NcoI*, a qual sabidamente gera três fragmentos de tamanhos diferentes (7.539pb, 726pb e 296pb). Como controle negativo foi utilizado o DNA do vetor pLEXSY digerido nas mesmas condições.

3.7 – Transfecção e Seleção das Células Hospedeiras

O parasito *L. tarentolae* foi transfectado com as construções pLEXSY/gene *E* ou com o vetor pLEXSY/*Stuffer* tanto linearizados quanto em suas formas circulares. A linearização do cassete de expressão e do vetor e foi realizada pela digestão do pLEXSY/gene *E* e do pLEXSY/*Stuffer* com a enzima *SwaI*, removendo-se a região da origem de replicação de *E. coli* junto com o gene *bla* de resistência a β-lactâmicos (~3Kpb) do restante do cassete (~6Kpb). A purificação do fragmento de interesse de 6Kpb foi realizada com o kit “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega Cat# A9282) seguindo as orientações do fabricante, após uma corrida eletroforética em gel de agarose 1% (Sambrook J & Russel DW, 2001).

O correspondente a 350µl de cultura contendo 10⁸ células de *L. tarentolae*/ml em 48h de cultivo foi transfectado por eletroporação com os produtos purificados da digestão com a enzima de restrição *SwaI*, ou com as construções ainda circularizadas nas seguintes condições: voltagem 450V; capacitância 450µF e resistência 50Ω. Depois da eletroporação, as células foram transferidas e cultivadas em meio Grace’s suplementado com 10% de soro fetal bovino contendo 10µg/mL de streptomomicina e 10U/mL de penicilina a 27°C por 24 horas. Após as 24 horas de cultivo que sucederam à transfecção, as células foram selecionadas com a adição de 100µg/mL de higromicina ao meio de cultura e incubadas novamente a 27°C.

As células que receberam as construções circulares passaram pela seleção clonal em meio sólido 2xBHI contendo 1M de HEPES pH 7,4, 4% de uma solução estoque de hemina 4mg/mL, 10µg/mL de estreptomomicina e 10U/mL de penicilina, 20% de soro fetal bovino inativado e 100µg/mL de higromicina. As placas foram incubadas a 27°C durante um período

de aproximadamente 14 dias. Após esse período as colônias em placa foram coletadas com o auxílio da alça de inoculação bacteriana, repassadas para 0,2mL de meio líquido seletivo em placa de 96 poços e incubadas a 27°C por 24 horas. Em seguida esses cultivos foram expandidos para 1mL em meio seletivo, em placas de 24 poços e incubadas a 27°C por mais 24-48h. Após este período de incubação as células foram passadas para 10mL de meio seletivo e usadas para criopreservação e avaliação da expressão.

3.8 – Extração de DNA e PCR Diagnóstico dos Clones de *L. tarentolae*

Com o intuito de se avaliar a correta inserção do cassete de expressão pLEXSY/gene *E* no *locus* do cromossomo da célula hospedeira, e também para detectar a presença do cassete circularizado foi realizado um ensaio de PCR. Para a reação de PCR utilizou-se o material genômico e plasmidial extraído das células hospedeiras de *L. tarentolae* provenientes da seleção após a transfecção com as construções lineares e circulares, respectivamente.

Na extração do material genômico utilizou-se o kit “Wizard SV Genomic DNA Purification System” (Promega Cat# A2361), de acordo com as orientações do fabricante referente ao protocolo para isolamento de DNA genômico a partir de culturas celulares. Na extração da construção circularizada utilizou-se o kit “High Pure Plasmid Isolation Kit” (Roche Cat# 11 754 785 001), de acordo com as orientações do fabricante.

A partir da fita molde de DNA genômico extraído das células selecionadas de *L. tarentolae*, foi realizado um PCR com oligonucleotídeos específicos, o *forward* F3001 e o *reverse* A1715 (Tabela 3.1), para gerar o fragmento de 1.000pb. O oligonucleotídeo *forward* F3001 hibridiza com a região 5' *ssu* presente somente no cromossomo da célula hospedeira, enquanto que o oligonucleotídeo *reverse* A1715 hibridiza com a região *utr1* presente no cassete de inserção pLEXSY/gene *E*. Esse fragmento corresponderá às regiões 5' *ssu* do cromossomo celular + *utr1* do cassete de expressão. Como controle negativo da reação foi utilizado o material genômico extraído de células selvagens. Além destes também foram utilizados como controles os materiais extraídos dos clones transfectados com as construções circulares.

Para esta reação de PCR diagnóstico nº1 foi utilizado o kit “Taq DNA Polymerase” (Invitrogen Cat# 18038-042), de acordo com as recomendações do fabricante. A programação no termociclador foi estabelecida para 94°C por 5min, e mais 40 ciclos de: 94°C por 45seg para a desnaturação das fitas, 60°C por 30seg para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C

por 1min e 30seg para a reação de extensão da polimerase. Ao fim de todos os ciclos, mais uma etapa de extensão adicional, de 72°C por 10min, foi realizada.

Em paralelo, as mesmas amostras de DNA genômico e plasmidial foram utilizadas em outras quatro reações de PCR (reação de PCR diagnóstico nº2, nº3, nº4 e nº5) (**Tablea 3.2**). Na reação de nº2 utilizou-se os oligonucleotídeos *forward* A3804 e o *reverse* F3002 (**Tabela 3.1**), a fim de se observar a formação de um fragmento de 2.100 a 2.900pb a partir do material genômico extraído. O oligonucleotídeo *forward* A3804 hibridiza com a região correspondente ao gene *hyg* presente no cassette de inserção pLEXSY/gene *E*, enquanto que o oligonucleotídeo *reverse* F3002 hibridiza com a região 3'*ssu* presente somente no cromossomo da célula hospedeira. Esse fragmento corresponderá às regiões *hyg* do cassette de expressão + 3'*ssu* do cromossomo celular. Para esta reação a temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos foi alterada para 53°C e o tempo de extensão da polimerase foi alterado para 3min e 30seg.

Na reação nº3 foram utilizados os oligonucleotídeos *forward* A3804 e o *reverse* A1715, a fim de se observar a formação de um fragmento de aproximadamente 6.669pb a partir das construções circulares extraídas. Esse fragmento corresponderá às regiões *utr1* + 5'*ssu* + *bla* + oriE.c + 3'*ssu* + *utr3* + *hyg* do vetor plasmidial. Para esta reação foi utilizado o kit “Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity” (Invitrogen Cat# 11304-011), de acordo com as recomendações do fabricante. Na programação do termociclador a temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos foi alterada para 53°C e a temperatura e o tempo de extensão da polimerase foram alterado para 68°C por 7min e 30seg. Ao fim de todos os ciclos mais uma etapa de extensão adicional a 68°C por 10min foi realizada.

Na reação nº4 foram utilizados os oligonucleotídeos *forward* Prot E FV e o *reverse* Prot E FV a fim de se observar a formação de um fragmento de aproximadamente 1.326pb correspondente ao gene *E*, a partir tanto das construções circulares como do DNA genômico extraídos. Para esta reação foi utilizado o kit “*Taq* DNA Polymerase” (Invitrogen Cat# 18038-042), de acordo com as recomendações do fabricante. Na programação do termociclador a temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos foi alterada para 55°C e, a temperatura e o tempo de extensão da polimerase foram alterados para 72°C por 2min. Ao fim de todos os ciclos mais uma etapa de extensão adicional a 72°C por 10min foi realizada.

Na reação nº5 foram utilizados os oligonucleotídeos *forward* P1442 e o *reverse* A264 a fim de se observar a formação de um fragmento de aproximadamente 1.486pb correspondendo ao gene *E* mais um pedaço da sequência do vetor em cada extremidade, a partir tanto das construções circulares como do DNA genômico extraído. Para esta reação foi utilizado o kit “Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity” (Invitrogen Cat# 11304-011), de acordo com as recomendações do fabricante. Na programação do termociclador a temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos foi alterada para 55°C e a temperatura e o tempo de extensão da polimerase foi alterado para 68°C por 2min. Ao fim de todos os ciclos mais uma etapa de extensão adicional a 68°C por 10min foi realizada.

O produto desta última reação de PCR também foi utilizado para o sequenciamento do gene *E* presente nas construções provenientes da célula hospedeira. Dessa forma foi possível avaliar as modificações sofridas na sequência de nucleotídeos decorrente da replicação nas células de *L. tarentolae*. O sequenciamento foi conduzido conforme descrito no item 3.9.

Todos os produtos das reações anteriormente descritas foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% (Sambrook J & Russel DW, 2001) corado com “GelRed Nucleic Acid Stain” (Biotium Cat# 41001), seguindo as orientações do fabricante, e fotografado sob luz ultravioleta.

Tabela 3.2 – Sumário da reação de PCR diagnóstico.

Reação de nº	Oligonucleotídeos <i>Forward</i> e <i>Reverse</i> utilizados	Tamanho esperado do fragmento do DNA genômico (pb)	Tamanho esperado do fragmento do DNA plasmidial (pb)	Enzima Polimerase utilizada na amplificação
1	F3001 e A1715	1.000	----	<i>Taq</i> DNA Polimerase Invitrogen Cat# 18038-042
2	A3804 e F3002	2.100 a 2.900	----	<i>Taq</i> DNA Polimerase Invitrogen Cat# 18038-042
3	A3804 e A1715	----	6.669	Platinum <i>Taq</i> DNA Polimerase High Fidelity Invitrogen Cat#11304-011
4	Prot E FV e Prot E FV	1.326	1.326	<i>Taq</i> DNA Polimerase Invitrogen Cat# 18038-042
5	P1442 e A264	1.486	1.486	Platinum <i>Taq</i> DNA Polimerase High Fidelity Invitrogen Cat#11304-011

3.9 – Sequenciamento

Após a confirmação dos clones bacterianos recombinantes por PCR e pelo perfil de restrição, foi realizado o sequenciamento nucleotídico das construções dos clones positivos (Clones #2, #3 e #4) utilizando-se kit “Big Dye Terminator” (Life Technologies Cat# 4337455) no equipamento “ABI 3500xL Genetic Analyzer” (Life Technologies), utilizando-se os oligonucleotídeos LF6 ao LF11, e o par P1442 e A264 (**Tabela 3.1**), conforme as orientações do fabricante.

Além das construções presentes nos clones bacterianos, também foram sequenciadas as seqüências nucleotídicas das construções presentes nos clones recombinantes de *L. tarentolae* confirmados pelo PCR diagnóstico no item **3.8** (Clones #2.1 ao #2.8). Para esta reação de sequenciamento foram utilizados os mesmos oligonucleotídeos usados nos clones bacterianos, LF6 ao LF11, e o par P1442 e A264.

As seqüências nucleotídicas provenientes dos eletroferogramas foram analisadas usando o programa DNASTar (Lasergene) versão 4.05, e comparadas com a seqüência de referência da cepa vacinal 17DD do vírus da febre amarela, depositada no *Gene Bank*, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), sob a identificação de YFU17066 (dos Santos CN et al. 1995).

3.10 – Avaliação da Presença de Transcrito por RT-PCR

Foi realizado um ensaio de RT-PCR com o objetivo de se detectar a transcrição de RNAm correspondente a proteína E produzida em células de *L. tarentolae*, bem como identificar o devido processamento da molécula até alcançar o seu estágio final de maturação após a reação de *trans-splicing*. Nesse experimento utilizaram-se os clones positivos confirmados pelo PCR diagnóstico descrito no item **3.8**. Os clones positivos bem como a célula selvagem foram cultivados durante o período de 96h, realizando-se a coleta de células nos pontos de 48h, 72h e 96h de cultivo, quando então foram submetidas à extração de RNA celular total. Para a extração de RNA celular total foi utilizado o kit “RNeasy Mini Kit” (QIAGEN Cat# 74106), seguindo-se as orientações fornecidas pelo fabricante referente à purificação a partir de células animais.

Após a extração do RNA celular total o material foi dosado no aparelho “NanoDrop” (Thermo Scientific) e em seguida o equivalente a 200ng do RNA foi submetido a digestão

com uma enzima “DNase I” (Invitrogen Cat# 18068-015) seguindo as orientações do fabricante. Como controle da reação de digestão também foi submetido à enzima uma amostra do plasmídeo pLEXSY-hyg2. O produto da digestão com a DNase foi utilizado para a síntese de uma molécula de cDNA numa reação de RT-PCR utilizando-se o oligonucleotídeo iniciador *reverse* específico para o gene *E*, *reverse* Prot E FV (**Tabela 3.1**). Para esta reação de RT-PCR foi utilizado o kit “Super Script III One-step RT-PCR” (Invitrogen Cat# 12574-018), de acordo com as recomendações do fabricante. A reação com a enzima transcriptase reversa foi realizada a 55°C por 30min.

Após a síntese do cDNA o produto da reação foi utilizado em outra reação de PCR utilizando-se a enzima “*Taq* DNA Polimerase” (Invitrogen Cat# 18038-042) e os oligonucleotídeos *forward* MinAB (**Tabela 3.1**), específico para a região de mini-exon, e o *reverse* para o gene *E*, Prot E FV. Nesta reação antes de se adicionar o mix do PCR ao tubo de reação, foi primeiramente adicionado somente o molde de cDNA e o par de oligonucleotídeos *forward* e *reverse*. O tubo contendo os oligonucleotídeos e o cDNA foi incubado a 94°C por 5min e logo em seguida imerso no gelo por 1min. Passado 1min foi adicionado no tubo, ainda em gelo, o restante do mix contendo os demais elementos da reação. Essa medida foi necessária devido a formação de uma estrutura secundária em grampo no oligonucleotídeo *forward* MinAB. A programação no termociclador foi estabelecida para 94°C por 5min, e mais 40 ciclos de: 94°C por 45seg para a desnaturação das fitas, 55°C por 30seg para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 1min e 30seg para a reação de extensão da polimerase. Ao fim de todos os ciclos mais uma etapa de extensão adicional de 72°C por 10min foi realizada. Como controle, foi realizada outra reação de PCR em paralelo, porém nesta foi utilizado o par de oligonucleotídeos formados pelo *forward* Prot E FV e o *reverse* Prot E FV (**Tabela 3.1**) enquanto que a programação utilizada no termociclador foi a mesma da reação anterior.

Havia ainda a necessidade de se avaliar a funcionalidade do oligonucleotídeo *forward* MinAB, quanto a sua capacidade de reconhecer a região mini-exon que é inserida no início da molécula de RNAm madura. Assim sendo, com o RNA celular total de células selvagens digerido com DNase e o oligonucleotídeo *reverse* R8S (**Tabela 3.1**) (generosamente cedido pela Dr^a. Claudia Maisini d Avila Levy, pesquisadora da Fundação Oswaldo Cruz no departamento de Biologia Celular e Molecular, Rio de Janeiro/RJ), específico para o gene *8S*, foi sintetizada uma molécula de cDNA, a qual foi usada como molde em um PCR com os

oligonucleotídeos *forward* MinAB e *reverse* R8S. Nesta reação também foi necessário realizar a incubação do tubo reacional contendo apenas a molécula molde com os oligonucleotídeos *forward* MinABA e *reverse* R8S a 94°C por 5min e depois em gelo por 1min antes de se adicionar o restante do mix de reação. O gene *8S* é um gene constitutivo de aproximadamente 660pb que codifica para uma proteína ribossomal da subunidade 40S (Sequência de referência depositada no NCBI sob a identificação: NC_009316.2) (Rogers MB et al. 2011). O oligonucleotídeo R8S foi desenhado para a região compreendida entre os nucleotídeos 613 ao 634 do gene *8S* de *L. braziliensis*. Contudo, essa região presente em *L. braziliensis* mostrou um alto grau de similaridade (86%) com a mesma região no gene *8S* presente em *L. tarentolae* (ANEXO 1). Desta amplificação espera-se observar a formação de uma banda de aproximadamente 670pb, correspondendo ao gene *8S* e a região mini-exon a frente do gene. Ainda no mesmo experimento outro mix foi produzido com o par de oligonucleotídeos *forward* F8S e *reverse* R8S para o gene *8S* (Tabela 3.1). O oligonucleotídeo F8S foi desenhado para a região compreendida entre os nucleotídeos 498 ao 520 do gene *8S* de *L. braziliensis*. Contudo, essa região presente em *L. braziliensis* também mostrou um alto grau de similaridade (81%) com a mesma região no gene *8S* presente em *L. tarentolae*. Desta amplificação espera-se observar a formação de uma banda de aproximadamente 130pb, correspondendo apenas a uma porção do gene *8S*. A programação da máquina termociclador foi a mesma descrita no parágrafo anterior.

Para as reações de PCR descrita nessa seção foram utilizados como controles positivos e negativos um fragmento do gene *E* clonado e o material de RNA extraído das células selvagens. O produto da reação onde foram utilizados os oligonucleotídeos F8S e R8S foram visualizados por eletroforese em um gel de agarose 2,5% (Sambrook J & Russel DW, 2001) corado com “GelRed Nucleic Acid Stain” (Biotium Cat# 41001), seguindo as orientações do fabricante, e fotografado sob luz ultravioleta. Os produtos das demais reações foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1%.

3.11 – Indução da Expressão e Purificação da Proteína E do Vírus da Febre Amarela Produzida em *Escherichia coli*

Para obter a proteína E utilizou-se o clone de *E. coli* BL21 DE3 Star recombinante desenvolvido no LATER a partir da clonagem do gene *E* no vetor de expressão pET28a. Realizou-se o cultivo deste clone em 1L de meio LB Canamicina 100µg/mL Glicose 1% à 37°C com agitação de 200rpm até que alcançasse a densidade ótica (D.O) de 0,6-0,8 (600nm).

Após alcançar a D.O desejada adicionou-se ao meio de cultura 1mL de IPTG (isopropylthio- β -galactoside), um indutor de transcrição genética do operon *lac*, na concentração de 1M de forma que a sua concentração final em solução fosse 1mM. A cultura foi então novamente incubada sob as mesmas condições de temperatura e agitação por um período de 2h. Após a incubação a cultura foi centrifugada e o *pellet* lisado por sonicação com o tampão nº1 (Tris 100mM, NaCl 300mM, Uréia 8M e Imidazol 5mM) respeitando-se a proporção de 5mL de tampão para cada 1g de *pellet* de células. Para a lise das células no sonicador foi realizado um ciclo de 1min no equipamento e 30seg no gelo, e mais três ciclos de 30seg no sonicador e 30seg no gelo. Com os *pellets* já lisados, o material foi novamente centrifugado para se obter uma suspensão clarificada.

A proteína recombinante E produzida em *E.coli* e possuidora de uma cauda de seis histidina foi purificada por cromatografia de afinidade em uma coluna de 10mL de resina de níquel fixado. Após equilibrar a coluna com 50mL (5 volumes de coluna) do tampão nº1 a amostra clarificada obtida por centrifugação foi aplicada, deixando-se ocorrer a interação da amostra com a coluna por um período de 2h imerso em gelo. Ao término das 2h de incubação o *Flow Through* foi coletado e foram iniciados os passos de lavagens da coluna e eluição da proteína de interesse.

Para a lavagem da coluna foi aplicado 50mL do tampão nº1 (Tris 100mM, NaCl 300mM, Uréia 8M e Imidazol 5mM) e em seguida mais 50mL do mesmo tampão. O mesmo processo foi repetido para os demais tampões utilizados nas lavagens subsequentes, são eles: o tampão nº2 (Tris 100mM, NaCl 300mM, Uréia 8M e Imidazol 10mM); tampão nº3 (Tris 100mM, NaCl 300mM, Uréia 8M e Imidazol 20mM); tampão nº4 (PBS pH 7,4, Uréia 6M e Imidazol 40mM); tampão nº5 (PBS pH 7,4, Uréia 4M e Imidazol 40mM); tampão nº6 (PBS pH 7,4, Uréia 4M e Imidazol 500mM) e por fim o tampão nº7 (PBS pH 7,4, Uréia 4M e Imidazol 1M). Todos os tampões, do nº1 ao nº6, passaram duas vezes pela coluna, e com exceção do tampão nº6 o volume correspondente em cada passagem foi de 50mL. Com o tampão nº6 foram realizadas duas passagens de apenas 2,5mL pela coluna, e como tampão nº7 foram realizadas três passagens de 1,5mL cada. A cada passagem dos tampões pela coluna o eluato era coletado e uma alíquota dele (16 μ l) misturada com tampão de amostra para uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 12% sob condições desnaturantes (Laemmli UK, 1970).

Em cada coleta caracterizava-se uma fração diferente indo desde a primeira fração (F3), representando o *Flow Through*, até a última fração (F18) representando o último passo de eluição com o tampão nº7. As frações F1 e F2 representam respectivamente um lisado de células antes da indução da expressão, e o lisado de células já induzido antes da aplicação na coluna. Todas as frações coletadas da F1 a F18 foram analisadas por SDS-PAGE para se determinar em qual fração a proteína de interesse estava presente. Em seguida, as frações coletadas da coluna que continham a proteína foram reunidas em um único recipiente e concentradas simultaneamente à troca de tampão. Para isso foi utilizado um tubo concentrador do tipo AMICON “U-Tube™ 15H-30” com uma membrana filtrante de baixa adsorção de proteína com o poro de 30KDa (Calbiochem Cat# 71882-4).

No processo de troca do tampão adicionaram-se ao tubo concentrador todas as frações obtidas da cromatografia onde se encontrava a maior concentração da proteína de interesse até o volume máximo de 15mL. O tubo foi então centrifugado a aproximadamente 4.000g até que o volume fosse reduzido a 3mL. Após a redução do volume foi adicionado ao tubo o tampão de troca (PBS pH7,4 diluído 1:2 com Triton X-100 0,005%) até atingir novamente o volume máximo de 15mL. O tubo foi novamente centrifugado para reduzir o volume e após, mais tampão foi adicionado. Os passos na troca do tampão foram repetidos no total de 4 vezes conservando-se o volume final de amostra de 3mL. Após a concentração e a troca de tampão o volume da amostra foi dividido em alíquotas e armazenado a -20°C. A quantificação da proteína E purificada seguiu o protocolo do método BCA (Smith PK et al. 1985).

3.12 – Formulação do Composto Imunogênico para Imunização e Obtenção do Soro Policlonal Contra a Proteína E produzida em *E. coli*

Realizou-se a imunização de um animal de experimentação com o intuito de se obter um soro policlonal contra a proteína E do vírus da febre amarela produzida na bactéria *E. coli*. Basicamente, o animal utilizado foi um coelho albino da linhagem Nova Zelândia, no qual foi inoculada o imunógeno cuja formulação consiste da proteína purificada obtida no item 3.11 adsorvida em hidróxido de alumínio como adjuvante. As respectivas concentrações respeitaram a seguinte proporção: 2mg de hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) e 0,2mg de proteína para cada 1mL de volume final da vacina diluída em PBS.

As doses, 1mL cada, foram administradas via intramuscular (quadríceps) em intervalos de sete dias até que fosse aplicado o total de três doses. Passado o período de sete dias após a aplicação da terceira dose o animal recebeu uma dose de reforço de 0,5mL pela

via endovenosa, na marginal da orelha, cuja formulação foi de apenas 0,08mg de proteína. Para este procedimento o animal foi sedado, utilizando-se 100-200mg/Kg de cloridrato de quetamina associado a 5-16mg/Kg de cloridrato de xilazina.

Três dias após o esquema completo de imunização o animal foi submetido a sangria total por punção cardíaca. Para realização do procedimento de punção cardíaca, o coelho foi contido manualmente e anestesiado com tiopental sódico na dose de 50mg/Kg de peso vivo, via intraperitoneal. Ao término do experimento, o animal foi submetido à eutanásia com overdose de tiopental sódico.

O sangue coletado foi acondicionado em tubos falcon de 50mL e incubado com os tubos inclinados em estufa 37°C por 30min e depois na geladeira a 4°C também por 30min. Ao serem retirados da geladeira os tubos foram centrifugados a 1.500g por 20min a 4°C. Após a centrifugação a fase do soro foi removida com o auxílio de uma pipeta e recentrifugada em novos tubos sob as mesmas condições. Novamente, após a formação do precipitado a fase líquida correspondente ao soro foi coletada e aliquoteada para posterior utilização na titulação.

3.13 – Titulação do Soro Policlonal

Uma vez coletado o soro policlonal do animal imunizado procedeu-se com a sua titulação objetivando a detecção da maior diluição capaz de reconhecer a molécula alvo. Para a titulação por Imunoblotting sete diferentes concentrações da proteína utilizada na imunização (250ng; 125ng; 60ng; 30ng; 15ng; 7ng e 3ng) foram adsorvidas na superfície de uma membrana de nitrocelulose de poro 0,22µm e submetidas a diferentes diluições do soro policlonal obtido (1:2.000, 1:4.000, 1:8.000, 1:16.000, 1:32.000, 1:64.000, 1:128.000 e 1:256.000).

Em paralelo também foi realizado uma titulação por *Western Blotting* (Sambrook J & Russel DW, 2001). O correspondente a 2µg da proteína foi submetida a uma eletroforese em gel de poliacrilamida, e transferida do gel para uma membrana de nitrocelulose 0,22µm usando o equipamento “Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell” (Bio-Rad) por 30min a 20V conforme a recomendação do fabricante. Em seguida a membrana foi recortada em tiras separando cada linha de proteína para então também ser incubada com diferentes diluições do soro policlonal (1:8.000, 1:32.000, 1:128.000 e 1:512.000).

Anteriormente à incubação com o soro as membranas foram bloqueadas *over night* a 4°C com uma solução de PBS tween 20 a 0,05% com leite desnatado a 4%. Após o bloqueio cada tira de membrana contendo as diferentes concentrações da proteína foi incubada com uma diluição diferente do soro policlonal. O soro também foi diluído em uma solução de PBS tween 20 a 0,05% com leite desnatado a 4% e a incubação das membranas com as diluições do soro ocorreu a 27°C sob agitação por um período de 2h. Em seguida as membranas foram lavadas três vezes com PBS tween 20 0,05%, e então incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com a enzima fosfatase alcalina (Sigma Cat# A3812) diluído 1:30.000 em PBS tween 20 a 0,05% com leite desnatado a 4%. A incubação com o anticorpo secundário ocorreu sob as mesmas condições utilizadas para as diluições do soro. Após a incubação as membranas foram lavadas três vezes com PBS tween 20 0,05%, e então reveladas no escuro pela adição do substrato da enzima fosfatase alcalina “Western Blue Stabilizer Substrate for Alkaline Phosphatase” (Promega Cat# A9282).

3.14 – Cultivo Celular Para Expressão da Proteína E em *L. tarentolae*

A fim de se avaliar a expressão da proteína E recombinante produzida em *L. tarentolae* as células selvagens e o clone #2.2, escolhido aleatoriamente para avaliação da expressão, foram utilizados em um cultivo otimizado. Para cada tipo de célula um pré-inóculo de 10^5 células/ml foi realizado em duas garrafas de 40ml cada, contendo meio Grace's suplementado com 10% de soro fetal bovino contendo 10µg/mL de streptomomicina e 10U/mL de penicilina. Nas garrafas das células do clone #2.2 também foi adicionado 10µg/ml de hygromicina. O número de células foi estimado pela contagem em câmara de Neubauer com a ajuda do corante azul de trypan a 0,4%, após serem fixadas com 10% de formaldeído. As garrafas foram incubadas a 27°C pelo período de aproximadamente 60h, quando as células se encontravam em fase exponencial de crescimento.

Após as 60h de cultivo as células em cultura foram quantificadas pela contagem em câmara de Neubauer e o volume correspondente a 5×10^8 células foi coletado e centrifugado 1.500g por 10min a 4°C. Após a centrifugação os *pellets* celulares foram lavados três vezes com PBS 7,4 gelado sob a mesma rotação na centrífuga. Após as lavagens os *pellets* de cada tipo celular, selvagens e clones #2.2, foram ressuspendidos em 1ml de meio RPMI sem soro, suplementado com 2mM de L-glutamina e 25mM de HEPES de forma a conservar concentração final de células (Cuervo P et al. 2009). O mesmo procedimento também foi

realizado para a incubação das células em um mesmo volume de PBS 7,4 estéril com 1% de glicose (Elias CG et al. 2009).

As células ressuspensas nos dois meios diferentes foram incubadas pelo período de 4h na estufa a 27°C. Após o período de incubação as suspensões de células em RPMI e PBS Glucose foram centrifugadas em tubos eppendorfs a 20.000g por 1h a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante dos tubos foi cuidadosamente coletado, procurando-se não carrear células na coleta, e recentrifugado a 20.000g por 1h 30min a 4°C. Os *pellets* de células obtidos da centrifugação foram lisados com 500µl do tampão Tris HCl 50mM, NaCl 150mM e Triton X-100 1%, em 3 ciclos de 5min no vórtex e 5min no gelo. Após a lise os tubos foram centrifugados (spin) por 1min, e a porção superior foi coletada para os próximos experimentos.

O sobrenadante coletado após a segunda centrifugação (1ml) foi precipitado com a adição de 4 volumes de acetona gelada (4ml) em tubos falcon de 15ml imersos em gelo. Após a adição da acetona gelada o conteúdo dos tubos falcon foi dividido em tubos eppendorf e incubados *over night* no freezer -20. No dia seguinte os tubos foram centrifugados 20.000g por 1h 30min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e descartado, enquanto os tubos contendo os *pellets* foram incubados abertos na estufa 27°C para secar por aproximadamente 3h. Os *pellets* secos foram recuperados em 100µl de PBS 7,4, concentrando-se as amostras dez vezes.

As amostras de sobrenadante concentrado e *pellets* lisados, ambas adicionadas do coquetel de inibidores de proteases nº VII (Calbiochem Cat# 539138), foram utilizadas na avaliação da expressão em testes como *Dot Blotting*, SDS-PAGE e *Western Blotting*.

3.15 – Avaliação da Expressão da Proteína Recombinante por SDS-PAGE

Para se estudar a presença da proteína recombinante no *pellet* celular e secretada no meio de cultura foi realizada uma análise por eletroforese em gel de poliacrilamida com 10% dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Laemmli UK, 1970) utilizando-se amostras do sobrenadante de cultura concentrado das células de *L. tarentolae* transfectadas ou não e de *pellets* lisados como descrito no item 3.14 da metodologia.

Após a concentração, uma alíquota de cada sobrenadante, aproximadamente 20µg, foi coletada, adicionada ao tampão de amostra de proteína (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 100mM DTT, 2% SDS, 0,1% azul de bromo fenol, 10% glicerol) e fervidas por 5min, para então ser

submetida a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida à 120V por aproximadamente 1h e 30min. No final da eletroforese o gel foi corado com a solução de Coomassie Brilliant Blue-R250 para visualização das bandas correspondentes à proteína recombinante.

3.16 – Avaliação da Expressão da Proteína Recombinante por Immunoblotting

A partir das amostras concentradas dos sobrenadantes de cultura e de *pellets* lisados como foi descrito no item 3.14 as proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose 0,22 μ m. A transferência foi realizada usando o equipamento “Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell” (Bio-Rad) por 30min a 20V conforme as recomendações do fabricante.

Em seguida essas membranas foram submetidas à reação de *Western-Blot* (Sambrook J & Russel DW, 2001), bloqueadas *over night* a 4°C com uma solução de PBS Tween 20 0,05% com leite desnatado 4%. Após o bloqueio as membranas foram lavadas com PBS Tween 20 0,05% e então incubadas pelo período de 2h com o soro policlonal obtido no item 3.12 diluído 1:2000 em PBS Tween 20 0,05% com leite desnatado 4%. Após esta incubação as membranas foram lavadas 3 vezes com PBS Tween 20 0,05% e submetidas por 2h à reação com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com a enzima fosfatase alcalina ou com a enzima peroxidase. As membranas foram então lavadas mais três vezes com o PBS Tween 20 0,05% e reveladas no escuro pela adição do substrato “Western Blue Stabilizer Substrate for Alkaline Phosphatase” (Promega Cat# A9282) ou pela adição do substrato luminescente “SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate” (Thermo Scientific Cat# 34080) (generosamente cedido pela Dr^a. Leila Mendonça Lima, pesquisadora da Fundação Oswaldo Cruz no departamento de Biologia Celular e Molecular, Rio de Janeiro/RJ), sensibilizando e revelando um filme radiográfico, de acordo com as recomendações do fabricante.

4 – RESULTADOS

4.1 – RT - PCR do gene *E*

Na reação de RT-PCR, o RNA genômico do vírus 17DD, cedido pelo LATEV, foi utilizado para obtenção do fragmento do gene *E*. A figura 4.1 mostra os produtos das reações de amplificação, com o fragmento de 500pb da reação controle e um fragmento de 1.326pb correspondente ao fragmento do gene *E*.

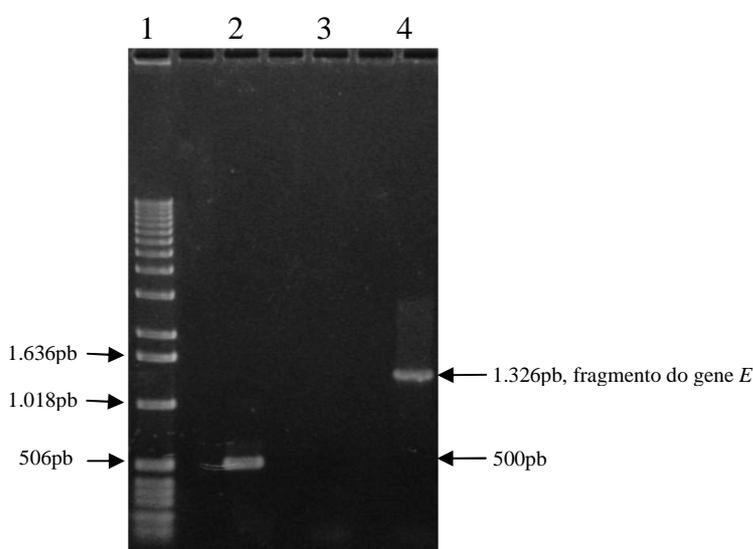


Figura 4.1- Eletroforese em gel de agarose 1% com os produtos da amplificação do fragmento do gene *E* do vírus da febre amarela por RT-PCR. Linha 1: padrão 1Kb DNA ladder (Invitrogen Cat# 15615-016). Linha 2: controle positivo da amplificação. Linha 3: controle negativo da reação de amplificação. Linha 4: produto do RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para o fragmento do gene *E*.

4.2 – Clonagem no Vetor de Transferência pLEXSY-hyg2

O fragmento do gene *E* e o vetor plasmidial pLEXSY-hyg2 foram inicialmente digeridos utilizando a enzima a *KpnI*. A digestão do vetor plasmidial circular levou a formação de uma única banda de aproximadamente 9Kpb, representando a sua linearização (**Fig. 4.2.a, linha 3**). Como controle negativo, utilizou-se uma amostra do vetor não digerido (**Fig. 4.2.a, linha 2**). Após a eletroforese em gel de agarose 1%, a banda correspondente ao vetor plasmidial pLEXSY-hyg2 linearizado foi retirada do gel e o DNA nela contido purificado, obtendo-se o total de 79ng/μL do material. O produto da digestão do fragmento do gene *E* também foi purificado, obtendo-se 71ng/μL de DNA.

Após a purificação, os fragmentos obtidos do vetor e do inserto foram submetidos à digestão com a *Xba*I. A digestão do vetor plasmidial linear levou a formação de duas bandas, uma de aproximadamente 1Kpb, representando a região *Stuffer* e outra de aproximadamente 8Kpb, representando o restante do vetor (**Fig. 4.2.b, linha 3**). Como controle negativo, utilizou-se uma amostra do vetor não digerido (**Fig. 4.2.b, linha 2**). A banda correspondente ao vetor plasmidial pLEXSY-hyg2, de aproximadamente 8Kpb, foi retirada do gel e o DNA nela contido foi purificado, obtendo-se o total de 9,5ng/μL do material. O produto da digestão do fragmento do gene *E* também foi purificado, obtendo-se 62ng/μL de DNA. O vetor e o inserto do gene *E* foram ligados e o produto da ligação utilizado para transformar células competentes de *E. coli* TOP10.

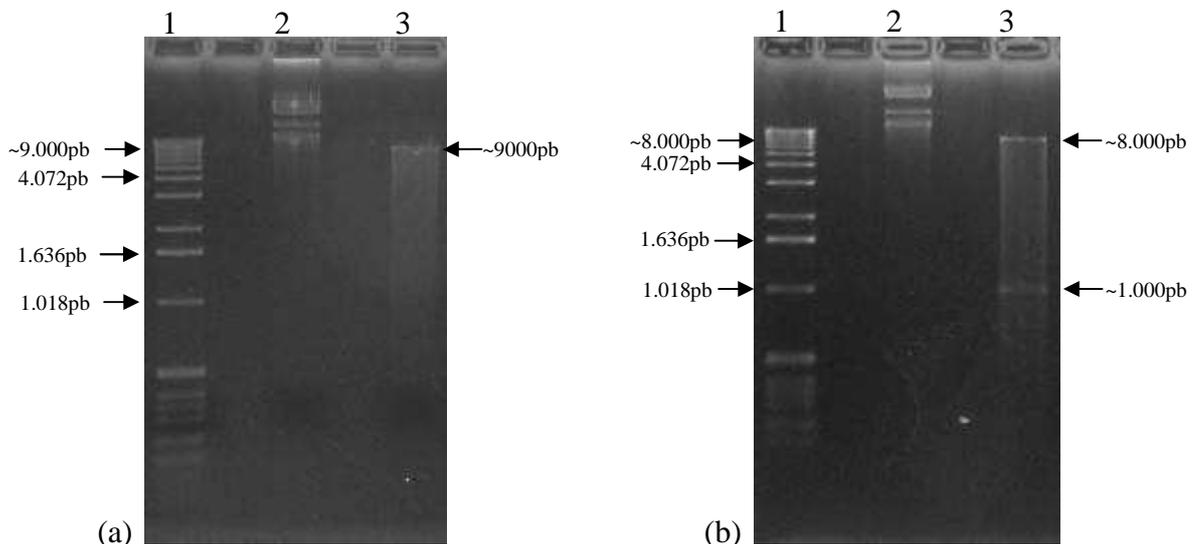


Figura 4.2- Eletroforese em gel de agarose 1% com os fragmentos do vetor pLEXSY-hyg2 obtidos após digestão com as enzimas *Kpn*I e *Xba*I. (a) Digestão primária com a enzima *Kpn*I. Linha 1: padrão 1Kb DNA ladder (Invitrogen). Linha 2: plasmídeo não digerido com *Kpn*I. Linha 3: vetor pLEXSY-hyg2 linearizado pela digestão. (b) Digestão secundária com a enzima *Xba*I. Linha 1: padrão 1Kb DNA ladder (Invitrogen). Linha 2: plasmídeo não digerido. Linha 3: vetor pLEXSY-hyg2 digerido *Kpn*I e *Xba*I.

4.3 – Seleção dos Clones Recombinantes Bacterianos

A seleção das células recombinantes de *E. coli* TOP 10 foi realizada por PCR das colônias obtidas, na qual se identificou 41 clones positivos e 9 negativos (**Fig. 4.3**). Nesta reação foram utilizados os oligonucleotídeos específicos para o gene *E*, *forward* Prot E FV e *reverse* Prot E FV. Como controle positivo foi utilizado como molécula molde o fragmento

do gene *E* amplificado pela reação de RT-PCR. Como controle negativo, realizou-se o PCR a partir de uma colônia de *E. coli* TOP 10 recombinante para a proteína VP1 do vírus da hepatite A. Nos clones positivos observou-se uma banda de aproximadamente 1,3Kb, tamanho esperado para o fragmento do gene *E*.

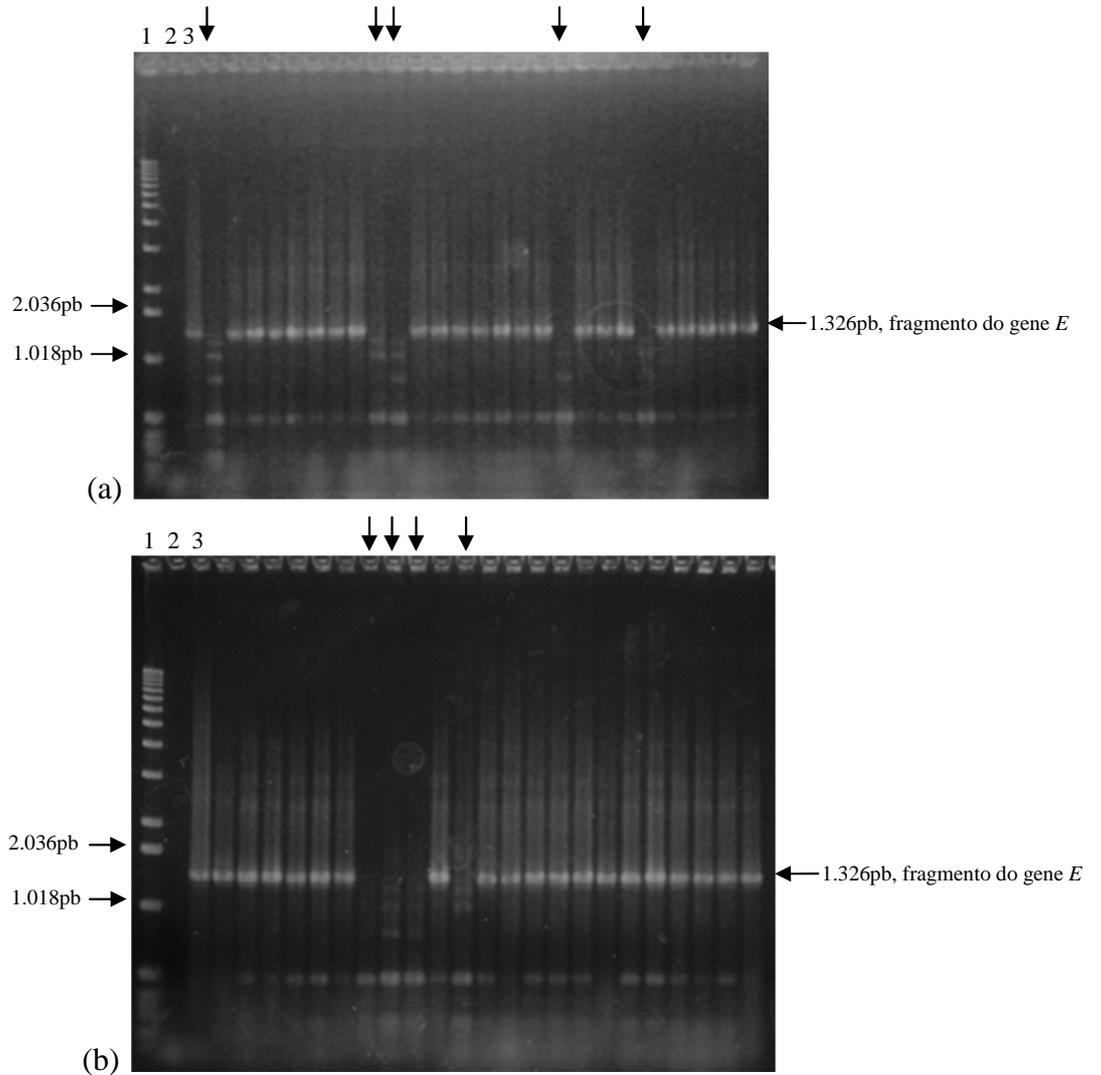


Figura 4.3- Eletroforese em gel de agarose 1% com os produtos da reação de PCR das colônias de *E. coli* TOP 10 possivelmente recombinantes, utilizando-se os oligonucleotídeos específicos para o gene *E forward* Prot E FV e *reverse* Prot E FV. Tanto em (a) como em (b), linha 1: padrão 1Kb DNA ladder (Invitrogen), linha 2: controle negativo com uma colônia de *E. coli* TOP 10 recombinante para a proteína VP1 do vírus da hepaite A, linha 3: controle positivo fragmento do gene *E* purificado. As demais linhas representam produto da reação da PCR dos possíveis clones recombinantes. As linhas apontadas com as setas indicam um resultado negativo de determinada colônia em placa.

Após a confirmação por PCR, três dos clones bacterianos positivos (#2, #3 e #4) foram escolhidos aleatoriamente para a confirmação pelo perfil de restrição com a enzima *Nco*I. Após a eletroforese em gel de agarose 1%, todos os três clones testados se mostraram

positivos para o perfil de restrição esperado, observando-se a formação de três bandas de tamanhos diferentes: 7.539pb, 726pb e outra de 296pb. Como controle negativo da digestão foi utilizado o vetor pLEXSY-hyg2 circular, sem o inserto do fragmento do gene *E*, onde houve a formação de apenas uma única banda de aproximadamente 9Kpb (**Fig. 4.4**).

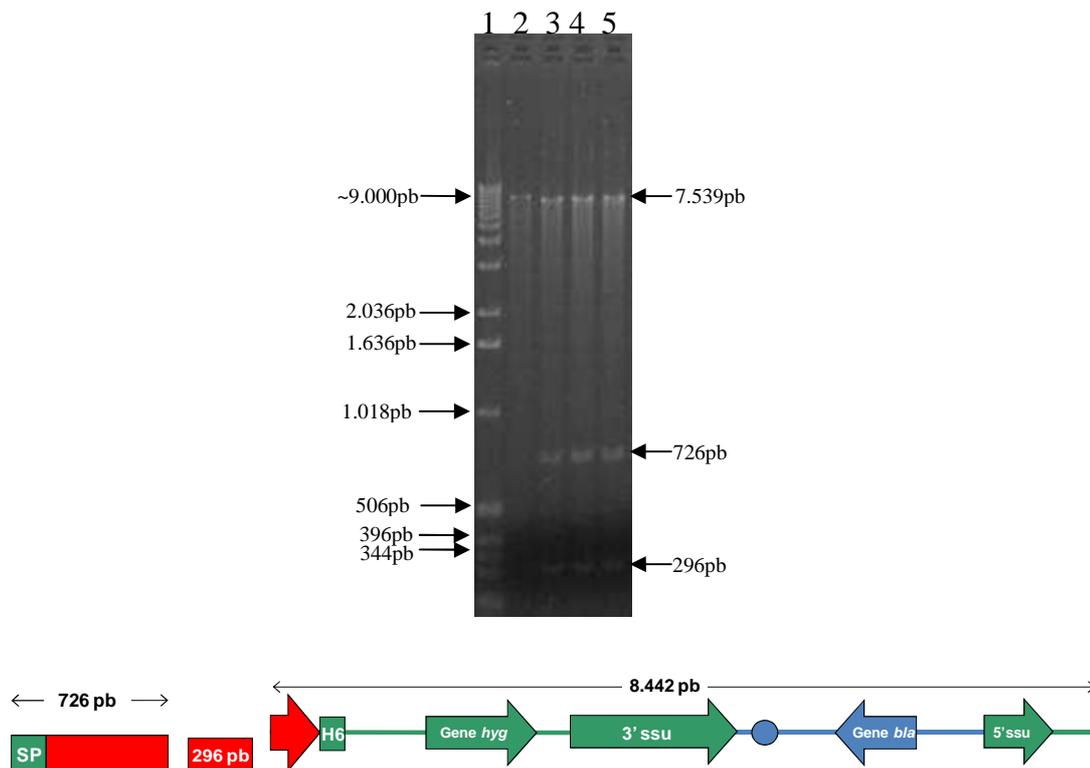


Figura 4.4- Eletroforese em gel de agarose 1% com os produtos das reações de digestão com *Nco*I. Linha 1: padrão 1Kb DNA ladder (Invitrogen). Linha 2: controle negativo com digestão do plasmídeo pLEXSY-hyg2 circular sem o inseto do gene *E*. Linha 3, linha 4 e linha 5 plasmídeos digeridos dos clones recombinantes #2, #3 e #4 respectivamente.

4.4 – Digestão com *Swa*I

As construções pLEXSY/*Stuffer* e pLEXSY/*gene E* circulares, obtida de cada clone bacteriano positivo foi linearizada pela digestão com a enzima de restrição *Swa*I. Após a eletroforese em gel de agarose 1% observou-se a formação de duas bandas no gel: uma de aproximadamente 3Kpb, característica da região correspondente a origem de replicação de *E. coli* e do gene de resistência *bla*; e uma outra banda de aproximadamente 6Kpb, representando o restante do cassete de expressão que será integrado ao cromossoma hospedeiro (**Fig. 4.5**). As bandas correspondentes ao cassete de inserção, de aproximadamente 6Kpb, foram purificadas do gel e os DNAs guardados a -20°C para posterior utilização.

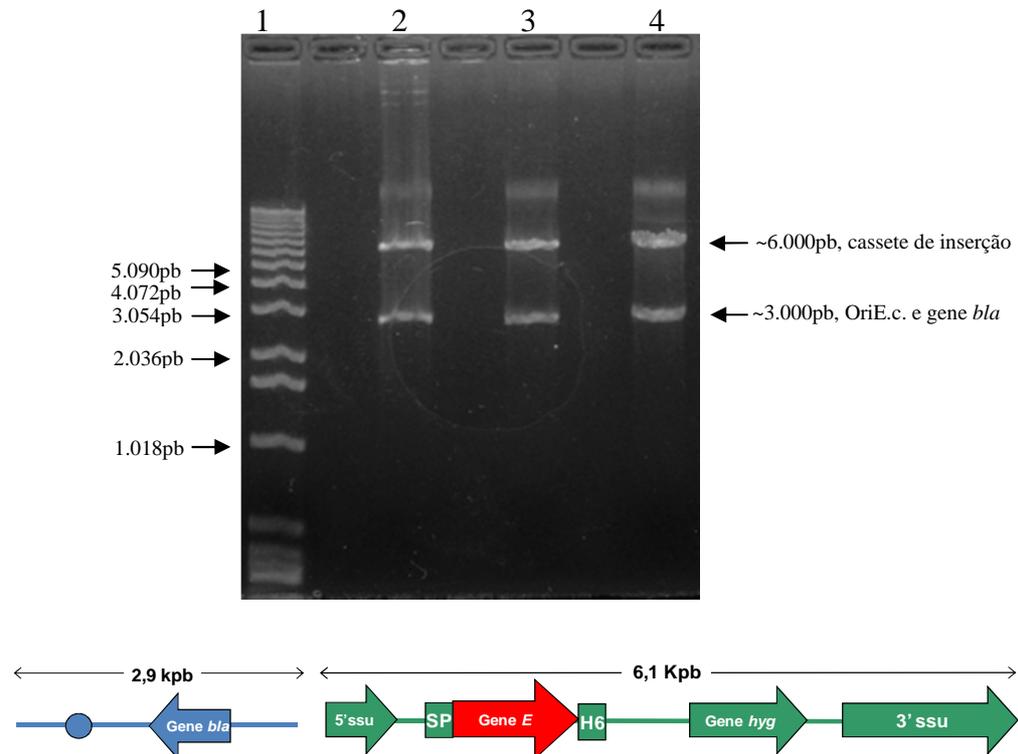


Figura 4.5- Eletroforese em gel de agarose 1% com o resultado da digestão da construção pLEXSY/gene *E*, extraída dos clones recombinantes, com a enzima de restrição *Swa*I. Linha 1: padrão 1Kb DNA ladder (Invitrogen). Linha 2, linha 3 e linha 4 representam respectivamente as digestões das construções extraídas de três clones diferentes #2, #3 e #4.

4.5 – Seleção dos Clones Recombinantes de *L. tarentolae*

As transfecções das células foram realizadas utilizando-se as três diferentes construções pLEXSY/gene *E* obtidas até momento (#2, #3 e #4). Tais construções foram sequenciadas e suas identidades com a sequência original do vírus vacinal 17DD estudada e comprovada. Além de se utilizar na transfecção as construções linearizadas na digestão com a enzima de restrição *Swa*I também se utilizou as mesmas construções ainda circularizadas. Também foram realizadas transfecções com as construções do vetor pLEXSY-hyg2 lineares e circulares que não possuíssem o inserto do gene *E*, mas sim a região *Stuffer* no seu lugar (#pLEXSY/*Stuffer*).

Como resultado foi possível obter, após uma semana de seleção em meio líquido, um total de quatro clones diferentes com o cassete integrativo, sendo um clone proveniente de cada construção. Estas células de *L. tarentolae* foram denominadas de Clones #2, #3, #4 e #pLEXSY linear, referente a cada construção utilizada na geração de tal clone.

A partir das transfecções onde se utilizaram as construções circulares, foi possível obter, após duas semanas de seleção clonal em meio sólido, um total de sete clones provenientes da construção #2. Estes clones foram denominados de Clones #2.1, #2.2, #2.3, #2.4, #2.5, #2.6 e por fim o #2.8, referente à ordem em que foram isolados. Também se obteve um clone da transfecção com a construção vetor #pLEXSY/*Stuffer* circular, e esse clone foi nomeado de #pLEXSY circular.

4.6 – PCR Diagnóstico

Nesse experimento as reações nº1 e nº2 de PCR serviram para constatar a inserção do cassete de expressão do gene *E* no *locus* gênico das células transfectadas com as construções linearizadas (#2, #3, #4 e #pLEXSY linear). Para isso utilizou-se os pares de oligonucleotídeos específicos *forward* F3001 e o *reverse* A1715 na reação nº1, e o par *forward* A3804 e o *reverse* F3002 na reação nº2 (**Tabela 3.1**). Como um dos controles negativos foi utilizado água no lugar de DNA e como outro controle foi utilizado o material genômico extraído de células de *L. tarentolae* selvagens.

Visto que os oligonucleotídeos *forward* F3001 e o *reverse* F3002 são específicos para a região *ssu* presente apenas no cromossomo da célula, espera-se observar a formação de um fragmento de aproximadamente 1.000pb e de 2.100-2.900pb em cada reação respectivamente (**Fig.4.6**) para se comprovar a inserção correta. Não foram observadas em nenhuma das reações descritas e mostradas abaixo as respectivas bandas provenientes das amplificações (**Fig. 4.6, linhas 4 a 7**). É possível visualizar apenas bandas resultantes de amplificações inespecíficas nos clones circulares (**Fig. 4.6, linhas 8 a 15**). Esse resultado confirma a ausência do cassete de expressão inserido na região do DNA celular correspondente ao *locus* da subunidade menor ribossomal 18S.

A reação nº3 serviu para mostrar a presença do plasmídio de expressão em sua forma circularizada no interior das células transfectadas com a construção circular (#2.1 ao #2.8 e #pLEXSY circular). Para isso utilizou-se o par de oligonucleotídeos específicos *forward* A3804 e o *reverse* A1715 (**Tabela 3.1**). Nesta reação esperava-se observar a formação de uma banda de aproximadamente 6.669pb, comprovando a presença do plasmídio circular. Assim sendo, a formação das tais bandas de amplificação confirmou que o plasmídio se encontrava dentro das células recombinantes selecionadas em meio sólido, e que ainda conservava a sua forma circular (**Fig. 4.7, linhas 8 a 15**).

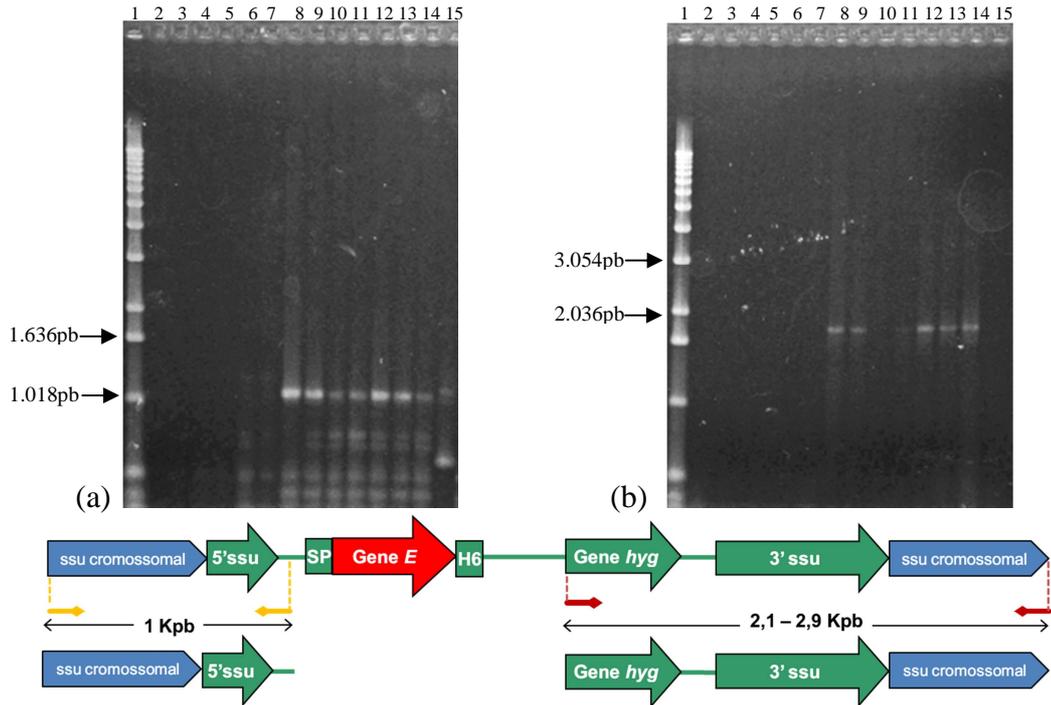


Figura 4.6- Eletroforese em gel de agarose 1% com o produto das reações de PCR diagnóstico n°1(a) e n°2 (b). Tanto em (a) como em (b), linha 1: padrão 1Kb DNA ladder (Invitrogen), linha 2: controle negativo onde o DNA foi substituído por água, linha 3: controle negativo com produto da reação com o material extraído da célula selvagem, linhas 4, 5, 6 e 7 representam os produtos das reações com o material genômico dos clones #pLEXSY linear, #2, #3 e #4 respectivamente, linhas 8 a 15 representam os produtos das reações com o material plasmidial extraído dos clones #2.1 ao #2.8 e #pLEXSY circular respectivamente.

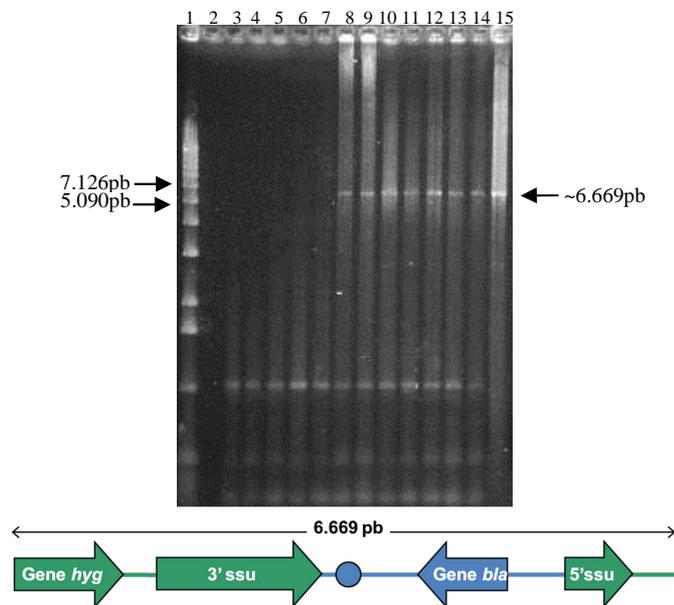


Figura 4.7- Eletroforese em gel de agarose 1% com o produto reação de PCR diagnóstico n°3. Linha 1: padrão 1Kb DNA ladder (Invitrogen). Linha 2: controle negativo onde o DNA foi substituído por água. Linha 3: controle negativo com produto da reação com o material extraído da célula selvagem. Linhas 4, 5, 6 e 7 representam os produtos das reações com o material genômico dos clones #pLEXSY linear, #2, #3 e #4 respectivamente. Linhas 8 a 15 representam os produtos das reações com o material plasmidial extraído dos clones #2.1 ao #2.8 e #pLEXSY circular respectivamente.

Os resultados das reações de PCR diagnóstico de nº4 e nº5 tiveram por objetivo corroborar com os dados obtidos nas reações de amplificação anteriores. Sendo assim, na reação nº4 ao se utilizar o par de oligonucleotídeos específicos para o gene *E forward* Prot E FV e *reverse* Prot E FV (**Tabela 3.1**), esperava-se obter um fragmento de aproximadamente 1.326pb em todas as amostras que possuíssem o gene *E* transfetado com sucesso. Como mostra a figura 4.8 linhas 8 a 14 essa confirmação só foi possível nos clones submetidos à transfecção com a construção circular (#2.1 ao #2.8).

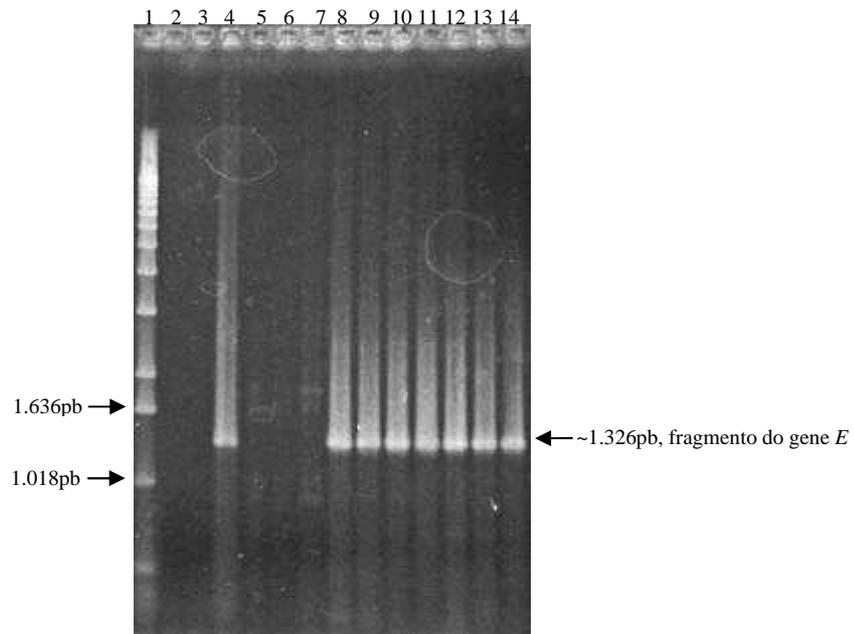


Figura 4.8- Eletroforese em gel de agarose 1% com o produto da reação de PCR diagnóstico nº4. Linha 1: padrão 1Kb DNA ladder (Invitrogen). Linha 2: controle negativo onde o DNA foi substituído por água. Linha3: controle negativo com produto da reação com o material extraído da célula selvagem. Linha 4: controle positivo com o fragmento do gene *E* clonado. Linhas 5, 6 e 7 representam os produtos das reações com o material genômico dos clones #2, #3 e #4 respectivamente. Linhas 8 a 14 representam os produtos das reações com o material plasmidial extraído dos clones #2.1 ao #2.8 respectivamente.

O resultado obtido na reação nº5 reafirmou o resultado obtido na reação nº4. Ao utilizar o par de oligonucleotídeos *forward* P1442 e *reverse* A264 (**Tabela 3.1**), esperava-se obter um fragmento de aproximadamente 1.486pb nas amostras que possuíssem o cassete de expressão junto com o gene *E*, enquanto que a construção em que o gene era ausente o fragmento possuiria apenas 1.160pb. A banda de 1.486pb foi observada apenas nos clones circulares (**Fig. 4.9, linhas 9 a 15**), enquanto que nos clones lineares não foi possível visualizar a formação de nenhuma banda (**Fig. 4.9, linhas 6 a 8**). Essas características observadas no gel de agarose com o produto da reação reafirmam a presença da construção circular contendo o gene *E* nos clones recombinantes transfetados com o plasmídeo

circularizado (#2.1 ao #2.8) e a ausência do cassete integrado nos clones transfectados com a construção linear (#2, #3 e #4).

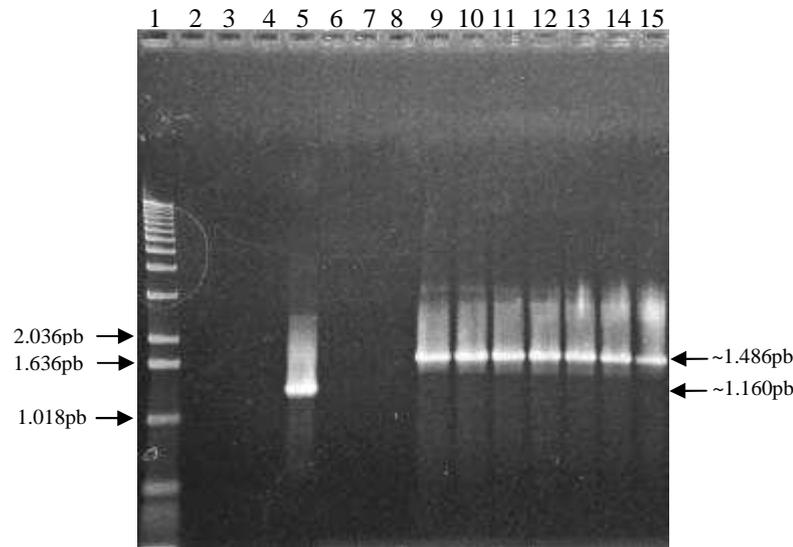


Figura 4.9- Eletroforese em gel de agarose 1% com o produto da reação de PCR diagnóstico nº5. Linha 1: padrão 1Kb DNA ladder (Invitrogen). Linha 2: controle negativo onde o DNA foi substituído por água. Linha 3: controle negativo com produto da reação com o material extraído da célula selvagem. Linha 4: representa o produto da reação com o material genômico do clone #pLEXSY linear. Linhas 5: representa o produto da reação com o material plasmidial do clone #pLEXSY circular. Linhas 6, 7 e 8 representam os produtos das reações com o material genômico dos clones #2, #3 e #4 respectivamente. Linhas 9 a 15 representam os produtos das reações com o material plasmidial extraído dos clones #2.1 ao #2.8 respectivamente.

4.7 – Sequenciamento dos Clones Bacterianos e Eucariotos

Os três clones bacterianos selecionados e confirmados por restrição quanto à presença do inserto do gene *E*, foram submetidos ao sequenciamento, e posterior análise das mesmas frente ao gene *E* do vírus vacinal 17DD. Os resultados demonstraram 100% de identidade de aminoácidos com a sequência molde do vírus vacinal fornecido pelo LATEV.

A molécula de RNA viral utilizada como molde no RT-PCR, proveniente do LATEV, apresentou uma mutação em comparação com a sequência referência YF17066 depositada no *Gene Bank*. A modificação foi a troca de um nucleotídeo adenina para uma guanina na posição 2.110 do genoma viral, posição correspondente ao 1.137º nucleotídeo da sequência do gene *E* clonado (**ANEXO 2**). Contudo, esta mutação não levou a alteração nos aminoácidos da proteína resultante (**Fig. 4.10**).

Essa modificação na sequência de nucleotídeos foi conservada dentre os clones bacterianos recombinantes #2, #3 e #4 provenientes da clonagem. Além desta, outra mutação no gene *E* do clone #3 foi observada na posição 1.003 da sequência nucleotídica do genoma

viral, posição correspondente ao 30º nucleotídeo da sequência do gene *E* clonado (ANEXO 2), havendo a substituição da base timina por uma citosina. Porém, esta também se mostrou silenciosa após o alinhamento das sequências nucleotídicas traduzidas em aminoácidos. Na figura 4.10 as regiões vermelhas indicam correspondência de sequência e as demais regiões em verde indicam a não correspondência devido à presença do peptídeo sinal e da cauda se seis histidinas no início e no fim das sequências respectivamente.

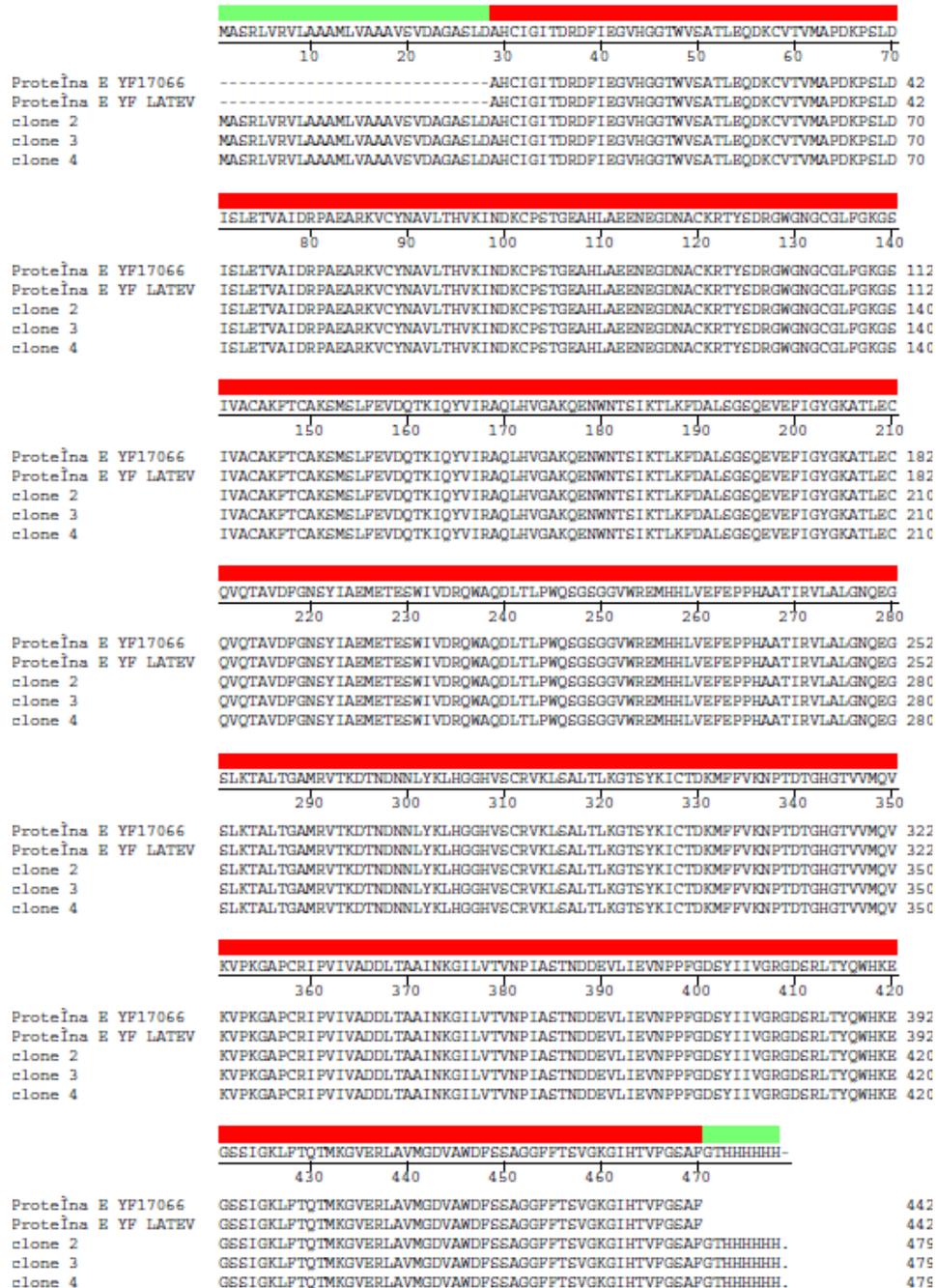


Figura 4.10- Alinhamento entre as sequências de aminoácidos do gene *E* do vírus vacinal da febre amarela 17DD proveniente do LATEV e da sequência de referência YF17066 depositada no *Gene Bank*, bem como dos genes resultantes do processo de clonagem nos clones bacterianos.

Quanto aos clones de *L. tarentolae*, não houve mutação decorrente da replicação das construções nas células hospedeiras (ANEXO 3). A mutação presente na sequência nucleotídica provida do LATEV se conservou em todas as demais construções extraídas dos clones recombinantes de *L. tarentolae* (#2.1 ao #2.8). Não houve também modificações na sequência da proteína resultante da tradução dos nucleotídeos (Fig. 4.11).

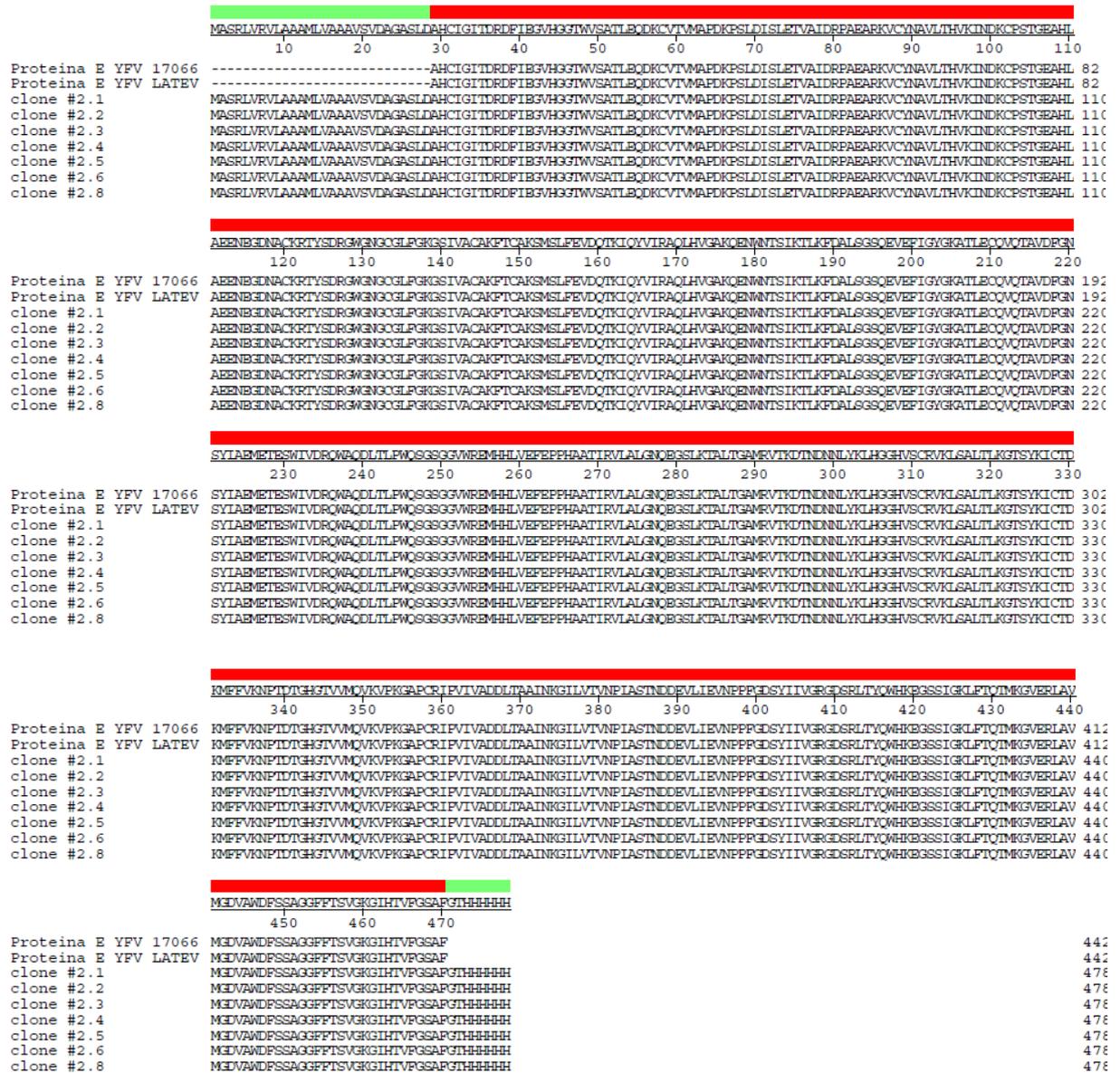


Figura 4.11- Alinhamento entre as sequências de aminoácidos do gene E do vírus vacinal da febre amarela 17DD proveniente do LATEV e da sequência de referência YF17066 depositada no “Gene Bank”, bem como dos genes resultantes do processo de clonagem nos clones de *L. tarentolae*.

Após o alinhamento e análise das sequências de aminoácidos da etapa de sequenciamento, foi utilizada a ferramenta de bioinformática *on line* "ExpASY" (<http://expasy.org/>) para a determinação preditiva do peso molecular da proteína resultante da

expressão em *L. tarentolae*. Segundo o programa a proteína E recombinante teria, incluindo as regiões de peptídeo sinal e cauda de histidina, um tamanho teórico de 51,76KDa e um ponto isoelétrico de 6,34.

4.8 – Detecção de Transcritos por RT-PCR

Ao se realizar esse experimento foi possível determinar quais os clones já selecionados até o momento produziam de fato as moléculas de RNA mensageiro maduras correspondentes à proteína E clonada. Para isso, foi utilizado na síntese do cDNA em uma reação de RT-PCR, o oligonucleotídeo iniciador *reverse* Prot E FV específicos para a sequência nucleotídica referente a proteína desejada, a partir do RNA celular total extraído dos clones positivos para o PCR diagnóstico descrito nos resultados do item 4.6 (#2.1 ao #2.8). Com o cDNA uma nova reação de PCR foi realizada contendo o par de oligonucleotídeos *forward* MinAB e *reverse* Prot E FV.

O teste foi realizado após o cultivo das células recombinantes e selvagens em diferentes tempos (48h, 72h e 96h) para posterior extração do RNA e digestão com a enzima DNase. Os produtos das reações de amplificação dos tempos de 48h, 72h, e 96h de cada clone foram aplicados, lado a lado, em um gel de agarose 1% e os resultados mostraram a ausência de transcritos maduros em todos os clones positivos testados (**Fig.4.12a**), porém, os resultados revelaram a presença de transcritos primários, sendo possível a visualização da banda de aproximadamente 1.326pb correspondente a amplificação do transcrito primário do gene *E* (**Fig. 4.12b**). Como controle positivo na figura 4.12b foi utilizado o fragmento do gene *E* clonado. Como controle negativo ambas as reações tiveram em comum o RNA de células selvagens ou o material genético substituído por água.

A figura 4.13 mostra o controle da reação de digestão com a enzima DNase, onde se submeteu o plasmídeo pLEXSY-hyg2 a digestão com a mesma enzima utilizada na digestão do RNA celular total. Após a digestão do plasmídeo uma alíquota do produto foi aplicada em gel de agarose 1%. Como pode ser observado, a enzima degradou todo o DNA não sendo possível a formação de bandas no gel, enquanto que na linha do plasmídeo não digerido ocorre a formação de diversas bandas.

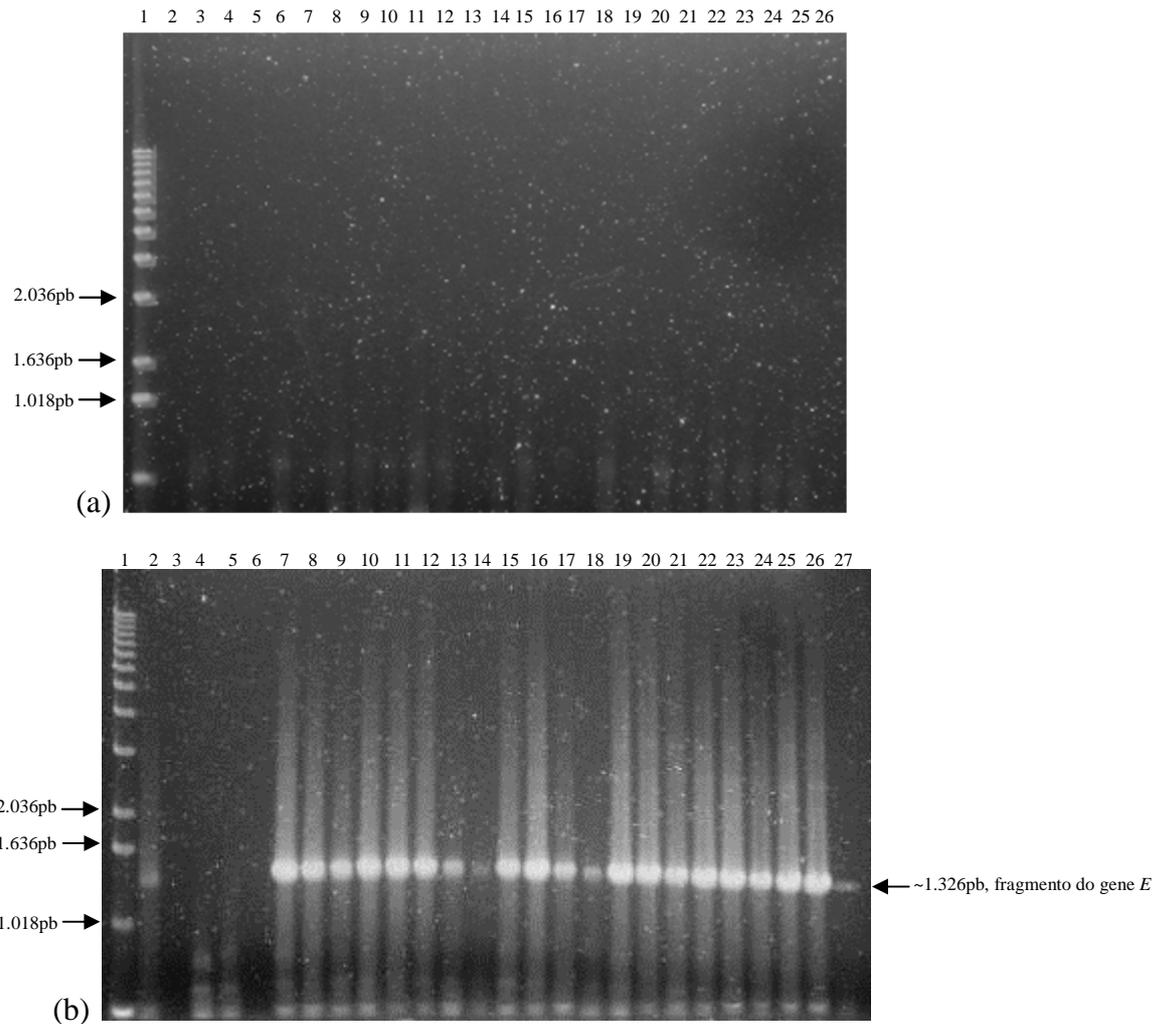


Figura 4.12- Eletroforese em gel de agarose com os produtos da amplificação da reação de PCR a partir do molde de cDNA obtido do RT-PCR usando o RNA celular total das células selvagens e dos clones #2.1 ao #2.8 de *L. tarentolae* digerido com DNase. (a) Produto da reação com os oligonucleotídeos *forward* MinAB e *reverse* Prot E FV. Linha 1: padrão 1Kb DNA ladder (Invitrogen). Linha 2: controle negativo onde o material genético foi substituído por água. Linhas 3, 4 e 5: produto da reação como material genético obtido das células selvagens nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente. Linhas 6, 7 e 8: produto da reação como material genético obtido do clone #2.1 nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente. Linhas 9, 10 e 11: produto da reação como material genético obtido do clone #2.2 nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente. Linhas 12, 13 e 14: produto da reação como material genético obtido do clone #2.3 nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente. Linhas 15, 16 e 17: produto da reação como material genético obtido do clone #2.4 nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente. Linhas 18, 19 e 20: produto da reação como material genético obtido do clone #2.5 nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente. Linhas 21, 22 e 23: produto da reação como material genético obtido do clone #2.6 nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente. Linhas 24, 25 e 26: produto da reação como material genético obtido do clone #2.8 nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente. (b) Produto da reação com os oligonucleotídeos *forward* Prot E FV e *reverse* Prot E FV. Linha 1: padrão 1Kb DNA ladder (Invitrogen). Linha 2: controle positivo onde o material genético utilizado foi o fragmento de gene *E* clonado. Linha 3: controle negativo onde o material genético foi substituído por água. Linhas 4 a 27: produto das reações de amplificação do material genético obtido das células selvagens e dos clones recombinantes #2.1 ao #2.8 conforme descrito em (a).

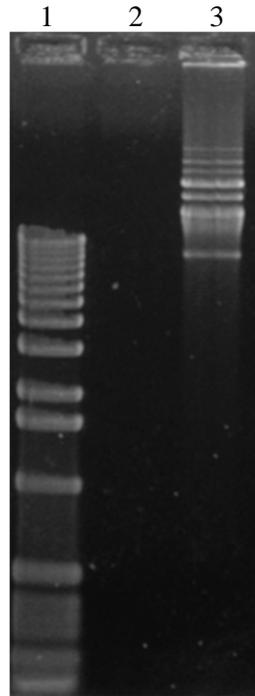


Figura 4.13- Digestão do plasmídeo pLEXY-hyg2 com a enzima DNase I. Linha 1: padrão 1Kb DNA ladder (Invitrogen). Linha 2: produto da digestão do DNA plasmidial com a enzima. Linha 3: amostra do plasmídeo não exposto a ação da enzima.

Para ter certeza de que todo o DNA das amostras de RNA celular total havia sido degradado na digestão com a DNase, foi realizada uma reação de PCR com o par de oligonucleotídeos *forward* Prot E FV e *reverse* Prot E FV a partir das amostras de RNAs digeridos que foram extraídos das células. A figura 4.14 mostra que não houve formação de bandas provenientes da amplificação, confirmando a ausência de moléculas de DNA do gene *E* nas amostras testadas. Como controle positivo foi utilizado um fragmento de DNA do gene *E* clonado.

Ao se avaliar o anelamento do oligonucleotídeo *forward* MinAB constatou-se que ele era capaz de reconhecer a região mini-exon e formar junto com o oligonucleotídeo *reverse* R8S a banda de tamanho esperado para o fragmento correspondente ao gene 8S mais a sequência mini-exon, 670pb (**Fig.4.15 linha 3**). Os oligonucleotídeos *forward* F8S e *reverse* R8S também foram capazes de amplificar um pequeno fragmento de 130pb do gene 8S (**Fig.4.15 linha 5**). A figura 4.15 mostra o resultado do experimento, onde pode-se observar que os controles negativos em que o RNA foi substituído por água não houve formação de bandas, linhas 2 e 4. Ainda na reação com o *forward* MinAB houve a formação de várias bandas de ampliações inespecíficas.

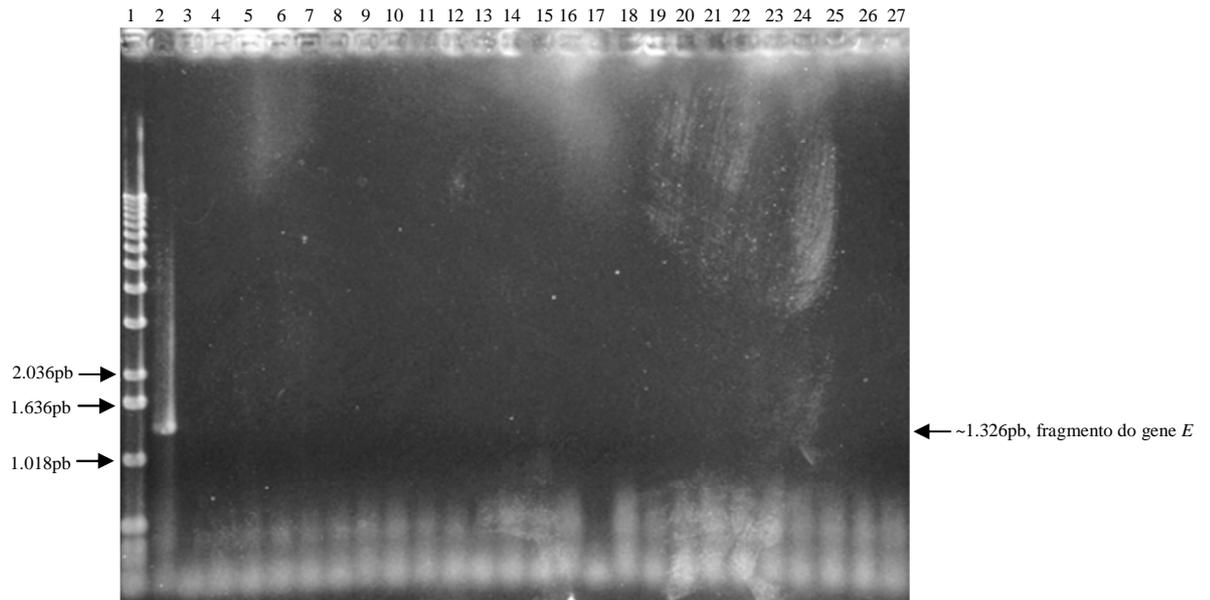


Figura 4.14- Eletroforese em gel de agarose 1% com os produtos das reações de amplificação do PCR utilizando os produtos das digestões com a enzima DNase do RNA celular total extraídos dos clones #2.1 ao #2.8 e células selvagens. Linha 1: padrão 1Kb DNA ladder (Invitrogen). Linha 2: controle positivo com fragmento do gene *E* clonado. Linha 3: controle negativo onde o DNA foi substituído por água. Linhas 4, 5 e 6: produto da reação como material genético obtido das células selvagens nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente. Linhas 7, 8 e 9: produto da reação como material genético obtido do clone #2.1 nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente. Linhas 10, 11 e 12: produto da reação como material genético obtido do clone #2.2 nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente. Linhas 13, 14 e 15: produto da reação como material genético obtido do clone #2.3 nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente. Linhas 16, 17 e 18: produto da reação como material genético obtido do clone #2.4 nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente. Linhas 19, 20 e 21: produto da reação como material genético obtido do clone #2.5 nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente. Linhas 22, 23 e 24: produto da reação como material genético obtido do clone #2.6 nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente. Linhas 25, 26 e 27: produto da reação como material genético obtido do clone #2.8 nos tempos de 48, 72 e 96h, respectivamente.

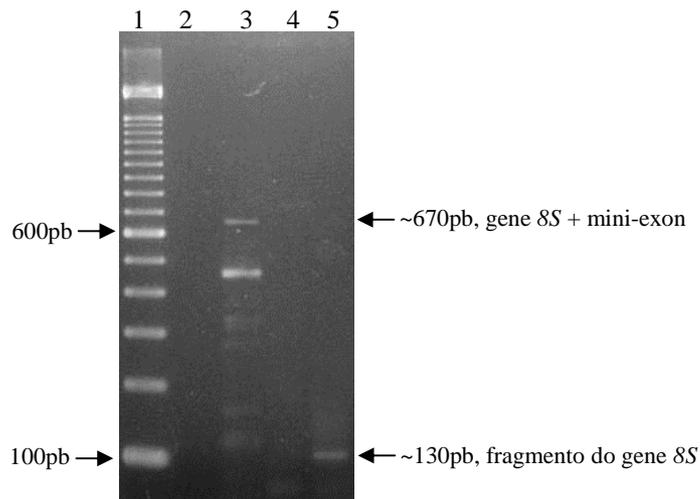


Figura 4.15- Produto da amplificação da reação de PCR para avaliação do oligonucleotídeos MinAB. Linha1: padrão 100pb DNA Ladder (Invitrogen Cat# 15628-019). Linha 2: controle negativo onde o material genético foi substituído por água e contendo os oligonucleotídeos *forward* MinAB e *reverse* R8S. Linha3: produto a amplificação da reação com os oligonucleotídeos *forward* MinAB e *reverse* R8S. Linha 4: controle negativo onde o material genético foi substituído por água e contendo os oligonucleotídeos *forward* F8S e *reverse* R8S. Linha 5: produto a amplificação da reação com os oligonucleotídeos *forward* F8S e *reverse* R8S.

4.9 – Expressão e Purificação da Proteína E de *E. coli*

Durante os passos da purificação da proteína as frações de lavagem e eluição foram armazenadas e analisadas por SDS-PAGE como mostra a figura 4.16. Desde a fração F2 (**linha 3**) até a fração F18 (**linha 20**) é possível acompanhar a presença da proteína E de interesse. Como mostra a figura, os tampões n°6 e n°7 utilizados na eluição foram capazes de carrear a maior parte da proteína, dividindo-a entre as frações F14 (**linha 16**), F15 (**linha 17**), F16 (**linha 18**), F17 (**linha 19**) e F18 (**linha 20**). É possível notar também a ausência da proteína antes da indução por IPTG, visto que não há banda correspondente a ela na fração F1 (**linha 2**), se fazendo presente somente a partir da fração de células induzidas F2 (**linha 3**).

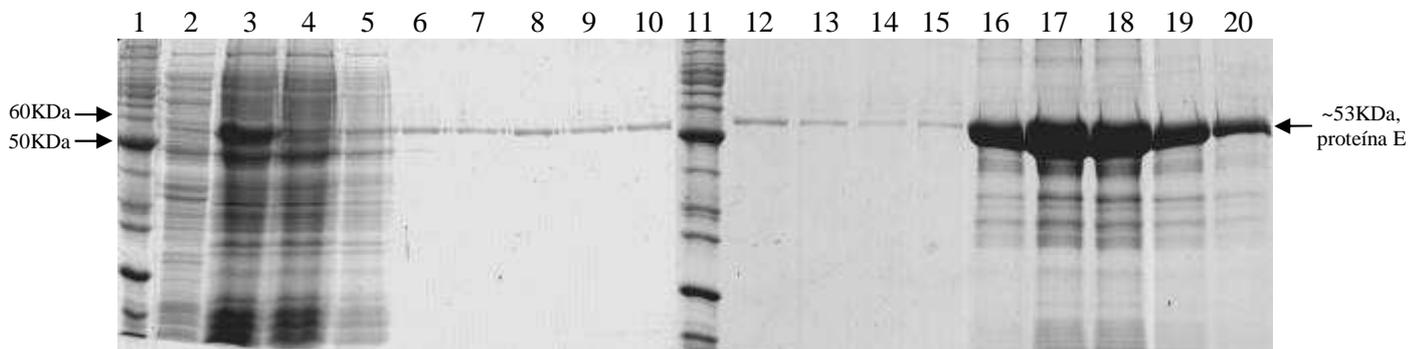


Figura 4.16- SDS-PAGE com as frações coletadas na purificação da proteína E de *E. coli*. Linha 1: padrão de peso molecular Bench Mark (Invitrogen Cat# 10747-012). Linha 2: lisado celular de *E. coli* antes da indução da expressão (F1). Linha 3: lisado celular de *E. coli* após indução da expressão (F2). Linha 4: *Flow Through* (F3). Linha 5: eluato da 1ª lavagem com o tampão n°1 (F4). Linha 6: eluato da 2ª lavagem com o tampão n°1 (F5). Linha 7: eluato da 1ª lavagem com o tampão n°2 (F6). Linha 8: eluato da 2ª lavagem com o tampão n°2 (F7). Linha 9: eluato da 1ª lavagem com o tampão n°3 (F8). Linha 10: eluato da 2ª lavagem com o tampão n°3 (F9). Linha 11: padrão de peso molecular Bench Mark (Invitrogen Cat# 10747-012). Linha 12: eluato da 1ª lavagem com o tampão n°4 (F10). Linha 13: eluato da 2ª lavagem com o tampão n°4 (F11). Linha 14: eluato da 1ª lavagem com o tampão n°5 (F12). Linha 15: eluato da 2ª lavagem com o tampão n°5 (F13). Linha 16: eluato da 1ª lavagem com o tampão n°6 (F14). Linha 17: eluato da 2ª lavagem com o tampão n°6 (F15). Linha 18: eluato da 1ª lavagem com o tampão n°7 (F16). Linha 19: eluato da 2ª lavagem com o tampão n°7 (F17). Linha 20: eluato da 3ª lavagem com o tampão n°7 (F18).

Após a união das frações com a maior parte da proteína (F14 ao F18) e a concentração da amostra, bem como a troca do tampão pelo PBS 0,5x Triton X-100 0,005%, o conteúdo proteico do concentrado foi mensurado pelo método BCA (Smith PK et al. 1985). A partir de uma curva padrão construída com diferentes concentrações de BSA foi possível correlacionar a absorbância da luz visível detectada em um leitor ótico com as concentrações das amostras em mg/mL. A tabela 4.1 abaixo mostra os valores obtidos com a metodologia na determinação da densidade ótica de cada ponto da curva padrão e da amostra testada. Com esses valores foi construído por regressão linear o gráfico 4.1 da curva padrão, possibilitando

a utilização da equação da reta para determinar a concentração de proteínas totais da amostra de proteína E purificada. Sendo assim, o valor da concentração determinada para a proteína foi de 0,51mg/mL.

Tabela 4.1 – Valores da dosagem pelo método BCA da proteína E purificada de *E.coli*.

Tipo de Amostra	Réplicas da Densidade Ótica			Média	Média com a Dedução do Branco	
Padrão de BSA em mg/mL	1	1,363	1,39	1,296	1,350	1,263
	0,5	0,71	0,742	0,745	0,732	0,646
	0,25	0,449	0,462	0,43	0,447	0,361
	0,125	0,289	0,294	0,299	0,294	0,208
	0,062	0,194	0,199	0,196	0,196	0,110
	0,03	0,138	0,143	0,159	0,147	0,060
Branco do Tampão	0,079	0,073	0,107	0,086	-----	
Proteína E Purificada sem Diluição	0,828	0,694	0,711	0,744	0,658	
Proteína E Purificada Diluída 1:2	0,52	0,462	0,449	0,477	0,391	

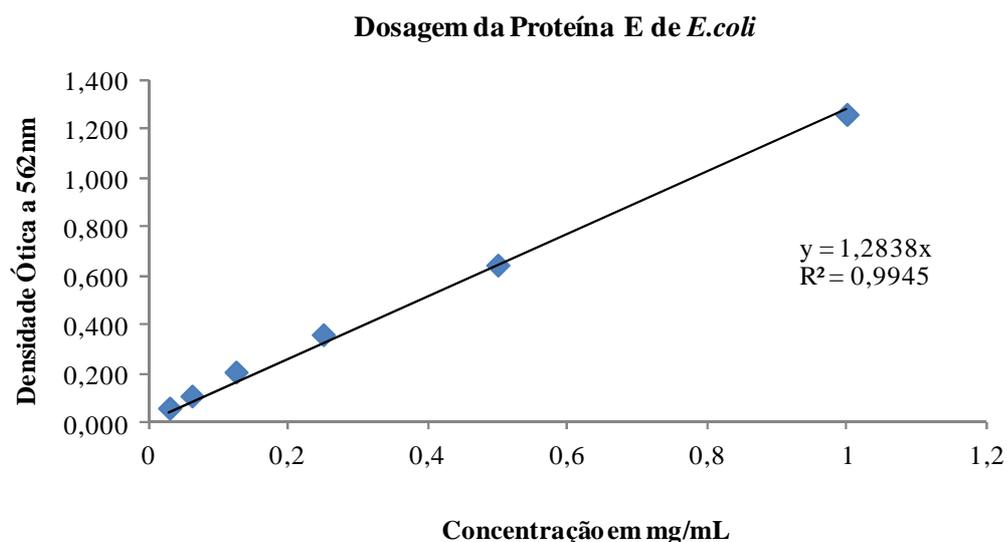


Gráfico 4.1- Curva padrão obtida por regressão linear que mostra a concentração de BSA versus a leitura da densidade ótica a 562nm. Dados obtidos na dosagem da proteína E produzida em *E.coli*.

4.10 – Titulação e Padronização do Soro Imune Policlonal

O soro policlonal obtido da imunização do coelho foi testado contra a proteína E purificada objetivando-se determinar a maior diluição do soro capaz de reconhecer a molécula alvo. A partir da reação de *Western Blotting* é possível observar a formação de uma banda de aproximadamente 53KDa característica da proteína E (**Fig. 4.17**). Este experimento demonstra que o soro foi capaz de reconhecer 2 μ g da proteína até mesmo na diluição de 1:512.000 (**Fig. 4.17, linha 6**). O soro obtido também foi capaz de reconhecer a proteína viral em sua forma nativa, obtida a partir de um extrato de cultura de células infectadas com a cepa vacinal do vírus da febre amarela 17DD (**Fig. 4.17, linha 2**).

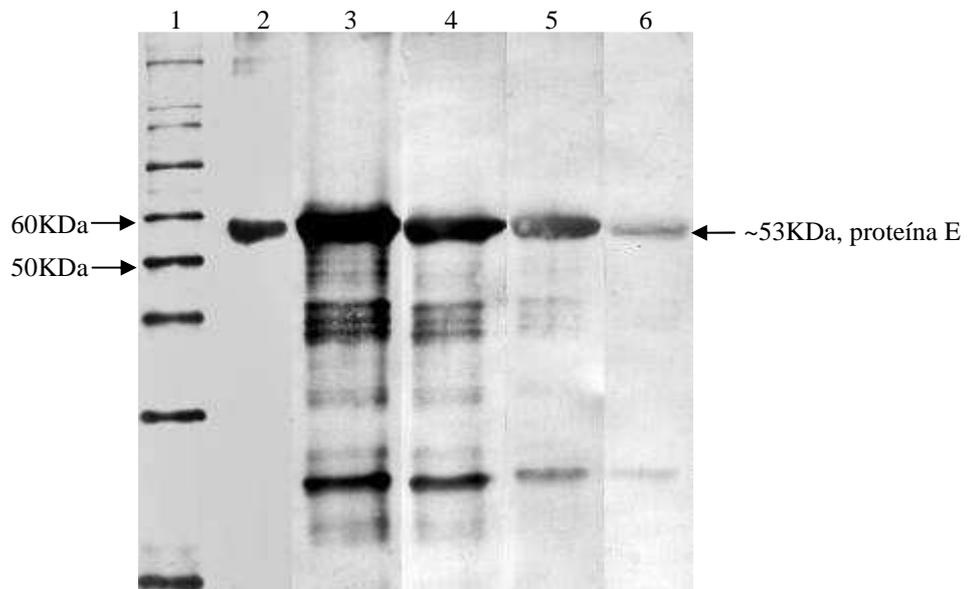


Figura 4.17- *Western Blotting* com 2 μ g da proteína E purificada de *E.coli*. Linha 1: Padrão de peso molecular Magic Mark XP *Western Blotting* Protein Standard (Invitrogen Cat# LC5602). Linha 2: Controle positivo com 2 μ g de proteína E de um extrato de cultura de células infectadas pelo vírus vacinal da febre amarela 17DD revelado com o soro na diluição 1:2.000. Linha 3: proteína E de *E.coli* revelado com o soro na diluição 1:8.000. Linha 4: proteína E de *E.coli* revelado com o soro na diluição 1:32.000. Linha 5: proteína E de *E.coli* revelado com o soro na diluição 1:128.000. Linha 6: proteína E de *E.coli* revelado com o soro na diluição 1:512.000.

Em paralelo também foi realizado um *Dot Blotting* para determinar o limite de detecção do soro policlonal. A figura 4.18 mostra com clareza que o soro foi capaz de reconhecer até 30ng do purificado quando diluído 1:2.000.

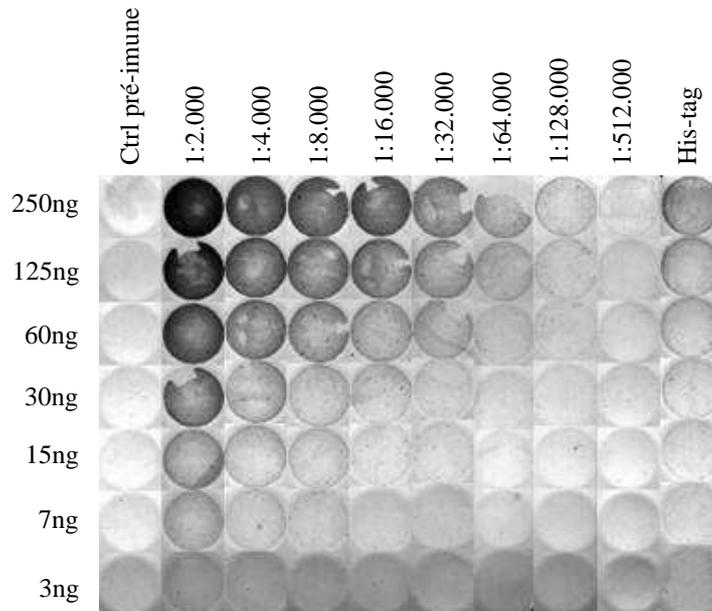


Figura 4.18- *Dot Blotting* com diferentes concentrações da proteína E de *E. coli* em cada linha, e diferentes diluições do soro policlonal em cada coluna. Cada coluna possui sete concentrações diferentes da proteína (250ng a 3ng), e cada uma das colunas foi submetida a uma diluição diferente do soro (1:2.000 a 1:512.000). O controle do soro pré-imune está representado como "Ctrl pré-imune". A coluna "His-tag" foi incubada com uma diluição de um anticorpo anti cauda de histidina "Anti-His6x" (Invitrogen Cat# 372900) na diluição 1:100.

4.11 – Avaliação da expressão da Proteína Recombinante Por SDS-PAGE

Em um gel de poliacrilamida 12% foram aplicadas as amostras de secretoma e *pellet* lisado de células de *L. tarentolae* selvagens e do clone #2.2 (20µg de proteínas totais) com o objetivo de se avaliar a expressão da proteína E recombinante. As amostras preparadas como descrito no item 3.14 da metodologia foram adicionadas do tampão de amostra, fervidas por 5min e aplicadas no gel.

As células utilizadas na preparação das amostras descritas no item 3.14 se encontravam na fase exponencial de crescimento, aproximadamente 60h de cultivo (**Gráfico 4.2**). Nesse gráfico 4.2 é possível observar todos os estágios do ciclo celular das células, bem como o perfil proliferativo das selvagens e do clone #2.2 na presença e na ausência da droga ao longo de 168h, aproximadamente sete dias. As células cultivadas a 27°C em meio Grace's contendo 10µg/mL de streptomomicina e 10U/mL de penicilina, suplementado com 10% de soro fetal bovino, incubadas ou não com o antibiótico higromicina a 10µg/ml, foram estimadas diariamente pela contagem na câmara de Neubauer com o corante azul de trypan 0,4%, após a fixação das células com formaldeído a 10%. É possível notar uma severa queda na taxa proliferativa das células selvagens quando cultivadas na presença do antibiótico de seleção,

enquanto que as células do clone #2.2 mantêm, seja na presença ou ausência de higromicina, uma taxa proliferativa igual a das células selvagens na ausência da droga.

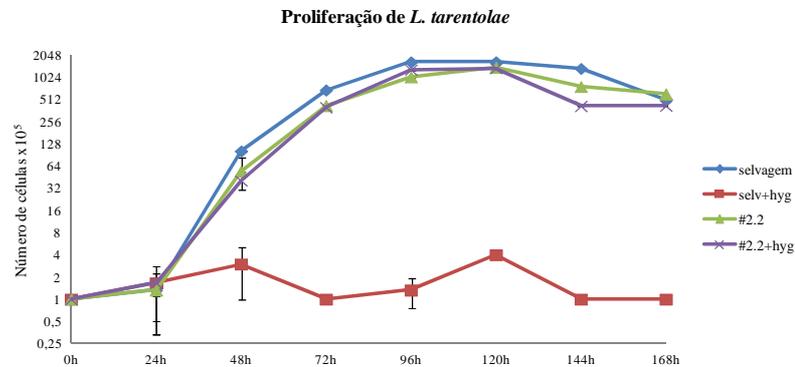


Gráfico 4.2- Perfil proliferativo das células selvagens e do clone #2.2 de *L. tarentolae* na presença e na ausência do antibiótico de seleção higromicina. Selvagem: células selvagens cultivadas na ausência do antibiótico. selv+hyg: células selvagens cultivadas na presença do antibiótico higromicina a 10µg/ml. #2.2: células do clone #2.2 cultivadas na ausência do antibiótico higromicina. #2.2+hyg: células do clone #2.2 cultivadas na presença do antibiótico higromicina a 10µg/ml.

Após a separação das proteínas em seus diferentes tamanhos moleculares a 120V por aproximadamente 1h 30min com a subsequente revelação do gel, foi possível observar o padrão de bandas obtido da eletroforese. A figura 4.19 (a) e (b) linha 2 mostra com clareza a banda característica do controle positivo com a proteína E de *E. coli* (2µg da proteína purificada) de aproximadamente 53KDa, contudo não é possível observar a banda equivalente nas demais linhas onde foram aplicadas as amostras do extrato de células infectadas com o vírus vacinal (linha 3) e nem nas linhas aplicadas com as amostras das células selvagens (4 e 5) e recombinantes (6 e 7).

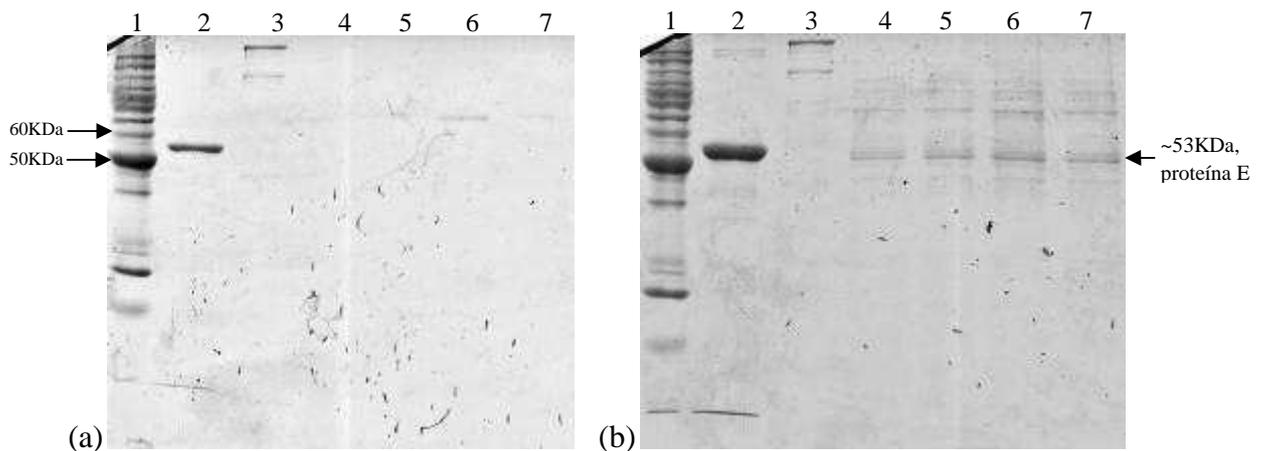


Figura 4.19- SDS-PAGE com as amostras de sobrenadante de cultura (a) e *pellets* lisados centrifugados (b) de células de *L. tarentolae* selvagens e do clone #2.2. Tanto em (a) como em (b), linha 1: padrão de peso molecular Bench Mark (Invitrogen Cat# 10747-012). Linha 2: 2µg da proteína E purificada de *E. coli*. Linha 3: 2µg do extrato E33/1215 de cultura de células infectadas com o vírus vacinal 17DD. Linha 4: 20 µg de proteínas totais das células selvagens incubadas em PBS Glucose 1%. Linha 5: 20µg de proteínas totais das células selvagens incubadas em RPMI. Linha 6: 20µg de proteínas totais das células do clone #2.2 incubadas em PBS Glucose 1%. Linha 7: 20µg de proteínas totais das células do clone #2.2 incubadas em RPMI.

4.12 – Avaliação da Expressão da Proteína Recombinante Por Immunoblotting

A avaliação da expressão da proteína e em *L. tarentolae* também foi realizada através de uma reação de *Western Blotting* utilizando-se um substrato luminescente para a revelação. Para isso as amostras do sobrenadante ou *pellet* lisado centrifugado da cultura em PBS Glucose 1% e RPMI das células selvagens e das células do clone #2.2 foram aplicadas, lado a lado, em um gel de poliacrilamida 12% e submetidas a uma corrida eletroforética. Após a separação das proteínas por seu tamanho molecular elas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e incubadas com o soro policlonal de coelho na diluição 1:2000, e depois com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com a enzima peroxidase. A revelação foi realizada no escuro ao se adicionar o substrato da enzima sobre as membranas.

Após a etapa de transferência e antes da incubação com o anticorpo primário as membranas foram coradas com ponceau 0,4%, evidenciando qualitativamente a eficiência da transferência das proteínas para as membranas. Este dado pode ser observado na figura 4.20 (a) e (d) onde estão representadas as membranas para as quais foram transferidas as amostras de sobrenadante de cultura e de *pellet* lisado, respectivamente. É possível constatar que as membranas continham as proteínas antes da incubação com o anticorpo.

Após a adição do substrato para a enzima peroxidase, a emissão de luminescência foi capaz de sensibilizar um filme radiográfico, e logo em seguida, este foi imerso nas soluções reveladora e fixadora, tornando possível a visualização das bandas. Os filmes radiográficos foram expostos à luminescência proveniente da marcação por dois tempos diferentes, 20min (**Fig.4.20 (b) e (e)**) e 1h (**Fig.4.20 (c) e (f)**).

A visualização com clareza foi possível apenas para os controles positivos da proteína E de *E. coli* e para o extrato celular E33/1215, tanto na revelação das membranas contendo amostras do sobrenadante, (b) e (c), quanto para as membranas contendo amostras de *pellets* lisados e centrifugados, (e) e (f).

Anteriormente a revelação do *Western Blotting* pela enzima peroxidase também foi realizado um ensaio com a revelação pela enzima fosfatase alcalina, contudo não foi possível a visualização da reação positiva nas amostras testadas (Dados não mostrados).

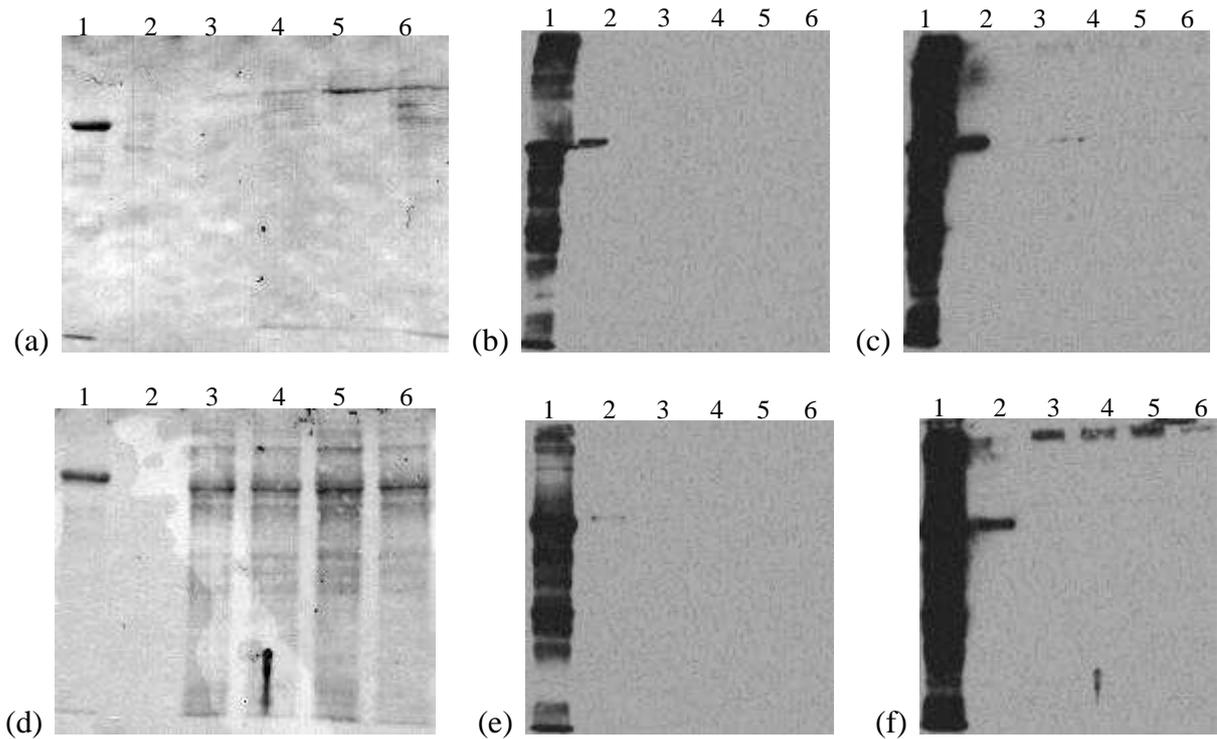


Figura 4.20- Resultado do *Western Blotting* revelado com o substrato luminescente “SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate” (Thermo Scientific Cat# 34080) utilizando-se amostras de sobrenadante de cultura de células selvagens e do clone #2.2 cultivadas em PBS Glucose 1% e RPMI (b) e (c), e de amostras de *pellets* lisados e centrifugados de células selvagens e do clone #2.2 cultivados em PBS Glucose 1% e RPMI (e) e (f). Os filmes ficaram expostos à luminescência durante os tempos de 20min (b) e (e) e 1h (c) e (f). As membranas (a) e (d) representam a avaliação da qualidade da reação de transferência do *Western Blotting*. Na linha superior (a), (b) e (c) se encontram os resultados obtidos a partir do gel onde foram corridas as amostras de sobrenadantes, enquanto que na linha inferior (d), (e) e (f) se encontram os resultados obtidos a partir do gel onde foram corridas as amostras de *pellets* lisados e centrifugados. Em (a), (b), (c), (d), (e) e (f) linha 1: 2 μ g da proteína E purificada de *E. coli*. Linha 2: 2 μ g do extrato E33/1215 de cultura de células infectadas com o vírus vacinal 17DD. Linhas 3 e 4: 20 μ g de proteínas totais das células selvagens. Linhas 5 e 6: 20 μ g de proteínas totais das células do clone #2.2.

5 – DISCUSSÃO

Nos anos de 1990 quando houve o início dos experimentos com transfecção de tripanossomatídeos ainda se conhecia muito pouco a respeito das sequências necessárias para a expressão genética nesses organismos. Entretanto, rapidamente os protocolos de transfecção evoluíram permitindo a manipulação gênica, a geração de mutantes *knockout* e inserção de marcadores genéticos e a identificação dos elementos genéticos envolvidos na expressão. Dessa forma tornou-se possível o desenvolvimento de novos vetores que permitiam altos níveis de expressão de genes heterólogos em diferentes espécies. Tais vetores deveriam possuir os sítios para inserção da SL tanto *upstream* quanto *downstream* ao gene exógeno, para a reação de *trans-splicing* e para a poliadenilação respectivamente, sendo a região promotora da subunidade menor ribossomal 18S a melhor escolha para expressão nesses organismos (Teixeira SM et al. 2003).

Não existe um sistema de expressão universalmente aplicável e é difícil de acreditar que algum dia existirá. Cada proteína é única e exige estratégias diferenciadas para a sua melhor expressão. A compilação de uma longa lista de novos sistemas de expressão é um processo que está em desenvolvimento, entretanto, a identificação do hospedeiro/vetor ideal continua sendo a última questão a ser respondida. O desenvolvimento de sistemas de expressão é um campo dinâmico, que está sempre evoluindo com a identificação de novos hospedeiros e elementos genéticos. Na escolha do sistema mais adequado alguns aspectos críticos devem ser levados em consideração como: a localização celular e vias secreção da proteína de interesse, características físico-químicas da mesma, tempo para geração do clone recombinante e desenvolvimento do sistema, rendimento e pureza da proteína recombinante e contenção biológica na manipulação do organismo recombinante (Sodoyer R, 2004).

Embora nos casos descritos de expressão de proteínas heteróloga em células de tripanossomatídeos patogênicos sejam relatados a obtenção de proteínas biologicamente ativas, a expressão e os rendimentos da proteína recombinante eram baixos, mesurados em microgramas por litro de cultura. Outro fator crítico, além da segurança e a exposição ao risco

na manipulação de organismos patogênicos, é que as espécies patogênicas avaliadas apresentavam baixas taxas proliferativas, além de serem fastidiosas necessitando da adição de soro como fonte de suplemento ao meio de cultura. Essas características são limitantes para a utilização desses tripanossomatídeos como sistema de expressão. Para sobrepujar as limitações descritas, o grupo de Breitling R et al. (2002), desenvolveu um sistema de expressão em *L. tarentolae*, tripanossomatídeos não patogênico ao homem com baixa exigência nutritivas e com altas taxas proliferativas. A estratégia do grupo baseou-se no uso de um cassete de expressão que se integra ao gene da sub-unidade menor ribossomal das células de *L. tarentolae*, pois este gene é fortemente transcrito pela RNA polimerase I (Breitling R et al. 2002).

Dentre as vantagens em relação aos sistemas de procariotos, eucariotos inferiores (leveduras) e superiores a *L. tarentolae* apresenta: 1) sistemas de modificações pós-traducionais bem próximo às das células de mamíferos quando comparado com sistemas como células de inseto e leveduras; 2) nível de expressão superior e taxa de proliferação maior que células de mamíferos e inseto; 3) podem ser facilmente rompidas com a simples utilização de um agente detergente, ou por sonicação representando uma significativa vantagem sobre o sistema em levedura; 4) as células de *L. tarentolae* podem ainda ser cultivadas em meios definidos, para que uma proteína biofarmacêutica sofra menos com a contaminação por príons ou vírus que podem acompanhar culturas de células de mamíferos dependendo do componente de origem animal utilizado como suplemento (Breitling R et al. 2002).

Em eucariotos os genes codificantes para proteínas são transcritos pela RNA polimerase II, enquanto que a RNA polimerase I transcreve genes que codificam para os RNAs ribossomais (RNAr). Entretanto, em tripanossomatídeos é possível que genes codificantes para proteínas sejam transcritos pela RNA polimerase I e sofram a subsequente tradução. Isso se deve a reação de *trans-splicing* do pré-RNA policistrônico. O *trans-splicing* adiciona a região capeada SL de 39 nucleotídeos ao terminal 5' do RNA. O terminal Cap é necessário para o transporte da molécula, estabilidade e eficiência na tradução. Assim, nesses organismos a alta taxa de transcrição da polimerase I é usada para garantir os altos níveis de expressão gênica. No sistema de expressão em *L. tarentolae*, a integração do cassete de expressão no *locus* cromossômico da sub-unidade menor do RNA ribossomal (*ssu*) permite geração de altos níveis de transcritos numa expressão constitutiva. O cassete de

expressão dos vetores de expressão para *L. tarentolae* são flanqueados por dois fragmentos do locus da sub-unidade menor do RNAr (5' e 3' *ssu*) para a recombinação homóloga. Além disso, o mínimo que um vetor precisa possuir para utilização da expressão em *L. tarentolae* consiste em um plasmídeo circular contendo o sinal para o *trans-splicing* do RNAm antes e após ao gene de interesse. Melhores expressões podem ser alcançadas se o gene alvo for antecedido e seguido, respectivamente, de uma região 5' e 3' não codificante (UTR), de um gene fortemente expresso. Já que a regulação gênica em tripanossomatídeos ocorre principalmente a nível pós-transcricional por através das regiões intergênicas UTRs, a escolha da melhor UTR se faz importante para a construção eficiente de um vetor de expressão. O vetor pLEXSY-hyg2 contém três UTR otimizadas: *utr1* de 0,4Kpb proveniente da região intergênica do gene adenina fosforibosil transferase de *L. tarentolae*; *utr2* de 1.4 Kpb da região intergênica das calmodulinas C e B; e a *utr3* de 1,7Kpb da região intergênica do gene para dihidrofolato redutase-timidilato sintase, flanqueando o gene alvo e fornecendo o sinal para o *trans-splicing* para o processamento do RNAm. No sistema de expressão em *L. tarentolae* a proteína heteróloga pode ser expressa tanto associada à célula quanto extracelularmente. Para a secreção, é utilizada no vetor uma sequência sinal proveniente de uma enzima secretada de *L. mexicana*, a fosfatase ácida (*lmsap*). No presente momento o sistema de expressão de *L. tarentolae* representa uma promissora alternativa à células de mamíferos para a produção de proteínas recombinantes (Niimi, 2012).

O correto *trans-splicing* do RNAm, com a adição de uma sequência SL capeada e cauda poliadenilada, a partir de diferentes transcritos produzidos por diferente polimerases é importante para um plano ambicioso de criar um sistema em *L. tarentolae*, um tripanossomatídeo modelo que possui altas taxas proliferativas em meios relativamente baratos, e que pode, em muitos aspectos, ser superior aos já estabelecidos em bactéria e levedura em termos de expressão de proteínas humanas (Simpson AG et al. 2006).

O trabalho de dissertação teve como objetivo avaliar a utilização do sistema de expressão do protozoário *L. tarentolae* como uma nova plataforma de produção de proteínas recombinantes. Para tal, utilizamos com modelo a proteína de envelope E do vírus de febre amarela 17DD. Anteriormente, outras proteínas virais foram obtidas com sucesso no sistema *L. tarentolae*, tais como: Gag do HIV (Breton M et al. 2007) e E7 do HPV (Salehi M et al. 2012).

Ao ser capaz de expressar epítomos da proteína Gag do vírus da imunodeficiência humana, as células de *L. tarentolae* foram avaliadas, com resultados promissores, quanto a possibilidade na utilização como vetor vacinal em sistema de hospedeiros *in vivo* BALB/c e *ex vivo* em cultura de tecido tonsilar humano, observando-se uma ativação das defesas celulares e humorais. Esse trabalho demonstrou a importância do organismo recombinante na indução da proteção imune tanto em sistema *in vivo* quanto *ex vivo*, destacando-o em uma promissora medida estratégica no desenvolvimento de uma vacina contra o HIV. Os resultados obtidos na expressão da proteína viral E7 corroboraram com os dados obtidos na expressão da proteína Gag quanto à relevância na utilização das células recombinantes de *L. tarentolae* como vetor vacinal em sistemas *in vivo*. Devido a expressão da E7 em *L. tarentolae* com a sua subsequente administração em camundongos foi constatada uma maior produção de IFN- γ e IgG2a, com significativo controle do crescimento tumoral em camundongos desafiados com células tumorais induzidas (Breton M et al. 2007; Salehi M et al. 2012).

O gene que codifica para proteína E foi amplificado e clonado com sucesso no vetor bifuncional pLEXY-hyg2. As construções pLEXY/gene *E* foram transfectadas em *L. tarentolae* para obtenção de clones com as construções integradas ao genoma ou na forma episomal. Contudo, somente obtivemos clones positivos na forma episomal. Vale ressaltar, que embora não obtivéssemos clones integrativos, avaliados pela detecção por PCR diagnóstico, as células transformadas adquiriram o fenótipo de resistência ao antibiótico seletivo higromicina. Os clones circulares foram confirmados por PCR quanto a sua forma extracromossômica e a presença do gene que codifica para proteína E.

O DNA plasmidial extraído foi amplificado e sequenciado, apresentando 100% de identidade quando comparado com a construção obtida na etapa de clonagem, com a sequência molde proveniente do RNA genômico viral da vacina de febre amarela, e com a sequência de referência YF17066 depositada no *Gene Bank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (dos Santos CN et al. 1995), ressaltando a estabilidade genética dos clones recombinantes de *L. tarentolae*. As regiões que codificam para o peptídeo sinal e a cauda de histidina também não sofreram alterações na proteína resultante.

O soro policlonal obtido a partir da proteína E produzido *E. coli* foi utilizado como reagente para detectar a expressão da proteína recombinante produzida em *L. tarentolae*. Para tal, esse soro foi caracterizado e mostrou-se capaz de detectar 30-15ng da proteína na diluição

de 1:2000 por *immunoblotting*. Embora esse soro tenha sido gerado a partir de uma proteína recombinante produzida em *E.coli* esse também foi capaz de reconhecer a proteína E nativa no extrato de células infectadas. Esse resultado demonstra a capacidade desse soro em reconhecer epítomos da proteína E do vírus. Apesar de não se incluir dentre os objetivos iniciais do trabalho é importante ressaltar a produção de um reagente que poderá ser aplicado a outros projetos relacionados a Febre Amarela desenvolvidos em Bio-Manguinhos.

Na avaliação da expressão da proteína E recombinante nas células de *L. tarentolae* pela técnica de SDS-PAGE não foi possível à visualização da banda correspondente a proteína E. Nessa avaliação tanto amostras de *pellet* lisado quanto de sobrenadante de cultura foram usados. Devido à inclusão da sequência de peptídeo sinal na estratégia de clonagem adotada esperava-se que a proteína recombinante fosse secretada e se encontrasse no sobrenadante de cultura. Por isso, foram aplicados nessa avaliação dois protocolos de estudo de secretoma em tripanossomatídeos, Cuervo P et al. (2009) e Elias CG et al. (2009). Basicamente, realizou-se uma incubação das células em meios livres de proteínas, RPMI e PBS Glucose, pretendendo-se eliminar toda e qualquer banda de contaminação por proteína do meio de cultivo, restando apenas as moléculas secretadas pelas células. O resultado desta avaliação mostrou-se negativo após a transferência das proteínas por SDS-PAGE e ensaio de *Western Blotting* baseada na reação com fosfatase alcalina.

Devido à ausência de sinal observada com revelação baseada em fosfatase alcalina, poderíamos especular que o nível de expressão estava abaixo de 15ng de acordo com os nossos ensaios de sensibilidade. Para confirma tal hipótese foi realizado um novo ensaio de *Western Blotting* com sistema de revelação mais sensível baseado na reação da peroxidase e quimioluminescência. Embora o sistema tenha uma sensibilidade superior, na ordem de picograma, o experimento demonstrou resultado negativo. Baseado nos dados obtidos passamos a inferir duas hipóteses sobre o trabalho até o momento: 1) os níveis da produção da proteína recombinante em *L. tarentolae* estavam muito abaixo do limite de detecção do anticorpo e das técnicas utilizadas; 2) a proteína recombinante E não estava sendo traduzida nas células do protozoário.

Embora expressão na proteína E do vírus vacinal da febre amarela não tenha sido detectada. Podemos citar diversos genes que foram expressos com sucesso no sistema proposto para esse trabalho. Tais como, laminina humana (Phan HP et al. 2009), peróxido dismutases e eritropoietina (Breitling R et al. 2002; Gazdag EM et al. 2010), luciferase (Lang

T et al. 2005), tranferases (Orlando TC et al. 2007; Ben-Abdallah M et al. 2011), convertases (Basak A et al. 2008), Gag do HIV (Breton M et al. 2007), proteína E7 do HPV (Salehi M et al. 2012) e precursor da proteína alfa amiloide relacionada ao Mal de Alzheimer (Klatt S et al. 2013).

Para investigar possibilidade da tradução da proteína de interesse foi realizado experimento para detecção de transcritos. As reações de PCR realizadas a partir da molécula de cDNA no teste para a detecção de moléculas de RNAm maduras e devidamente processadas após a reação de *trans-splicing*, mostrou que não há transcrito maduro referente à proteína E sendo processado pela célula hospedeira. Esse resultado foi constatado quando se utilizou o oligonucleotídeo específico para a região mini-exon MinAB. No entanto, no mesmo experimento quando se utilizou apenas os oligonucleotídeos para o gene *E* foi possível visualizar a formação de bandas indicando a presença do transcrito primário imaturo. Os controles da reação de digestão pela DNase e a reação de PCR diretamente a partir deste produto, bem como a avaliação da funcionalidade do oligonucleotídeo MinAB confirmam os resultados obtidos. Apesar de se observar a formação de outras bandas de diferentes tamanhos, produtos de anelamentos e ampliações inespecíficas dos oligonucleotídeos *forward* MinAB e *reverse* R8S, essa reação confirma que o MinAB atende ao objetivo do experimento devido a presença da banda de aproximadamente 670pb, representando o gene *8S* antecedido da região mini-exon. É importante ressaltar que nas amostras de RNA celular total, extraídas e utilizadas neste experimento, há uma mistura de várias moléculas de RNAm processadas e não processadas. A sequência do oligonucleotídeo MinAB não possui complementaridade no interior do gene *8S*, mas ele pode estar se anelando em outras regiões de outros genes já processados e também em mini-exons de outros transcritos maduros, e dessa mesma forma o oligonucleotídeo R8S também estaria se hibridizando nas demais moléculas.

As sequências *utr1*, *utr2* e *utr3* representam grande importância ao fornecer, através da sequência nucleotídica, o sinal adequado para a reação de *trans-splicing* onde haverá a inserção da região SL e da cauda poliadenilada. Esse sinal se caracteriza por uma região rica em bases pirimídicas seguidas de um dinucleotídeo AG. Na decorrência do surgimento de alguma mutação, devido à replicação do vetor nos clones bacterianos e eucariotos, que modifique a sequência sinal de bases, muito provavelmente afetará diretamente a sucessão de todo o processo de *trans-splicing* das moléculas de transcrito primário policistrônico imaturo,

interferindo no processamento e no surgimento de moléculas maduras individuais. Sem a molécula de RNAm monocistrônica, com a sequência SL a sua frente 5' e a cauda poliadenilada ao seu final 3', não haverá o processo de tradução da fita em uma proteína. Levando-se em consideração que as identidades das sequências UTRs nas construções dos clones recombinantes são desconhecidas, essa realidade da interferência do sinal de *trans-splicing* pode estar se refletindo nos resultados negativos de expressão da proteína E. Assim sendo, o sequenciamento e confirmação da identidade dessas regiões UTRs se fazem de extrema importância na tentativa de identificar e solucionar o problema enfrentado na expressão da proteína E.

O sistema utilizado neste trabalho foi inicialmente idealizado para a expressão constitutiva com a subsequente inserção do cassete de expressão no *locus* cromossômico 18S por recombinação homóloga. Entretanto, também é possível a expressão da construção de forma episomal, com o plasmídeo circular no interior da célula. A construção circular pode se integrar de forma heterogênea no genoma da célula hospedeira, e por isso é importante a seleção clonal das células transfectadas com o cassete circular, caso contrário o nível de expressão da proteína desejada pode se reduzir drasticamente. Com as células transfectadas com as construções linearizadas e que sofreram ou não a seleção clonal esse problema com o nível de expressão não é encontrado (Jena Bioscience, 2012).

A possibilidade do estudo sobre clones de *L. tarentolae* com a construção integrativa em seu genoma também se torna importante por estabelecer um parâmetro comparativo para a expressão da proteína E desenvolvida no presente trabalho. Da mesma forma, a alternativa de não se utilizar a sequência de peptídeo sinal presente no vetor é interessante ao passo que a lise celular nesses protozoários também não representa maiores dificuldades. Ao se estabelecer uma estratégia de clonagem em que não se utilize o peptídeo sinal acarretaria na pesquisa da proteína junto ao *pellet* celular, estratégia esta adotada nos vários trabalhos anteriores utilizando esse sistema (**Tabela 1.1**).

6 – CONCLUSÃO

Não foi possível, com as metodologias utilizadas no presente trabalho, a detecção da expressão da proteína recombinante E da cepa vacinal do vírus da febre amarela 17DD nas células hospedeiras recombinantes de *L. tarentolae*. Dessa forma, o potencial desse sistema na expressão da proteína modelo E permaneceu desconhecido. O gene *E* foi amplificado e clonado com sucesso no vetor de clonagem pLEXSY-hyg2, e as reações de PCR e análises de sequenciamento mostraram que o gene não sofrera mutações em sua sequência de nucleotídeos que pudesse alterar a sequência de aminoácidos da proteína resultante como demonstrado em análises *in silico* das sequências traduzidas.

Os três clones recombinantes bacterianos e os sete clones recombinantes eucariotos foram obtidos da transfecção por eletroporação com as construções pLEXSY/gene *E*, contudo, os clones eucariotos obtidos possuíam apenas a construção episomal dentro da célula.

O soro imune obtido da proteína E recombinante, produzida em células de *E. coli* recombinantes foi capaz de reconhecer em altos títulos tanto a proteína de *E. coli* como a proteína em seu estado nativo, presente em um extrato de células infectadas. Dessa forma, servindo como ferramenta na pesquisa da proteína E recombinante produzida por células de *L. tarentolae*. A proteína E de *E. coli* e o extrato de células infectadas com o vírus vacinal também serviram como parâmetros comparativos no estudo e pesquisa da proteína E produzida em *L. tarentolae*.

Durante as reações de PCR para avaliação da presença da região mini-exon na molécula de RNAm madura, constatou-se que as moléculas de RNAm referentes ao códon da proteína E não estavam sendo devidamente processadas em transcritos monocistronicos passíveis de tradução. Essa problemática pode ter se refletido nos resultados negativos obtidos das reações de *Western Blotting* e na avaliação por SDS-PAGE.

Apesar da possibilidade de expressão do cassete em sua forma circular, seria muito importante a obtenção de clones recombinantes que possuíssem o cassete integrativo, para a avaliação nas diferenças da expressão e possível identificação do problema surgido na expressão das construções circulares deste projeto.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allison SL, Stiasny K, Stadler K, Mandl CW, Heinz FX. **Mapping of functional elements in the stem-anchor region of tick-borne encephalitis virus envelope protein E.** J. Virol. 1999 jul; 73(7): 5605–12.
- Barrett ADT, Higgs S. **Yellow fever: a disease that has yet to be conquered.** Annu. Rev. Entomol. 2007; 52: 209–29.
- Barrett ADT, Teuwen DE. **Yellow fever vaccine - how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place?** Curr. Opin. Immunol. 2009 jun; 21(3): 308–13.
- Barrett ADT. **Yellow fever vaccines.** Biologicals. 1997 mar; 25(1): 17–25.
- Basak A, Shervani NJ, Mbikay M & Kolajova M. **Recombinant proprotein expression convertase 4 (PC4) from *Leishmania tarentolae* expression system: Purification, biochemical study and inhibitor design.** Protein Expression and Purification. 2008; 60: 117–126.
- Basile G, Peticca M. **Recombinant protein expression in *Leishmania tarentolae*.** Mol. Biotechnol. 2009 nov; 43(3): 273–8.
- Belen Carrillo M, Gao W, Herrera M, Alroy J, Moore JB, Beverley SM, et al. **Heterologous expression of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase in *Leishmania major* enhances virulence.** Infect. Immun. 2000 maio; 68(5): 2728–34.
- Ben-Abdallah M, Bondet V, Fauchereau F, Béguin P, Goubran-Botros H, Pagan C, Bourgeron T, Bellalou J. **Production of soluble, active acetyl serotonin methyl transferase in *Leishmania tarentolae*.** Protein Expr Purif. 2011 Jan; 75(1): 114-8.
- Benz C, Nilsson D, Andersson B, Clayton C, Guilbride DL. **Messenger RNA processing sites in *Trypanosoma brucei*.** Mol Biochem Parasitol. 2005 Oct; 143(2): 125-34.
- Bolhassani A, Taheri T, Taslimi Y, Zamanilui S, Zahedifard F, Seyed N, Torkashvand F, Vaziri B, Rafati S. **Fluorescent *Leishmania* species: development of stable GFP expression and its application for in vitro and in vivo studies.** Exp Parasitol. 2011 Mar; 127(3): 637-45.
- Bonaldo MC, Mello SM, Trindade GF, Rangel AA, Duarte AS, Oliveira PJ, et al. **Construction and characterization of recombinant flaviviruses bearing insertions between E and NS1 genes.** Virol. J. 2007; 4: 115.
- Breitling R, Klingner S, Callewaert N, Pietrucha R, Geyer A, Ehrlich G, Hartung R, Müller A, Contreras R, Beverley SM and Alexandrov K. **Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as platform for protein research and production.** Protein Expr Purif. 2002 Jul; 25(2): 209-18.

Breton M, Zhao C, Ouellette M, Tremblay MJ, Papadopoulou B. **A recombinant non-pathogenic *Leishmania* vaccine expressing human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) Gag elicits cell-mediated immunity in mice and decreases HIV-1 replication in human tonsillar tissue following exposure to HIV-1 infection.** J. Gen. Virol. 2007 jan; 88(Pt 1): 217–25.

Bryant JE, Vasconcelos PF, Rijnbrand RC, Mutebi JP, Higgs S, Barrett AD. **Size heterogeneity in the 3' noncoding region of South American isolates of yellow fever virus.** J. Virol. 2005 Mar; 79(6): 3807-21.

Campbell DA, Thomas S, Sturm NR. **Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal?** Microbes Infect. 2003 Nov; 5(13): 1231-40.

Centro de Vigilância Epidemiológica [online]. **Informe técnico de febre amarela.** [citado 20 fev 2012]. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/FA_INFORME.htm.

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. **Flavivirus genome organization, expression, and replication.** Annu. Rev. Microbiol. 1990; 44: 649–88.

Chan RC, Penney DJ, Little D, Carter IW, Roberts JA, Rawlinson WD. **Hepatitis and death following vaccination with 17D-204 yellow fever vaccine.** Lancet. 2001; 358: 121–122.

Clayton CE. **Genetic manipulation of kinetoplastida.** Parasitol. Today. 1999, 15: 372–378.

Clayton CE. **Life without transcriptional control? From fly to man and back again.** EMBO J. 2002 Apr 15; 21(8): 1881-8.

Co MDT, Terajima M, Cruz J, Ennis FA, Rothman AL. **Human cytotoxic lymphocyte responses to live attenuated 17D yellow fever vaccine: identification of HLA-B335-restricted CTL epitopes on nonstructural proteins NS1, NS2b, NS3, and the structural protein E.** Virology. 2002; 293:151–63.

Codeço CT, Luz PM, Coelho F, Galvani AP and Struchiner C. **Vaccinating in disease-free regions: a vaccine model with application to yellow fever.** J. R. Soc. Interface. 2007; 4: 1119–1125.

Cuervo P, De Jesus JB, Saboia-Vahia L, Mendonça-Lima L, Domont GB, Cupolillo E. **Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes.** J. Proteomics. 2009 Nov 2; 73(1): 79-92.

Curotto de Lafaille MA, Laban A, Wirth DF. **Gene expression in *Leishmania*: analysis of essential 5' DNA sequences.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Apr 1; 89(7): 2703-7.

Dadashpour M, Fukuta Y, Asano Y. **Comparative expression of wild type and highly soluble mutant His103Leu of hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta* in prokaryotic and eukaryotic expression systems.** Protein Expr Purif. 2011 May; 77(1): 92-7.

de Almeida SR. **Estratégias moleculares para utilização do vírus da febre amarela como vetor vacinal.** Tese de Doutorado em Saúde Pública. Recife. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães. 2011.

de La Llave E, Lecoeur H, Besse A, Milon G, Prina E, Lang T. **A combined luciferase imaging and reverse transcription polymerase chain reaction assay for the study of *Leishmania* amastigote burden and correlated mouse tissue transcript fluctuations.** Cell Microbiol. 2011 Jan; 13(1): 81-91.

Docampo R, de Souza W, Miranda K, Rohloff P, Moreno SNJ. **Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man.** Nat. Rev. Microbiol. 2005 mar; 3(3): 251-61.

dos Santos CN, Post PR, Carvalho R, Ferreira II, Rice CM, Galler R. **Complete nucleotide sequence of yellow fever virus vaccine strains 17DD and 17D-213.** Virus Res. 1995 jan; 35(1): 35-41.

Downs WG. **The story of yellow fever since Walter Reed.** Bull N Y Acad Med. 1968 jun; 44(6): 721-7.

Elias CG, Aor AC, Valle RS, d'Avila-Levy CM, Branquinha MH, Santos AL. **Cysteine peptidases from *Phytomonas serpens*: biochemical and immunological approaches.** FEMS Immunol Med Microbiol. 2009 Dec; 57(3): 247-56.

Engel AR, Vasconcelos PF, McArthur M A adn Barrett ADT. **Characterization of a viscerotropic yellow fever vaccine variant from a patient in Brazil.** Vaccine. 2006; 24, 2803-2809.

Ferguson MA. **The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites.** Phil.Trans. R. Soc. Lond. B. 1997, 352; 1295-1302.

Foldynová-Trantírková S, Matulová J, Dötsch V, Löhr F, Cirstea I, Alexandrov K, Breitling R, Lukes J, Trantírek L. **A cost-effective amino-acid type selective isotope labeling of proteins expressed in *Leishmania tarentolae*.** J Biomol Struct Dyn. 2009 Jun; 26(6): 755-61.

Fritsche C, Sitz M, Weiland N, Breitling R, Pohl H-D. **Characterization of the growth behavior of *Leishmania tarentolae*: a new expression system for recombinant proteins.** J. Basic Microbiol. 2007 out; 47(5): 384-93.

Galler R, Pugachev KV, Santos CLS, Ochran SW, Jabor AV, Rodrigues SG, Marchevsky RS, Freire MS, Almeida LFC, Cruz ACR, Yamamura AMY, Rocco IM, Travassos da Rosa ES, Souza LTM, Vasconcelos PF, Guirakhoo F, Monath TP. **Phenotypic and molecular analyses of yellow fever 17DD vaccine viruses associated with serious adverse events in Brazil.** Virology. 2001; 290: 309-319.

Gardner CL, Ryman KD. **Yellow fever: a reemerging threat.** Clin. Lab. Med. 2010 mar; 30(1): 237-60.

Gazdag EM, Cirstea IC, Breitling R, Lukes J, Blankenfeldt W, Alexandrov K. **Purification and crystallization of human Cu/Zn superoxide dismutase recombinantly produced in the protozoan *Leishmania tarentolae*.** Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2010 Aug 1; 66(Pt 8): 871-7.

Hemayatkar M, Mahboudi F, Majidzadeh-A K, Davami F, Vaziri B, Barkhordari F, Adeli A, Mahdian R, Davoudi N. **Increased expression of recombinant human tissue plasminogen activator in *Leishmania tarentolae*.** Biotechnol J. 2010 Nov; 5(11): 1198-1206.

Hoare CA & Wallace FG. **Development stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology.** Nature. 1966. 212, 1385-1386.

Jena Bioscience. LEXY essence [online]. [citado 20 fev 2012]. Disponível em: <http://www.jenabioscience.com/>.

Klatt S, Rohe M, Alagesan K, Kolarich D, Konthur Z, Hartl D. **Production of glycosylated soluble amyloid precursor protein alpha (sAPPalpha) in *Leishmania tarentolae*.** J Proteome Res. 2013 Jan 4; 12 (1): 396-403.

Kushnir S, Gase K, Breitling R, et al. **Development of an inducible protein expression system based on the protozoan host *Leishmania tarentolae*.** Protein Expression and Purification. 2005; 42: 37–46.

La Flamme AC, Buckner FS, Swindle J, Ajioka J, Van Voorhis WC. **Expression of mammalian cytokines by *Trypanosoma cruzi* indicates unique signal sequence requirements and processing.** Mol. Biochem. Parasitol. 1995 dez; 75(1): 25–31.

Laemmli UK. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature. 1970 ago 15; 227(5259): 680–5.

Lake JA, de la Cruz VF, Ferreira PC, Morel C, Simpson L. **Evolution of parasitism: kinetoplastid protozoan history reconstructed from mitochondrial rRNA gene sequences.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1988 jul; 85(13): 4779–83.

Lang T, Goyard S, Lebastard M & Milon G. **Bioluminescent *Leishmania* expressing luciferase for rapid and high throughput screening of drugs acting on amastigote-harbouring macrophages and for quantitative real-time monitoring of parasitism features in living mice.** Cellular Microbiology. 2005; 7(9): 383–392.

Liang XH, Haritan A, Uliel S, Michaeli S. ***trans* and *cis* splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation.** Eukaryot Cell. 2003 Oct; 2(5): 830-40.

Lindenbach DB, Thiel HJ, Rice CM. **Flaviviridae: the viruses and their replication.** Fields Virology. 5ª ed. Philadelphia: Quebecor Versailles. 2007; 1: 1100-1152.

Lindsey NP, Schroeder BA, Miller ER, Braun MM, Hinckley AF, Marano N, Slade BA, Barnett ED, Brunette GW, Horan K, Staples JE, Kozarsky PE and Hayes EB. **Adverse event reports following yellow fever vaccination.** Vaccine. 2008 Nov 11; 26(48): 6077-82.

Luiza-Silva M, Campi-Azevedo AC, Batista MA, Martins MA, Avelar RS, da Silveira Lemos D, Bastos Camacho LA, de Menezes Martins R, de Lourdes de Sousa Maia M, Guedes Farias RH, da Silva Freire M, Galler R, Homma A, Leite Ribeiro JG, Campos Lemos JA, Auxiliadora-Martins M, Eloi-Santos SM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA. **Cytokine signatures of innate and adaptive immunity in 17DD yellow fever vaccinated children and its association with the level of neutralizing antibody.** J. Infect. Dis. 2011 Sep 15; 204(6): 873-83.

Lukes J, Paris Z, Regmi S, Breitling R, Mureev S, Kushnir S, Pyatkov K, Jirků M, Alexandrov KA. **Translational initiation in *Leishmania tarentolae* and *Phytomonas serpens* (Kinetoplastida) is strongly influenced by pre-ATG triplet and its 5' sequence context.** Mol Biochem Parasitol. 2006 Aug; 148(2): 125-32.

Machado CM, Martins TC, Colturato I, Leite MS, Simione AJ, Souza MP de, et al. **Epidemiology of neglected tropical diseases in transplant recipients. Review of the literature and experience of a Brazilian HSCT center.** Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 2009 dez; 51(6): 309–24.

Mansfield KL, Horton DL, Johnson N, Li Li, Barrett ADT, Smith DJ, Galbraith SE, Solomon T, and Fooks AR. **Flavivirus-induced antibody cross-reactivity.** J Gen. Virol. 2011 December; 92 (Pt 12): 2821–2829.

Marchevsky RS, Freire MS, Coutinho ESF & Galler R. **Neurovirulence of yellow fever 17DD vaccine virus to rhesus monkeys.** Virology. 2003; 316: 55–63.

Martin M, Tsai TF, Cropp B, Chang GJ, Holmes DA, Tseng J, Shieh W, Zaki SR, Al-Sanouri I, Cutrona AF, Ray G, Weld LH, Cetron MS. **Fever and multisystem organ failure associated with 17D-204 yellow fever vaccination: a report of four cases.** Lancet. 2001; 358: 98–104.

Martínez-Calvillo S, Vizuet-de-Rueda JC, Florencio-Martínez LE, Manning-Cela RG, Figueroa-Angulo EE. **Gene expression in trypanosomatid parasites.** J Biomed Biotechnol. 2010; Feb 11.

Martins MÂ, Silva ML, Marciano APV, Peruhype-Magalhães V, Eloi-Santos SM, Ribeiro JGL, Correa-Oliveira R, Homma A, Kroon EG, Teixeira-Carvalho A and Martins-Filho OA. **Activation/modulation of adaptive immunity emerges simultaneously after 17DD yellow fever first-time vaccination: is this the key to prevent severe adverse reactions following immunization?** Clinical and Experimental Immunology. 2007; 148: 90–100.

Maslov DA, Votycka J, Yurchenko V, Lukes J. **Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed.** Trends in Parasitology. January 2013; Vol. 29, n° 1.

Massad E, Coutinho FAB, Burattini MN, Lopez LF. **The risk of yellow fever in dengue infested area.** Trans R Soc Trop Med Hyg 2001; 95: 370–4.

Mayer MG, Floeter-Winter LM. **Pre-mRNA trans-splicing: from kinetoplastids to mammals, an easy language for life diversity.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005 Aug; 100(5): 501-13.

Ministério da Saúde [online]. [citado 20 fev 2012] (a). Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1552.

Ministério da Saúde [online]. [citado 20 fev 2012] (b). Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/febreamarela/historico.php>.

Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde [online]. **Manual de vigilância epidemiológica da febre amarela.** [citado 20 fev 2012]. Brasília, 1999. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manu_feam.pdf.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde [online]. **Guia de Vigilância Epidemiológica.** 7ª ed. [citado 20 fev 2012]. Brasília, 2009. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual.pdf.

- Mirzaahmadi S, Asaadi-Tehrani G, Bandehpour M, Davoudi N, Tahmasbi L, Hosseinzadeh N, Mirzahoseini H, Parivar K, Kazemi B. **Expression of recombinant human coagulation factor VII by the Lizard *Leishmania* expression system.** J Biomed Biotechnol. 2011.
- Misslitz A, Mottram JC, Overath P, Aebischer T. **Targeted integration into a rRNA locus results in uniform and high level expression of transgenes in *Leishmania* amastigotes.** Mol. Biochem. Parasitol. 2000 abr 15; 107(2): 251–61.
- Monath TP. **Yellow fever vaccine.** Expert Rev Vaccines. 2005 ago; 4(4): 553–74.
- Monath TP. **Yellow fever: Victor, Victoria? Conqueror, conquest? Epidemics and research in the last forty years and prospects for the future.** Am. J. Trop. Med. Hyg. 1991 jul; 45(1): 1–43.
- Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. **A structural perspective of the flavivirus life cycle.** Nat. Rev. Microbiol. 2005 jan; 3(1):13–22.
- Niculae A, Bayer P, Cirstea I, Bergbrede T, Pietrucha R, Gruen M, et al. **Isotopic labelling of recombinant proteins expressed in the protozoan host *Leishmania tarentolae*.** Protein Expression and Purification. 2006; 48: 167–172.
- Niimi, T. **Recombinant protein production in the eukaryotic protozoan parasite *Leishmania tarentolae*: a review.** Methods Mol Biol. 2012; 824: 307-15.
- Orlando TC, Mayer MG, Campbell DA, Sturm NR, Floeter-Winter LM. **RNA polymerase I promoter and splice acceptor site recognition affect gene expression in non-pathogenic *Leishmania* species.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2007 nov; 102(7):891–4.
- Parodi AJ. **N-glycosylation in trypanosomatid protozoa.** Glycobiology. 1993 Jun; 3(3):193-9.
- Phan H-P, Sugino M, Niimi T. **The production of recombinant human laminin-332 in a *Leishmania tarentolae* expression system.** Protein Expr. Purif. 2009 nov; 68(1): 79–84.
- Post PR, de Carvalho R, da Silva Freire M, Galler R. **The early use of yellow fever virus strain 17D for vaccine production in Brazil - a review.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2001 Aug; 96(6): 849-57.
- Rogers MB, Hilley JD, Dickens NJ, Wilkes J, Bates PA, Depledge DP, Harris D, Her Y, Herzyk P, Imamura H, Otto TD, Sanders M, Seeger K, Dujardin JC, Berriman M, Smith DF, Hertz-Fowler C, Mottram JC. **Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*.** Genome Res. 2011 Dec; 21(12): 2129-42.
- Romanos MTV. **Febre Amarela e Dengue.** Introdução à Virologia Humana. 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan AS. 2008. 1, 399-409.
- Ryman KD, Ledger TN, Weir RC, Schlesinger JJ and Barrett ADT. **Yellow fever virus envelope protein has two discrete type-specific neutralizing epitopes.** Journal of General Virology. 1997; 78: 1353–1356.

- Salehi M, Taheri T, Mohit E, Zahedifard F, Seyed N, Taslimi Y, Sattari M, Bolhassani A, Rafati S. **Recombinant *Leishmania tarentolae* encoding the HPV type 16 E7 gene in tumor mice model.** Immunotherapy. 2012 Nov; 4(11): 1107-20.
- Sambrook J, Russel DW. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 3th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, New York.
- Sampath A, Padmanabhan R. **Molecular targets for flavivirus drug discovery.** Antiviral Res. 2009 jan; 81(1): 6–15.
- Siegel TN, Tan KS, Cross GA. **Systematic study of sequence motifs for RNA *trans* splicing in *Trypanosoma brucei*.** Mol Cell Biol. 2005 Nov; 25(21): 9586-94.
- Simpson AG, Stevens JR, Lukes J. **The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates.** Trends Parasitol. 2006 Apr; 22(4):168-74.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. **Measurement of protein using bicinchoninic acid.** Anal Biochem. 1985 Oct; 150(1): 76-85.
- Sodoyer R. **Expression systems for the production of recombinant pharmaceuticals.** BioDrugs. 2004;18(1):51–62.
- Soleimani M, Mahboudi F, Davoudi N, Amanzadeh A, Azizi M, Adeli A, Rastegar H, Barkhordari F, Mohajer-Maghari B. **Expression of human tissue plasminogen activator in the trypanosomatid protozoan *Leishmania tarentolae*.** Biotechnol Appl Biochem. 2007 Sep; 48(Pt 1): 55-61.
- Sousa MA. **Tripanossomatídeos de insetos e plantas: análise do crescimento, diferenciação e divisão celular, biometria e fenômenos sugestivos de sexualidade: valor taxonômico.** Tese de Doutorado, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro. 2000.
- Stokes A, Bauer JH, Hudson NP. **The transmission of yellow fever to *Macacus rhesus*. 1928.** Rev. Med. Virol. 2001 jun; 11(3): 141–8.
- Teixeira SM, daRocha WD. **Control of gene expression and genetic manipulation in the *Trypanosomatidae*.** Genet. Mol. Res. 2003 Mar 31, 2(1): 148-58.
- Teixeira SM. **Control of gene expression in *Trypanosomatidae*.** Braz. J. Med. Biol. Res. 1998, 31: 1503–1516.
- Theiler M, Smith HH. **The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization.** J. Exp. Med. 65, 787-800 (1937). Rev. Med. Virol. 2000 fev; 10(1): 6–16; discussion 3–5.
- Tobin JF, Reiner SL, Hatam F, Zheng S, Leptak CL, Wirth DF, et al. **Transfected *Leishmania* expressing biologically active IFN-gamma.** J. Immunol. 1993 jun 1; 150(11): 5059–69.
- Tovar J, Cunningham ML, Smith AC, Croft SL, Fairlamb AH. **Down-regulation of *Leishmania donovani* trypanothione reductase by heterologous expression of a trans-**

dominant mutant homologue: effect on parasite intracellular survival. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1998 abr 28; 95(9): 5311–6.

Vasconcelos PF, Luna EJ, Galler R, Silva LJ, Coimbra TL, Barros VL, et al. **Serious adverse events associated with yellow fever 17DD vaccine in Brazil: a report of two cases.** Lancet. 2001 jul 14; 358 (9276): 91–7.

Vasconcelos PF. **Yellow fever.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2003 mar-abr; 36 (2): 275-293.

Vasconcelos PF. **Yellow fever: reflections on the disease, prospects for the century and risk of re-urbanization.** Braz J Epidemiol. 2002, 5: 244–58.

Vickerman K & Preston TM. **Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates.** In **Biology of the Kinetoplastida** (Lumsden WHR, & Evans DA, ed.). Academic Press. 1976. pp., 35–130.

Vickerman K. **Phylum Zoomastigina – class kinetoplastida.** In: **Handbook of protoctista.** James and Barlett Publishers. Boston. pp. 215-238. 1990.

Vickerman K. **The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates.** Int. J. Parasitol. 1994 dez; 24(8): 1317–31.

Volk DE, May FJ, Gandham SH, Anderson A, Von Lindern JJ, Beasley DW, Barrett AD, Gorenstein DG. Epub 2009 Oct 8. **Structure of yellow fever virus envelope protein domain III.** Virology. 2009 Nov 10; 394 (1): 12-8.

WHO | Vaccine-preventable diseases [*online*]. WHO. [citado 20 fev 2012]. Disponível em: http://www.who.int/immunization_monitoring/diseases/en/. 2012.

Yin J, Li G, Ren X, Herrler G. **Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes.** J. Biotechnol. 2007 jan 10; 127(3): 335–47.

Zhang WW, Charest H, Matlashewski G. **The expression of biologically active human p53 in *Leishmania* cells: a novel eukaryotic system to produce recombinant proteins.** Nucleic Acids Res. 1995 Oct 25; 23(20): 4073-80.

8 – ANEXO 1

LbrM.24.2160
tarentolae
ATGGGTATCGTTCGCAGCCGCTGCATAAGCGCAAGATCACCGGTGGAAAGACCAAGATC
ATGGGCATCGTCCGCAGCCGCTGCATAAGCGCAAGATCACCGGTGGAAAGACCAAGATC

LbrM.24.2160
tarentolae
CACCGGAAGCGCATGAAGGCCGAGCTGGGTGCGCTTCCCGCCAACACCCGCTCTTGGCGCC
CACCGGAAGCGCATGAAGGCTGAGCTTGGTTCGCTTCCCGCCAACACCCGCTTGGCGCC

LbrM.24.2160
tarentolae
CGCCGCGTGAGCCCTGTGCGTGCTCGTGGTGGCAACTTCAAGATCCGCGCCCTGCGCCTG
CGCCGCGTGAGCCCTGTGCGCGCTCGCGGTGGCAACTTCAAGATCCGCGCCCTGCGCCTG

LbrM.24.2160
tarentolae
GACACCGGCAACTTCGCTGGGGCTCCGAGGCCATCGCGCAGCGCGTTCGTATCCTCGAC
GACACCGGCAACTTTGCTGGGCATCCGAGGCCATCGCGCAGCGCGTTCGTATCCTCGAT

LbrM.24.2160
tarentolae
GTCGTGTACAACGCCACCTCGAACGAGCTGGTGCACGACGAAGACGCTGGTGAAGAACTGC
GTCGTGTACAACGCCACTTCGAACGAGCTGGTGCCTACGAAGACGCTGGTGAAGAACTGC

LbrM.24.2160
tarentolae
ATCGTCTCCGTGGACGCCGCGCCGTTCAAGCGCTGGTACGCCAAGCATTACGGCATCGAC
ATCGTCTCCGTGGATGCCGCGCCGTTCAAGCGCTGGTACGCCAAGCACTACGGCATCGAC

LbrM.24.2160
tarentolae
TTGGATGCGGGGAAGAAGAGCGCCAAGACCGCCGCGCCGCTGAGAAGAAAGCAAGAAG
TTGGATGCGGATAAGAAGAGCGCCAAGGTCGCGCCGCGCGGAGAGAAGAGCAAGAAG

LbrM.24.2160
tarentolae
TCTGCCCATGCCGCTGCTGAAAAGTACGACGTGAACAAGGCTTCGCCCCAAGCTGCAGCGC
TCCGCTCACACCGCTGCCGACAAGTACGACGTGAGCAAGGCTCTCCCAAGCTTCAGCGC
** ** * .***** ** .***** ** *****

LbrM.24.2160
tarentolae
GAGTGGACGCGCCGCCCGCAGCAGCCACAAGGTCGAGAAGCGCGATCGCTGATCAGCTGCGC
GAGTGGACGCGCCGCCCGCAGCAGCCACAAGGTCGAGAAGCGCGATCGCTGATCAGCTGCGT

Anelamento *Forward* F8S

LbrM.24.2160
tarentolae
GAGGGTCGTGTGCTTGACGCGATGACGAGCCCGCCGGGTCAGTCCGGTTCGTGCCGACGGT
GAGGGTCGCGTGCTTGCGCGCATTACGAGCCCGCCAGGCCAGTCCGGCCGTGCTGATGGT

LbrM.24.2160
tarentolae
ATCCTACTGGAGGGTGCAGGCTTCAGTTCTACCTGAAGCGCCTGGAGAAGAAGAAGTGA
ATCCTGCTGGAGGGCGCTGAGCTCCAGTTCTACCTGAAGCGCCTGGAGAAGAAGAAG

Anelamento *Reverse* R8S

LbrM.24.2160
tarentolae

AAGAAGTAA

9 - ANEXO 2

	10 20 30 40 50
	----- ----- ----- ----- -----
	GCTCACTGCATTGGAATTACTGACAGGGATTCATTGAGGGGGTGCATGGAGGAACTTG
Gene E YF 17066 974-2299pb.seq(1>1326)	→
Gene E YF LATEV 974-2299 pb.seq(1>1326)	→
consensus sequencia clone 2 proteina E.seq(1>2337)	→
consensus sequencia clone 3 proteina E.seq(1>2459)	→
consensus sequencia clone 4 proteina E.seq(1>2521)	→
	GCTCACTGCATTGGAATTACTGACAGGGATTCATTGAGGGGGTGCATGGAGGAACTTG
	60 70 80 90 100 110
	----- ----- ----- ----- -----
	GGTTTCAGCTACCCTGGAGCAAGACAAGTGTGTCACTGTTATGGCCCTGACAAGCCTT
Gene E YF 17066 974-2299pb.seq(1>1326)	→
Gene E YF LATEV 974-2299 pb.seq(1>1326)	→
consensus sequencia clone 2 proteina E.seq(1>2337)	→
consensus sequencia clone 3 proteina E.seq(1>2459)	→
consensus sequencia clone 4 proteina E.seq(1>2521)	→
	GGTTTCAGCTACCCTGGAGCAAGACAAGTGTGTCACTGTTATGGCCCTGACAAGCCTT
	120 130 140 150 160 170
	----- ----- ----- ----- -----
	CATTGGACATCTCACTAGAGACAGTAGCCATTGATAGACCTGCTGAGGCGAGGAAAAGTG
Gene E YF 17066 974-2299pb.seq(1>1326)	→
Gene E YF LATEV 974-2299 pb.seq(1>1326)	→
consensus sequencia clone 2 proteina E.seq(1>2337)	→
consensus sequencia clone 3 proteina E.seq(1>2459)	→
consensus sequencia clone 4 proteina E.seq(1>2521)	→
	CATTGGACATCTCACTAGAGACAGTAGCCATTGATAGACCTGCTGAGGCGAGGAAAAGTG
	180 190 200 210 220 230
	----- ----- ----- ----- -----
	TGTTACAATGCAGTTCTCACTCATGTGAAGATTAATGACAAGTGCAGGCGCCAGCAGCTGGAGA
Gene E YF 17066 974-2299pb.seq(1>1326)	→
Gene E YF LATEV 974-2299 pb.seq(1>1326)	→
consensus sequencia clone 2 proteina E.seq(1>2337)	→
consensus sequencia clone 3 proteina E.seq(1>2459)	→
consensus sequencia clone 4 proteina E.seq(1>2521)	→
	TGTTACAATGCAGTTCTCACTCATGTGAAGATTAATGACAAGTGCAGGCGCCAGCAGCTGGAGA
	240 250 260 270 280 290
	----- ----- ----- ----- -----
	GGCCACCTAGCTGAAGAGAACGAAGGGGACAATGCGTGCAGCGCACTTATTCTGATA
Gene E YF 17066 974-2299pb.seq(1>1326)	→
Gene E YF LATEV 974-2299 pb.seq(1>1326)	→
consensus sequencia clone 2 proteina E.seq(1>2337)	→
consensus sequencia clone 3 proteina E.seq(1>2459)	→
consensus sequencia clone 4 proteina E.seq(1>2521)	→
	GGCCACCTAGCTGAAGAGAACGAAGGGGACAATGCGTGCAGCGCACTTATTCTGATA
	300 310 320 330 340 350
	----- ----- ----- ----- -----
	GAGGCTGGGGCAATGGCTGTGGCCTATTGGGAAAGGGAGCATTGTGGCATGCGCCAAA
Gene E YF 17066 974-2299pb.seq(1>1326)	→
Gene E YF LATEV 974-2299 pb.seq(1>1326)	→
consensus sequencia clone 2 proteina E.seq(1>2337)	→
consensus sequencia clone 3 proteina E.seq(1>2459)	→
consensus sequencia clone 4 proteina E.seq(1>2521)	→
	GAGGCTGGGGCAATGGCTGTGGCCTATTGGGAAAGGGAGCATTGTGGCATGCGCCAAA
	360 370 380 390 400 410
	----- ----- ----- ----- -----
	TTCACTTGTGCCAAATCCATGAGTTTGTGGAGTTGATCAGACCAAATTCAGTATGT
Gene E YF 17066 974-2299pb.seq(1>1326)	→
Gene E YF LATEV 974-2299 pb.seq(1>1326)	→
consensus sequencia clone 2 proteina E.seq(1>2337)	→
consensus sequencia clone 3 proteina E.seq(1>2459)	→
consensus sequencia clone 4 proteina E.seq(1>2521)	→
	TTCACTTGTGCCAAATCCATGAGTTTGTGGAGTTGATCAGACCAAATTCAGTATGT
	420 430 440 450 460 470
	----- ----- ----- ----- -----
	CATCAGAGCACAAATTCATGTAGGGGCCAAGCAGGAAAATTTGGAATACCAGCATTAAAGA
Gene E YF 17066 974-2299pb.seq(1>1326)	→
Gene E YF LATEV 974-2299 pb.seq(1>1326)	→
consensus sequencia clone 2 proteina E.seq(1>2337)	→
consensus sequencia clone 3 proteina E.seq(1>2459)	→
consensus sequencia clone 4 proteina E.seq(1>2521)	→
	CATCAGAGCACAAATTCATGTAGGGGCCAAGCAGGAAAATTTGGAATACCAGCATTAAAGA
	480 490 500 510 520 530
	----- ----- ----- ----- -----
	CTCTCAAGTTTGTATGCCCTGTCAGGCTCCCAGGAAGTCGAGTTTCATTGGGTATGGAAAA
Gene E YF 17066 974-2299pb.seq(1>1326)	→
Gene E YF LATEV 974-2299 pb.seq(1>1326)	→
consensus sequencia clone 2 proteina E.seq(1>2337)	→
consensus sequencia clone 3 proteina E.seq(1>2459)	→
consensus sequencia clone 4 proteina E.seq(1>2521)	→
	CTCTCAAGTTTGTATGCCCTGTCAGGCTCCCAGGAAGTCGAGTTTCATTGGGTATGGAAAA

1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290

CGCCTGGCCGTCATGGGAGACGTCGCCTGGGATTCAGCTCCGCTGGAGGGTTCTTCACTTCGGTTGG

Gene E YF 17066 974-2299pb.seq(1>1326) → CGCCTGGCCGTCATGGGAGACGTCGCCTGGGATTCAGCTCCGCTGGAGGGTTCTTCACTTCGGTTGG

Gene E YF LATEV 974-2299 pb.seq(1>1326) → CGCCTGGCCGTCATGGGAGACGTCGCCTGGGATTCAGCTCCGCTGGAGGGTTCTTCACTTCGGTTGG

consenso sequencia clone #2.1.seq(1>1326) → CGCCTGGCCGTCATGGGAGACGTCGCCTGGGATTCAGCTCCGCTGGAGGGTTCTTCACTTCGGTTGG

consenso sequencia clone #2.2.seq(1>1326) → CGCCTGGCCGTCATGGGAGACGTCGCCTGGGATTCAGCTCCGCTGGAGGGTTCTTCACTTCGGTTGG

consenso sequencia clone #2.3.seq(1>1326) → CGCCTGGCCGTCATGGGAGACGTCGCCTGGGATTCAGCTCCGCTGGAGGGTTCTTCACTTCGGTTGG

consenso sequencia clone #2.4.seq(1>1326) → CGCCTGGCCGTCATGGGAGACGTCGCCTGGGATTCAGCTCCGCTGGAGGGTTCTTCACTTCGGTTGG

consenso sequencia clone #2.5.seq(1>1326) → CGCCTGGCCGTCATGGGAGACGTCGCCTGGGATTCAGCTCCGCTGGAGGGTTCTTCACTTCGGTTGG

consenso sequencia clone #2.6.seq(1>1326) → CGCCTGGCCGTCATGGGAGACGTCGCCTGGGATTCAGCTCCGCTGGAGGGTTCTTCACTTCGGTTGG

consenso sequencia clone #2.8.seq(1>1326) → CGCCTGGCCGTCATGGGAGACGTCGCCTGGGATTCAGCTCCGCTGGAGGGTTCTTCACTTCGGTTGG

1300 1310 1320

GAAAGGAATTCATACGGTGTTGGCTCTGCCTTT

Gene E YF 17066 974-2299pb.seq(1>1326) → GAAAGGAATTCATACGGTGTTGGCTCTGCCTTT

Gene E YF LATEV 974-2299 pb.seq(1>1326) → GAAAGGAATTCATACGGTGTTGGCTCTGCCTTT

consenso sequencia clone #2.1.seq(1>1326) → GAAAGGAATTCATACGGTGTTGGCTCTGCCTTT

consenso sequencia clone #2.2.seq(1>1326) → GAAAGGAATTCATACGGTGTTGGCTCTGCCTTT

consenso sequencia clone #2.3.seq(1>1326) → GAAAGGAATTCATACGGTGTTGGCTCTGCCTTT

consenso sequencia clone #2.4.seq(1>1326) → GAAAGGAATTCATACGGTGTTGGCTCTGCCTTT

consenso sequencia clone #2.5.seq(1>1326) → GAAAGGAATTCATACGGTGTTGGCTCTGCCTTT

consenso sequencia clone #2.6.seq(1>1326) → GAAAGGAATTCATACGGTGTTGGCTCTGCCTTT

consenso sequencia clone #2.8.seq(1>1326) → GAAAGGAATTCATACGGTGTTGGCTCTGCCTTT