

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS DE INTERESSE
TERAPÊUTICO EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS EM
CULTURA

Thiago Machado Mello de Sousa

Brasília
2006

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS DE INTERESSE
TERAPÊUTICO EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS EM
CULTURA

Thiago Machado Mello de Sousa

Orientação: Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca
Co-orientação: Profa. Dra. Andréa Queiroz Maranhão

Dissertação apresentada ao
Departamento de Biologia Celular
do Instituto de Ciências Biológicas
da Universidade de Brasília, como
requisito parcial à obtenção do grau
de Mestre em Biologia Molecular.

Brasília
2006

Banca examinadora:

Profa. Dra. Cynthia Maria Kyaw – UnB/CEL

Profa. Dra. Mônica Pereira Garcia – UnB/GEM

Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca – UnB/GEM

Profa. Dra. Andréa Queiroz Maranhão – UnB/CEL

Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brigido – UnB/CEL (Suplente)

AGRADECIMENTOS

Ao José, meu orientador, por todos esses anos de amizade e companheirismo, pelos ensinamentos e pela perseverança (mesmo eu sendo ateu, ele não mede esforços na tentativa de catequizar!). À Andréa, minha co-orientadora, pela amizade, pela ajuda nos momentos mais oportunos e pelo seu maravilhoso senso prático. À All e Marcelo grandes professores, que muito contribuíram para este trabalho dentro e fora do laboratório, queridos companheiros de copo!

Às professoras Cynthia e Mônica pelo aceite em compor a minha banca e pelo tempo que vocês dispensaram à leitura e correção do meu trabalho. Obrigado! Cynthia um grande beijo, te adoro!

Agradecimentos especiais à uma patota do Lab 3: Lorena, Luciano, Sérgio, Marciano e Popó. Melhores amigos e colegas de bancada não poderiam existir! Vocês não valem um tostão furado, mas eu adoro vocês!!! Um grande beijo para a Lú, grande companheira da sala de cultura, por ter me agüentado esses anos com meu típico mal-humor! E um grande abraço para os novos recrutas do Lab 3: Menino Leandro, Menino Gafanhoto e Menina Letícia.

Um grande abraço aos amigos do peito: Daves, Hélio (agora tio!), Léo, Juninho, André, Marcão, Lucas, Lucas (campeão), Betão, Edu, Tatá, Luís, Baba, Cris, Cris Doida (sem comentários!), Flávio, Ninha, Talita, Maria, Drica, Gláucio, entre outros tantos, que mesmo não entendendo bulhufas do que eu faço sempre me deram o maior apoio!!!

Aos amigos da graduação Verônica e Rodrigo.

Aos meus pais José Orlando e Kátia, que sempre me apoiaram, me incentivaram e me deram carinhos incondicionais, até mesmo quando eu não estava disposto a escutá-los. Amo vocês!

Aos colegas e queridos amigos do laboratório de Biologia Molecular: Flavinha, Gina (mamãe do ano!), Chrisinha, Carmela, Didi, Patty Lu, Gaúcho, Pedro, Hernandez, Mariana (que virou casaca e debandou para o Lab 1!), Túlio, Alê Dantas, Alex, Mauro, Saulo, Nádia, Bruno, Sócrates, Eduardo, Camila, Izabel, Hugo, Patty Vet, Vanilce, Rose, Carine, Fabrício, Plínio, Cecília, Marcus, Aldo, Edvaldo, Loise, Patty Girl, Simoneide, André, Larrissa, Vera, Luanne, João Ricardo, Livônios, Janice, Gabi, Henrique, Mariana,

Carol, Viviane, David, Tiago, Cristiano e mais um penca de gente que não vou lembrar agora (me perdoem!).

Aos amigos do Laboratório de Morfologia e Morfogênese: João Paulo, Carol, Érica, Luciano, Umberto e Fafi. Um obrigado em especial ao Ricardo, que além de ser muito gente boa, gentilmente nos permitiu usar sua sala de cultura quando a nossa passava por problemas.

Aos demais professores do Laboratório de Biologia Molecular e do departamento de Biologia Celular: Elida, Sueli, Fernando, Lídia, Marcos, Marlene, Bergman e Cláudia Renata, obrigado pelo incentivo, ensinamentos e auxílios prestados.

Aos funcionários da BioMol: Dona Fátima, Dona Ivanildes Celso e Dona Conceição, sem vocês o laboratório não anda!

À Ana e à Sandra da Secretaria da CEL, obrigado pela atenção e pela presteza em resolver os pepinos dos alunos da pós!

Ao CNPq e ao Ministério da Saúde pelo apoio financeiro.

Por fim, um agradecimento especial.

No final do meu Segundo Grau, eu vi uma garota, era uma pequena menina e sua mochila roxa com bolinhas pretas. Era um Sábado, dia de prova no Sigma, perto da hora do almoço, na saída do colégio. Eis que lá de longe vejo correndo esta pequena menina, vindo em minha direção. Mas não vinha ao meu encontro, provavelmente estava com pressa, pois perdera o ônibus. Corria como se o Diabo em pessoa a perseguisse. Ao passar por mim ela cai, mas cai, não em um simples tombo, não senhor, foi belo estabaco! Surpreso, me presto a ajudá-la a levantar, mas um amigo dela o faz antes de mim. Essa foi a primeira vez em que a vi. Foi um belo tombo!

Quase um ano depois, outro tombo, a mesma menina e eu. Só que desta vez em vez de ajudá-la a levantar, rolei na grama com ela! Passado este episódio, já faz cinco anos e meio que estamos juntos! Cinco anos incríveis! Nos quais sempre tive muito carinho, apoio, companheirismo, ajuda, compreensão e muito, muitos beijos!

Tati gostaria que você soubesse o quão importante é você para mim, e quão grande foi sua participação, para que eu chegasse aonde cheguei.

Amo você minha pequena!

ÍNDICE

RESUMO	p. viii
ABSTRACT	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xii
ABREVIATURAS	xiii
INTRODUÇÃO	01
1. - EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE BIOFÁRMACOS	01
2. - EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS	02
3. - HIV-AIDS	11
3.1 - TRASMISSÃO E PATOGÊNESE	13
3.2 - BIOLOGIA DO VÍRUS	14
3.2.1 - ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO HIV-1.	14
3.2.2 - MECANISMO DE ENTRADA DO VÍRUS NA CÉLULA	18
3.3 – ESTRUTURA E SÍNTESE DO COMPLEXO GLICOPROTÉICO	20
4. AGENTES ANTI-RETROVIRAIS	23
OBJETIVOS	30
MATERIAL	31
1. - LINHAGENS BACTERIANAS.	31
2. - LINHAGENS DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS	31
3. - PLASMÍDEOS.	32
4. - AMOSTRA DE CDNA VIRAL	38
5. - OLIGONUCLEOTÍDEOS SINTÉTICOS	38
6. - MEIOS DE CULTURA PARA O CULTIVO DE <i>E. coli</i>	40
7. - ANTIBIÓTICOS.	41
8. - MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES PARA O CULTIVO DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS	41
9. - SOLUÇÕES-TAMPÃO	43
10. - ENZIMAS E RESPECTIVOS TAMPÕES	45
11. – SOLUÇÕES	47
12. – ANTICORPOS	50
13. - DEMAIS REAGENTES E KITS UTILIZADOS	50
MÉTODOS	52
1. - CULTURA DE CÉLULAS	52
1.2 - MANUTENÇÃO E PROPAGAÇÃO DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS	52
1.3 - CONTAGEM DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS EM CÂMERA DE NEUBAUER	52
1.4 – TRANSFECCÕES	53
1.4.1 - TRANSFECCÃO TRANSIENTE COM FOSFATO DE CÁLCIO	53

1.4.2 - TRANSFECCÃO TRANSIENTE POR MEIO DE LIPOSSOMOS	54
1.5 - ENSAIO DA β -GALACTOSIDASE EM CULTURA DE CÉLULAS (HISTOQUÍMICA ENZIMÁTICA)	55
1.6 - PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS PROTÉICOS CELULARES	55
1.7 - ENSAIO DE ELISA DE CAPTURA	55
1.8 - ENSAIO DE ELISA INDIRETO	56
1.9 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
1.10 - PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM TCA	57
1.11- ANÁLISE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA E POR <i>WESTERN BLOTTING</i>	57
2. - ESTRATÉGIAS DE AMPLIFICAÇÃO DE SEQÜÊNCIAS DO HIV-1 POR PCR	58
2.1 - GP120	59
2.2 - GP41	59
2.3 - GP160	60
2.4 - GP140	60
2.5 - ACOPLAMENTO DO PEPTÍDEO SINAL À GP41	61
3. - CLONAGENS	62
3.1. - CLONAGEM NO VETOR pGEM [®] -T Easy	62
3.2 - AMPLIFICAÇÕES PARA SUBCLONAGEM NO VETOR DE EXPRESSÃO	63
4. - PREPARO E TRANSFORMAÇÃO PELA TÉCNICA DE ELETROPORAÇÃO DE CÉLULAS DE <i>E coli</i> . COMPETENTES	63
5. - PREPARAÇÕES DE DNA PLASMIDIAL	64
5.1 - PREPARAÇÃO DE DNA PLAMIDIAL EM PEQUENA ESCALA	64
5.2 - PREPARAÇÃO DE DNA PLAMIDIAL EM LARGA ESCALA	65
6. - DIGESTÃO DE DNA COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO	65
7. - ANÁLISE DE ÁCIDOS NUCLÉICOS EM GEL DE AGAROSE	66
8. - SEQÜENCIAMENTO	66
RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
1. - TRANSFECCÕES TRANSIENTES DE CÉLULAS CHO-K1 E HSG	67
1.1 - AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE TRANSFECCÃO PELO ENSAIO DA β -GALACTOSIDASE EM CÉLULAS EM CULTURA (HISTOQUÍMICA ENZIMÁTICA)	67
1.2 - DETECÇÃO POR ELISA DE CAPTURA DO ANTICORPO ANTI-z-DNA Z22 NOS SOBRENADANTES DE CULTURA	71
2. - AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DA GP120	73
3. - AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DA GP 41	75
4. - AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DA GP160	77
5. - AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DA GP140	78
6. - SEQÜENCIAMENTO E ANALISE DAS SEQÜÊNCIAS	79
7. - AMPLIFICAÇÃO E ACOPLAGEM DO PEPTÍDEO SINAL NA GP41	85
8 SUBCLONAGEM DA GP160, GP140, GP120 E GP41PS EM VETOR DE EXPRESSÃO PARA CÉLULAS DE MAMÍFEROS	90
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

RESUMO

As proteínas recombinantes de interesse terapêutico vêm ganhando cada vez mais espaço na indústria farmacêutica e atualmente já movimentam um mercado anual de cerca de 50 a 60 bilhões de dólares em todo o mundo. As células de mamíferos são as hospedeiras de expressão preferencialmente escolhidas no caso de proteínas que requerem um grau sofisticado de processamento pós-traducional, sendo crescente a iniciativa de identificação de novas linhagens de células, especialmente humanas, como sistemas alternativos de expressão às células utilizadas. Nosso grupo de pesquisa tem interesse na produção de antígenos para seleção de anticorpos com potencial neutralizante, especialmente os antígenos de superfície do envelope viral de HIV-1, agente etiológico da pandemia mundial de AIDS, que atualmente apresenta mais de 40 milhões de infectados. O presente trabalho teve por objetivo a avaliação preliminar das células de ducto de glândula submandibular humana (HSG) como sistema de expressão heteróloga alternativo às células de ovário de hamster chinês (CHO-K1). Comparativamente, foi avaliada a eficiência de transfecção, assim como a de expressão transiente do anticorpo quimérico anti-Z-DNA Z22, na forma recombinante de fragmento FvFc pelas duas linhagens celulares. Outro objetivo foi a produção de versões recombinantes das glicoproteínas virais de HIV-1.

Os resultados apontaram as células HSG como um bom sistema alternativo para a produção de proteínas heterólogas secretadas, especialmente quando transfectadas por coprecipitação com fosfato de cálcio, sendo ainda necessários alguns ajustes, uma vez que os choques osmóticos com glicerol e DMSO, considerados potencializadores da transfecção, mostraram-se tóxicos da forma como foram executados. Foram amplificados e clonados em vetor de expressão para células de mamíferos os segmentos gênicos correspondentes a quatro versões recombinantes das glicoproteínas do envelope viral de HIV-1 (gp160, gp140, gp120 e gp41+PS), subtipo C que, de acordo com as nossas análises, utiliza CCR5 como co-receptor. Até o presente momento, não foi possível a detecção das glicoproteínas recombinantes, expressas de forma transiente em células CHO-K1, sendo necessários ajustes, principalmente na etapa de transfecção.

ABSTRACT

Recombinant therapeutic proteins have become more and more important in the pharmaceutical industry, and nowadays they are responsible for an injection of about 50 to 60 million dollar a year into the worldwide market. Animal cell cultures are the preferential expression systems for those proteins which require extensive posttranslational modifications. In this view, the identification of alternative expression systems is an issue of increasing concern, specially considering human cell lines. Our research group has been interested in the production of antigens to be used for the selection of neutralizing antibodies, particularly those antigens derived from the envelope surface of HIV-1, the etiologic agent of the pandemic infection of AIDS, which nowadays affects more than 40 million people.

This work aimed the preliminary evaluation of the human salivary gland duct cells (HSG) as a heterologous expression system alternative to the Chinese hamster ovary cells (CHO-K1). The transfection efficiency for both cell lines was comparatively evaluated, as well as the transient expression of the anti-Z-DNA Z22 chimeric antibody, as a recombinant FvFc fragment. Another objective was the production of recombinant versions of HIV-1 glycoproteins.

Our results pointed out to the HSG cells as a good alternative system for the production of secreted heterologous proteins, specially when transfected by co-precipitation with calcium phosphate. Some adjusts are still needed, considering that the glycerol and DMSO osmotic shocks, generally considered as transfection pontentializers, proved to be toxic in the employed protocol. The genic fragments corresponding to four recombinant versions of the HIV-1 envelope glycoproteins (gp160, gp140 gp120 and gp41+PS), subtype C, were amplified and cloned in a mammal cells expression vector. According to our analysis, this virus subtype uses CCR5 as co-receptor. So far, it was not possible to detect the recombinant glycoproteins expressed in a transient form in the CHO-K1 cells. In order to achieve this objective, some adjustments are still necessary, specially concerning the transfection protocol.

ÍNDICE DE FIGURAS

	p.
Figura 1. Representação esquemática da molécula de imunoglobulina e dos fragmentos recombinantes.	10
Figura 2. Desenho representativo da estrutura do vírus da imunodeficiência humana.	15
Figura 3. Diagrama esquemático do genoma do HIV-1. Os números representam a posição dos nucleotídeos referentes à linhagem viral HXB2	17
Figura 4. Mecanismo de entrada do HIV-1 na célula hospedeira.	19
Figura 5. Mapa da gp160 contendo as principais regiões da gp120 e gp41.	20
Figura 6. Diagrama esquemático do núcleo de um monômero deglicosilado da gp120.	21
Figura 7. A: Diagrama esquemático do “feixe de 6 hélices” formado pelo enovelamento das regiões em α -hélice HR1 (amarelo) e HR2 (vermelho) em um trímero da gp41. B: Vista frontal do “feixe de 6 hélices”.	22
Figura 8. Representação esquemática do mapa físico do vetor pCMV β -Gal (Clontech).	32
Figura 9. Representação esquemática do mapa físico do vetor pMAC/PS.	33
Figura 10. Representação esquemática do mapa físico do vetor pMAC/PS/Z22.	34
Figura 11. Representação esquemática do mapa físico do vetor para clonagem de produtos de PCR pGEM [®] -T Easy (Promega).	35
Figura 12. Representação esquemática do mapa físico do vetor de expressão pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen).	36
Figura 13. Representação esquemática do mapa físico do vetor controle de expressão pcDNA3.1/V5-His-TOPO/ <i>lacZ</i> (Invitrogen).	37
Figura 14. Células CHO-K1 (A) e HSG (B) transfectadas com o plasmídeo pCMV β Gal.	67

Figura 15. Eficiências de transfecção transiente das células CHO-K1 e HSG de acordo com a atividade da β -galactosidase.	69
Figura 16. Esquema do fragmento FvFc do anticorpo Z22.	71
Figura 17. ELISA de captura do componente Fc da cadeia pesada de imunoglobulina em sobrenadante de cultura de células CHO-K1 e HSG transfectadas por co-precipitação com fosfato de cálcio (A) e lipofectamina (B).	72
Figura 18. A: <i>Nested</i> PCR para a amplificação do fragmento gênico correspondente à gp120.	75
Figura 19. A: <i>Nested</i> PCR para a amplificação do fragmento gênico correspondente à gp41	76
Figura 20. A. PCR de sobreposição para a amplificação do fragmento gênico correspondente à gp160.	77
Figura 21. A. PCR para a amplificação do fragmento gênico correspondente à gp140.	78
Figura 22. Alinhamento das seqüências de aminoácidos preditos para as construções recombinantes de <i>env</i> da amostra 116/00.	81
Figura 23. Alinhamento das seqüências de aminoácidos preditos de várias regiões da gp120 da construção recombinante de <i>env</i> da amostra 116/00, juntamente com seqüências de vários isolados que utilizam CCR5 como co-receptor.	83
Figura 24. A: Estrutura topológica de um peptídeo sinal. B: Peptídeo sinal de <i>env</i> da linhagem de HIV-1 HXB2.	86
Figura 25. Predição do peptídeo sinal para a gp120 da amostra 166/00 segundo o programa SignalP 3.0.	87
Figura 26. PCR de sobreposição para o acoplamento do peptídeo sinal de HIV à gp41	89
Figura 27. Subclonagem dos fragmentos recombinantes de <i>env</i> no vetor pcDNA3.1/V5-His-TOPO.	91

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Proteínas recombinantes de interesse farmacoterápico produzidas nos Estados Unidos (EUA) e Europa (EUR)	p. 04
Tabela 2. Proteínas do HIV-1.	17
Tabela 3. Diferentes drogas aprovadas para a terapia anti-retroviral do HIV-1.	24
Tabela 4. Oligonucleotídeos sintéticos utilizados para amplificação de seqüências de <i>env</i> , correspondentes às glicoproteínas de HIV-1.	39

ABREVIATURAS

1X - Concentração para uso normal
 5X - Cinco vezes concentrado
 10X - Dez vezes concentrado
 100X - Cem vezes concentrado
 BCIP - 5-bromo-4-cloro-indolil fosfato
 ° C - Graus Celsius
 cDNA - Ácido desoxirribonucléico complementar
 CH - Cadeia constante pesada de anticorpo
 CL - Cadeia constante leve de anticorpo
 cm - Centímetro
 cm² - Centímetro quadrado
 C-terminal - Extremidade carboxi-terminal
 DNA - Ácido desoxirribonucléico
 DMSO – Dimetilsulfóxido
 DOPE - 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
 DOPG - 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-[fosforac-(1-glicerol)]
 dNTP - Desoxirribonucleotídeo trifosfato
 EDTA - Ácido etilenoaminotetracético
 EGTA - Ácido tetracético etilenoglicol
 ELISA - Ensaio de ligação imunoenzimático
 Fab – Região da molécula de anticorpo que se liga ao antígeno
 Fc - Fração cristalizável do anticorpo (porção constante)

Fv - Fragmento variável do anticorpo
 g - Grama
 g - Força gravitacional
 h - hora
 IgG - Imunoglobulina G
 IPTG - Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
 ITRNNs - Inibidores da transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo
 ITRNs - Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo
 kb - Kilobase
 kDa - Kilodalton
 L - Litro
 M - Molar
 mg - Miligrama
 min - Minuto
 mL - Mililitro
 mA - Miliampére
 mM - Milimolar
 µg - Micrograma
 µm - Micrometro
 µL - Microlitro
 NBT - *Nitro Blue Tetrazole*
 nm - Nanômetro
 N-terminal - Extremidade amino-terminal
 O.D. – Densidade óptica
 pb - Pares de bases
 PCR - Reação em cadeia da polimerase

pH - potencial hidrogeniônico
PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil
p-NPP - p-nitrofenilfosfato
PR - Protease viral
PS - P-eptídeo sinal
p/v - Peso/volume
q.s.p. - Quantidade suficiente para
RMN - Ressonância magnética nuclear
RNA - Ácido ribonucléico
RNase - Ribonuclease
rpm - revoluções por minuto
s - segundo
SDS - Sódio Dodecil Sulfato
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de
poliacrilamida desnaturante (com SDS)
scFv - Fragmento variável de anticorpo
de cadeia única
SPase - Peptidase sinal
TEMED - N,N, N', N' – tetrametil
etilenodimetilamina
TCA - Ácido tricloro acético
TR - Transcriptase reversa viral
U - Unidade enzimática
VH - Domínio variável de cadeia pesada
de um anticorpo
VL - Domínio variável de cadeia leve de
um anticorpo
v/v - Volume/volume
X-Gal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-
galactopiranosídeo

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1. - EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE BIOFÁRMACOS

Abordagens terapêuticas baseadas na utilização de peptídeos e proteínas têm atraído a atenção da indústria farmacêutica. As proteínas recombinantes de interesse farmacoterápico vêm ganhando cada vez mais espaço na economia e atualmente já movimentam um mercado anual de cerca de 50 a 60 bilhões de dólares em todo o mundo (Schmidt, 2004).

O mercado de produção de biofármacos pode ser dividido em dois segmentos: proteínas que não são pós-traducionalmente modificadas e as que necessitam de tais modificações (especialmente a *N*-glicosilação) para terem atividade biológica. As proteínas não-glicosiladas normalmente são expressas em bactérias ou leveduras e atualmente representam cerca de 40% do mercado (Walsh, 2003).

Bactérias Gram-negativas, como, por exemplo, *Escherichia coli*, apresentam várias vantagens na expressão heteróloga: a capacidade de produção em grande quantidade, grande capacidade replicativa, simplificadas condições de cultivo e fermentação, fácil manipulação genética e maior facilidade na conversão de bioprocessos para larga escala, técnicas de transformação com DNA exógeno que, além de muito bem estabelecidas, requerem quantidades mínimas de DNA (Verma *et al.*, 1998). Contudo, devido sua natureza procariótica, o sistema apresenta limitações no processo de modificação pós-traducional de proteínas, o que limita o tipo de farmacoterápico produzido. Além disso, há problemas de enovelamento tanto na expressão de proteínas como corpos de inclusão, quanto de proteínas secretadas para o espaço periplasmático, havendo também problemas de degradação do produto recombinante (revisto por Arbabi-Ghahroudi *et al.*, 2005).

Outro sistema de expressão bastante utilizado são as leveduras, contando com uma maquinaria celular mais complexa para expressão de proteínas que necessitam de modificações pós-traducionais. O uso de leveduras também tem como vantagem a simplicidade no cultivo e nos processos de fermentação quando comparados a células animais (revisto por Gerngross, 2004). Duas espécies que já estão bem estabelecidas para a produção industrial são *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*. Enquanto *S. cerevisiae*

é um dos organismos eucarióticos com melhor caracterização genética e prevalece entre as espécies de leveduras utilizadas na indústria farmacêutica (Walsh, 2003), a levedura metilotrófica *P. pastoris* é atualmente a espécie de levedura mais utilizada para expressão heteróloga de uma forma em geral, graças à alta eficiência dos seus sistemas de expressão e secreção (Schmidt, 2004), tendo, por exemplo, uma produção de 10g/L de albumina sérica humana (Kobayashi *et al.*, 2000), enquanto em *S. cerevisiae* a produção é de 150 mg/L (Sleep *et al.*, 1991).

Entre os sistemas de expressão utilizando células animais, as células de insetos transformadas via baculovírus têm alcançado uma popularidade comparável à que *P. pastoris* representa entre as leveduras. Isso porque essas células são consideradas mais resistentes ao estresse metabólico, além de serem mais produtivas que células de mamíferos, sendo empregadas para produções em larga escala de proteínas recombinantes. A marca de 300 mg/L na produção de colagenase IV humana foi alcançada em células de larva da mariposa *Trichoplusia ni* (George *et al.*, 1997). Contudo, os sistemas utilizando células de insetos apresentam algumas limitações devido à infecção pelo baculovírus, sendo reportados problemas de secreção e dobramento correto de proteínas (McCaroll & King, 1997) e problemas de degradação devido a proteases expressas, além de diferenças nos padrões de glicosilação e problemas na adição de ácido siálico à proteína heteróloga (Ikonomou *et al.*, 2003).

2. - EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS

A produção de proteínas recombinantes utilizadas como fármacos que necessitam de modificações pós-traducionais, como por exemplo, acetilação, metilação, fosforilação, prenilação, sulfonação e glicosilação, especialmente a *N*-glicosilação são preferencialmente expressas em células de mamíferos, que têm a capacidade de mimetizar os padrões de modificações humanos. Sistemas de expressão utilizando *E. coli*, possuem limitados sistemas de glicosilação e sistemas mais complexos como, as leveduras e as células de inseto, normalmente apresentam variações no padrão de glicosilação que podem comprometer a atividade biológica da proteína recombinante e seus parâmetros farmacocinéticos (Coloma *et al.*, 2000). Essas variações podem até levar ao

desencadeamento de respostas imunes contra o fármaco (Schellekens, 2005). Um bom exemplo disso é o trabalho de Tate e colaboradores (2003), que compararam a expressão de um transportador de serotonina murino (rSERT), uma proteína *N*-glicosilada, em vários sistemas de expressão. O estudo demonstrou que o transportador biologicamente ativo foi apenas sintetizado pelas linhagens de células de mamíferos (variantes da linhagem de células de rim embrionário humano, HEK293), sendo parcialmente degradado em *E. coli*, enovelado erroneamente em *P. pastoris* e incorretamente glicosilado nas células de inseto (Sf9).

A utilização de culturas de células animais como modelo de estudo na Biologia tem sua história iniciada há quase 100 anos, com os primeiros experimentos de Ros Harrison (1907), que manteve por mais de 30 dias uma cultura de células nervosas. Em 1928, temos as primeiras tentativas do cultivo do vírus da varíola em cultura de células (Maitland & Maitland, 1928) e, em 1949, o cultivo do vírus da pólio em células HeLa, com a perspectiva de sua utilização para a produção de vacinas (Enders *et al.*, 1949). Em 1955 foi desenvolvido o primeiro meio definido para células animais em cultura, o EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*, Eagle, 1955), que tomou o lugar dos fluidos biológicos utilizados até então. O grande interesse nas culturas de células de mamíferos em bioprocessos, no entanto, teve grande impulso entre os anos de 1970 e 1980, com o desenvolvimento de tecnologias de produção de proteínas recombinantes. O primeiro produto recombinante produzido em escala industrial em células de mamíferos foi o ativador do plasminogênio tecidual (tPA), uma proteína utilizada na dissolução de coágulos no tratamento de infartos. O produto foi licenciado em 1987, sendo produzido em células de ovário de hamster chinês, CHO (revisto por Walsh, 2003). (Tabela 1).

As proteínas recombinantes para uso terapêutico produzidas em células de mamíferos atualmente representam 60% do mercado de biofármacos licenciados nos Estados Unidos e Europa, sendo que o número de produtos passa de 30 (Walsh, 2003). Dentre as proteínas recombinantes, temos fatores plasmáticos sanguíneos, anticoagulantes, hormônios, fatores de crescimento, vacinas, anticorpos monoclonais entre outros produtos (Tabela 1).

Tabela 1. Proteínas recombinantes de interesse farmacoterápico produzidas nos Estados Unidos (EUA) e Europa (EUR) (adaptado de Walsh, 2003). BHK: células de rim de neonatos de hamster. CHO: células de ovário de hamster chinês.

Produto	Empresa	Indicação terapêutica	Célula produtora	Data de aprovação
Fatores sangüíneos recombinantes humanos				
<i>Fator VIII</i>				
Helixate NexGen	Bayer Genetics	Hemofilia A	BHK ^A	2000 (EUR)
ReFacto	Institute/Wyeth Europa	Hemofilia A	CHO ^B	1999 (EUR), 2000 (EUA)
Kogenate	Bayer	Hemofilia A	BHK	1993 (EUA), 2000 (EUR)
Bioclate	Aventis Behring Baxter	Hemofilia A	CHO	1993 (EUA)
Recombinante	Healthcare/Genetics Institute	Hemofilia A	Não disponível	1992 (EUA)
<i>Outros</i>				
NovoSeven (Fator VII humano)	Novo Nordisk	Algumas formas de hemofilia	BHK	1996 (EUR), 1999 (EUA)
Benefix (Fator IX humano)	Genetics Institute	Hemofilia B	CHO	1997 (EUR, EUA)
Anticoagulantes recombinantes				
<i>Ativador do plasminogênio tecidual humano (htPA)</i>				
Tenecteplase	Böering Ingelheim	Infarto do miocárdio	CHO	2001 (EUR)
TNKase	Genetech	Infarto do miocárdio	CHO	2000 (EUA)
Activase	Genetech	Infarto do miocárdio	CHO	1987 (EUA)
Hormônios recombinantes				
<i>Hormônio folículo estimulante humano (FSH)</i>				
Follistim	NV Organon	Infertilidade	CHO	1997 (EUA)
Puregon	NV Organon	Distúrbios de ovulação	CHO	1996 (EUR)
Gonal F	Ares-Serono	Distúrbios de ovulação	CHO	1995 (EUR), 1997 (EUA)
<i>Outros hormônios</i>				
Ovitrelle (coriogonadotrofina humana)	Serono	Usado em técnicas de reprodução assistida	CHO	2000 (EUA), 2001 (EUR)
Thyrogen (tirotrófina- α humana)	Genzyme	Deteção e tratamento de câncer na tireóide	CHO	1998 (EUA), 2000 (EUR)
Luvertis (LSH humano)	Ares-Serono	Infertilidade	CHO	2000 (EUR)
Fatores de crescimento hematopoiéticos recombinantes				
<i>Eritropoetina</i>				
Aranesp	Amgen	Tratamento de anemia	CHO	2001 (EUA, EUR)
Nespo	Dompe Biotec	Tratamento de anemia	CHO	2001 (EUR)

Neorecormon	Roche	Tratamento de anemia	CHO	1997 (EUR)
Procrit	Ortho Biotech	Tratamento de anemia	Não disponível	1990 (EUA)
Epogen	Amgen	Tratamento de anemia	Não disponível	1989 (EUA)
Interferons e interleucinas recombinantes				
<i>Interferon-β humano (hINFβ)</i>				
Rebif	Ares -Serono	Esclerose múltipla	CHO	1998 (EUR), 2002 (EUA)
Avonex	Biogen	Esclerose Múltipla	CHO	1997 (EUR), 1996 (EUA)
Vacinas recombinantes				
<i>Hepatite B</i>				
Hepacare (antígeno de superfície)	Medeva Pharma	Imunização contra hepatite B	Não disponível	2000 (EUR)
Anticorpos Monoclonais				
Bexxar (mAb anti-CD20)	Corixa/GlaxoSmithKlin	Tratamento de linfomas não-Hodgkin	Não disponível	2003 (EUA)
Xolair (mAb anti-IgE)	Genetech	Asma	CHO	2003 (EUA)
Humira (mAb anti-receptor TNF)	Abbott Laboratories	Artrite reumatóide	Não disponível	2002 (EUA)
Zevalin (mAb anti-CD20)		Tratamento de linfomas não-Hodgkin	CHO	2002 (EUA)
Outras proteínas recombinantes				
<i>Proteínas de morfogênese óssea</i>				
Inductos (proteína morfogênica óssea-2)	Genetics Institute/Wyeth Europa	Recuperação de fraturas	CHO	2002 (EUA)
Infuse (proteína morfogênica óssea-2)	Medtronik Sofamor Danek	Recuperação de fraturas	CHO	2002 (EUA)
Osteogenic protein 1 (proteína osteogênica-1)	Howmedica	Recuperação de fraturas	CHO	2001 (EUA)
Outras				
Fabrazyme (α -galactosidase)	Genzyme	Doença de Fabry	CHO	2001 (EUA), 2003 (EUR)
Aldurazyme (laronidase)	Biomarin Pharmaceuticals	Tratamento de mucopolissacaridoses	CHO	2003 (EUA)
Xigris (drotreconina- α)	Eli Lilly	Sepsias severas	Não disponível	2001 (EUA), 2002 (EUR)
Enbrel (proteína de fusão receptor TNF-IgG)	Amgen	Artrite reumatóide	CHO	1998 (USA)
Pulmozine (dornase- α)	Genentech	Fibrose cística	CHO	1993 (EUA)

As células de ovário de hamster chinês (CHO) e variantes são as linhagens de células imortalizadas preferencialmente escolhidas para a produção de biofármacos. Além de contarem com um eficiente sistema de glicosilação (Freeman *et al.*, 2001), já estão bem caracterizadas as tecnologias que permitem a transfecção (seja via co-precipitação com fosfato de cálcio ou via lipídeos) e a amplificação gênica do gene transfectado para seleção de clones altamente produtores dessas linhagens, sendo amplamente utilizado o sistema CHO *dhfr*⁻, associado ao tratamento das células com metotrexato (MTX) para o aumento do número de cópias do gene de interesse (Butler, 2005).

Conforme revisto por Ruggiero (2002), a enzima DHFR é essencial para a biossíntese de aminoácidos e nucleotídeos em células eucarióticas. A linhagem celular CHO *dhfr*⁻ apresenta perda de função do gene *dhfr*, e quando transfectada com o vetor contendo o gene funcional, esse é incorporado ao genoma da célula levando à expressão do fenótipo DHFR⁺. Os transfectomas com este fenótipo são capazes de crescer em meio de cultura sem a adição de glicina, hipoxantina e timina, como é requerido para as células CHO *dhfr*⁻. O MTX é um análogo de folato que inibe irreversivelmente a enzima DHFR, resultando em morte celular (Asselberg *et al.*, 1995). As células CHO *dhfr*⁻ que são transfectadas com vetores contendo o gene *dhfr* desenvolvem resistência à droga por meio de amplificação do gene *dhfr*. Como a região amplificada é cerca de 100 a 3000 vezes maior que o tamanho do gene *dhfr*, o gene de interesse que está adjacente ao gene amplificado no mesmo vetor de expressão ou em regiões próximas no cromossomo hospedeiro é também amplificado (Asselberg *et al.*, 1995).

As células CHO apresentam também grande versatilidade para adaptação de formas de cultivo. É uma célula de origem epitelial, tipicamente aderente, mas também muito bem adaptável ao crescimento em suspensão, modo de cultivo preferencialmente utilizado na produção em larga escala em biorreatores (Schütt *et al.*, 1997). Adicionalmente as células CHO podem ser adaptadas ao cultivo celular em meio completamente livre de soro (Rosser *et al.*, 2005). O uso de soro no meio de cultivo de células aderentes ajuda o bom crescimento das células, uma vez que é fonte de fatores de crescimento, sendo viável quando é utilizado para produção em pequena escala. No entanto, em escala industrial, o uso do soro se torna desvantajoso, uma vez que representa um componente indefinido no

meio de cultivo, podendo ser fonte de contaminação no produto final, além de ter o seu custo elevado (Schröder, *et al.*, 2004).

Apesar da hegemonia das células CHO como sistemas de produção de biofármacos, uma série de outras linhagens celulares vem ganhando espaço como sistemas alternativos de produção, especialmente células de origem humana, como por exemplo, PER-C6 (*human-retina-derived*) e HEK293 (*human embryonic kidney*). A PER-C6 é uma linhagem de retinoblastos fetais imortalizados pela transfecção do minigene E1 de adenovírus humano tipo 5 (Fallaux *et al.*, 1998). É uma linhagem celular que cresce bem tanto em aderência quanto em suspensão em meio sem soro (Pau *et al.*, 2001) e que já vem sendo utilizada para a produção de anticorpos monoclonais em larga escala (Jones *et al.*, 2003). A linhagem HEK293 é uma linhagem de células embrionária de rim também imortalizada pela transfecção de fragmentos de DNA de adenovírus tipo 5 (Graham *et al.*, 1977) e vem sendo utilizada para expressão de proteínas com potencial anti-inflamatório (Cao, 2004).

Atualmente, os grupos de Cultura de Células e Imunologia Molecular do laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília (UnB) têm grande interesse na expressão heteróloga de proteínas de interesse terapêutico, como anticorpos monoclonais humanizados (Ruggiero, 2002); fatores plasmáticos recombinantes (participando do projeto de pesquisa em rede “Produção de fatores plasmáticos humanos da coagulação sangüínea” financiado pelo FINEP/MS), assim como a produção de vários modelos de antígenos para seleção de anticorpos com potencial neutralizante, como por exemplo, os antígenos de superfície do envelope viral de HIV-1.

Além de expressão heteróloga, nos interessa a busca de linhagens celulares que possam servir de hospedeiras alternativas de expressão às linhagens comumente utilizadas. Contamos no grupo com uma linhagem de células de glândula submandibular humana (HSG). A linhagem foi estabelecida em 1981 a partir de células tumorais de uma glândula salivar humana irradiada (Shirasuna *et al.*, 1981). Essa linhagem têm sido utilizada em estudos de citotoxicidade de substâncias terapêuticas (Atsumi *et al.*, 2001) e no estudo da mutagênese (Campos-da-Paz., 2005), além estudos de engenharia de tecidos e diferenciação celular visando à obtenção de uma glândula salivar artificial para pacientes que sofrem de hipofunção glandular. (Aframian *et al.*, 2000; Daniels *et al.*, 2000).

As HSG são células epiteliais, mais especificamente derivadas da região

correspondente ao ducto intercalar da glândula salivar submandibular humana. Por meio do tratamento das células HSG com o quimioterápico 5-azacitidina, é possível realizar a diferenciação *in vitro* das células para um fenótipo acinar, conhecido com HSG-AZA3 (Kasamatsu *et al.*, 2006), tipicamente secretor de uma série de glicoproteínas constituintes da saliva, como algumas amilases e mucinas. A diferenciação é também observada com o crescimento das células sobre diversos substratos como, por exemplo, colágeno tipo I, laminina tipo I e Matrigel (um preparado que mimetiza a matriz extracelular) (Lam *et al.*, 2005).

Apesar do grande potencial secretor das células HSG, até o presente, poucos estudos que envolvem a expressão heteróloga com a linhagem foram realizados. Assim, não se estabeleceu um protocolo para a transfecção otimizada dessas células. Desta forma, é interessante verificar o potencial da linhagem como sistema de expressão heterólogo. Além disso, as células HSG são interessantes para a produção de antígenos virais recombinantes de HIV-1. São células humanas e por esse fato possuem, teoricamente, a maquinaria celular mais apropriada para a produção das glicoproteínas do envelope viral de HIV-1. Já foi relatada a produção de partículas virais infecciosas de HIV nesta linhagem celular (Ham *et al.*, 2000).

Várias metodologias foram desenvolvidas para a introdução do DNA em células de mamíferos, com o objetivo de ultrapassar duas principais barreiras: as membranas plasmática e nuclear (Labat-Moleur *et al.*, 1996). A mais comumente utilizada devido ao seu baixo custo e facilidade de manejo consiste em compactar a molécula de DNA com fosfato de cálcio em uma partícula densa, positivamente carregada e pequena o suficiente para ser endocitada (revisto por Fielden *et al.*, 2001). A técnica foi originalmente descrita por Graham e Van der Eb em 1973 e desde então inúmeras variações vêm sendo incorporadas a esse protocolo, como, por exemplo, o uso de choque das células com glicerol e DMSO (Wilson & Smith, 1996).

Outros métodos de entrega de DNA às células são: sonoporação e eletroporação, que criam poros transitórios na membrana para que grandes moléculas de DNA possam ter acesso ao interior da célula, assim como a biolística e a microinjeção, que liberam os plasmídeos diretamente no citoplasma (revisto por Pinnaduwa *et al.*, 1989). A baixa eficiência de transfecção, a instabilidade dos genes introduzidos, toxicidade às células e

demais limitações associadas às técnicas comentadas anteriormente vêm tornando a transferência de genes mediada por lipossomos (lipofecção) é cada vez freqüente. Os lipossomos, por interações eletrostáticas, formam complexos espontâneos com o DNA, fundem-se à membrana plasmática e liberam seu conteúdo (Dass, 2004).

Ruggiero (2002) estabeleceu um protocolo para a expressão em células CHO-K1 de fragmentos de anticorpos. Nesse estudo, Ruggiero expressou fragmentos do anticorpo murino Z22, que é capaz de reconhecer o DNA na forma Z. O DNA dupla hélice pode transitar de sua conformação nativa B para a conformação Z, de sentido levógiro e cujo traçado do esqueleto fosfato em zigue-zague faz com que a estrutura seja denominada Z-DNA (Wang *et al.*, 1979). Os anticorpos anti-Z-DNA reagem com o DNA em sua forma Z, e estão muito associados a doenças auto-imunes, como o lupus eritematoso sistêmico (Roben *et al.*, 1996). Mais especificamente, o anticorpo expresso por Ruggiero é o anticorpo quimérico anti-Z-DNA Z22, na forma recombinante de fragmento FvFc, sendo a porção Fv murina e de cadeia única (scFv), fusionada ao fragmento Fc de IgG 1 humana, comportando-se como moléculas diméricas devido a pontes dissulfeto entre dois fragmentos FvFc (Figura 1).

O protocolo estabelecido por Ruggiero permite a detecção do anticorpo recombinante diretamente do sobrenadante de cultivo pelo teste de ELISA, consistindo em um método para avaliação de expressão heteróloga transiente em diferentes células em cultura, sendo esta utilizada, neste estudo, para avaliação preliminar do potencial das células HSG como sistemas de expressão.

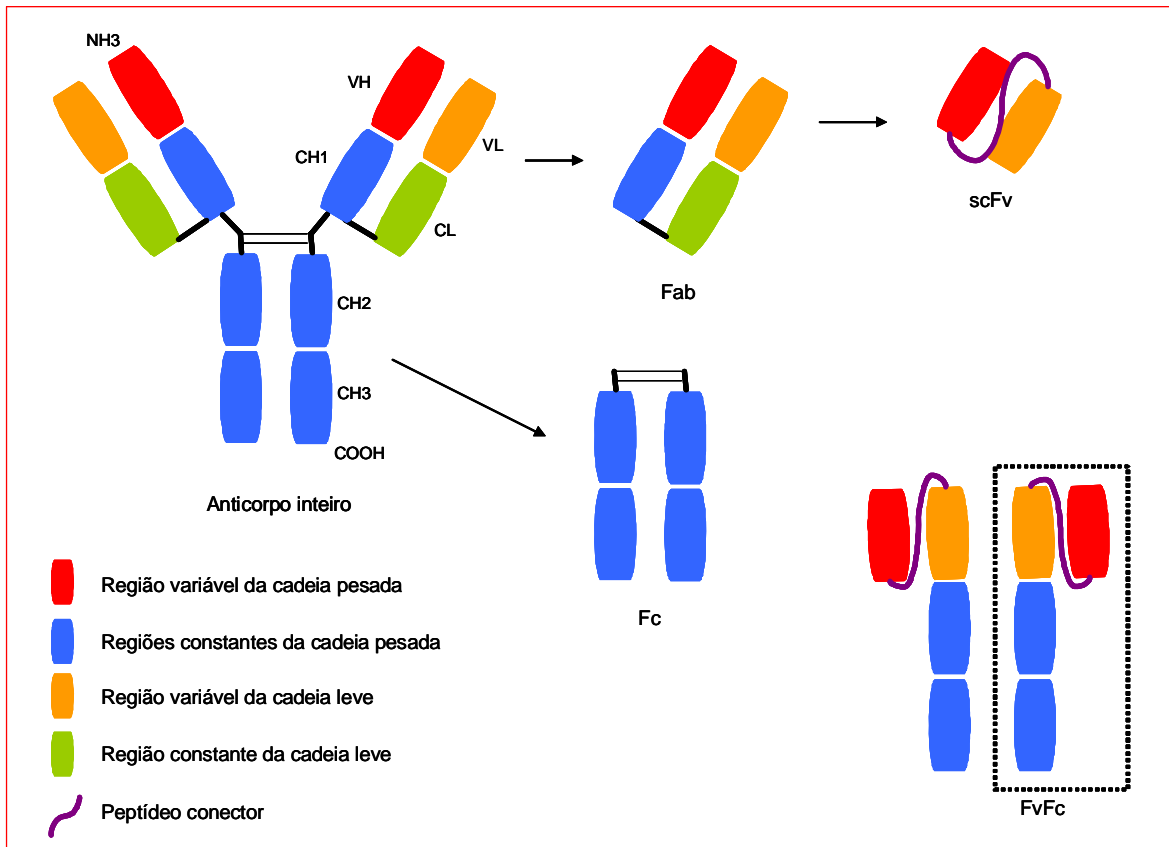


Figura 1. Representação esquemática da molécula de imunoglobulina e dos fragmentos recombinantes. VH: região variável da cadeia pesada, VL: região variável da cadeia leve, CH1CH2CH3: regiões constantes da cadeia pesada, CL: região constante da cadeia leve, Fab: fragmento de ligação ao antígeno, Fc: fragmento cristalizável, scFv: fragmento variável de cadeia única, FvFc: monômero do fragmento de cadeia única variável fusionado ao fragmento cristalizável (adaptado de Ruggiero, 2002).

3. - HIV-AIDS

Em 1981, foi reportada à comunidade científica a primeira descrição clínica de um caso do que hoje se conhece como síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Gottlieb *et al.*, 1981). Um número crescente de novos casos de AIDS foi reportado no início dos anos 80, normalmente associado a um aumento do número de casos de um câncer raro, o sarcoma de Kaposi e um grande número de infecções oportunistas, tais como *Pneumocystis carinii* e *Candida albicans* (revisto por Prusiner, 2002).

Com o aumento das descrições clínicas dos casos de AIDS nos anos 80, a drástica redução na contagem de linfócitos T dos pacientes tornou-se foco de investigações médicas para o descobrimento da causa da doença. A primeira pista sobre a etiologia da AIDS veio à tona com o isolamento de um retrovírus de um nódulo linfático de um paciente com linfadenopatia, no Instituto Pasteur de Paris, pelo grupo de Luc Montagnier em 1983 (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983). Igualmente importantes, foram as descobertas do grupo de Robert Gallo do *National Institute of Health* (NIH) que, em uma série de artigos confirmou que o vírus descoberto por Montagnier era realmente o agente etiológico da AIDS (revisto por Prusiner, 2002).

Como comumente acontece, cada laboratório deu aos seus isolados do novo vírus um nome diferente. O grupo de Montagnier o chamou de LIV (*lymphadenopathy-associated virus*), enquanto o grupo de Gallo, que já havia identificado dois outros retrovírus conhecidos como HTLV-I e HTLV-II, o denominou HTLV-III (*human T-cell lymphotropic virus type III*), sendo também chamado de ARV (*AIDS-associated retrovirus*). Com uma melhor caracterização dos isolados, em 1986, o impasse foi resolvido, tendo decidido o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) em chamá-lo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Flint *et al.*, 2004).

Em mais de duas décadas após o primeiro caso documentado de AIDS, segundo estimativas do *Joint United Nations Programme on HIV/AIDS* (UNAIDS, 2005) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 40 milhões de pessoas vivem hoje com o vírus HIV-1, em todo o mundo. Só em 2005, ocorreram mais de 5 milhões de novos casos da infecção e mais de 3 milhões de mortes de pacientes com AIDS (UNAIDS, 2005). No Brasil, entre os anos de 1980 e 2004 foram registrados um total de 362.340 casos (Brasil,

Ministério da Saúde, Boletim Epidemiológico – AIDS e DST, 2005), sendo que se estima que hoje vivem, em território nacional, cerca de 600 mil portadores do vírus.

Ao longo do que se conhece da história evolutiva do vírus, sabe-se que o HIV-1 difere geneticamente de uma localização geográfica para outra. Tal variabilidade pode ser atribuída à alta taxa de erro da transcriptase reversa na incorporação de nucleotídeos e à incapacidade da enzima de efetuar a correção dos mesmos, à presença de um genoma diplóide que facilita eventos de recombinação, à rápida proliferação do vírus na célula hospedeira, a diferentes pressões seletivas geradas pelo sistema imune de cada hospedeiro e devido a tratamentos anti-retrovirais (Perin *et al.*, 2003).

A análise filogenética de inúmeros isolados de HIV-1, por meio de suas seqüências, permitiu agrupá-los em 3 grandes grupos. A maioria das seqüências está agrupada como grupo M (*major*), enquanto um número menor, porém crescente de seqüências são classificadas junto ao grupo O (*outlier*), existindo ainda o grupo N (não-M e não-O). Os dois últimos grupos permanecem restritos a isolados da África Central e Ocidental, enquanto o grupo M, por sua vez, apresenta uma distribuição mundial (Kandathil *et al.*, 2005). As linhagens do grupo M incluem 9 diferentes subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J e K) e sub-subtipos (A₁, A₂, A₃, F₁ e F₂), além de 21 formas recombinantes circulantes já descritas (*circulating recombinant forms – CRFs*) (revisto por Geretti, 2006).

Atualmente, o C é o subtipo mundialmente prevalente, correspondendo a cerca de 57% dos casos de infecção (Esparza & Bhamarapavati, 2000). É o subtipo dominante na África Sub-Saariana, em Israel, na Índia e na China, tendo sido identificado inicialmente na África do Sul e Etiópia, em amostras analisadas dos anos de 1984 (Zachanova *et al.*, 1995) e 1986 (Johansson *et al.*, 1994).

No Brasil, como um todo, apesar de o subtipo circulante mais freqüente ser o B (cerca de 80% dos casos registrados), outros tais como F, C, B/C e B/F também têm sido documentados (revisto por Cerqueira *et al.*, 2004). No Distrito Federal, Veras (2006) aponta o subtipo B como o mais prevalente.

3.1 - TRANSMISSÃO E PATOGÊNESE

As principais formas de transmissão do HIV são a sexual, sangüínea (no caso de receptores de sangue/hemoderivados e usuários de drogas injetáveis) e a vertical, da mãe para o filho, durante a gestação, parto ou aleitamento. Existe também a transmissão ocupacional, ocasionada por acidente de trabalho em profissionais da área de saúde que sofrem ferimentos com instrumento perfuro-cortantes contaminados (Levy *et al.*, 2003)

A infecção pelo HIV pode ser dividida em 3 fases clínicas: a infecção aguda, a fase assintomática e AIDS (Sereti & Lane, 2001). A infecção aguda caracteriza-se tanto por viremia elevada, como por resposta imune intensa. Durante o pico de viremia, ocorre uma diminuição rápida dos linfócitos T CD4+, que posteriormente aumentam, mas geralmente não retornam aos níveis prévios à infecção. Observa-se, também, aumento do número absoluto de linfócitos T CD8+ circulantes, o que provavelmente reflete uma resposta T citotóxica potente, que é detectada antes do aparecimento de anticorpos neutralizantes. Uma série de sintomas clínicos podem aparecer durante a fase aguda: febre, faringite, linfadenopatia, ulcerações muco-cutâneas, cefaléia, entre outros.

Após a fase aguda, ocorre a estabilização da carga viral, que permanece relativamente constante durante a fase assintomática, quando o estado clínico básico é mínimo ou inexistente, uma vez que o sistema imune permanece competente para controlar a viremia e a maioria das outras infecções. Entretanto, dentro dos tecidos linfóides, a destruição de células T CD4+ progride ao longo dos anos, em uma velocidade que vai aumentando em relação à capacidade de reposição dessas células pelo organismo, levando à queda do número de linfócitos T CD4+ no sangue circulante. Durante a progressão da doença, as respostas imunes a outras infecções podem estimular a produção do HIV e acelerar a destruição dos tecidos linfóides. As citocinas produzidas pelo sistema imune inato em resposta a outras infecções servem de estímulo para replicação do HIV. Desta forma, à medida em que o sistema imune tenta erradicar outros microrganismos, acelera a sua própria destruição pelo HIV. A doença progride para a fase final, AIDS, quando a destruição do tecido linfóide periférico está essencialmente completa e o sistema imune já não é capaz de controlar infecções oportunistas como citomegalovirose, herpes simples,

micobacterioses, pneumonias, candidíase, criptococose, histoplasnose, além de uma série de neoplasias (revisto por Abbas *et al.*, 2002).

3.2 - BIOLOGIA DO VÍRUS

O vírus da imunodeficiência humana é membro da família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus*. Assim como o HIV, os demais lentivirus, tais como o vírus visna do carneiro, os vírus da imunodeficiência bovina, eqüina, felina e símia (SIV) são capazes de provocar infecção latente a longo prazo e efeitos citopáticos a curto prazo, associados a imunodeficiências, desordens no sistema hematopoiético e encefalopatias (Flint *et al.*, 2004). Foram identificados, até então, dois tipos de HIV, designados HIV-1 e HIV-2. O HIV-2 é endêmico na África Ocidental, e o HIV-1, mais virulento, com distribuição mundial (Kandathil *et al.*, 2005).

3.2.1 - ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO HIV-1

Uma partícula infecciosa de HIV-1 tem um diâmetro que varia de 80 a 100 nm. O vírion apresenta uma estrutura complexa constituída de envelope, matriz protéica e nucleocapsídeo.

O envelope é formado por uma bicamada lipídica, derivada da membrana plasmática da célula hospedeira, e que apresenta proteínas celulares e virais. As glicoproteínas virais gp120 (superfície externa) e gp41 (transmembrânica) desempenham um papel fundamental na infecção viral. Delimitando a superfície interna do envelope, a matriz protéica é formada por aproximadamente 2000 cópias da proteína p17. Internamente, está o nucleocapsídeo cônico constituído por também aproximadamente 2000 cópias da proteína p24. No centro do vírus, estão as duas fitas do RNA genômico, estabilizadas como um complexo ribonucleoprotéico com a proteína p7, e as enzimas virais: transcriptase reversa (TR), integrase (IN) e protease (PR) (revisto por Turner & Summers, 1999) (Figura 2).

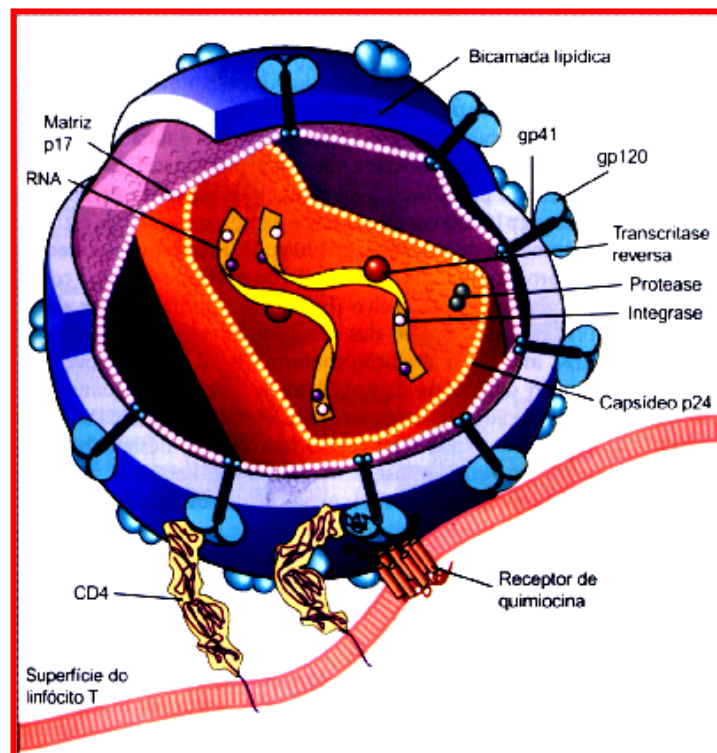


Figura 2. Desenho representativo da estrutura do vírus da imunodeficiência humana. (adaptado de Abbas *et al.*, 2002).

O genoma do HIV-1 contém 9 diferentes genes distribuídos em aproximadamente 9,8 kb (Figura 3). Os três principais genes são *gag*, *pol* e *env*. O gene *gag* codifica as proteínas estruturais do nucleocapsídeo e matriz, *pol* é responsável por enzimas virais como transcriptase reversa, protease e integrase e *env* codifica glicoproteínas do envelope. Os genes *tat* e *rev* codificam proteínas regulatórias com papel essencial na replicação viral. Os genes *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu* codificam proteínas acessórias, não essenciais para a reprodução viral na maioria das linhagens de células T imortalizadas, mas que modulam a replicação viral e são importantes para uma eficiente produção viral *in vivo* (revisito por Flint *et al.*, 2004). As funções de cada proteína estão resumidas na Tabela 2.

A expressão das proteínas virais é controlada por seqüências regulatórias existentes nas repetições terminais longas (*long-terminal repeats*, LTRs), que são reconhecidas pela maquinaria transcricional da célula hospedeira. A 5'LTR contém um promotor e seqüências intensificadoras às quais se ligam uma série de fatores transcricionais necessários para a transcrição, enquanto a 3'LTR contém seqüências necessárias para a poliadenilação (revisito por Flint *et al.*, 2004)

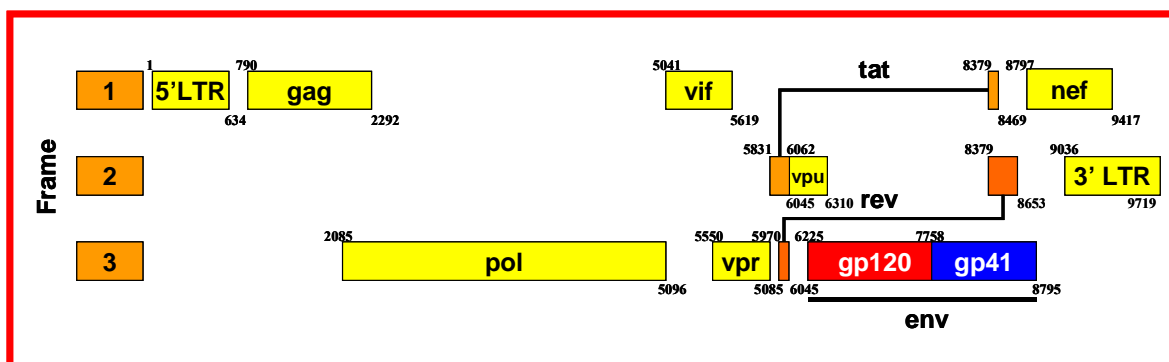


Figura 3. Diagrama esquemático do genoma do HIV-1. Os números representam a posição dos nucleotídeos referentes à linhagem viral HXB2. (adaptado de *HIV Sequence Compendium*, 2005)

Tabela 2. Proteínas do HIV-1 (adaptado de *HIV Sequence Compendium*, 2005; Flint *et al.*, 2004)

Proteína	Função	Localização
Gag		
p17	Proteína da matriz	Vírião
p24	Proteína do nucleocapsídeo	Vírião
p7	Proteína do nucleocapsídeo, liga-se ao RNA	Vírião
p6	Liga-se a Vif	Vírião
Pol		
Protease (PR)	Clivagem de Gag/Pol e maturação do vírus	Vírião
Transcriptase reversa (TR)	Transcrição reversa	Vírião
Integrase (IN)	Integração do DNA próviral	Vírião
Env		
gp120/gp41	Permitem a entrada do vírus na célula	Vírião, membrana
Tat	Ativador transcricional, necessário para o alongamento dos transcritos virais, aumenta a processividade da maquinaria transcricional	Núcleo
Rev	Transporte dos RNAs virais do núcleo para o citoplasma	Núcleo/Citoplasma
Nef	Modulador da replicação viral, reduz a expressão de CD4 e de moléculas de MHC classe I	Membrana, citoplasma
Vpr	Promove o transporte nuclear do DNA viral, paralisa o ciclo celular em G2.	Vírião, núcleo
Vif	Facilita a maturação do vírião e aumenta a infectividade	Vírião, citoplasma
Vpu	Facilita a liberação do vírus pela célula, reduz a expressão de CD4	Membrana

3.2.2 - MECANISMO DE ENTRADA DO VÍRUS NA CÉLULA

A entrada do HIV na célula hospedeira ocorre por meio de um mecanismo envolvendo a fusão direta do envelope viral com as membranas celulares. As proteínas do envelope viral estão envolvidas neste processo. A glicoproteína solúvel gp120 e a subunidade transmembrânica da gp41 encontram-se associadas na superfície viral por interações não covalentes, na forma de um complexo heterotrimérico, $(gp41)_3-(gp120)_3$ (revisto por Koch *et al.*, 2003)

No modelo de infecção atualmente aceito, o processo de entrada começa com a ligação de gp120 a CD4 na superfície da célula (Maddon *et al.*, 1986). Esta interação leva à formação de um complexo gp120-CD4, que sofre uma mudança conformacional, expondo um sítio de ligação reconhecido por um co-receptor, no caso um receptor de quimiocina, principalmente CCR5 em macrófagos (Wu *et al.*, 1996) e CXCR4 em linfócitos T (Feng *et al.*, 1996). Conforme revisto por Finnegan e colaboradores (2002), a interação do co-receptor com gp120-CD4 forma um complexo intermediário que promove o deslocamento da gp120 de gp41, seguindo-se uma série de mudanças conformacionais em gp41, que expõe sua porção *N*-terminal, o peptídeo de fusão. Os peptídeos de fusão do trímero formado por gp41 inserem-se na membrana celular e, pela formação de grampos, mediam a fusão vírus-célula (Figura 4).

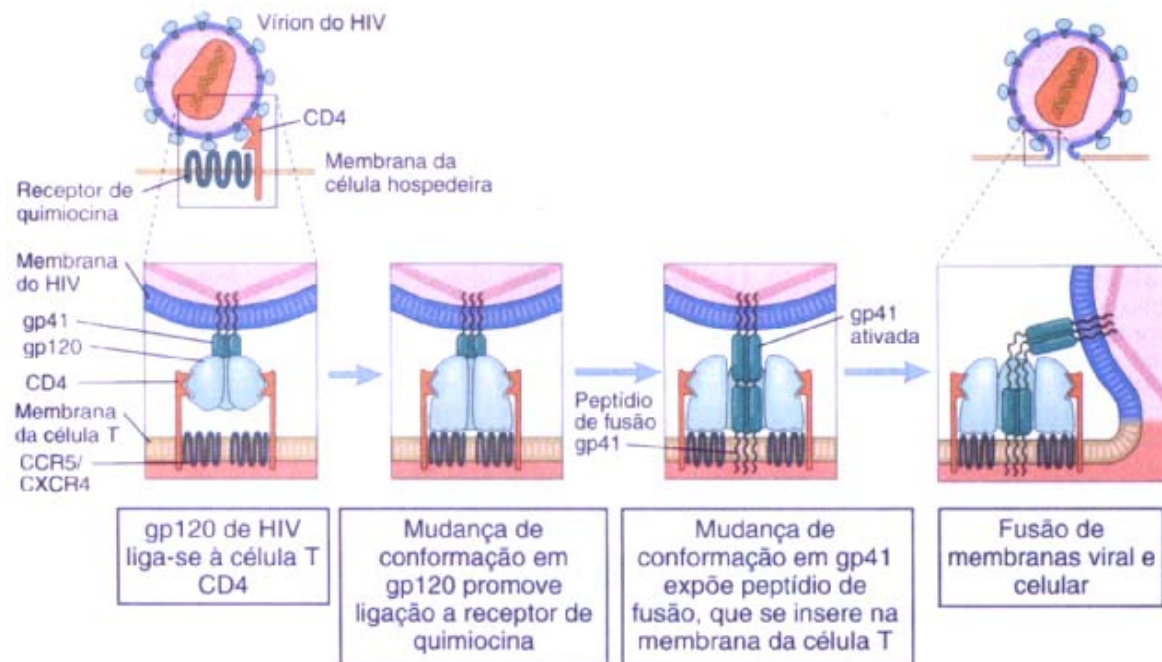


Figura 4. Mecanismo de entrada do HIV-1 na célula hospedeira (adaptado de Abbas *et al.*, 2002).

3.3 - A ESTRUTURA E SÍNTESE DO COMPLEXO GLICOPROTÉICO

A gp120 é uma proteína solúvel intensamente glicosilada, sendo as cadeias de carboidratos responsáveis por cerca de 50% da massa molecular da proteína. É composta por 5 regiões constantes (C1 - C5), intercaladas por 5 regiões variáveis (V1 - V5) (Figura 5). O mapeamento topográfico, baseado em estudos de modelagem molecular, cristalografia e RMN sugerem que as regiões constantes formam um núcleo central, enquanto as regiões variáveis estão agrupadas por pontes dissulfeto (com exceção de V5) e formam alças que emergem da superfície da proteína (revisto por Pognard *et al.*, 2001).

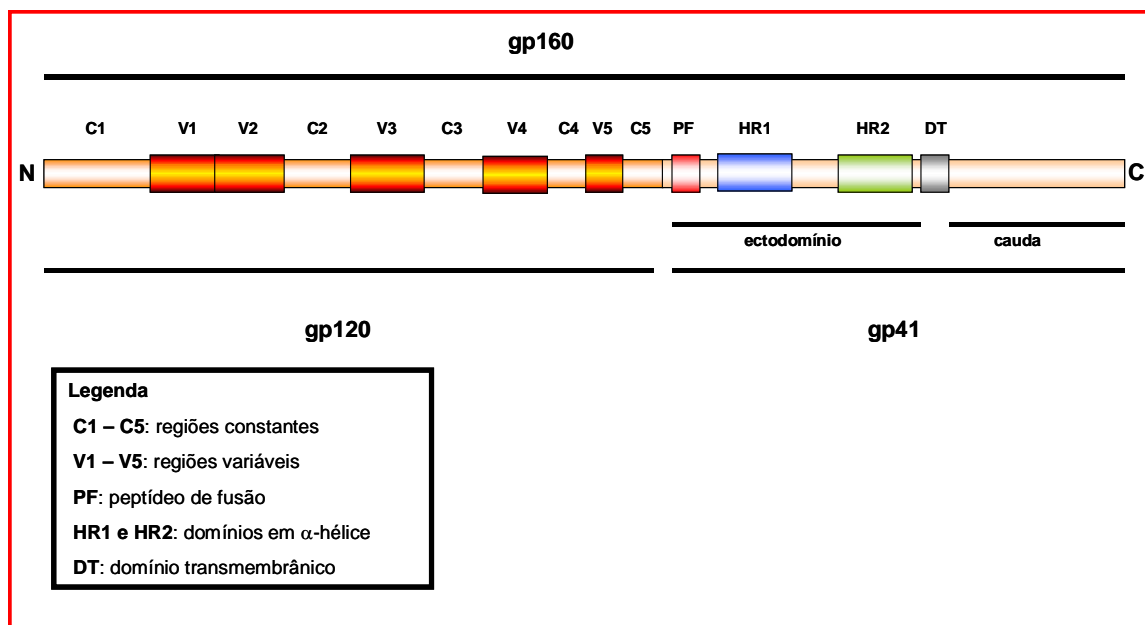


Figura 5. Mapa da gp160 contendo as principais regiões da gp120 e gp41.

A estrutura cristalina da gp120, em resolução de 2,5Å revelou que o núcleo deglicosilado da proteína é formado por 25 folhas β , 5 α -hélices e 10 segmentos em alça formando uma estrutura globular em formato de coração (Figura 6). A cadeia polipeptídica da gp120 enovelada possui dois grandes domínios, um domínio interno e um externo, ligados por uma folha β , formando uma depressão que constitui o sítio de ligação a CD4 (Kwong *et al.*, 1998).

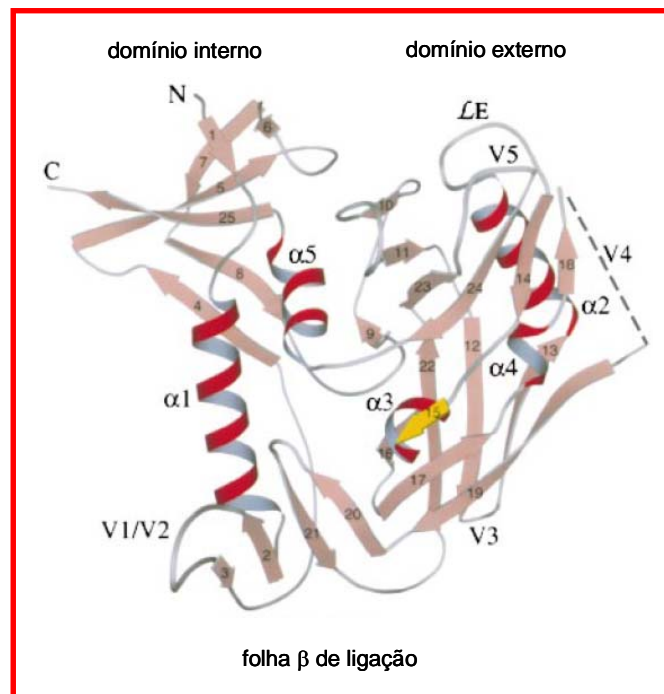


Figura 6. Diagrama esquemático do núcleo de um monômero deglicosilado da gp120.(adaptado de Kwong *et al.*,1997).

O sítio de ligação a CCR5 é relativamente próximo ao sítio de ligação a CD4. Resíduos de aminoácidos da alça V3 provavelmente também estão envolvidos na ligação a CCR5, potencialmente formando um sítio de ligação descontínuo. Sugere-se também que o CXCR4 interaja com gp120 em uma região similar a de CCR5, com contato em alguns resíduos de aminoácidos diferentes (revisto por Pognard *et al.*, 2001).

O monômero da gp41 é uma proteína que possui um ectodomínio *N*-terminal, um domínio transmembrânico único e uma extensa cauda *C*-terminal (Fig 5). De acordo com a revisão feita por Bär & Alizon (2004), o ectodomínio, região mais conservada de *env*, contém o peptídeo de fusão e apresenta duas regiões propensas a formar domínios em α -hélice, conhecidos como HR1 e HR2 (*heptad repeated sequences*). Os estudos cristalográficos de peptídeos derivados da gp41 (Chan *et al.*, 1997; Tan *et al.*, 1997 e Weissenhorn *et al.*, 1997;) mostraram que as α -hélices HR1, considerando a gp 41 no seu

contexto trimérico, formam um feixe central de 3 α -hélices com faces hidrofóbicas, nas quais as 3 α -hélices HR2 são enoveladas em um sentido antiparalelo (Figura 7).

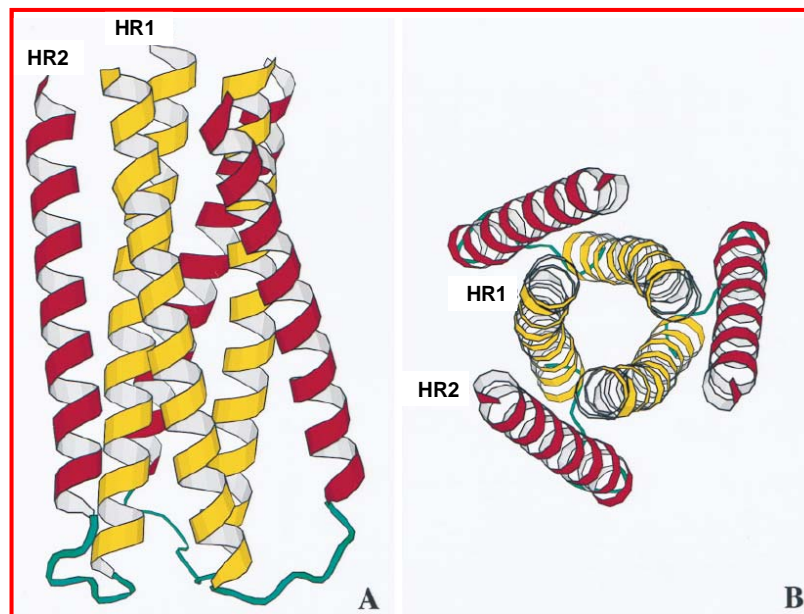


Figura 7. A: Diagrama esquemático do “feixe de 6 hélices” formado pelo enovelamento das regiões em α -hélice HR1 (amarelo) e HR2 (vermelho) em um trímero da gp41. B: Vista frontal do “feixe de 6 hélices” (adaptado de Tan *et al.*, 1997).

Em um monômero de gp41 completo, uma alça hidrofílica contendo dois resíduos de cisteína une HR1 e HR2 por uma ponte dissulfeto, de forma que cada monômero se dobre em uma conformação de grampo, formando o “feixe de 6 hélices”, responsável pela fusão vírion-célula (revisto por Colman & Lawrence 2003)(Fig 7).

Segundo o modelo tradicional da estrutura da gp41, a porção C-terminal da proteína está inteiramente contida no interior da célula/vírion. Contudo, após analisar a porção C-terminal de 357 seqüências de gp41 de subtipos de A a D, Hollier & Dimmock (2005) sugerem que todas potencialmente possuem um segundo ectodomínio, de aproximadamente 40 resíduos de aminoácidos, suportado por 3 domínios transmembrânicos, além de uma cauda interna de aproximadamente 100 resíduos. Tal conformação da gp41 representaria uma pequena parcela da população de gp41 que é incorporada aos vírions.

As glicoproteínas do envelope viral são geradas a partir da clivagem, por proteases celulares de um único precursor protéico, gp160, codificado por *env*. A gp160 é sintetizada no retículo endoplasmático e é sujeita a uma extensiva N-glicosilação por cadeias de

manose ligadas a resíduos de asparagina em sítios NXS ou NXT (revisto por Land & Braakman, 2001). Considerando que 50% da massa molecular de gp160 é devida a carboidratos, sugere-se que tais modificações pós-traducionais sejam de grande importância para o tráfego intracelular e o processamento do precursor. Versões mutantes da gp160, com alterações nos sítios de glicosilação N621, N630 e N642 apresentam um atraso no transporte intracelular e diminuição do processamento proteolítico, quando comparadas ao tipo selvagem (Fenouillet & Jones, 1995).

Após a clivagem, gp120 e a gp41 sofrem a adição pós-traducional de fucose, galactose e ácido siálico (revisto por Moulard & Decroly, 2000).

4. AGENTES ANTI-RETROVIRAIS

A terapia anti-retroviral (TARV) administrada em pacientes soro-positivos normalmente é constituída por um coquetel de medicamentos que inclui pelo menos dois inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo (ITRNs) e um inibidor da protease (IP) e/ou um inibidor da transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo (ITRNN). Atualmente, existem 17 drogas aprovadas para o tratamento da infecção (Tabela 3) (revisto por Potter *et al.*, 2004; Ministério da Saúde, 2004).

Na maioria dos casos, o tratamento resulta em uma diminuição da carga viral. Entretanto, o tratamento prolongado com tais drogas pode resultar na seleção de linhagens virais resistentes, levando à progressão da doença (revisto por Deeks, 2003).

Uma série de mutações em resíduos de aminoácidos da TR e PR virais foi caracterizada e essas têm sido associadas ao desenvolvimento de resistência do vírus. Tais mutações são classificadas como primárias, quando diminuem a sensibilidade do vírus a um medicamento, ou secundárias quando estão associadas a um aumento na capacidade replicativa do vírus quando na presença das drogas. Diversos trabalhos publicados no Brasil (Dumans *et al.*, 2002; Tanuri *et al.*, 2002 e Couto-Fernandez *et al.*, 2005) e no mundo (Johnson *et al.*, 2005) comprovam a emergência de tais mutações,

Tabela 3. Diferentes drogas aprovadas para a terapia anti-retroviral do HIV-1 (adaptado de Potter *et al.*, 2004; Brasil, Ministério da Saúde, 2004)

Classe	Droga	Alvo	Modo de ação
Inibidor da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo (ITRN)	Zidovudina (AZT)	Transcriptase reversa	Fosforilados por enzimas celulares. Competitivamente inibem a síntese do DNA viral ou provocam terminação de cadeia.
	Didanosina (ddl)		
	Zalcitabina (ddC)		
	Estavudina (d4T)		
	Lamivudina (3TC)		
	Abacavir (ABC)		
	Tenofovir (TFV)		
Inibidor da transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo (ITRNN)	Nevirapina (NVP)	Transcriptase reversa	Não-fosforilados. Inibição não competitiva da síntese do DNA viral. Ligam-se diretamente à enzima.
	Delavirdina (DLV)		
	Efavirenz (EFZ)		
Inibidor da protease (IP)	Saquinavir (SQV)	Protease	Inibição da função enzimática por ligação direta ao sítio ativo.
	Indinavir (IDV)		
	Ritonavir (RTV)		
	Nelfinavir (NFV)		
	Amprenavir (APV)		
	Lopinavir (LPV)		
	Atazanavir (ATV)		

Montessori e colaboradores (2004) e dados do Ministério da Saúde (Brasil, Ministério da Saúde, 2004) apontam para outro problema inerente à terapia anti-retroviral: a toxicidade. Já foram reportados inúmeros casos de hipersensibilidade, neuropatias, hepatotoxicidade, pancreatite, cardiomiopatias, osteoporose, distúrbios neuropsiquiátricos (distúrbios do sono, depressão, dificuldade de concentração, amnésia, alucinações), entre outros efeitos adversos.

Em vista do número crescente de casos de linhagens de HIV resistentes aos anti-retrovirais e da toxicidade dos medicamentos, novos alvos têm sido considerados para o desenvolvimento de drogas.

Um passo do ciclo de vida do vírus que tem recebido um grande enfoque no desenvolvimento de novas drogas é a entrada do vírus na célula. A Enfuvirtidina (Roche/EUA), também conhecida como Fuzeon ou T-20, impede a interação de gp41 com a

membrana da célula hospedeira já existe comercialmente. Aprovada pelo *Food and Drug Administratio/EUA* (FDA) em 2003, a Enfuvirtidina é um peptídeo de 36 resíduos de aminoácidos que se liga a um intermediário conformacional da gp41 impedindo a formação do grampo de fusão (reviso por Jamjian & Mcnicholl, 2004). Como para todos os anti-retrovirais existentes, também já foram detectadas mutações que conferem resistência ao T-20 (Johnson *et al.*, 2005).

Devido ao número crescente de novos casos de infecção do HIV em todo o mundo, e ao custo elevado da terapia anti-retroviral, pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de vacinas tem ganhado mais espaço. Segundo dados de 2006 da *International AIDS Vaccine Initiative* (IAVI), em todo o mundo, entre estudos de fase I, II e III, estão em teste mais de 30 tipos diferentes de vacinas contra o HIV. Estas incluem vacinas de DNA, peptídeos sintéticos, vetores virais e proteínas recombinantes, principalmente as glicoproteínas do envelope.

Conforme revisto por Grundner e colaboradores (2005), há muito vem se tentando utilizar epítomos derivados de versões monoméricas da gp120 como agentes vacinais. Os resultados, entretanto, foram pouco animadores, uma vez que estes imunógenos apresentaram uma baixa capacidade de elicitar a produção de anticorpos neutralizantes contra isolados clínicos de HIV. Um clássico exemplo mal sucedido foi a vacina desenvolvida pela firma de biotecnologia VaxGen, chamada de AIDSVAX, consistindo de versões monoméricas e recombinantes da gp120 (Billch, 2004). Entretanto, os testes de fase III realizados em 2003 não apresentaram resultados muito significativos, uma vez que as respostas imunes celular e humoral induzidas apenas pela AIDSVAX não ofereceram nenhum efeito protetor contra o HIV (revisto por Mcneil *et al.*, 2004).

O insucesso em se usar somente a gp120 de HIV-1 como agente terapêutico é devido à alta variabilidade da estrutura de superfície desta proteína, resultado de seu alto teor de glicosilação, à presença de numerosas alças peptídicas flexíveis e não conservadas e à taxa de mutação do HIV-1 (revisto por Root & Hamer, 2003). Além disso, anticorpos contra versões monoméricas dessas glicoproteínas apresentam um potencial neutralizante limitado, pois no contexto nativo (trimérico) as glicoproteínas têm muitos de seus determinantes antigênicos camuflados (Check, 2003; Koch *et al.*, 2003 e Grundner *et al.*, 2004).

Por outro lado, segundo Burton e col. (2004), estudos empregando versões de gp120 e gp41 na sua forma trimérica nativa, ou versões recombinantes, vêm se tornando estratégias plausíveis para o desenvolvimento de antígenos para a seleção de anticorpos neutralizantes com ação de amplo espectro, uma vez que a seleção desses anticorpos estaria sendo dirigida contra os epítomos realmente relevantes. Alguns exemplos desse tipo de iniciativa são apresentados a seguir.

Srivastava e colaboradores (2002) expressaram, em células CHO *dhfr*⁻, uma versão oligomérica da gp140 (forma truncada da gp160 contando apenas com o ectodomínio da gp41) com o sítio de clivagem entre a gp120 e gp41 mutado. Anticorpos do soro de coelhos imunizados apresentaram capacidade de reconhecer a proteína purificada. No entanto, não foi testado o potencial neutralizante dos soros. Schülke e colaboradores (2002) também expressaram, em células CHO *dhfr*⁻, uma versão oligomérica da gp140, desta vez com o sítio de clivagem intacto, contando com pontes dissulfeto estabilizando a gp120 e o ectodomínio da gp41. Uma série de anticorpos neutralizantes clássicos como 2G12 (anti-gp120), 2F5 (anti-gp41) e 17B (anti-sítio de ligação a CD4 e CCR5), foram capazes de reconhecer a construção recombinante.

Lenz e colaboradores (2005) fizeram a expressão na linhagem BL21 de *E. coli*, de uma versão recombinante trimérica do ectodomínio da gp41. Apesar do baixo poder neutralizante do soro coletado de coelhos imunizados, foi observado um potencial inibitório de fusão similar ao T-20 (enfuvirtidina). Qiao e colaboradores (2005) expressaram, em células de inseto, construções triméricas contando com formas truncadas da gp120 (somente com os domínios C1 e C5) fusionadas ao ectodomínio da gp41, não sendo detectada a atividade neutralizante nos soros de coelhos imunizados. Jeffs e colaboradores (2004) expressaram em células CHO versões oligoméricas da gp140 de vários subtipos de HIV-1. Os soros de coelhos imunizados apresentaram capacidade de reconhecimento antigênico cruzado entre as construções de subtipos diferentes. Não foi testado o potencial neutralizante dos soros.

Como último exemplo, temos o trabalho de Grundner e colaboradores (2005), fazendo a expressão, em células HEK293, de versões triméricas da gp140, com o sítio de clivagem mutado, mas mantendo o domínio transmembrânico da gp41. O complexo purificado, assim como versões monoméricas, foram associados a preparações lipídicas e

inoculados em coelhos. Os soros dos coelhos imunizados com as versões oligoméricas apresentaram capacidade neutralizante sobre isolados clínicos de HIV-1.

No entanto, outra metodologia, que não o teste do soro de animais imunizados tem sido bastante empregada para a obtenção de anticorpos neutralizantes contra o HIV-1, tal metodologia é conhecida como *Phage Display*.

Conforme revisto por Brigido & Maranhão (2002) o *Phage Display* é uma técnica que se baseia na utilização de bacteriófagos para a produção de proteínas de interesse fusionadas a proteínas estruturais (normalmente p3 ou p8) de bacteriófagos da família Inoviridae (fagos filamentosos como M13, fd, fl, entre outros), de modo que, uma vez montada a partícula viral, o peptídeo exógeno é incorporado ao capsídeo. A expressão da proteína de fusão no capsídeo do fago dá-se de maneira que a mesma possa ser reconhecida por um determinado ligante.

Por manipulação genética, é feita a incorporação de uma biblioteca de DNA, que codifica milhões de variações da proteína de fusão, em vetores plasmidiais que codificam uma proteína do capsídeo viral, e a origem de replicação de fagos filamentosos. Esse conjunto de vetores contendo a biblioteca é então utilizado para a transformação de células bacterianas que são posteriormente infectadas com fagos auxiliares que contêm todos os genes do bacteriófago filamentoso e o gene de replicação viral defectivo. Deste modo ocorre o resgate dos vetores sob a forma de partículas virais, sendo gerada uma biblioteca de inúmeros variantes da proteína de interesse expressa na superfície dos fagos. A biblioteca pode ser utilizada para a seleção de determinados variantes da proteína de interesse com maior capacidade de ligação a um ligante específico.

As formas variantes da proteína selecionadas, podem ser, por exemplo, fragmentos de anticorpos e o ligante específico, um epítipo de interesse.

Por meios desta metodologia, têm sido descobertos vários anticorpos neutralizantes de amplo espectro, isto é com alta capacidade de neutralização cruzada entre isolados virais de diferentes subtipos. O primeiro anticorpo neutralizante descoberto foi o b12, anticorpo que reconhece o sítio de ligação da gp120 a CD4, selecionado de uma biblioteca de fragmentos de anticorpos (Fabs) apresentada na superfície de fagos, construída a partir do RNA extraído de células de medula óssea de um paciente soro-positivo assintomático (Barbas *et al.*, 1992). Zwick e colaboradores (2001) isolaram um fragmento de anticorpo

denominado Z13, que reconhece o ectodomínio da gp41, próximo à região transmembrana. O Z13 também foi selecionado por meio de uma biblioteca de Fabs apresentada na superfície de fagos, construída a partir do repertório imune de células da medula óssea de um paciente soro-positivo. Em 2004, Zhang e colaboradores, também isolaram - a partir de uma biblioteca de Fabs derivados de células de medula óssea de um paciente infectado, não-progressor - o anticorpo o m14, que reconhece a gp120 complexada com CD4.

Karle e colaboradores (2004) selecionaram um fragmento de anticorpo (JL413) capaz de se ligar a gp120. A biblioteca utilizada para a seleção do JL413 foi construída com base no repertório imune de linfócitos de sangue periférico de pacientes portadores de lupus eritematoso sistêmico, uma biblioteca em princípio não relacionada com o antígeno utilizado para a seleção. Isto, no entanto, já é esperado, uma vez que, se uma biblioteca é suficientemente ampla e diversa, ela pode muito bem ser utilizada para a seleção de anticorpos a partir de antígenos aparentemente não relacionados (Albuquerque, 2005).

Atualmente, é interessante considerar não apenas a utilização de um anticorpo específico que neutralize um certo número de isolados clínicos. Por maior que seja o espectro de neutralização cruzada para um mesmo anticorpo, este não será capaz de atuar de forma eficiente sobre todas as formas variantes de um vírus tão sujeito a mutações como o HIV. Desta forma, o uso combinado desses anticorpos, dirigidos contra epítomos variados da glicoproteínas do envelope viral pode se tornar uma alternativa viável no desenvolvimento de vacinas profiláticas, impedindo o estabelecimento da infecção. Exemplos bem sucedidos do uso desta estratégia já foram observados.

Xu e colaboradores (2001) foram capazes de neutralizar a infecção de linfócitos humanos por 20 isolados de HIV-1, subtipo C, utilizando uma combinação de quatro anticorpos classicamente reconhecidos como neutralizantes para isolados de subtipo B: o b12, o 2G2 (contra resíduos de manose na gp120), o 2F5 e o 4E10 (ambos contra epítomos no ectodomínio da gp41). Em um outro trabalho, o mesmo grupo foi capaz de neutralizar todos os isolados virais de subtipos A e D, em um total de 9 analisados, utilizando a mesma combinação de anticorpos (Kitabwalla *et al.*, 2003).

Em um modelo de estudo diferente (Hofmann-Lehmann *et al.*, 2001), neonatos de macacos *Rhesus* foram tratados com uma combinação dos anticorpos F105 (contra o sítio de ligação a CD4), 2G12 e 2F5 e posteriormente infectados com uma versão quimérica de

SIV expressando *env* de HIV-1 (SHIV). Oito dias após o desafio com SHIV, foi realizado novo tratamento com os anticorpos. Os macacos tratados foram protegidos da infecção, ao contrário do grupo controle.

Recentemente, o grupo de Imunologia Molecular do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília (UnB), construiu uma biblioteca de fragmentos de anticorpos humanos (forma Fab) apresentados na superfície de fagos filamentosos a partir do repertório imune de 11 pacientes com osteosarcoma. A biblioteca apresenta $1,45 \times 10^8$ formas funcionais diferentes de Fab e foi utilizada para selecionar Fabs com capacidade de reconhecimento de células derivadas de tumores ósseos em cultura (Dantas-Barbosa, 2005). Ainda em 2005, no trabalho desenvolvido por Albuquerque, esta mesma biblioteca foi utilizada para a seleção de fragmentos de anticorpos humanos ligantes a um peptídeo sintético de 23 resíduos de aminoácidos, correspondente à porção HR1 do ectodomínio da gp41 de HIV-1. Os Fabs selecionados encontram-se em fase de expressão e purificação.

Tendo em vista este cenário, é interessante a amplificação e clonagem de formas recombinantes de *env* para expressão de proteínas recombinantes de HIV-1 em células de mamíferos. Tais proteínas podem ser utilizadas para o teste da capacidade de ligação dos Fabs selecionados por Albuquerque (2005), assim como testes preliminares dos mesmos Fabs quanto à capacidade de neutralizar o processo de fusão das membranas de células que expressam o complexo glicoprotéico recombinante e aquelas expressando CD4 e os co-receptores. Células expressando o complexo glicoprotéico recombinante também podem ser utilizadas para a seleção de outros anticorpos da biblioteca construída por Dantas-Barbosa e colaboradores(2005) tendo como alvo não apenas um epítipo específico, mas sim o complexo glicoprotéico como um todo.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Tendo em vista o interesse do grupo na produção de proteínas com potencial terapêutico, este trabalho tem por objetivos a avaliação preliminar das células HSG como sistemas alternativos para a expressão heteróloga, assim como a produção de versões recombinantes dos antígenos de superfície do envelope viral de HIV-1.

Objetivos específicos:

- Avaliar, comparativamente, a eficiência de transfecção entre as células CHO-K1 e HSG pelas metodologias de co-precipitação com fosfato de cálcio e transfecção mediada por lipídeos catiônicos;
- Testar o efeito dos choques osmóticos com glicerol e DMSO como potencializadores da eficiência de transfecção nas células HSG;
- Avaliar, comparativamente, a eficiência de expressão transiente de uma proteína recombinante secretada pelas células CHO-K1 e HSG. No caso, o anticorpo quimérico anti-Z-DNA Z22, na forma recombinante de fragmento FvFc;
- Amplificação, clonagem e expressão de versões recombinantes das glicoproteínas do envelope viral de HIV-1, subtipo C, em vetores de expressão para células de mamíferos.

MATERIAL

MATERIAL

1. - LINHAGENS BACTERIANAS

A seguir são listadas as linhagens de *Escherichia coli* utilizadas para amplificação de plasmídeos durante a realização desse trabalho, com seus respectivos genótipos. As linhagens bacterianas foram estocadas a – 80° C em meio LB contendo 35% de glicerol.

- **XL1-Blue** – *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA lac* [F' *proAB lacI^qZΔM15 Tn10* (Tet^r)] (Stratagene, 2004);

- **SURE** – *e14⁻ (McrA⁻) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan^r) uvrC* [F' *proAB lacI^qZΔM15 Tn10* (Tet^r)] (Stratagene, 2004);

- **TOP10** – F⁻ *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG* (Invitrogen, 2004).

2. - LINHAGENS DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS

- **CHO-K1** – (ATCC[®] número: CCL-61), linhagem celular aderente de morfologia epitelial, estabelecida inicialmente como um subclone da linhagem parental CHO (*Chinese Ovary Hamster*), iniciada a partir da biopsia de um ovário de uma fêmea adulta de Hamster Chinês (*Cricetulus griseus*), (Puck *et al.*, 1958). Linhagem adquirida pelo Banco de Células do Rio de Janeiro;

- **HSG** – linhagem celular aderente de morfologia epitelial, derivada de células tumorais do ducto de glândula submandibular humana. A linhagem foi estabelecida em cultura a partir de uma glândula salivar humana irradiada (Shirasuna *et al.*, 1981). A linhagem celular HSG nos foi cedida pelo Prof. B. J. Baum (*National Institute of Health*, Bethesda, Maryland);

3. - PLASMÍDEOS

Os vetores utilizados para transfecção de células de mamíferos, para clonagem dos produtos de PCR e o vetor de expressão utilizados neste trabalho estão descritos abaixo.

- **pCMV β -Gal (Clontech)**: O vetor de 7200 pb possui o promotor precoce de citomegalovírus (pCMV IE), íntron SV40 SD/SA, gene de β -galactosidase de *E. coli* (*lacZ*), sinal de poliadenilação do SV40 (SV40pA); origem de replicação plasmidial (*ori*) e gene de resistência a ampicilina (*amp*) bacterianos (Figura 8). O vetor foi utilizado para estimativa de eficiência de transfecção.

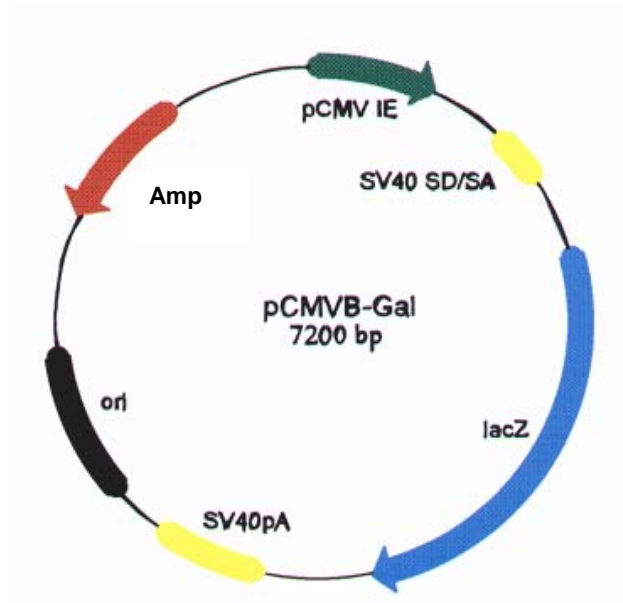


Figura 8. Representação esquemática do mapa físico do vetor pCMV β -Gal (Clontech). Adaptado de Ruggiero (2002).

- **pMAC/PS**: O vetor de 4393 pb possui promotor de citomegalovírus (pCMV), origem de replicação plasmidial (*ori*), gene de resistência a ampicilina (*amp*), sinal de poliadenilação do SV40 (SV40pA), sítio múltiplo de clonagem (MSC), promotores do fago T7 e do SP6. O vetor conta ainda com a região codificadora do peptídeo sinal do domínio pesado de imunoglobulina murina IgG1 Z22, da família gênica VH10 (Figura 9). O vetor foi utilizado como controle negativo nos experimentos de transfecção (vetor vazio).

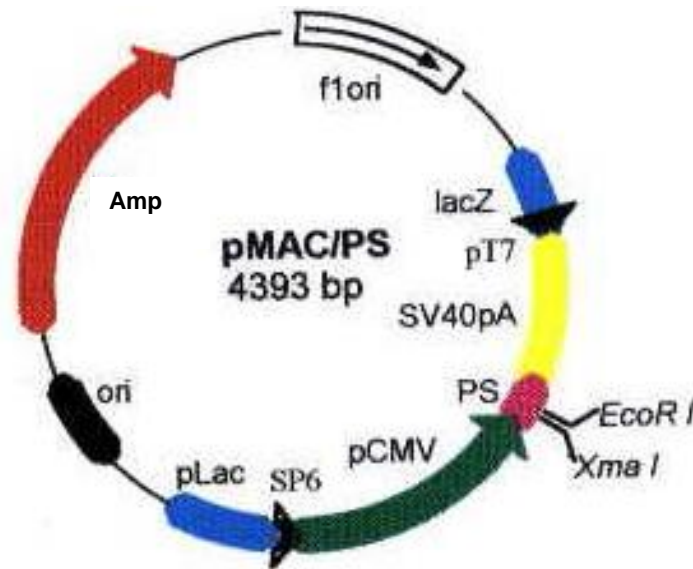


Figura 9. Representação esquemática do mapa físico do vetor pMAC/PS. Adaptado de Ruggiero (2002).

-pMAC/PS/Z22: Vetor de 5839 pb que conta com as mesma características do vetor pMAC/PS, mas que possui entre o pCMV e o SV40pA o gene que codifica o anticorpo quimérico anti-Z-DNA Z22, em forma de Fv de cadeia única, fusionada ao fragmento Fc humano (Figura 10)

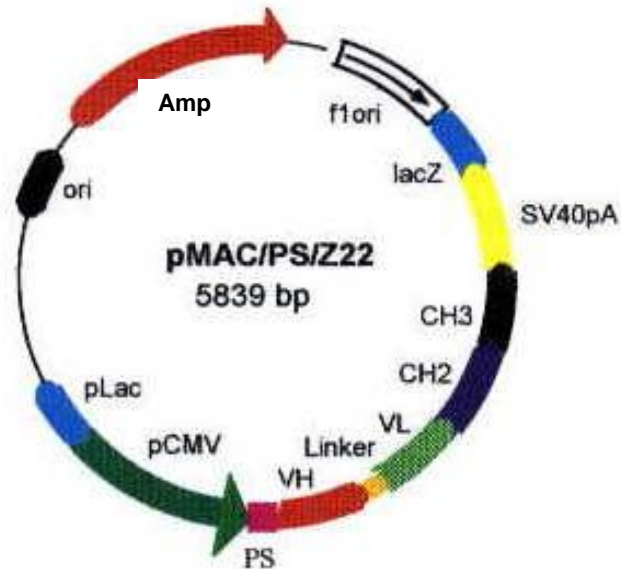


Figura 10. Representação esquemática do mapa físico do vetor pMAC/PS/Z22. Adaptado de Ruggiero (2002).

- **pGEM[®]-T Easy** (Promega) - O vetor de 3015 pb possui o gene de resistência a ampicilina (*amp*) como marca de seleção, a origem de replicação bacteriana (*ori*), parte do gene *lacZ* que codifica o fragmento amino-terminal da enzima β -galactosidase, sítio múltiplo de clonagem (MCS) na região codificadora do gene *lacZ* e os promotores T7 e SP6 flanqueando a região de clonagem (Figura 11).

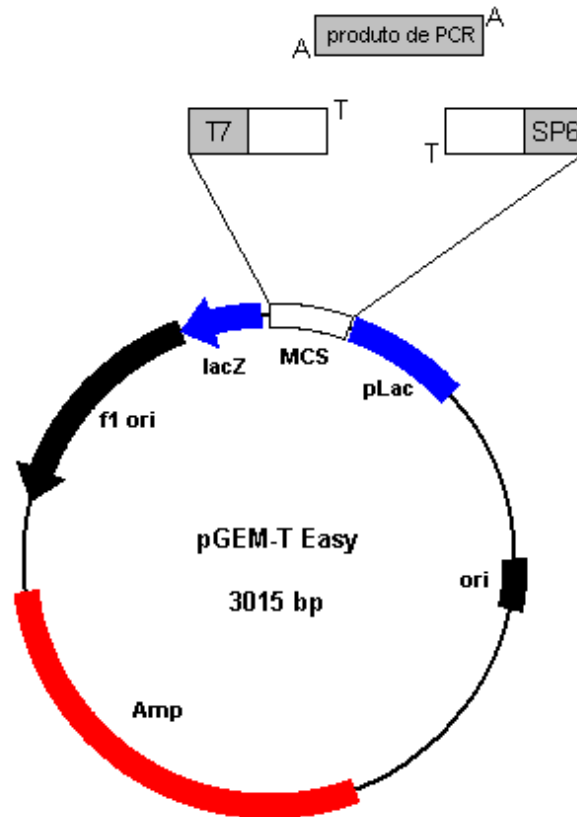


Figura 11. Representação esquemática do mapa físico do vetor para clonagem de produtos de PCR pGEM[®]-T Easy (Promega).

- **pcDNA3.1/V5-His-TOPO** (Invitrogen) - O vetor de 5523 pb possui o gene de resistência a ampicilina, como marca de seleção em *E. coli*, e o gene de resistência a geneticina (G418), marca de seleção para transfectomas estáveis em células de mamíferos. O inserto fica sob o controle da seqüência promotora de citomegalovírus (CMV), com sinal de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (BGH). O vetor conta ainda com sítio múltiplo de clonagem e seqüências codificadoras para o epítipoV5, derivado do epítipo PK presente nas proteínas V e P de paramixovirus SV5, e para uma cauda de histidina (His₆) C-terminais, possibilitando a identificação da proteína recombinante por anticorpos anti-V5 e anti-His-tag, além de permitir a purificação do produto protéico por cromatografia em coluna de níquel (Figura 12).

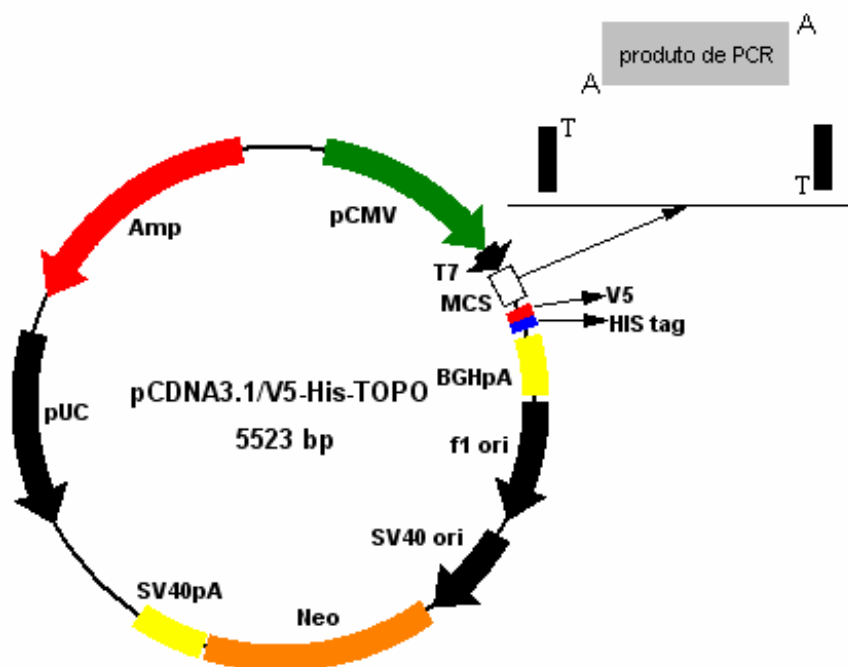


Figura 12. Representação esquemática do mapa físico do vetor de expressão pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen).

- **pcDNA3.1/V5-His-TOPO/lacZ** (Invitrogen) - O vetor de 8592 pb possui as mesmas características do pcDNA3.1/V5-His-TOPO, apresentando ainda região codificadora do gene *lacZ*. Esse vetor foi empregado como controle positivo de expressão nos experimentos de transfecção (Figura 13).

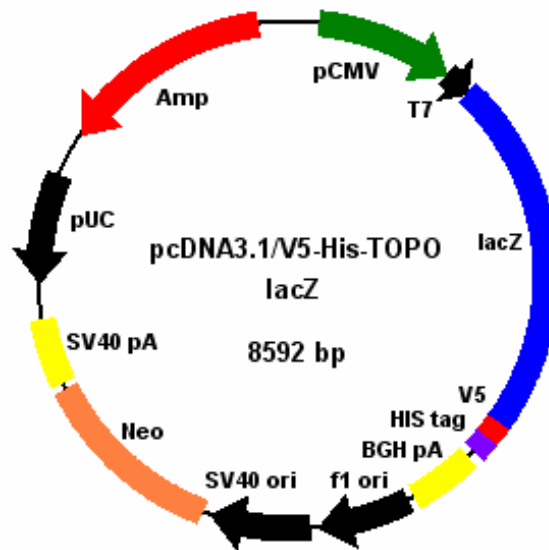


Figura 13. Representação esquemática do mapa físico do vetor controle de expressão pcDNA3.1/V5-His-TOPO/lacZ (Invitrogen).

4. - AMOSTRA DE cDNA VIRAL

Os fragmentos gênicos correspondentes às proteínas do envelope viral de HIV-1 foram amplificados a partir de uma amostra de cDNA viral retro-transcrito a partir de RNA extraído de plasma sanguíneo de uma paciente infectada, de 23 anos, não submetida ao tratamento anti-retroviral. A amostra de cDNA, identificada como 116/00, subtipo C, foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Retrovírus – Genotipagem do HIV do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo.

5. - OLIGONUCLEOTÍDEOS SINTÉTICOS

Os oligonucleotídeos utilizados como iniciadores para as reações de polimerização em cadeia deste trabalho foram desenhados tomando-se como base as seqüências de DNA da linhagem viral de referência HXB2 (GenBank K03455, subtipo B), assim como a linhagem 92BR025 (GenBank UR52953, subtipo C), empregando-se o programa Oligo 4.0 (National BioSciences) ou seqüências de iniciadores já descritas na literatura. Os oligonucleotídeos sintéticos estão representados na Tabela 4.

Tabela 4. Oligonucleotídeos sintéticos utilizados para amplificação de seqüências de *env*, correspondentes às glicoproteínas de HIV-1.

Oligonucleotídeo	Seqüência	Aplicação
BGHR	5' TAGAAGGCACAGTCGAGG 3'	Seqüenciamento de fragmentos de DNA clonados no vetor pcDNA3.1/V5-His
E70	5' GGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTGTAA 3'	Seqüenciamento
E120	5' GTAGAAATTAATTGTACAAGACCC 3'	Seqüenciamento
E130	5' ACAAATTATAAACATGTGGCAGG 3'	Amplificação da gp41, a partir da extremidade 3', seqüenciamento
E180	5' GTCTGGTATAGTG CAACAGCA 3'	Seqüenciamento
E230	5' AATATTCATAATGATAGTAGAG 3'	Seqüenciamento
ED3	5' TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGG 3'	Amplificação da gp120 a partir da extremidade 5'
ED14	5' TCTTGCCTGGAGCTGTTTGATGCCCCAGAC 3'	Amplificação da gp120 a partir da extremidade 3'
envM	5' TAGCCCTTCCAGTCCCCCTTTTCTTTTA 3'	Amplificação da gp41 a partir da extremidade 3'
LGP41	5'CATTTGTTCCCATTTTCTTGCAAAGCTGCTTCAAAGCCCTGTC 3'	Amplificação da gp41 para recebimento do peptídeo sinal
LGP120	5' TCCCTTTTCCCTTAGTGG 3'	Amplificação da gp120 a partir da extremidade 3', seqüenciamento
LGP140	5' CTGA AACGACAAGGGTGAGT 3'	Amplificação da gp140 a partir da extremidade 3', seqüenciamento
LGP160	5' GGAAAGAGCAGAAGACAGTG 3'	Amplificação da gp160 e da gp41 a partir da extremidade 3', seqüenciamento
M13 Universal	5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'	Seqüenciamento de fragmentos de DNA clonados no vetor pGEM-T-easy
M13 Reverso	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'	Seqüenciamento de fragmentos de DNA clonados no vetor pGEM-T-easy
PSLOWER	5' ATTACAAATCATTAACATCCA 3'	Amplificação do peptídeo sinal do HIV a partir da extremidade 3'
T7	5' TAATACGACTCACTATAGGGG 3'	Seqüenciamento de fragmentos de DNA clonados no vetor pcDNA3.1/V5-His
UGP41	5'TGGATGTTAATGATTTGTAATGCAGTGGAATAGGAGCTGTGTT 3'	Amplificação da gp41 a partir da extremidade 5' para recebimento do peptídeo sinal
UGP120	5'GCAGAAG ACAGTGGCAATGA 3'	Amplificação da gp120 a partir da extremidade 5', seqüenciamento
UGP160	5' CATTITTTCCCATTTTCTTG 3'	Amplificação da gp160 a partir da extremidade 5'

6. - MEIOS DE CULTURA PARA O CULTIVO DE *E. coli***- Meio Luria-Bertani (LB) pH 7,0**

Extrato de levedura (p/v)	0,5%
Peptona de caseína (p/v)	1,0%
NaCl (p/v)	1,0%

- Meio LB-Ágar pH 7,0

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico a 1,4% (p/v).

- Meio SB pH 7,0

Extrato de levedura (p/v)	0,5%
Peptona de caseína (p/v)	1,0%
MOPS (p/v)	1,0%

- Meio SOB pH 7,0

Triptona (p/v)	2,0 %
Extrato de levedura (p/v)	0,5 %
NaCl	10,0 mM
KCl	2,5 mM

- Meio SOC

Meio SOB suplementado com:

MgCl ₂	10,0 mM
MgSO ₄	10,0 mM
Glicose	20,0 mM

Após confecção, os meios foram autoclavados a 120° C por 20 minutos.

7. - ANTIBIÓTICOS

Os estoques das soluções de ampicilina e kanamicina foram preparados em água milliQ, nas concentrações de 100 e 50 mg/mL, respectivamente. O estoque de tetraciclina foi preparado a 20 mg/mL em etanol. Todas as soluções foram esterilizadas por filtração em membranas de éster de celulose com poros de 0,22 µm (Millipore), e estocadas a -20° C, abrigadas da luz, em alíquotas de 1,5 mL.

8. - MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES PARA O CULTIVO DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS

- Ham's/F12 *Nutrient Mixture* (HyClone) pH 7,2

Meio base	10,600g
NaHCO ₃	1,176g
dH ₂ O q.s.p	1,000L

- DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Hyclone) pH 7,2

Meio base	13,4g
NaHCO ₃	3,7g
dH ₂ O q.s.p	1,0L

- Meio de congelamento

DMEM adicionado de soro fetal bovino a 20% e de dimetilsulfóxido a 5%.

- BSS - *Hank's Balanced Salt Saline* (HyClone) pH 7,2

Meio base	9,80g
NaHCO ₃	0,35g
dH ₂ O q.s.p	1,00L

- BSS/CMF - *Hank's Balanced Salt Saline – modified: calcium and magnesium free* (HyClone) pH 7,2

Meio base	9,50g
NaHCO ₃	0,35g

dH₂O q.s.p 1,00L

- Tripsina-EDTA pH 7,6

Tripsina (1:250) (Gibco) 0,25%
(p/v)

EDTA•4NA⁺ 1,00mM

Solução preparada em BSS/CMF.

- Azul de Tripano

Azul de tripano (p/v) 0,4%

Solução preparada em PBS.

- Antibiótico-Antimicótico - 100X (Gibco)

Penicilina G 10000u/mL

Estreptomicina 10000u/mL

Anfotericina B 25µg/mL

A solução antibiótico-antimicótico foi adicionada aos meios de cultivo e às soluções BSS e CMF para a concentração de 1X

- Soro fetal bovino (Gibco)

O soro fetal bovino foi adicionado ao meio Ham's/F12, quando necessário, a uma concentração final de 10%.

Os meios de cultivo e demais soluções foram esterilizados por filtração em membranas de éster de celulose com poros de 0,22µm (Millipore).

9. - SOLUÇÕES-TAMPÃO

- Tampão de amostra para eletroforese em gel de agarose 5X

TEB	2,5 X
Glicerol (v/v)	50,0 %
Azul de bromofenol (p/v)	0,2 %

- Tampão de amostra SDS-PAGE 5X

Tris-HCl (pH 6,8)	60,0 mM
Glicerol (p/v)	25,0 %
SDS (p/v)	2,0 %
β -mercaptoetanol	14,4 mM
Azul de bromofenol (p/v)	0,1 %

- Tampão de corrida para eletroforese em gel de agarose - TEB 10X pH 8,2

Trizma Base	108,0 g
Ácido Bórico	55,0 g
EDTA	30,0 g
H ₂ O q.s.p.	1,0L

- Tampão de corrida para SDS-PAGE -Tris-Glicina 5X pH 8,3

Trizma-base	125,0 mM
Glicina	960,0 mM
SDS (p/v)	0,5 %

- Tampão de Lise pH 8,0

NaH ₂ PO ₄	50,00 mM
NaCl	300,00 mM
Imidazol	10,00 mM
Tween 20(v/v)	0,05 %
Triton X-100(v/v)	1,00 %

EDTA (pH 8,0)	1,00 mM
EGTA (pH8,0)	1,00 mM
PMSF	1,00 mM

O PMSF foi adicionado ao tampão imediatamente na hora do uso, a partir de um estoque a 100 mM, em isopropanol.

- Tampão TE

Tris-HCl (pH 8,0)	25,0 mM
EDTA (pH 8,0)	10,0 mM
Glicose	50,0 mM

- Tampão PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) 10X, pH 7,4

NaCl	1,37 M
NaH ₂ PO ₄	1,20 M
KCl	2,70 M
Na ₂ HPO ₄	1,20 M
NaN ₃ (p/v)	0,02%

- Tampão PBST

PBS 1X adicionado de Tween 20 a 0,05%.

-Tampão da Fosfatase Alcalina (APB)

Tris-HCl (pH 9,5)	100,0 mM
NaCl	100,0 mM
MgCl ₂	5,0 mM

10. - ENZIMAS E RESPECTIVOS TAMPÕES

- *Taq DNA Polimerase (5u/μL)* (CENBIOT)

- **Tampão da *Taq DNA Polimerase 10X*** (CENBIOT)

Tris-HCl (pH 8,3)	100,0 mM
KCl	500,0 mM
BSA (p/v)	0,1 %
MgCl ₂	15,0 ou 20,0 mM

- *Platinum[®] Taq DNA Polimerase (5u/μL)* (Invitrogen)

- **Tampão da *Platinum[®] Taq DNA Polimerase 10X*** (Invitrogen)

Tris-HCl (pH 8,4)	200,0 mM
KCl	500,0 mM
MgCl ₂	15,0 ou 20,0 mM

- *Platinum[®] Taq DNA Polimerase High Fidelity (5u/μL)* (Invitrogen)

- **Tampão da *Platinum[®] Taq DNA Polimerase High Fidelity 10X*** (Invitrogen)

Tris-SO ₄ (pH 8,9)	600,0 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	180,0 mM
MgSO ₄	20,0 mM

- *Elongase[®] Enzyme Mix* (Invitrogen)

- **Tampão A - *Elongase[®] Enzyme Mix 5X*** (Invitrogen)

Tris-SO ₄ (pH 9,1)	300,0 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	90,0 mM
MgSO ₄	10,0 mM

- Tampão B - *Elongase*[®] Enzyme Mix 5X (Invitrogen)

Tris-SO ₄ (pH 9,1)	300,0 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	90,0 mM
MgSO ₄	5,0 mM

- *EcoR* I (12u/μL) (Promega)

Utilizada 1 unidade para cada 100 ng de DNA, juntamente com o tampão H.

- Tampão H 10X (Promega)

Tris-HCl (pH 7,5)	90,0 mM
MgCl ₂	10,0 mM
NaCl	50,0 mM

- *Bgl* II (10u/μL) (Promega)

Utilizada 1 unidade para cada 100 ng de DNA, juntamente com o tampão D.

- Tampão D 10X (Promega)

Tris-HCl (pH 7,9)	6,0 mM
MgCl ₂	6,0 mM
NaCl	150,0 mM

- *Nde* I (20u/μL) (New England Biolabs)

Utilizada 1 unidade para cada 100 ng de DNA, juntamente com o tampão NEB 4.

- Tampão NEB 4 10X (New England Biolabs)

Tris-acetato (pH 7,9)	200,0 mM
Acetato de magnésio	100,0 mM
Acetato de potássio	50,0 mM
DTT	10,0 mM

11. - SOLUÇÕES

- Brometo de etídeo

EtBr 10,0 mg/mL

Abrigado da luz.

- DMSO (dimetilsulfóxido) 10%

DMSO (v/v) 10%

Esterilizada por filtração em membrana de éster de celulose com poro de 0,22 μ m (Millipore). Preparado em PBS.

- Gel concentrador 5 % para SDS-PAGE

Acrilamida/bis-acrilamida (v/v) 5,00 %

Tris-HCl (pH 6,8) 125,00 mM

SDS (p/v) 0,10 %

Persulfato de amônia (p/v) 0,05 %

TEMED (p/v) 0,10 %

- Gel separador 10 % para SDS-PAGE

Acrilamida/bis-acrilamida (v/v) 10,00 %

Tris-HCl (pH 8,8) 375,0 mM

SDS (p/v) 0,10 %

Persulfato de amônio (p/v) 0,05 %

TEMED (v/v) 0,05 %

- Glicerol 10%

Glicerol (v/v) 10%

Autoclavado a 120° C por 20 minutos.

- Glicerol 15%

Glicerol (v/v) 15%

Autoclavado a 120° C por 20 minutos. Preparado em PBS.

- Glicose 2M

Glicose anidra 2 M

Esterilizada por filtração em membrana de éster de celulose com poro de 0,22µm (Millipore).

- Solução II

NaOH 0,2 M

SDS (p/v) 1,0 %

- Solução III pH 4,8 - 5,0

Acetato de sódio 3,0 M

Ácido acético 2,0 M

- Solução acrilamida/bis-acrilamida 30%

Acrilamida (p/v) 30,0 %

Bis-acrilamida (p/v) 0,8 %

- Solução de bloqueio para ELISA e *Western Blot*

Leite em pó desnatado (p/v) 5,0 %

Solução preparada em PBST.

- Solução corante para SDS-PAGE

Metanol (v/v) 40,00 %

Ácido acético (v/v) 10,00 %

Azul brilhante de Coomassie R-250
(p/v) 0,25 %

- Solução descorante para SDS-PAGE

Metanol (v/v) 40 %

Ácido acético (v/v) 10 %

- Solução corante para Ensaio de β -Galactosidase em cultura de células

$K_4Fe(CN)_6$ 5,0 mM

$K_3Fe(CN)_6$ 5,0 mM

$MgCl_2$ 2,0 mM

X-Gal (em N, N-dimetilformamida) 1,0 mg/mL

Solução preparada em PBS.

- Solução de IPTG

IPTG 1,0 M

Esterilizada por filtração em membrana de éster de celulose com poros de 0,22 μ m (Millipore).

- Solução de $MgCl_2$

$MgCl_2$ 2,0 M

Esterilizada por filtração em membrana de éster de celulose com poros de 0,22 μ m (Millipore).

- Solução de RNase A

RNase A 10 mg/mL

Acetato de sódio pH 4,8 50 mM

Fervida em banho-maria por 10 minutos.

- Solução reveladora para *Western Blot*

O NBT (*Nitro Blue Tetrazole*) e o BCIP (5-bromo-4-cloro-indolil fosfato) foram preparados em soluções estoque a 50 mg/mL (Pierce), sendo o NBT dissolvido em N,N-dimetil formamida a 70%, enquanto o BCIP em N,N-dimetil formamida a 100%. Para o preparo de 10 mL da solução reveladora foram adicionados, respectivamente, 66 μ L e 33 μ L dos estoques de NBC e BCIP em 10 mL de APB.

- Solução de X-gal

X-gal 20,0 mg

N, N - dimetilformamida 1,0 mL

Esterilizada por filtração em membrana de éster de celulose com poros de 0,22 μ m (Millipore).

12. - ANTICORPOS**- Anti-Human IgG γ -Chain Specific (Sigma, I- 3382)**

Anticorpo IgG produzido em cabra, anti- cadeia pesada constante (γ) humana.

- Anti-Human IgG Caprine - Alkaline Phophatase Conjugated (Meridian Diagnostics, TCE 100)

Anticorpo IgG produzido em cabra, anti-IgG humana, conjugado a fosfatase alcalina.

- HIS Probe (Santa Cruz Biotechnology, SC 804)

Anticorpo IgG anti-His tag, produzido em coelho.

- Anti-Rabbit-IgG(FC)-Alkaline Phophatase Conjugated (Pierce, cat. no. 31341)

Anticorpo IgG anti-IgG de coelho, produzido em cabra, conjugado a fosfatase alcalina.

- Anti-gp120 (Affinity Bioreagents, cat. no. PA1-7218)

Anticorpo IgG policlonal anti-gp120 produzido em cabra.

- Anti-Goat-IgG(FC)-Alkaline Phophatase Conjugated (Pierce, cat. no. 31341)

Anticorpo IgG produzido em coelho, anti-IgG de cabra, conjugado a fosfatase alcalina.

13. - DEMAIS REAGENTES E KITS UTILIZADOS

- *Calcium Phosphate Transfection Kit*[®] (Invitrogen). Utilizado para transfecção em células de mamíferos.
- *Concert*[™] *Rapid PCR Purification System* (Gibco). Usado para purificação de produtos de PCR para o seqüenciamento automático.
- **Cubetas de 0,2 cm** (Bio-Rad). Utilizadas para eletroporação no equipamento Gene Pulser com Pulser Controller da Bio-Rad.
- **Marcador de massa molecular - 1 kb DNA Ladder (1,0µg/µL)** (Invitrogen).
- **Marcador de massa molecular - 1 kb DNA Ladder (1,0µg/µL)** (Sigma).
- **Marcador de massa molecular - 100 bp DNA Ladder (1,0µg/µL)** (Invitrogen).
- **Marcador de massa molecular - BenchMark**[™] *Protein Ladder* (Invitrogen).
- *Lipofectamine*[™] **2000** (Invitrogen). Usado para transfecção em células de mamíferos.
- *pcDNA3.1/V5-His*[®] *TOPO*[®] *TA Expression Kit* (Invitrogen). Vetor de expressão em células de mamíferos.
- *pGEM*[®] *-T Easy Vector System I* (Promega). Vetor para clonagem de produtos de PCR.
- *Qiagen Plasmid Maxi Kit* (Qiagen). Usado para preparação de plasmídeos para a transfecção em células de mamíferos.
- *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). Usado para eluição de bandas de DNA em gel de agarose.
- *Wizard*[®] *Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). Usado para purificação de plasmídeos para o seqüenciamento automático.

MÉTODOS

MÉTODOS

1. - CULTURA DE CÉLULAS

1.2 - MANUTENÇÃO E PROPAGAÇÃO DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS

As células CHO-K1 foram mantidas em meio Ham's/F12 (Hyclone), enquanto as células HSG foram mantidas em DMEM (Hyclone). Ambos os meios de cultivo foram suplementados com 10 % (v/v) de soro fetal bovino e tamponados com bicarbonato de sódio, com pH ajustado para 7,2 pela adição de NaOH ou HCl. As culturas foram estabelecidas a partir de inóculo inicial de 3×10^5 a 5×10^5 células, em frascos de cultura de poliestireno estéreis e mantidas a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO₂ e 70 % de umidade. Uma vez atingida a confluência, a monocamada de células foi lavada com solução BSS/CMF (Hyclone) e destacada do fundo do frasco de cultura por tratamento com solução de Tripsina 0,25 %/EDTA 1mM. As células foram então contadas e transfereidas para novo frasco de cultura.

1.3 - CONTAGEM DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS EM CÂMERA DE NEUBAUER

Após tratamento com tripsina e coleta por centrifugação a 1500 x g por 10 min, o precipitado de células foi ressuspenso em meio fresco e diluído no corante vital azul de tripano a 0,4 % (v/v), em uma proporção que variou de acordo com o tamanho do sedimento de células, normalmente de 1:2 (células:corante), em um volume final de 150 µL. As células mortas apresentaram coloração azul, em função do comprometimento da membrana citoplasmática e influxo do corante, enquanto as células viáveis mantiveram um aspecto translúcido. As células viáveis foram observadas em microscópio óptico, contadas nos quadrantes da Câmara de Neubauer e estimadas pela fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de células totais contadas} \div \text{quantidade de quadrantes contados} \\ \times \text{fator de diluição} \times 10^4 = \text{N}^\circ \text{ de células/mL.}$$

1.4 - TRANSFECCÕES

1.4.1 - TRANSFECCÃO TRANSIENTE COM FOSFATO DE CÁLCIO

A transfecção com fosfato de cálcio foi realizada com o kit *Calcium Phosphate Transfection Kit*[®] (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Utilizaram-se placas de cultura de 6 poços. Para cada poço foram inoculadas $2,5 \times 10^5$ células, de modo a que se atingisse cerca de 50 a 70 % de confluência no momento da transfecção. O meio de cultura utilizado foi o Ham's/F12 (Hyclone) para as células CHO, utilizadas como controle, e DMEM (Hyclone) para as células HSG, ambos suplementados com 10 % (v/v) de soro fetal bovino. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa com 70 % de umidade e 5 % de CO₂ durante aproximadamente 24 h. Cerca de 3 a 4 h antes da transfecção, o meio de cultura foi substituído por meio fresco.

Em tubos de 1,5 mL foram preparadas as soluções A e B de transfecção para cada poço. A solução A continha 75 µL de água estéril, 9 µL de solução de CaCl₂ 2M e 5µg de DNA. A solução B era constituída por 75 µL de tampão HBS 2X. Utilizando-se uma pipeta Pasteur, a solução A foi lentamente gotejada sobre a solução B enquanto se formavam bolhas de ar na solução B, empregando-se outra pipeta. Formou-se um fino precipitado a partir dessa mistura de A e B, esse foi incubado à temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse tempo, o precipitado foi gotejado em cada poço, contendo 2 mL de meio de cultura, e a placa foi agitada em movimento de cruz. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa com 70 % de umidade e 5 % de CO₂ durante aproximadamente 24 h. Em seguida, os poços foram lavados com a solução BSS (Hyclone) e o meio de cultura foi trocado. Após nova incubação em estufa durante 24 h, os sobrenadantes de cultura foram coletados e armazenados a -20 °C para posterior realização do ELISA.

Visando à otimização da eficiência de transfecção das células HSG, choques osmóticos com glicerol e dimetilsulfóxido (DMSO) foram realizados. Passadas 24 h da transfecção com fosfato de cálcio as células foram incubadas à temperatura ambiente com 2 mL de uma solução de glicerol a 15 % por 2 min ou com uma solução de DMSO a 10% por 2 min e meio, sendo o meio trocado em seguida.

1.4.2 - TRANSFEÇÃO TRANSIENTE POR MEIO DE LIPOSSOMOS

A transfecção por lipossomos foi realizada com o kit *Lipofectamine™ 2000* (Invitrogen) de acordo com instruções do fabricante. Utilizaram-se placas de cultura de 6 poços. Em cada poço foram inoculadas $6,0 \times 10^5$ células de modo a que se atingisse cerca de 90 % de confluência no momento da transfecção. O meio de cultura utilizado foi Ham's/F12 (Hyclone) para as células CHO, utilizadas como controle, e DMEM (Hyclone) para as células HSG, ambos suplementados com 10 % (v/v) de soro fetal bovino. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa com 70 % de umidade e 5 % de CO₂ durante aproximadamente 24 h.

Em tubos de 1,5 mL, foram preparadas as soluções A e B de transfecção para cada poço. A solução A continha 4 µg de DNA diluído em 250 µL de meio DMEM sem soro fetal bovino e sem antibiótico. A solução B era constituída por 10 µL de *Lipofectamine™ 2000*, diluída em 240 µL de meio de cultura sem soro fetal bovino e sem antibiótico. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, a solução A foi adicionada à solução B, em um volume final de 500 µL. A solução final foi incubada durante 20 minutos à temperatura ambiente, permitindo a formação dos complexos DNA-lipossomo. Decorrido esse tempo, a solução final foi adicionada a cada poço e a placa foi agitada em movimento de cruz. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa com 70 % de umidade e 5 % de CO₂ durante aproximadamente 48 h. Após esse período, os sobrenadantes de cultura foram coletados e armazenados a -20 °C, para posterior realização do ELISA.

1.5 - ENSAIO DA β-GALACTOSIDASE EM CULTURA DE CÉLULAS (HISTOQUÍMICA ENZIMÁTICA)

Para detectar a atividade da enzima β-galactosidase, codificada pelo gene *lacZ*, evidenciando a incorporação dos plasmídeos nas células, poços das culturas transfectadas foram lavados 1 vez com solução BSS (Hyclone) e depois com PBS 1X e fixadas com etanol a 80 % por 10 min. Em seguida, as células foram lavadas 1 vez com PBS, recobertas com 2 mL de solução corante contendo X-gal. As placas foram embrulhadas em papel alumínio e incubadas por 24 h a 37 °C. Decorridas 24 h, a solução corante foi trocada por

PBS e as células observadas em microscópio óptico. As células azuis indicaram a atividade da β -galactosidase.

1.6 - PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS PROTÉICOS CELULARES [adaptado do manual do kit *The QIAexpressionist* (Qiagen, 2001)]

A monocamada de células foi lavada com solução BSS/CMF (Hyclone) e destacada do fundo do poço da placa de cultura por tratamento com 500 μ L solução de Tripsina 0,25%/EDTA 1mM. A tripsina foi inativada com 500 μ L de meio DMEM, sem soro, contendo PMSF a 1 mM. As células foram então coletadas por centrifugação a 1500 x g por 5 min, a 4°C. O sedimento foi ressuspensionado em 500 μ L de tampão de lise (pH 8,0) gelado e a suspensão mantida no gelo por 30 min, sendo agitada vigorosamente em intervalos de 5 em 5 min. A suspensão foi então centrifugada a 10000 x g por 10 min, a 4 °C e o sobrenadante constituído do extrato protéico celular foi aliquoteado e armazenado a -20 °C.

1.7 - ENSAIO DE ELISA DE CAPTURA

O ELISA de captura foi utilizado para detecção do anticorpo anti-Z-DNA Z22, pela sua porção Fc, expresso de forma transiente nas células CHO-K1 e HSG em cultura.

Para o ensaio de detecção do anticorpo recombinante, foi realizado o protocolo descrito por Ruggiero (2002). Uma placa de microtitulação de poliestireno rígida e de fundo chato (Immulon, DYNATECH), foi sensibilizada com 100 μ L/poço de anticorpo anti-IgG humano, produzido em cabra, diluído em PBST em concentração final de 2 μ g/mL durante 1 hora à temperatura ambiente ou durante a noite a 4 °C. Após a sensibilização, a solução foi removida da placa e foram adicionados 100 μ L/poço de solução de bloqueio (leite em pó desnatado a 5%, em PBST). A placa foi então incubada por 1 hora à temperatura ambiente ou durante a noite a 4 °C. Em seguida, foram feitas 3 rápidas lavagens com 100 μ L de PBST, após o que foram adicionados os sobrenadantes de cultura, em um volume final de 100 μ L/poço. Após 3 lavagens com PBST, foram adicionados 100 μ L de anticorpo anti-IgG humana produzida em cabra e conjugado à fosfatase alcalina (diluição 1:5000). A placa foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, os

poços foram novamente lavados 3 vezes com PBST e uma vez com tampão da fosfatase alcalina (APB). Foram adicionados 100 μ L/poço de solução reveladora, p-nitrofenilfosfato (p-NPP) em APB e após, 30 minutos de revelação protegida da luz, a placa foi lida em leitor de ELISA *Microplate Reader Bio-Rad*[®] modelo 450 em comprimento de onda de 405 nm.

1.8 - ENSAIO DE ELISA INDIRETO

O ELISA indireto foi utilizado para detecção das glicoproteínas recombinantes, expressas de forma transiente nas células CHO-K1 em cultura.

Uma placa de microtitulação de poliestireno rígida e de fundo chato (Immulon, DYNATECH) foi sensibilizada diretamente com os sobrenadantes de cultura ou extratos protéicos celulares, em um volume final de 100 μ L/poço durante 1 hora à temperatura ambiente. Após a sensibilização, o sobrenadante ou extrato protéico foi removido da placa e foram adicionados 100 μ L/poço de solução de bloqueio (leite em pó desnatado a 5%, em PBST). A placa foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C. Em seguida, foram feitas 3 lavagens com PBST. Adicionou-se então o anticorpo primário (o **HIS Probe**, IgG produzido em coelho, anti-His-tag ou o **anti-gp120**, IgG policlonal produzido em cabra anti-gp120) a uma concentração final de 2 μ g/mL, durante 2 horas à temperatura ambiente. Após 3 lavagens com PBST, foram adicionados 100 μ L de anticorpo anti-IgG de coelho ou anti-IgG de cabra conjugados à fosfatase alcalina (diluição 1:5000), sendo a placa incubada por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram novamente lavados 3 vezes com PBST e uma vez com tampão da fosfatase alcalina (APB). Foram adicionados 100 μ L/poço de solução reveladora, p-nitrofenilfosfato (p-NPP) em APB e após, 30 minutos de revelação protegida da luz, a placa foi lida em leitor de ELISA *Microplate Reader Bio-Rad*[®] modelo 450 em comprimento de onda de 405 nm.

1.9 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística dos dados referentes às eficiências de transfecção e dos dados dos ensaios de ELISA, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), em nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

1.10 - PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM TCA

As amostras dos sobrenadantes de cultura e extratos protéicos foram precipitados com ácido tricloro acético. Uma alíquota de cada amostra foi acrescida de TCA a uma concentração final de 10 % (v/v), sendo incubada no gelo por 30 min e centrifugada a 12000 x g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado por duas vezes com acetona a -20 °C por 15 minutos no gelo e centrifugado a 12000 x g por 15 min a 4 °C, sendo ressuspenso em um volume apropriado de PBS, contendo uréia a 8M.

1.11 - ANÁLISE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA E POR *WESTERN BLOTTING*

O sistema de eletroforese de proteínas foi montado para SDS-PAGE, em condições desnaturantes, segundo o protocolo de Sambrook & Russel (2001). A solução de gel separador a 10% foi vertida até o nível adequado e, em seguida, coberta com álcool butílico para impedir o contato direto com o ar. Após a polimerização, o butanol foi descartado, a superfície do gel foi lavada com água destilada e a solução do gel concentrador a 5% foi adicionada, sendo o pente para a formação dos poços acoplado logo em seguida. Antes da aplicação no gel, as amostras diluídas em tampão de amostra 5X foram fervidas por 5 minutos. O sistema de eletroforese foi submetido a uma corrente inicial de 15 mA, para a entrada das amostras no gel, e depois de 30 mA, para a corrida. A eletroforese estendeu-se até a saída do azul de bromofenol presente no tampão de amostra.

Após a corrida eletroforética, as proteínas do gel de poliacrilamida foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences), utilizando-se o sistema de transferência semi-seca com eletrodos de grafite (Pharmacia). Para montagem do sistema de transferência foram feitos “sanduíches” de papel de filtro embebidos em tampão de transferência, contendo internamente o gel sobre a membrana. Os “sanduíches

foram colocados entre os dois eletrodos de grafite e o sistema submetido a uma corrente elétrica de $0,8 \text{ mA/cm}^2$ de membrana por 1 h e 30 min. A membrana, contendo as proteínas transferidas, foi incubada com a solução de bloqueio (leite em pó desnatado a 5% em PBST) sob agitação branda, durante a noite, a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Após o bloqueio, a membrana foi lavada 3 vezes com PBST. A membrana foi então incubada, sob agitação branda por 1 hora, à temperatura ambiente, com anticorpo primário (o **HIS Probe**, IgG produzido em coelho, anti-His-tag ou o **anti-gp120**, IgG policlonal anti-gp120, produzido em cabra), adicionado em uma diluição de 1:5000 em PBST. A membrana foi novamente lavada 3 vezes com PBST e incubada sob agitação branda por 1 hora, à temperatura ambiente, com anticorpo secundário (anticorpo anti-IgG de coelho ou anti-IgG de cabra conjugados à fosfatase alcalina) em uma diluição de 1: 10000. A membrana foi então submetida a uma última lavagem de 3 vezes com PBST, seguida de uma lavagem com APB. A revelação foi feita por incubação de 5 a 15min em solução reveladora para *Western Blot*, contendo NBT e BCIP, no escuro. A reação foi parada por meio da retirada dos reagentes com sucessivas lavagens da membrana com água destilada e secagem em papel de filtro.

2. - ESTRATÉGIAS DE AMPLIFICAÇÃO DE SEQÜÊNCIAS DO HIV-1 POR PCR.

Neste trabalho, optou-se pela amplificação e clonagem de segmentos do gene *env* em 4 versões recombinantes distintas:

- **gp120**: componente solúvel do complexo glicoprotéico. Uma vez que uma cauda de histidina será acoplada à proteína, foram suprimidos os 7 últimos resíduos de aminoácidos da região C-terminal (V-V-E-R-E-K-R), sendo que os 4 últimos correspondentes ao sítio de clivagem;

- **gp41**: componente transmembrânico do complexo glicoprotéico. Sendo adicionado à porção N-terminal o próprio peptídeo sinal de *env*. Suprimiu-se o códon de terminação no final da proteína, para acoplagem da cauda de histidina. Foi acoplado também a esta construção o próprio peptídeo sinal de HIV, região correspondente aos primeiros 32 resíduos de aminoácidos da gp120;

- **gp160**: precursor protéico que sofre processamento endoproteolítico originando gp120 e gp41. Também possui suprimido o códon de terminação.

- **gp140**: forma truncada da gp160 que não conta com o domínio citoplasmático da gp41.

Para a amplificação dos fragmentos gênicos correspondentes aos polipeptídeos descritos acima, foi empregada a técnica da Reação de Polimerização em Cadeia (PCR), normalmente em duas rodadas de amplificação (*Nested-PCR*). A amplificação na segunda rodada gera um fragmento menor que o da primeira rodada, aumentando a especificidade do produto obtido. Foi também empregada a PCR de sobreposição de fragmentos anteriormente amplificados.

2.1 - gp120

Para a amplificação do fragmento gênico correspondente à gp120, foram utilizados os oligonucleotídeos **ED3** e **ED14** (Delwart *et al.*, 2001) para a primeira rodada de amplificação e **UGP120** e **LGP120** para a segunda rodada; como molde foi utilizado o cDNA viral da amostra 116/00. A *Nested-PCR* foi realizada em uma primeira rodada de 4 ciclos iniciais de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 55 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min, seguidos de 33 ciclos constituídos das etapas de desnaturação a 94 °C por 15 segundos, anelamento a 55 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 1 min. Seguiu-se uma extensão final a 72 °C por 5 min. A amplificação durante a segunda rodada foi feita segundo os mesmos parâmetros, sendo que a temperatura de anelamento utilizada foi de 50 °C. Condições empregadas: 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 1,25 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP e 1,25 U de *Platinum[®] Taq DNA Polimerase* (Invitrogen), em um volume final de 50 µL.

2.2 - GP41

A amplificação da região correspondente à gp41 foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos **E130** e **envM** (Gao *et al.*, 1996) para a primeira rodada de amplificação e **E130** e **LGP160** para a segunda rodada; como molde foi utilizado o cDNA viral da amostra 116/00. A *Nested-PCR* foi realizada tanto na primeira quanto na segunda rodada, com um passo inicial de desnaturação a 94 °C por 2 min, seguido de 33 ciclos constituídos das etapas de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 48 °C por 1 min e extensão a

72 °C por 1min e 30 segundos. Seguiu-se uma extensão final a 72 °C por 5 min. Condições empregadas: 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 2,0 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP e 1.25 U de *Platinum[®] Taq DNA Polimerase* (Invitrogen), em um volume final de 50 µL.

2.3 - GP160

A amplificação do fragmento gênico correspondente à gp160 foi feita por PCR de sobreposição, usando como molde os *amplicons* de gp120 e gp41 gerados nas *Nested-PCR* acima descritas (itens 2.1 e 2.2) e como iniciadores os oligonucleotídeos **UGP120** e **LGP160**. Os *amplicons* correspondentes a gp41 e gp120 foram eluídos de um gel de agarose a 1,5%, empregando-se o kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). Após a eluição, os DNAs foram quantificados por espectrofotometria e quantidades equimolares de ambos fragmentos foram usadas para montagem de um sistema de anelamento. Tal sistema de anelamento consistiu em 400 ng de DNA de cada *amplicon* em um volume final de 40 µL em tampão de anelamento *Circunvent Sequencing Buffer* (Biolabs) diluído a 1X. O sistema foi então fervido por 5 min em banho-maria e em seguida deixado esfriar lentamente até que a água atingisse a temperatura ambiente. Posteriormente, a amostra foi mantida no gelo até o momento de ser utilizada diretamente como molde para a PCR.

A PCR foi feita com o kit *Elongase Enzyme Mix* (Invitrogen) com um período de *hot start* a 94 °C de 5 min, após o qual foi adicionada a enzima, seguido de uma rodada inicial de desnaturação a 94 °C por 2 min, 34 ciclos constituídos das etapas de desnaturação a 94°C por 1min, anelamento a 50 °C por 1 min e extensão a 68 °C por 6 min. Por fim, realizou-se uma extensão final a 68 °C por 10 min. Demais parâmetros: 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP e 1µL de *Elongase Enzyme Mix* (Invitrogen), em um volume final de 50 µL.

2.4 - GP140

A amplificação do fragmento gênico correspondente à gp140 foi feita utilizando-se os oligonucleotídeos **UGP120** e **LGP140**, usando como molde o fragmento da gp160 gerado pela PCR de sobreposição do item anterior (2.3), previamente clonado no vetor pGEM[®]-T Easy (Promega). A PCR foi realizada com um passo inicial de desnaturação a 94 °C por 5 min, seguido de 23 ciclos constituídos das etapas de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 50 °C por 45 segundos e extensão a 68 °C por 3 min. Seguiu-se uma extensão final a 72 °C por 5 min. Condições empregadas: 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 1,0 mM de MgSO₄, 200 µM de cada dNTP e 1 U de *Platinum[®] Taq DNA Polimerase High Fidelity* (Invitrogen), em um volume final de 50 µL.

Uma vez que a *Platinum[®] Taq DNA Polimerase High Fidelity* (Invitrogen) gera produtos de amplificação com extremidades abruptas, adicionalmente foi feito o *A-tailing* no produto de amplificação da gp140. Esse procedimento visa à adição das extremidades de adenina necessárias para a clonagem no vetor pGEM[®]-T Easy (Promega). Para a reação foram utilizados 100 ng do *amplicon*, 0,5 mM de MgCl₂, 200 µM de dATP e 5 U de *Platinum[®] Taq DNA Polimerase* (Invitrogen), em um volume final de 10 µL; a reação foi incubada a 70 °C por 30 min.

2.5 - ACOPLAMENTO DO PEPTÍDEO SINAL À GP41

O segmento gênico correspondente ao peptídeo sinal foi amplificado utilizando-se, como iniciadores, os oligonucleotídeos **UGP120** e **PSLOWER** e, como molde, o fragmento da gp120 clonado no vetor pGEM[®]-T Easy (item 2.1). Já o fragmento correspondente à gp41, contendo uma região complementar ao iniciador **PSLOWER**, foi amplificado com os oligonucleotídeos **UGP41** e **LGP41**, tendo como molde, o fragmento da gp41 também clonado no vetor pGEM[®]-T Easy (item 2.2).

A PCR realizada com um passo inicial de desnaturação a 94 °C por 2 min, seguido de 33 ciclos constituídos das etapas de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 48 °C por 30 segundos e extensão a 68 °C por 30 segundos. Seguiu-se uma extensão final a 72°C por 5 min. A PCR da gp41, por sua vez, foi realizada com um passo inicial de desnaturação a 94 °C por 2 min, seguido de 33 ciclos constituídos das etapas de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 65 °C por 1 min e extensão a 68 °C por 1 min e 30 segundos. Seguiu-

se uma extensão final a 72 °C por 5 min. Condições empregadas para ambas PCRs: 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 1,0 mM de MgSO₄, 200 µM de cada dNTP e 1 U de *Platinum[®] Taq DNA Polimerase High Fidelity* (Invitrogen), em um volume final de 50 µL. Os *amplicons* correspondentes ao peptídeo sinal e à gp41 foram eluídos de um gel de agarose a 1,5 % com o kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) e quantificados por espectrofotometria.

A segunda etapa desta estratégia consistiu em uma PCR de sobreposição utilizando como iniciadores os oligonucleotídeos **UGP120** e **LGP160** e, como molde os *amplicons* acima eluídos. A reação foi realizada com um passo inicial de desnaturação a 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos constituídos das etapas de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 50 °C por 1 min e extensão a 68 °C por 5 min. Seguiu-se uma extensão final a 72 °C por 5 min. As condições empregadas foram as mesmas descritas no parágrafo anterior. Também foi realizado o *A-tailing* no produto de amplificação da gp41 contendo o peptídeo sinal.

Todos os *amplicons* gerados foram analisados em géis de agarose de 0,8% a 1%, corados com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL, tendo como parâmetro marcadores de massa molecular comerciais.

3. - CLONAGENS

3.1. - CLONAGEM NO VETOR pGEM[®]-T Easy

Os fragmentos de tamanhos correspondentes ao esperado amplificados nos itens anteriores foram eluídos de géis de agarose a 1,5%, utilizando-se o kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) e clonados no vetor pGEM[®]-T Easy (Promega), seguindo-se as recomendações dos fabricantes. Tem-se como exceção o fragmento correspondentes à gp41 com peptídeo sinal, que foi diretamente clonado no vetor de expressão pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen).

Os passos seguintes consistiram na transformação dos sistemas de ligação (insertos amplificados + pGEM[®]-T Easy) em linhagens de *E. coli*, preparação de DNA plasmidial, digestão dos plasmídeos com endonucleases de restrição para confirmação da presença dos

insertos e seqüenciamento completo dos clones transformantes (metodologias abordadas nos tópicos seguintes).

3.2 - AMPLIFICAÇÕES PARA SUBCLONAGEM NO VETOR DE EXPRESSÃO

Uma vez seqüenciadas as construções recombinantes de *env* clonadas no pGEM[®]-T Easy (Promega), cada inserto foi amplificado com seu par de oligonucleotídeos específicos em reações simples de PCR que consistiram em um passo inicial de desnaturação a 94 °C por 5 min, seguido de 23 ciclos constituídos das etapas de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 50 °C por 45 segundos e extensão a 68 °C por 3 min. Seguiu-se uma extensão final a 72 °C por 5 min. Condições empregadas: 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 1,0mM de MgSO₄, 200µM de cada dNTP e 1U de *Platinum[®] Taq DNA Polimerase High Fidelity* (Invitrogen), em um volume final de 50 µL. Foram utilizados 100 ng de cada plasmídeo como molde para as reações. Os *amplicons* foram então eluídos de géis de agarose a 1,5%, empregando-se o kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen).

Seguiu-se a adição das extremidades de adenina aos *amplicons*, (*A-tailing*), conforme descrito anteriormente no item 2.4 e a subclonagem dos fragmentos no vetor de expressão para células de mamíferos pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante.

Mais uma vez os sistemas de ligação (insertos amplificados + pcDNA3.1/V5-His-TOPO) foram transformados em linhagens de *E. coli*, com posterior preparação dos DNAs plasmidiais, digestão dos plasmídeos com endonucleases de restrição para confirmação da presença dos insertos e seqüenciamento dos clones transformantes.

4. - PREPARO E TRANSFORMAÇÃO PELA TÉCNICA DE ELETROPORAÇÃO DE CÉLULAS DE *E coli*. COMPETENTES (adaptado de Sambrook & Russel, 2001)

Clones bacterianos de cada linhagem de *E. coli* utilizada neste trabalho foram crescidos em placas de Petri contendo 15 mL de meio LB-ágar e os antibióticos de seleção apropriados, por um período de 12 a 16 horas a 37 °C. Colônias isoladas foram selecionadas e crescidas em 5 mL em meio LB sob agitação (250 rpm), a 37 °C, por um período de 12 a 16 horas. Cerca de 500 µL de cada cultura foram inoculados em 250 mL de meio SB, contendo 2,5 mL da solução estoque de glicose 2M e 2,5 mL da solução estoque de MgCl₂ 2M. Esse inóculo foi mantido sob agitação (250 rpm), a 37 °C até que atingisse a densidade óptica a 600 nm entre 0,7 e 0,9. As células foram coletadas por centrifugação a 5000 x g, 4 °C por 15 min e em seguida ressuspensas em 20 mL de glicerol 10% gelado e centrifugadas a 3000 x g, a 4 °C por 15 min. Esta etapa de lavagem das células com glicerol e centrifugação foi repetida mais 3 vezes. Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em um volume apropriado de glicerol 10% (entre 1 e 2 mL), de forma que a densidade óptica a 600 nm final alcançasse entre 200 e 250. Neste estado, as células foram consideradas competentes, sendo imediatamente utilizadas ou congeladas em um banho de gelo seco-álcool e estocadas a -80 °C em alíquotas de 50 µL, para posterior utilização.

Para a eletroporação, uma alíquota de 50 µL de células competentes foi utilizada para cada transformação com plasmídeo intacto ou sistema de ligação. As células foram descongeladas no gelo e a elas adicionou-se até 5 µL de plasmídeo intacto ou do sistema de ligação. Em seguida, as células foram rapidamente transferidas para a cubeta própria para eletroporação e submetidas a pulso elétrico no eletroporador (Biorad). Os parâmetros elétricos utilizados foram: 25 µF, 200 Ω e 2,5 kV, por 4,0 a 5,0 ms. Após o choque, as células foram lavadas da cubeta três vezes com 1 mL de meio SOC. O sistema foi incubado a 37° C por uma hora, sob agitação. Foram semeadas de 20 a 200 µL de células, em placas de Petri contendo 15 mL de meio LB-ágar contendo ampicilina a 200 µg/mL e X-Gal a 0,04 mg/mL e IPTG a 0,2 mM, quando necessários.

5. - PREPARAÇÕES DE DNA PLASMIDIAL

5.1 - PREPARAÇÃO DE DNA PLAMIDIAL EM PEQUENA ESCALA

O protocolo de extração de plasmídeos de *E. coli* foi baseado na técnica de lise alcalina descrita por Birnboim & Dolly (1979), com algumas modificações. Colônias individuais de *E. coli* foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo ampicilina a 100 µg/mL. As células foram crescidas a 37°C, sob agitação de 250 rpm durante 18 horas. Cerca de 3 mL de cultura foram centrifugados a 10000 x g por 2 min, descartando-se o sobrenadante. O sedimento foi ressuspenso em 200 µL de TE, em seguida foram adicionados 360 µL de solução II, invertendo-se o tubo delicadamente várias vezes e incubando-se à temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 300µL de solução III, invertendo-se o tubo gentilmente várias vezes e incubando-se no gelo por 5 min. O material foi centrifugado a 10000 x g por 5 min e o sobrenadante foi transferido para novo tubo, ao qual foram adicionados 750 µL de isopropanol, procedendo-se a nova centrifugação nas condições descritas anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 200 µL de TE contendo RNase A a 50µg/mL, seguindo-se incubação a 37° C por 30 min. Adicionou-se então 110 µL de acetato de amônia 7,5 M, homogeneizando-se vigorosamente em agitador. A solução foi centrifugada a 10000 x g por 5 min e o sobrenadante transferido para novo tubo. O DNA foi precipitado pela adição de 750 µL de etanol 100% e centrifugado a 10000 x g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70%, sendo novamente centrifugado. O sobrenadante foi descartado e, após secagem ao ar, o precipitado foi ressuspenso em 50µL de água e estocado a -20°C.

Quando era necessário seqüenciar o material, a purificação de DNA plasmidial foi realizada utilizando-se o kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), seguindo-se as recomendações do fabricante.

5.2 - PREPARAÇÃO DE DNA PLAMIDIAL EM LARGA ESCALA

Para a preparação de DNA plasmidial em grandes concentrações para os experimentos de transfecção foi utilizado o *Qiagen Plasmid Maxi Kit* (Qiagen), seguindo-se as recomendações do fabricante.

6. - DIGESTÃO DE DNA COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO

Sistemas de digestão simples com enzimas de restrição foram montados utilizando-se 1 unidade de cada enzima por 100 ng de DNA, tampão de reação apropriado a 1X e água bidestilada autoclavada. Em cada sistema, o volume de enzima não ultrapassou 10% do volume total, de modo a evitar que o excesso de glicerol provocasse digestão inespecífica. Os sistemas de digestão foram incubados a 37°C, por períodos de 2 - 4 h ou durante a noite, conforme a quantidade de DNA a ser clivada.

As endonucleases de restrição utilizadas neste trabalho e seus respectivos tampões estão listados na seção MATERIAIS, no tópico 10.

7. - ANÁLISE DE ÁCIDOS NUCLÉICOS POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os géis de agarose na concentração desejada (0,8 a 1,5 %) foram preparados com agarose tipo II (Sigma) em tampão TEB 0,5X. A solução de agarose em TEB foi aquecida até a completa dissolução. Após resfriamento, adicionou-se 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. Depois da montagem da forma e pente apropriados, verteu-se a agarose fundida e esperou-se pela total solidificação.

As amostras a serem analisadas foram preparadas adicionando-se tampão de amostra a uma concentração final de 1X. Após a aplicação das amostras, o gel foi submetido a eletroforese em tampão de corrida TEB 0,5X utilizando-se uma voltagem não superior a 5 V/cm. A detecção dos ácidos nucléicos foi feita por meio de transluminador de luz ultra-violeta.

8. - SEQÜENCIAMENTO

Os DNAs plasmidiais dos clones transformantes foram seqüenciados com o kit *DYEnamicTMET - Dye terminator* no seqüenciador automático MegaBACE 500 plus (Molecular Dynamics). A quantidade de DNA enviada foi de 100 ng, juntamente com cada oligonucleotídeo específico, a uma concentração que variou de 5 a 15 μ M. As seqüências resultantes do seqüenciamento automático foram analisadas pelo programa PHRED (Ewing *et al.*, 1998 a,b) para pontuação das bases nucleotídicas. As seqüências correspondentes aos vetores foram filtradas pelo programa Cross-Match (Green, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. - TRANSFECCÕES TRANSIENTES DE CÉLULAS CHO-K1 E HSG

1.1 - AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE TRANSFECCÃO PELO ENSAIO DA β -GALACTOSIDASE EM CÉLULAS EM CULTURA (HISTOQUÍMICA ENZIMÁTICA)

Inicialmente, as células CHO-K1 e HSG foram transfectadas com o vetor pCMV β -Gal (Clontech), contendo o gene *lacZ* de *E. coli*, que codifica a enzima β -galactosidase. O *lacZ* foi utilizado como gene repórter para a eficiência de transfecção. A atividade hidrolítica da β -galactosidase sobre o substrato cromogênico sintético X-Gal gera um produto que forma um precipitado azul nas células transfectadas, como demonstrado na Figura 14.

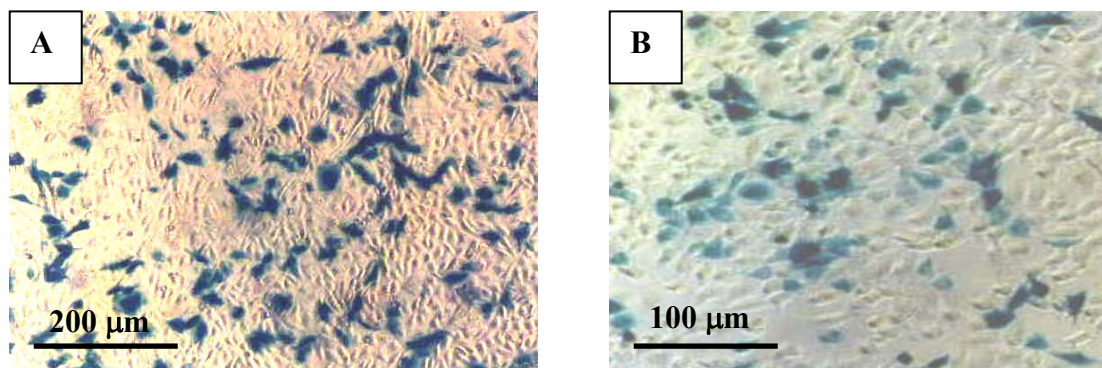


Figura 14. Células CHO-K1 (A) e HSG (B) transfectadas com o plasmídeo pCMV β Gal. Em azul células que expressam a β -galactosidase.

Os protocolos de transfecção testadas foram a co-precipitação do DNA com fosfato de cálcio e a transfecção mediada por lipídeos catiônicos. Como os dados a respeito de transfecção de células HSG são escassos na literatura científica, realizamos em paralelo às transfecções por co-precipitação com fosfato de cálcio choques osmóticos com glicerol (Wilson *et al.*, 1995; Wilsson & Smith, 1997) e DMSO (Segura *et al.*, 2001), uma vez que tais agentes vêm sendo descritos como potencializadores da transfecção.

O vetor pCMV β -Gal foi transfectado isoladamente (sendo chamado de sistema β GAL) e juntamente com o vetor pMAC/PS/Z22, que codifica o anticorpo quimérico anti-

Z-DNA Z22 (sistema Z22+ β GAL). Os vetores pMAC/PS/Z22, e o pMAC/PS (o vetor vazio) também foram transfectados isoladamente, servindo como controles negativos para a histoquímica enzimática. As transfecções foram feitas em triplicata e os sobrenadantes de cultura foram coletados para subsequente verificação por ELISA da presença do anticorpo anti-Z-DNA, nos grupos experimentais.

A avaliação da eficiência de transfecção foi estimada pela contagem do número de células azuis em relação ao total de células presentes em um quadrante representativo da placa de cultivo, sendo o resultado apresentado em porcentagem (Figura 15). As células HSG apresentaram uma eficiência de transfecção muito próxima à de CHO quando o método de transfecção foi co-precipitação com fosfato de cálcio. Isso foi observado tanto na transfecção do sistema β GAL isoladamente, quanto no sistema de co-transfecção Z22+ β GAL. O sistema de co-transfecção apresentou uma eficiência mais baixa, provavelmente em função da quantidade de vetor do gene repórter proporcionalmente menor (da ordem de 9 vezes).

Estudos que comparam a eficiência de transfecção transiente entre as metodologias de fosfato de cálcio e lipídeos catiônicos normalmente apontam a segunda estratégia como mais eficiente (Abul-Hassan *et al.*, 2000; Nowling *et al.*, 2002), o que foi observado para CHO. Curiosamente, para as células HSG, as eficiências de transfecção com a *Lipofectamine*TM 2000 (o preparado comercial de lipídeos catiônicos, lipofectamina) foram menores. No protocolo da lipofectamina, é transfectada uma monocamada de células em confluência de aproximadamente 90%. Passadas 24h da transfecção, é de rotina que se faça o acompanhamento do aspecto da cultura por visualização ao microscópio óptico. De uma forma geral as culturas de HSG apresentavam, após 24h de transfecção com a lipofectamina, uma confluência menor do que a das células CHO (dados não mostrados), o que é indicativo de uma maior taxa de morte celular. Isso pode refletir uma possível suscetibilidade das células HSG a um efeito citotóxico da lipofectamina, justificando a eficiência de transfecção mais baixa nesse modelo.

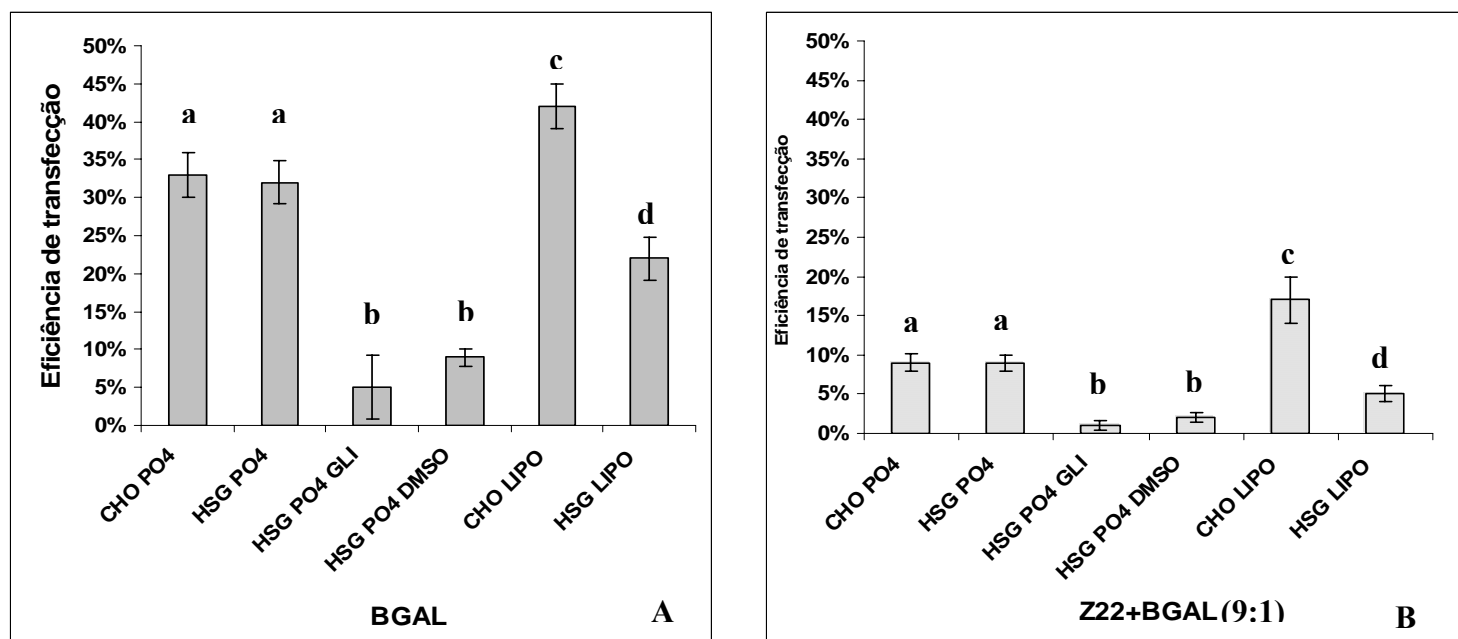


Figura 15. Eficiências de transfecção transiente das células CHO-K1 e HSG de acordo com a atividade da β -galactosidase. **A:** eficiência de transfecção apenas com o vetor pCMV β -Gal. **B:** eficiência de transfecção do vetor pCMV β -Gal, co-transfectado com o vetor pMAC/PS/Z22. **PO4:** células transfectadas por co-precipitação com fosfato de cálcio, **LIPO:** células transfectadas com lipídeos catiônicos (lipofectamina), **GLI:** células que sofreram choque osmótico com glicerol, **DMSO:** células que sofreram choque osmótico com dimetilsulfóxido. As letras diferentes (**a, b, c e d**) denotam diferença significativa ($p < 0,05$).

A literatura científica também aponta para uma relativa toxicidade de lipídeos catiônicos (Patil *et al.*, 2005; Romorem *et al.*, 2005) que varia de acordo com o tipo celular e de acordo com a quantidade de lipídeos utilizada na relação lipídeo:DNA para a formação dos complexos. Sendo que, quanto maior a quantidade de lipídeos em relação à quantidade de DNA, maior é o efeito citotóxico. A toxicidade é atribuída ao excesso de cargas positivas (Dass, 2004), uma vez que ao se utilizar formulações contendo maiores quantidades de lipídeos com cargas neutras/negativas, a toxicidade do complexo mostra-se menor (Patil *et al.*, 2005; Romorem *et al.*, 2005). Ainda não é muito bem elucidado o mecanismo da toxicidade do excesso dessas cargas positivas para células epiteliais, mas acredita-se que elas comprometam a integridade da membrana plasmática. Algumas evidências nos são dadas com o estudo de culturas primárias de células epiteliais. Tais células mantêm a capacidade de se organizarem *in vitro* como um epitélio e, quando tratadas com preparações de lipídeos catiônicos em grandes concentrações, têm essa capacidade comprometida, mostrando-se visivelmente danificadas (Romorem *et al.*, 2005). Também são reportados como efeitos do tratamento com lipídeos catiônicos em células em

cultura o alto grau de vacuolização e retração citoplasmática (Lappalainen, *et al.*, 1994), indicativos de sofrimento celular.

É possível que a quantidade de lipofectamina utilizada neste estudo com as células HSG (2,5 μ L de lipídeos para cada 1 μ g de DNA) tenha sido tóxica. Assim, seria interessante o teste com quantidades menores da formulação lipídica, ou a utilização de formulações lipídicas diferentes. Patil e colaboradores (2004) propuseram a formação de complexos lipídeo:DNA por meio de formulações lipídicas aniônicas na presença de íons Ca^{2+} . As formulações utilizando DOGP e DOPE, dois lipídeos aniônicos, apresentaram menor toxicidade e eficiência de transfecção equivalente aos preparados de lipídeos catiônicos.

A literatura aponta a lipofecção como um método mais eficiente do que a co-precipitação com fosfato de cálcio. Entretanto, isso não foi verificado para as células HSG. Tal resultado representa um incentivo à otimização do protocolo com fosfato de cálcio, que é muito mais barato.

Os choques osmóticos das células HSG recém-transfectadas pela metodologia de co-precipitação com fosfato de cálcio, tanto com glicerol (a 15% por 2 min), quanto com DMSO (a 10% por 2min e 30s), reduziram significativamente a eficiência de transfecção dos sistemas β GAL e Z22+BGAL (Figura 15). Não se observou a diminuição do número de células, mas sim uma diminuição na taxa de crescimento da cultura. Isso é indicativo de que os choques osmóticos tiveram um efeito de estresse fisiológico que levou a um atraso na proliferação das células HSG, ao invés do efeito potencializador da eficiência de transfecção ao qual são atribuídos.

Uma série de trabalhos utiliza os choques osmóticos para aumentar a eficiência de transfecção com fosfato de cálcio. Wilson & Smith (1997), transfectando células de rim de macaco verde (BSC-40), com o choque com glicerol (12,5% por 3 min) conseguiram um aumento de eficiência de 16%. Os autores argumentam que o choque teria aumentado a eficiência da captura de moléculas de DNA pela célula. Segura e colaboradores (2001) realizaram choques osmóticos com glicerol (a 15% por 30s) e DMSO (a 10% a 2 min) em cultura primária de células de cordão umbilical humano (HUVEC), observando um aumento de eficiência de cerca de 29% para ambos os tratamentos. Em 2001, Batard e colaboradores, utilizando vetores covalentemente ligados a fluoróforos, mostraram por

citometria de fluxo que os choques osmóticos não influenciam na captura do DNA, uma vez que não ocorre um aumento do número de moléculas de plasmídeo internalizadas. Entretanto os choques influenciam de alguma forma aumentando a expressão do gene repórter transfectado, no caso do estudo, o sistema GFP (*green fluorescent protein*).

As informações contidas nos trabalhos acima citados nos levam a crer que talvez as concentrações de glicerol e DMSO utilizadas, assim como o tempo dos choques osmóticos possam ter sido demasiadamente grandes e por isso tóxicos às células.

1.2 - DETECÇÃO POR ELISA DE CAPTURA DO ANTICORPO ANTI-Z-DNA Z22 NOS SOBRENADANTES DE CULTURA

Conforme mencionado no tópico anterior os sobrenadantes de cultura das transfecções dos sistemas Z22, Z22+BGAL e pMAC/PS, foram coletados para verificação da presença do anticorpo quimérico anti-Z-DNA Z22, na forma recombinante de fragmento FvFc. A detecção a proteína recombinante foi feita pela porção Fc humana (Figura 16), por meio de um ELISA de captura, tendo sido a placa sensibilizada com um anticorpo anti-IgG humana que reconhece a porção Fc. A revelação foi feita com um segundo anticorpo anti- IgG humana conjugado à fosfatase alcalina. A Figura 17, demonstra os resultados do ELISA para as transfecções realizadas com co-precipitação com fosfato de cálcio e choques osmóticos, assim como a transfecção com a lipofectamina.

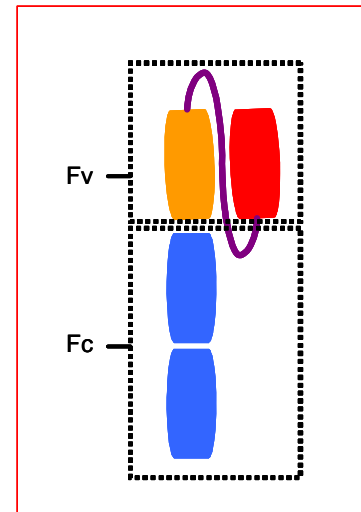


Figura 16. Esquema do fragmento FvFc do anticorpo Z22. **Fv**: fragmento de cadeia única variável, **Fc**: fragmento cristalizável

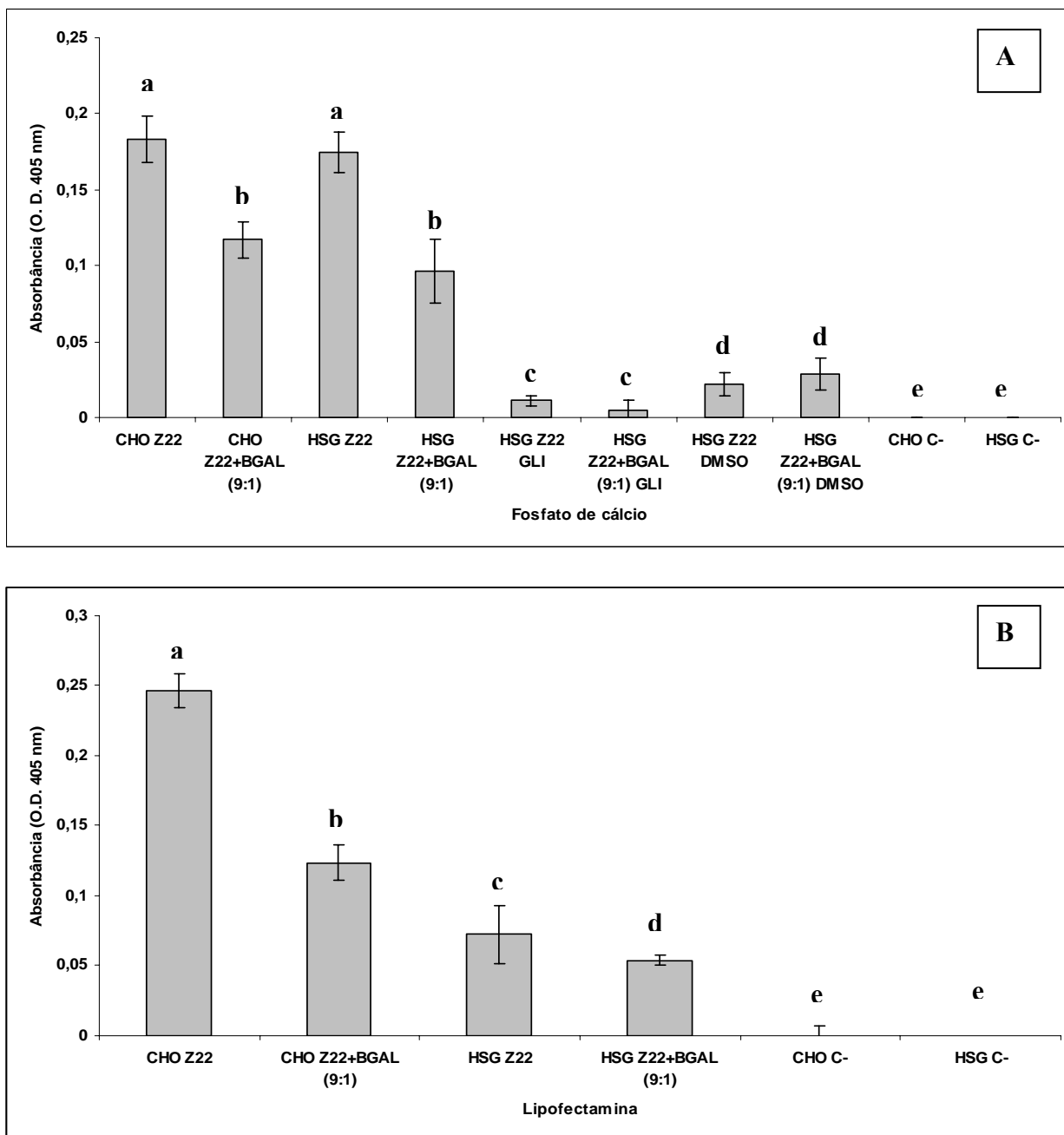


Figura 17. Elisa de captura do componente Fc da cadeia pesada de imunoglobulina em sobrenadante de cultura de células CHO-K1 e HSG transfectadas por co-precipitação com fosfato de cálcio (A) e lipofectamina (B). **Z22**: anticorpo anti Z-DNA Z22 (pMAC/PS/Z22), **BGAL**: pCMV β Gal, **C-**: controle negativo (vetor pMAC/PS vazio). **GLI**: células que sofreram choque osmótico com glicerol, **DMSO**: células que sofreram choque osmótico com dimetilsulfóxido. As letras diferentes (**a**, **b**, **c**, **d** e **e**) denotam diferença significativa ($p < 0,05$).

De acordo com a figura 17, nota-se que a eficiência de produção do anticorpo recombinante Z22 foi maior quando se utilizou o protocolo de transfecção com a lipofectamina, cerca de 1,3 vezes superior à metodologia de fosfato de cálcio. Quando da co-transfecção Z22 e

β -galactosidase, não se observou diferença entre os dois protocolos. O contrário aconteceu com as células HSG, que transfectadas por co-precipitação com fosfato de cálcio levaram a uma produção cerca de 2,4 vezes maior para o anticorpo Z22 isoladamente e cerca de 1,7 vezes maior para a produção simultânea do anticorpo e β -galactosidase. As eficiências de produção para o sistema Z22+ β GAL são menores do que para Z22 sozinho, em ambas as células, devido a uma provável competição por fatores de transcrição, uma vez que o vetor pMAC/PS/Z22 e o vetor pCMV β -Gal possuem o mesmo promotor (pCMV). Esses dados, que avaliaram a presença do anticorpo recombinante nos sobrenadantes de cultura, são condizentes com os dados da eficiência de transfecção pela detecção da atividade da β -galactosidase (Figura 15), ambos experimentos apresentaram padrões semelhantes de acordo, com a linhagem celular e com o método de transfecção empregado.

Para HSG, os choques osmóticos também não levaram a uma potencialização da produção do anticorpo, dados que corroboram a hipótese de toxicidade dos choques osmóticos do modo como foram realizados.

Em conjunto nossos dados indicam que as células HSG representam um bom sistema alternativo ao de células CHO para a produção de proteínas heterólogas, especialmente quando transfectadas pela metodologia de co-precipitação com fosfato de cálcio, com médias de eficiência em torno de 32%, superiores às médias de 15% atingidas por Ruggiero (2002), quando transfectando células CHO. Ainda, a produção de anticorpos em cultura de células de mamífero funciona como um bom sistema repórter para a avaliação da expressão de proteínas recombinantes secretadas.

2. - AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DA GP120

A estratégia escolhida para amplificação do fragmento gênico correspondente a gp120 foi a *Nested*-PCR, uma vez que esta é utilizada rotineiramente para amplificação de fragmentos de *env*, a partir de cDNA, viral para subtipagem pela metodologia conhecida como HMA (*Heteroduplex Mobility Analysis*). Resumidamente, esta metodologia consiste no anelamento do fragmento amplificado com os DNAs de seqüências de referência de diversos subtipos e análise da mobilidade do heteroduplex formado em gel de poliacrilamida: quanto mais relacionadas forem as seqüências, maior é a velocidade de migração (Delwart *et. al.*, 2001). A amplificação por *Nested*-PCR é também utilizada em

estudos epidemiológicos, para a clonagem e seqüenciamento de seqüências de HIV-1, em trabalhos tais como os de Thomson e colaboradores (2002) e Gao e colaboradores (1996).

A *Nested-PCR* foi realizada tendo como molde para amplificação o cDNA viral da amostra 116/00, subtipo C. Já na primeira rodada de amplificação com o par de iniciadores ED3/ED14 foi possível a detecção de um fragmento de aproximadamente 2,0 kb (Figura 18A, poço 1). Este fragmento foi utilizado como molde para uma segunda rodada de amplificação, com os iniciadores UGP120/LGP120, gerando um fragmento de aproximadamente de 1,5 kb (Figura 18A, poço 2). Este segundo fragmento gerado apresentou um tamanho de acordo com o esperado segundo a estratégia de amplificação, tendo como referência a seqüência da linhagem 92BR025 (GenBank UR52953, subtipo C), esquematizada na Figura 18B.

O par de iniciadores UGP120/LGP120 foi desenhado de modo que o *amplicon* ficasse em fase com o vetor de expressão pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen), permitindo a acoplagem da proteína recombinante com o epítipo V5 (GKPIPNLLGLDST), derivado do epítipo PK presente nas proteínas V e P de paramixovirus SV5, e uma cauda de histidina codificados pelo vetor. O iniciador UGP120 possui a seqüência GCAATG, compatível com o “Consenso de Kozak” (G/A)NNATG, sendo atribuída à purina na posição -3 um papel importante na iniciação da tradução de mRNAs de vertebrados (Kozac, 1987). O iniciador LGP120 foi desenhado de modo que anelasse no final da gp120, deixando de fora do produto de amplificação a região codificadora dos 7 últimos resíduos de aminoácidos (VVEREKR), sendo os 4 últimos correspondentes ao principal sítio de clivagem descrito para *env* (revisto por Moulard & Decroly, 2000). A não incorporação do sítio de clivagem na gp120 recombinante evitaria uma possível perda do epítipo V5 e da cauda de histidina por uma clivagem celular endoproteolítica.

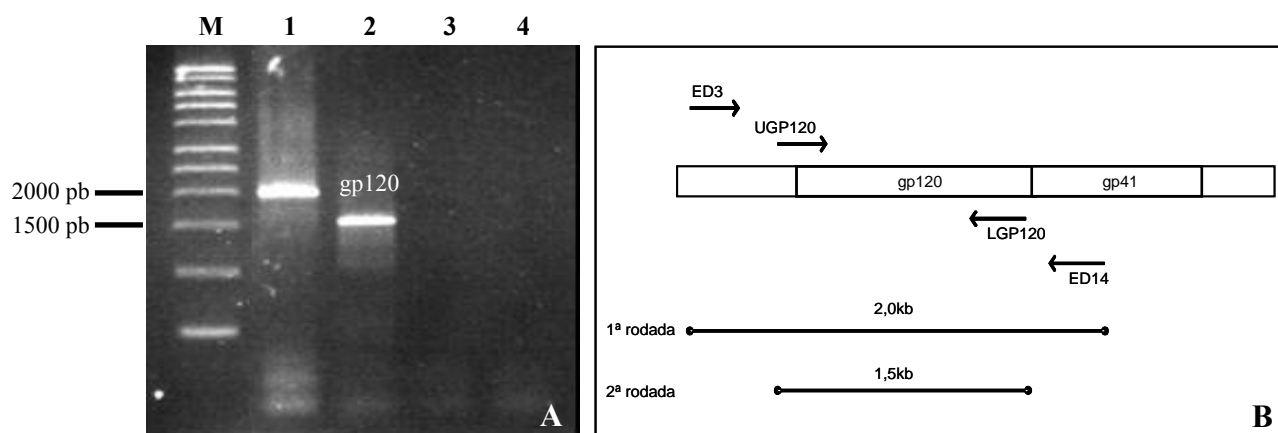


Figura 18. **A:** *Nested* PCR para a amplificação do fragmento gênico correspondente à gp120. Análise eletroforética em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídeo a 0,5 μ g/mL dos produtos de amplificação do cDNA da amostra 116/00. **M:** 1 kb DNA *Ladder* (Sigma). **Poço 1:** 1^a rodada de amplificação, iniciadores: ED3/ED14. **Poço 2:** 2^a rodada de amplificação, iniciadores:UGP120/LGP120. **Poços 3 e 4:** Controles negativos sem DNA para as amplificações da 1^a e 2^a rodada, respectivamente. **B:** Diagrama esquemático da estratégia de amplificação da gp120, tendo como base para o tamanho dos fragmentos a seqüência da linhagem 92BR025 (GenBank UR52953, subtipo C).

O fragmento de 1,5 kb foi eluído e clonado no vetor pGEM[®]-T Easy (Promega), com posterior transformação por eletroporação da linhagem de *E. coli* XL1-Blue. Feita a digestão dos DNA plasmidiais dos clones transformantes com *EcoR* I, foi verificada a presença do inserto para 10 clones, o que foi confirmado por PCR com os iniciadores UGP120/LGP120 (dados não mostrados). O DNA plasmidial dos clones transformantes foi aleatoriamente escolhido para ser seqüenciado.

3. - AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DA GP 41

Para amplificação do fragmento gênico correspondente a gp41 também foi utilizada a metodologia de *Nested*-PCR, utilizando-se o cDNA viral como molde. A primeira rodada de amplificação foi feita utilizando-se o par de iniciadores E130/*env*M, cujo produto de amplificação foi utilizado como molde para a segunda rodada de amplificação, empregando

os iniciadores E130/LGP160. Somente na segunda rodada de amplificação (Figura 19A, poço 2) foi possível detectar em gel o *amplicon* com o tamanho esperado de 1,3 kb, de acordo com a estratégia de amplificação, ilustrada na Figura 19B.

De acordo com a seqüência da linhagem 92BR025, este fragmento amplificado de aproximadamente 1,3 kb compreende toda a gp41 e uma porção final de 279 pb da gp120 codificando os dois sítios de clivagem de *env*. Este fragmento de 1,3 kb também foi eluído e clonado no vetor pGEM[®]-T Easy (Promega). A análise do perfil de restrição com *EcoR* I dos DNAs plasmidiais digeridos de 6 clones transformantes de XL1-Blue, evidenciou a presença do inserto em todos, o que foi confirmado por PCR com os iniciadores E130/LGP160 (dados não mostrados). O DNA plasmidial dos clones transformantes foi aleatoriamente escolhido para ser seqüenciado.

Este fragmento da gp41 serviu como um dos moldes para amplificação da gp160, assim como de arcabouço para o acoplamento da região codificadora do peptídeo sinal de HIV, dando origem a versão final da gp41 para clonagem no vetor de expressão.

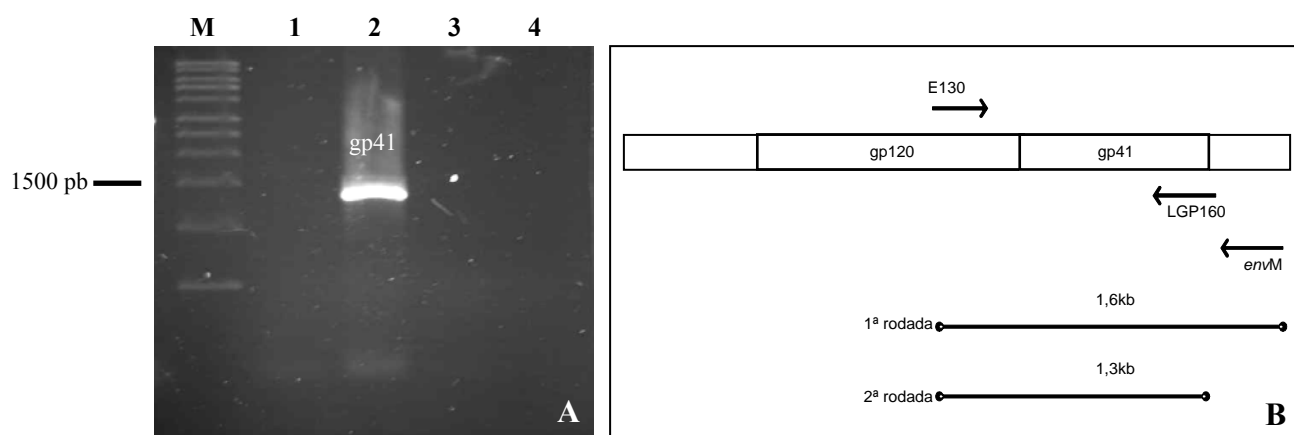


Figura 19. **A:** *Nested* PCR para a amplificação do fragmento gênico correspondente à gp41. Análise eletroforética em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídeo a 0,5µg/mL dos produtos de amplificação do cDNA da amostra 116/00. **M:** 1 kb DNA *Ladder* (Sigma). **Poço 1:** 1ª rodada de amplificação, iniciadores: E130/*envM*. **Poço 2:** 2ª rodada de amplificação, iniciadores: E130/LGP160. **Poços 3 e 4:** Controles negativos sem DNA para as amplificações da 1ª e 2ª rodada, respectivamente. **B:** Diagrama esquemático da estratégia de amplificação da gp41, tendo como base para o tamanho dos fragmentos a seqüência da linhagem 92BR025 (GenBank UR52953, subtipo C).

4. - AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DA GP160

A amplificação do fragmento gênico correspondente a gp160 foi realizada por meio de uma PCR de sobreposição, usando como molde os *amplicons* de gp120 e gp41 gerados nos itens anteriores e os iniciadores UGP120/LGP160. A sobreposição foi possível uma vez que o *amplicon* da gp41 utilizado conta com uma região complementar a 247 pb referentes ao final da gp120. De acordo com a estratégia de amplificação desenvolvida (Figura 20B) um fragmento de aproximadamente 2,6 kb (Figura 20A) foi obtido como produto de amplificação. Tal fragmento foi eluído e clonado no vetor pGEM[®]-T Easy (Promega).

A análise do perfil de restrição dos DNA plasmidiais digeridos com *Eco* RI de 14 clones transformantes da linhagem de *E. coli* XL1-Blue, evidenciou a presença do inserto em 3 clones, o que também foi confirmado por PCR (dados não mostrados). O DNA plasmidial de um clone bacteriano foi aleatoriamente escolhido para ser seqüenciado. Esta terceira construção, a gp160, representa todo o polipeptídeo codificado por *env*, que uma vez produzido sofre a clivagem pós-traducional por proteases celulares, dando origem à gp120 e à gp41.

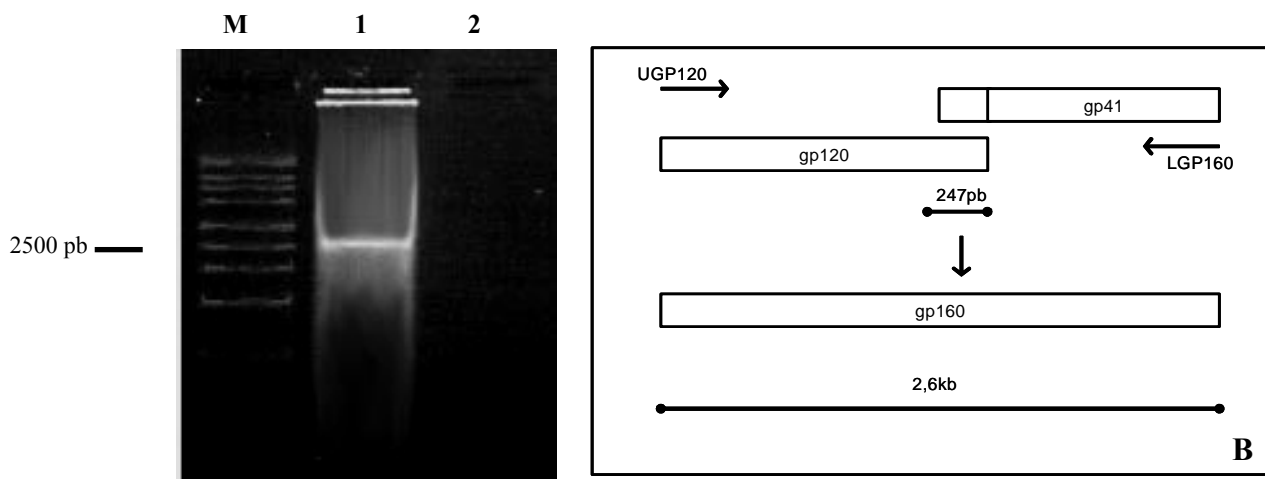


Figura 20. **A.** PCR de sobreposição para a amplificação do fragmento gênico correspondente à gp160. Análise eletroforética em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídeo a 0,5µg/mL do produto de amplificação obtido a partir do sistema de anelamento da gp120 e gp41. **M:** 1kb DNA Ladder (Sigma). **Poço 1:** Produto de amplificação, iniciadores: UGP120/LGP160. **Poço 2:** Controle negativo sem DNA. **B.** Diagrama esquemático da estratégia de amplificação da gp160.

5. - AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DA GP140

A amplificação da quarta e última versão recombinante de *env*, a forma truncada da gp160, denominada gp140, foi realizada em uma etapa única de PCR com os iniciadores UGP120/LGP140. O fragmento amplificado com cerca de 2,2 kb (Figura 21A, poço 1), foi eluído e clonado no vetor pGEM[®]-T Easy (Promega). Feita a transformação da linhagem de *E. coli* SURE, foram obtidos 12 clones transformantes. Por perfil de restrição com *EcoR* I verificou-se a presença do inserto em quatro deles. O DNA plasmidial de um dos clones identificado foi aleatoriamente escolhido para ser seqüenciado.

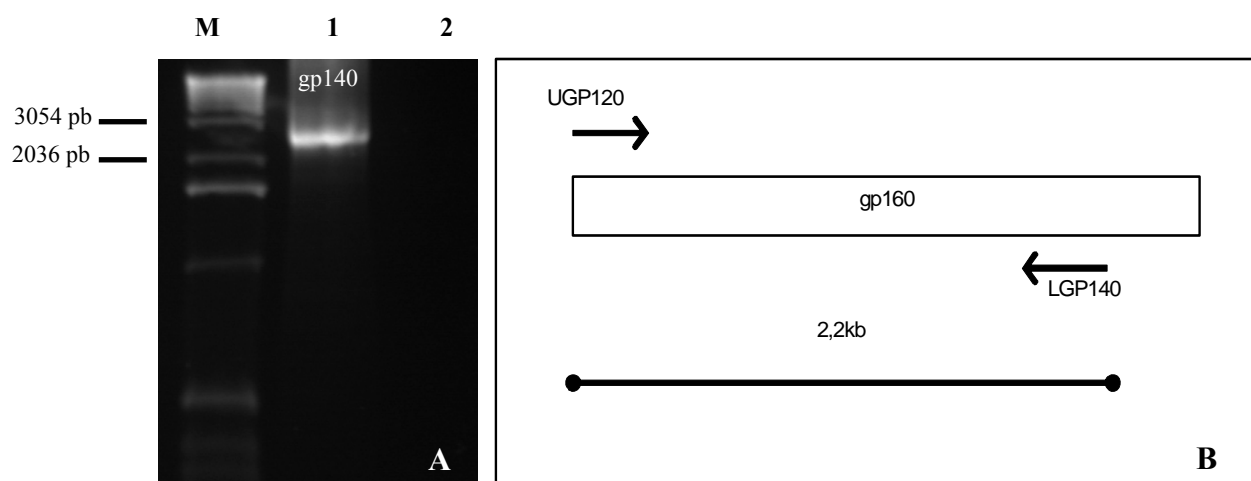


Figura 21. **A.** PCR para a amplificação do fragmento gênico correspondente à gp140. Análise eletroforética em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídeo a 0,5 μ g/mL do produto de amplificação obtido a partir da gp160 clonada no vetor pGEM-T *easy* (Promega). **M:** 1kb DNA Ladder (Invitrogen). **Poço 1:** Produto de amplificação da gp140, iniciadores: UGP120/LGP140. **Poço 2:** Controle negativo sem DNA. **B.** Diagrama esquemático da estratégia de amplificação da gp140.

Atualmente, a denominação “gp140” não necessariamente indica que o políptídeo produzido tem uma massa molecular de 140 kDa, como por exemplo indicam as denominações “gp160”, “gp120” e “gp41”. O termo “gp 140” é atualmente utilizado pela comunidade científica como um nome genérico para formas truncadas da gp160. Tal fato é evidenciado pela análise da metodologia de trabalhos que fazem a expressão de formas recombinantes de *env*. Qiao e colaboradores (2005) expressaram diversas formas de gp140 que, na verdade, eram pequenas construções relativas a uma gp120 contando apenas com

os domínios C1 e C5 unidos por um peptídeo de ligação, além do ectodomínio da gp41, com massas moleculares de aproximadamente 50 kDa. As gp140 expressas por Jeffs e colaboradores (2004) contam com a gp120 e ectodomínios da gp41 com tamanhos variados, apresentando massa molecular entre 130 e 150 kDa. Srivastava e colaboradores (2002) expressaram uma forma da gp140 com uma mutação no sítio de clivagem entre a gp120 e a gp41, gerando um monômero na faixa de 160 kDa. A gp140 proposta no presente trabalho conta com a gp120 e com o ectodomínio, o domínio transmembrana e parte do endomínio da gp41.

6. - SEQÜENCIAMENTO E ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS

O seqüenciamento dos fragmentos gênicos referentes à gp120, gp41, gp160 e gp140 obtidos a partir da amostra 166/00 e clonados no pGEM[®]-T Easy (Promega) foi feito pela estratégia de *primer walking*, com montagem dos *contigs* feita meio do programa CAP3 (Huang & Madan, 1999) e o alinhamento das seqüências feito com o programa CLUSTAL W (Higgins *et. al.*, 1994).

A amostra de cDNA utilizada neste trabalho (116/00) havia sido previamente identificada como pertencente ao subtipo C, com base na análise da região C2-C3 da gp120 (Dr. Luís Fernando Brigido, comunicação pessoal). Após realizarmos o sequenciamento de *env* completo, essa classificação foi confirmada para toda a sua extensão, por meio do programa REGA HIV-1 *Subtyping Tool* 1.0 (de Oliveira *et al.*, 2005) (<http://hivdb.stanford.edu/>), sendo confirmado o subtipo C.

O subtipo C foi inicialmente detectado no Brasil nas cidades de Porto Alegre e São Paulo (Csilagg, 1994) e com o seqüenciamento de amostras de 1991 e 1992 o primeiro genoma completo de subtipo C brasileiro, o 92BR025, foi montado, indicando que em 1992 este subtipo já estava presente no país (Gao *et al.*, 1998). As análises filogenéticas de seqüências da transcriptase reversa e protease virais de isolados brasileiros, comparadas juntamente com várias seqüências de subtipo C de todo o mundo, mostram que as seqüências do subtipo C brasileiras formam um grupo monofilético distinto, indicativo da probabilidade da entrada do subtipo C no Brasil em um evento único (Soares *et al.*, 2003b).

Atualmente o subtipo C já é o mais prevalente no sul do país, reportado em cerca de 45% dos casos no Rio Grande do Sul e 30% no Paraná (revisto por Soares *et al.*, 2003a), sendo crescente os números de casos reportados no Rio de Janeiro e em São Paulo, o que é indicativo de uma alta taxa de disseminação para outras regiões do país (Salemi *et al.*, 2005). A disseminação do subtipo C vem gerando preocupação quanto à eficácia e espectro de ação dos tratamentos anti-retrovirais, já sendo relatados no Rio de Janeiro, dois casos graves de resistência a inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo (Couto-Fernandez *et. al*, 2005).

A análise preliminar do alinhamento das seqüências de resíduos de aminoácidos deduzidas a partir das quatro construções recombinantes (Figura 22), não evidenciou a ocorrência de deleções ou inserções entre as construções e conforme o esperado, também não foram evidenciados códons de terminação ao longo das seqüências. A Figura 22 ilustra ainda a topologia das principais regiões da gp160, gp140, gp120. e da gp 41 ainda sem o peptídeo sinal.

Foi também realizado um alinhamento da seqüência deduzida de resíduos de aminoácidos da gp160-166/00, a maior das construções, juntamente com 34 outras seqüências de *env* de HIV-1 depositadas no *HIV sequence database* do Laboratório Nacional de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov>). Tal alinhamento foi realizado no intento de se verificar nas construções recombinantes de *env* deste trabalho, a presença de resíduos de aminoácidos e motivos protéicos importantes, tais como os de ligação a CD4 e ao co-receptor, e o sítio de clivagem entre gp 120 e gp41 (Figura 23).

Kwong e colaboradores (1998) em um trabalho que elucidou a estrutura cristalina da gp120 interagindo com CD4, mostraram que o sítio de ligação está localizado na depressão formada pelos dois grandes domínios da gp120, ligados por uma folha β . Segundo este trabalho, CD4 interage com 26 resíduos de aminoácidos da cavidade de gp120, sendo os mais críticos: D368, E370, W427, V430 e P438. Tais resíduos estão conservados em todas as seqüências do alinhamento e também presentes na seqüência da gp160-116/00 (Figura 23).

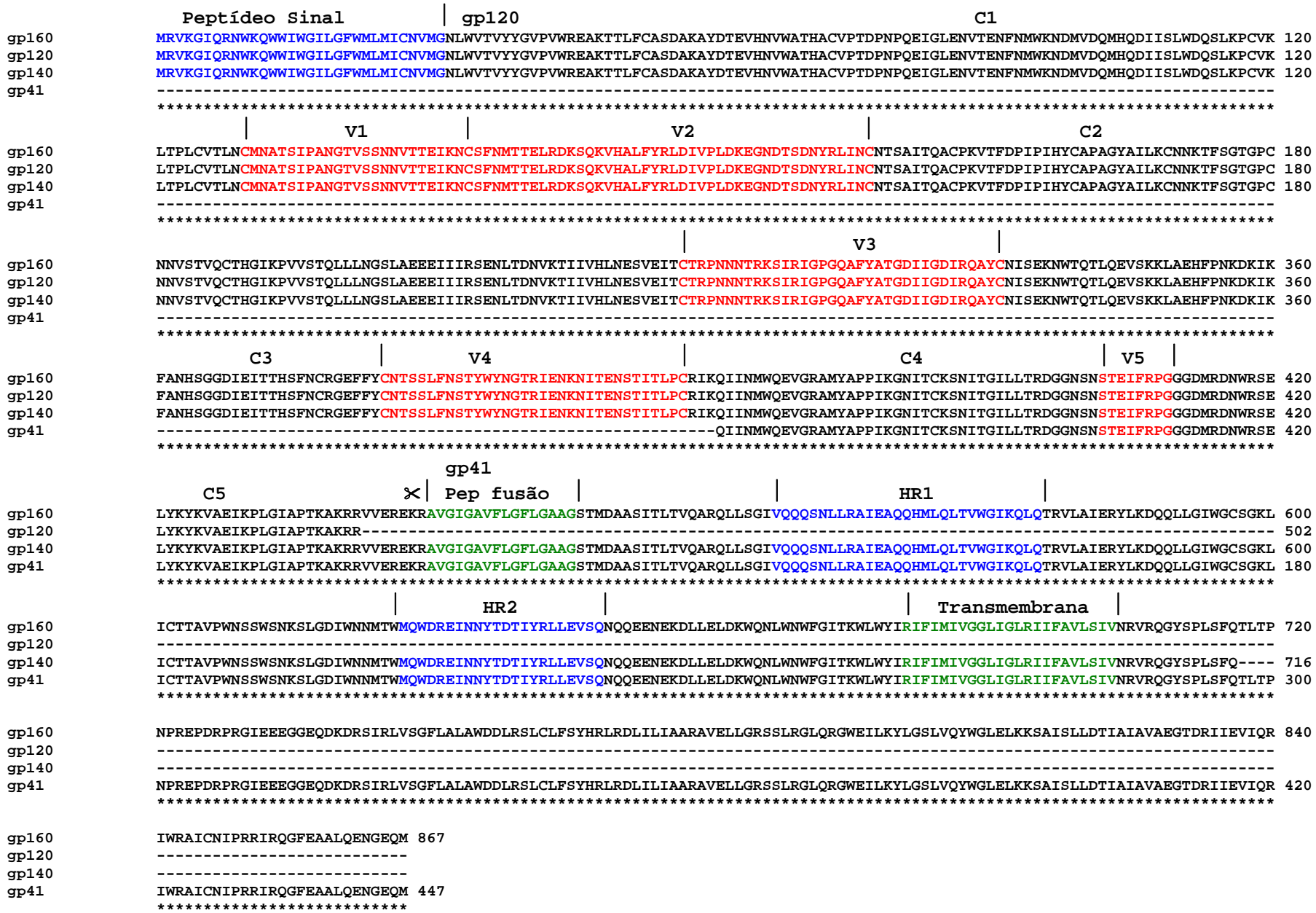


Figura 22. Alinhamento das seqüências de resíduos aminoácidos preditos para as construções recombinantes de env obtidas a partir da amostra 116/00. O mapa topológico das principais regiões é baseado na anotação do banco UniProtKB/Swiss-Prot para a linhagem de referência HXB2 (nº de entrada P04578).

Mais de 14 receptores de quimiocinas e outras moléculas estruturalmente relacionadas, acopladas a proteína G, foram identificadas *in vitro* como co-receptores utilizados pelo HIV como ponte de entrada na célula hospedeira (revisito por Koning *et al.*, 2003). Os mais utilizados são CCR5, em macrófagos, e CXCR4 em linfócitos T, sendo denominados R5 os isolados virais que usam CCR5 e X4 os que usam CXCR4, ou ainda X4R5 os que usam os dois.

A forma clássica de determinação de qual é o co-receptor utilizado por um isolado viral é por meio de linhagens de células que naturalmente não possuem o receptor (CD4) e nenhum dos co-receptores. Essas são transfectadas com CD4 e com um dos co-receptores em questão. A entrada, e subsequente replicação o vírus nessas células, indica que co-receptor foi utilizado pelo isolado viral. Outra forma de determinação do co-receptor são os ensaios de fusão célula-célula, nos quais se monitora a fusão entre uma linhagem de células expressando CD4 e um dos co-receptores com uma segunda linhagem expressando a gp120 (Edinger *et al.*, 1998).

É crescente o esforço no sentido de se mapear resíduos e motivos protéicos que teriam participação na determinação do co-receptor usado. Há muito já se aponta um papel importante para a alça V3 da gp120 influenciando o tropismo viral (Shioda *et al.*, 1991, Shimizu *et al.*, 1999; Verrier *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2000), sendo que a substituição de poucos resíduos de aminoácido leva à troca do co-receptor usado.

Inúmeros trabalhos vêm mostrando o que parece ser o predomínio do uso de CCR5 por isolados virais do subtipo C (Tscherning *et al.*, 1998; Zhang *et al.* 1998; Cilliers *et al.*, 2003; Pollakis *et al.*, 2004), sendo que alguns resíduos de aminoácidos e motivos protéicos têm papel de destaque. O resíduo R298 na alça V3 é altamente conservado entre isolados R5 e X4 e é importante para a ligação ao co-receptor, mas não para sua determinação (Wang *et al.*, 1998 e 1999). A mutação do motivo IKQ (420-422) e do resíduo G441, ambos na região C4, revelou que estes resíduos de aminoácidos são importantes para a ligação a CCR5 (Rizzuto *et al.*, 1998 e 2000). Outro motivo protéico apontado como importante em V3 é o GPG (317-319) (Xiao *et al.*, 1998 e Hu *et al.*, 2000). Hoffman e colaboradores. (2002) também apontam o resíduo R432, na região C4 da gp120, como fundamental para a utilização de CCR5.

DOMÍNIO→	... V3 C3 C4 C5 ...
	↙298* ↘317-319	368 ↘ ↙370	420-422 ↘ 427 ↘ 430 ↓ ↘432 ↓438 ↘440	↙503 ↘511
gp160.116.00	ESVEITCT RP NNNTRKSIRIG PG QAFYAT	KFANHSGG DI EITTHSFNCR	LPCR IKQ IINM Q EVGRAMYAP PIK GNITC	APT KAKRRVVEREK RAVG
C.BR.92.BR025-d	-----N-----	---K---L-----	I-----G-----E-IL--	-----
C.IN.93.93IN101	Q---V-----T---	---SS---L-----	I-----A-----	---A-----
C.IN.93.93IN9999	Q---E-V-----E-----T---	---PS---L-----	I-----A-----	-----V---
C.IN.93.93IN904	Q--Q-V-----T---	---DSP---L-----	I-----E-----	---T-----
C.IN.93.93IN905	Q---V-----T---	---PS---L-----	I-----E-----	V--E-----
C.ZA.98.TV001B	---N-----V-----	---EP-A---L---M----	-Q-K---VR--G-Q---A----	-----Q-K----
C.ZA.98.TV002	--I--K---G---V-----	---P---L---G-----	-Q-----R-----A----	---A-----
C.ZA.98.TV003	-----V-----T---	---EPS---L-----G	-----R-----A----	---G-----
C.ZA.98.TV004	--I--R-----T---	---EPS---L-----	I-----VA-----	---N-----
C.ZA.98.TV006A	-----V---G---Q---T---	---P---L---M-----	-----V---G---I---A----	---N-----T
C.ZA.98.TV006B	-----V---G---Q---T---	---P---L---M-----	-----V---G---I---A----	---N-----T
C.ZA.98.TV006C	-----V---G---Q---T---	---P---L---M-----	-----V---G---I---A----	---N-----T
C.ZA.98.TV007A	--I--R-P--H--R-----	---P---L-----	-----V---G---I---A----	---T---A---A---
C.ZA.98.TV008A	--IR-M-----T-F--	T-RPS---L-----	-----A-----	---A-----
C.ZA.98.TV008B	--IR-V-----T-F--	T-RPS---L-----	-----TA-----	---A-----
C.ZA.98.TV010	Q-I--V-----V-----T---	T-KP---P-----I-S	-----G-----A----	---T-----
C.ZA.98.TV012A	-----M-----T---	---NSS---L-----G	-QY--R---G---A-----	-----A.
C.ZA.98.TV013A	Q--K-V-----R-----TN	--EP---L-----	-----F-----A----	---E-----
C.ZA.98.TV013B	Q--K-V-----R-----TN	-LEP---L-----	-----F-----A----	---E-----
C.ZA.98.TV014B	K---V---G---V---T---	E-KPS---L-----	--K---G---L---A----	---E-----
C.ZA.98.TV019	--IA-M---G-----F--	R--PP---L-----G	-----	---G-----
C.ZA.98.TV001	---N-----V-----	--EP-A---L---M----	-Q-K---VR--G-Q---A----	-----Q-K----
C.ZA.98.98TV002	--I--K---G---V-----	---P---L---G-----	-Q-----A-----	---A-----
C.ZA.99.DU151	K---V-----T---	E-KPP---L-V-----	--K-----K-----E----	---S-----
C.ZA.99.DU422	K---K-----V-----T---	--EPS---L-V-----	-----E-----	---S--K--G-----
C.ZA.98.CTSC2	-AI--N---G-----	---PS---L-----G	-Q---F-----A----	-----
C.ZA.98.98ZA502	K---V---H---V-----	E-KPS---L-----	-Q---VV---T-----E----	-----
C.ZA.98.98ZA528	KNIS---I--G---Q---T-F--	---PP-----	-----Q-----A----	-----
C.MW.93.93MW_965	-----V-----V-----T---	E-KPS---L-----	-----G-----A----	---G-----
C.IN.94.94IN_20635_4	---D-V-----T---	---SS---L-----	I-----T-----	---A-----
C.SO.89.89SM_145	Q---R---YA-----V---TN	---EPS---L-----	-Q-----Q-----	---G-----
C.SN.90.90SE_364	--I--V-A-----M-----T---	S-EPS---L-----	IQ-----G---I---A----	-----
C.ET.02.02ET_288	-P--N-----Q---T---	L--PS---L-----	I-----I-----	---G---A---G---AL
C.DJ.91.DJ259A	---A-N-----E-----T---	T-QPS---L-----G	-Q-----I-----	-----G---AL

Figura 23. Alinhamento das seqüências de aminoácidos preditos de várias regiões da gp120 da construção recombinante de *env* da amostra 116/00, juntamente com seqüências de vários isolados que utilizam CCR5 como co-receptor. Em vermelho: resíduos de aminoácidos importantes para ligação a CD4. Em azul: resíduos de aminoácidos importantes para ligação a CCR5. Em laranja: motivos protéicos relacionados aos sítios de clivagem. * A numeração dos resíduos é de acordo com a linhagem de referência HXB2 (GenBank K03455) que consta no *HIV Sequence Compendium* (2005).

As seqüências presentes no alinhamento da (Figura 23) foram especialmente escolhidas no banco de dados de Los Alamos, uma vez que esses isolados virais utilizam CCR5 como co-receptor. Os resíduos de aminoácidos acima citados apresentam-se com um alto grau de conservação em todas as seqüências, com destaque principalmente para o motivo GPG (317-319) na alça V3 e o resíduo G441 da região C4, presentes em todas. O resultado deste alinhamento, juntamente com os dados dos trabalhos acima citados, nos dão indícios de que o co-receptor CCR5 é o utilizado pelo isolado viral da amostra 116/00. Isto, no entanto, não descarta a necessidade da confirmação por abordagens experimentais, como o ensaio de fusão célula-célula, tão logo as construções recombinantes sejam expressas.

Segundo Moulard & Decroly (2000), dentre as proteases celulares, as pro-proteína convertases (PC), envolvidas na maturação endoproteolítica de hormônios em mamíferos, são as principais candidatas para a clivagem de gp160. Destaca-se a furina, uma serino-protease predominantemente localizada no complexo de Golgi, com ampla distribuição em diversos tipos de tecidos.

A clivagem da gp160 ocorre imediatamente após um grupo de resíduos de aminoácidos básicos na posição 511, especificamente após a seqüência REKR₅₁₁↓, que é altamente conservada e está incluída em um dos domínios mais conservados de gp120, o C5. Mutagênese sítio-dirigida no ponto de clivagem, juntamente com análises de *western blot* dos produtos de processamento da gp160, mostraram que a seqüência mínima para clivagem é K/RXK/RR↓ (Bosch & Pawlita, 1990). Um segundo sítio de clivagem é predito, localizado 8 resíduos de aminoácidos a montante do primeiro sítio, na posição R503 (KAKR₅₀₃↓RVVQREKR₅₁₁↓). A substituição dos resíduos básicos, no segundo sítio, por resíduos neutros diminui a eficiência de processamento de gp160, sugerindo um papel do segundo sítio no sentido de facilitar o acesso da protease ao primeiro sítio (Bosch & Pawlita, 1990). Dados de difração circular e espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) indicam que as regiões próximas ao sítio de clivagem favorecem a formação de uma alça que serve de ponto de ancoragem para a protease (Moulard *et al.*, 1998). O processamento proteolítico no segundo sítio gera uma gp41 com uma porção polar antes do peptídeo de fusão, o que atrapalha sua inserção na membrana da célula hospedeira. Essas espécies alternativas de gp41 representam cerca de 15% da população

total de gp41 formada (Fenouillet & Gluckman, 1992). Tanto o primeiro, quanto o segundo sítio de clivagem, foram evidenciados nas nossas construções recombinantes de *env*, estando de acordo com os consensos identificados (Figura 23).

7. - AMPLIFICAÇÃO E ACOPLAGEM DO PEPTÍDEO SINAL NA GP41

Com o seqüenciamento da gp120 foi possível fazer a predição do peptídeo sinal. Conforme revisto por Martoglio & Dobberstein (1998) os peptídeos sinais variam, em tamanho, de 15 a mais de 50 resíduos de aminoácidos. Topologicamente, um peptídeo sinal conta com um pequeno núcleo de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (região *h*), que é flanqueada na porção C-terminal por uma região polar (região *c*). A região *c* possui pequenos resíduos não-carregados nas posições -3 e -1, relativas ao sítio de clivagem da peptidase sinal. Por fim, a região *h* é flaqueada, na porção N-terminal, por uma região composta por resíduos neutros e polares (região *n*) (Figura 24A).

Como exemplo, temos *env* da linhagem de referência HXB2 (GenBank K03455, subtipo B). Segundo a anotação do banco UniProtKB/Swiss-Prot (nº de entrada P04578), a gp160 possui um peptídeo sinal de 30 resíduos de aminoácidos, sendo os resíduos das posições -3 e -1, respectivamente uma cisteína (resíduo pequeno e polar não-carregado) e uma alanina (resíduo pequeno e apolar), antecidos por uma série de resíduos hidrofóbicos (região *h*) (Figura 24B).



Figura 24. **A:** Estrutura topológica de um peptídeo sinal. **B:** Peptídeo sinal de *env* da linhagem HXB2 de HIV-1. SPase = peptidase sinal. Adaptado de Martoglio & Dobberstein (1998).

Devido a falta de uma base mais próxima de comparação e determinação do peptídeo sinal das nossas construções recombinantes, isto é, a falta de seqüências de HIV-1 subtipo C depositadas e anotadas em bancos de dados de proteínas, decidiu-se fazer a predição do peptídeo sinal por meio do programa SignalP 3.0 (Bendtsen *et. al.*, 2004) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

O programa trabalha com dois tipos de algoritmos: NN (*Neural Networks*) e HMM (*Hidden Markov Models*). Os algoritmos de NN atribuem 3 tipos de valores para cada resíduo de aminoácido da seqüência submetida. O primeiro valor, o valor **S**, corresponde à probabilidade do resíduo em questão pertencer a um peptídeo sinal. O segundo valor, o **C**, corresponde à probabilidade do resíduo ser o sítio de clivagem e o último valor, o **Y**, é derivado das informações de **S** e **C** cruzadas, resultando na predição mais precisa do sítio de clivagem do que o valor de **C** sozinho. Os dados referentes aos 3 valores são plotados em um gráfico. Neste programa, os algoritmos de HMM também trabalham em cima dos valores de **S** e **C** e calculam a probabilidade de cada resíduo de aminoácido de pertencer às regiões **n**, **h** ou **c**.

A Figura 25 mostra os gráficos da predição do peptídeo sinal da gp120. Segundo as duas metodologias (NN e HMM) o peptídeo sinal para a amostra 116/00 compreende os 31 primeiros resíduos de aminoácidos, sendo o sítio de clivagem predito como VMG-N, contando na posição -3 com uma valina e, na posição -1, com uma glicina, ambos resíduos pequenos e apolares.

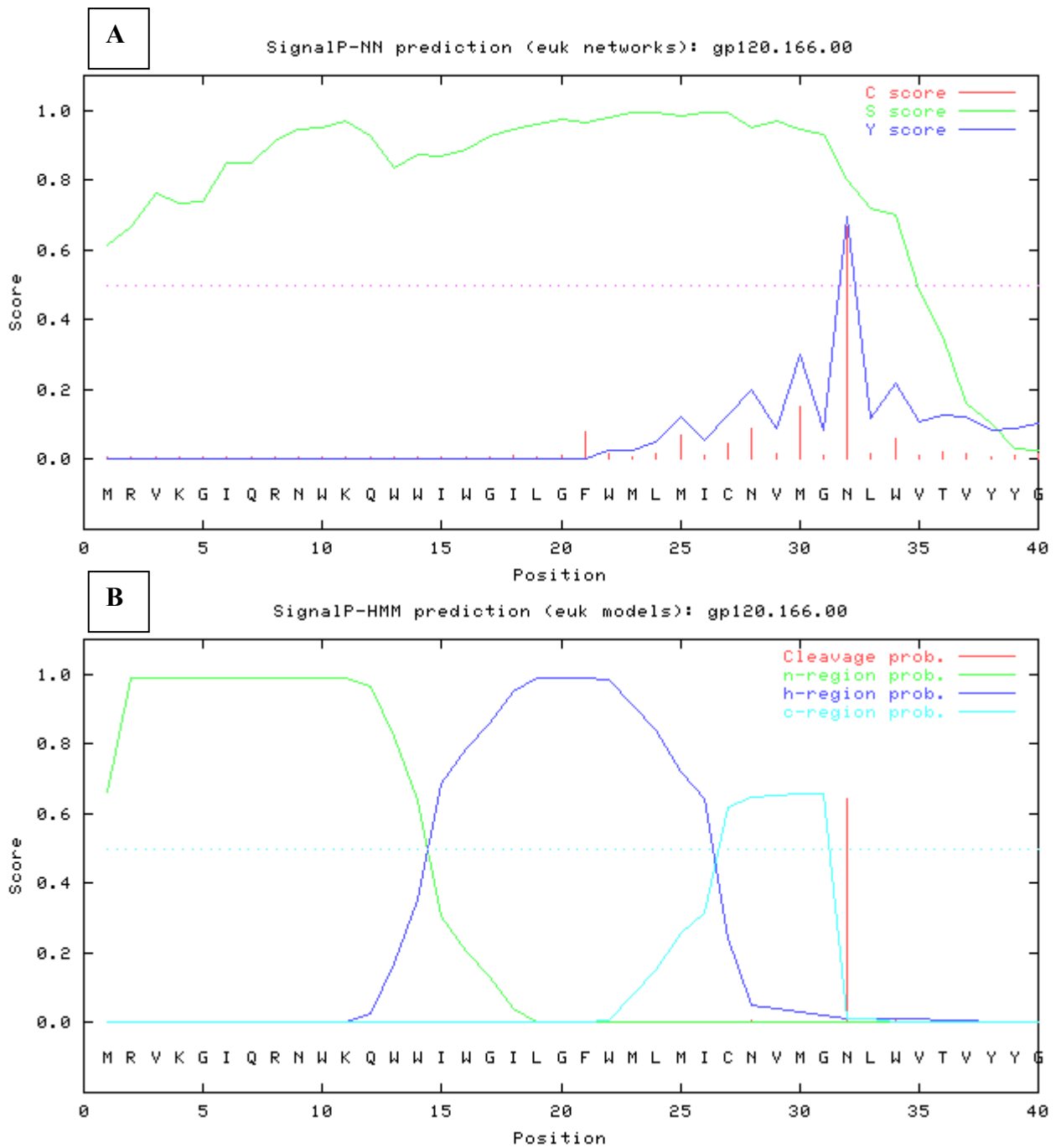


Figura 25. Predição do peptídeo sinal para a gp120 da amostra 166/00, segundo o programa SignalP 3.0. **A:** gráfico da predição segundo a metodologia de NN (*Neural Networks*) **B:** gráfico da predição segundo a metodologia HMM (*Hidden Markov Models*).

Após a determinação do peptídeo sinal, o passo seguinte consistiu em uma PCR de sobreposição para o acoplamento da região codificadora do peptídeo sinal da gp120, na gp41. A construção de uma versão recombinante da gp41 contando com seu próprio peptídeo sinal é interessante porque permite a expressão da gp120 e da gp41 sem a necessidade da clivagem de um precursor por proteases celulares, além de permitir a expressão da gp41 independentemente da gp120.

A estratégia de acoplagem, conforme esquematizada na Figura 26C consistiu em 3 etapas. Para a primeira etapa, o iniciador PSLOWER foi desenhado de modo que, junto com o iniciador UGP120, permitisse em uma PCR simples a amplificação da região codificadora do peptídeo sinal da gp120, gerando um fragmento de 112 pb (Figura 26A, poço 1). Esse fragmento é correspondente à região codificadora dos 32 primeiros resíduos de aminoácidos, conforme predito anteriormente. Como molde para esta primeira PCR, foi utilizado o fragmento da gp120 clonado no pGEM[®]-T Easy (Promega). A segunda etapa também consistiu em uma PCR simples para amplificação, a partir do fragmento da gp41 clonado no pGEM[®]-T Easy (Promega) de um fragmento de 1095 pb (Figura 26A, poço 2), utilizando-se o par de iniciadores UGP41/LGP41. O iniciador UGP41 possui, no seu início, uma região complementar aos 21 pb do iniciador PSLOWER, permitindo, na terceira etapa, a realização de PCR de sobreposição com os dois fragmentos acima amplificados. O iniciador LGP160, por sua vez, foi desenhado de modo a suprimir o códon de terminação da gp41.

A PCR de sobreposição foi realizada com os iniciadores UGP120/LGP160 usando uma *Taq* polimerase de alta fidelidade (*Platinum[®] Taq DNA Polimerase High Fidelity* da Invitrogen), gerando um fragmento de 1186 pb (Figura 26B, poço 1), correspondente à seqüência de gp41 com a região do peptídeo sinal acoplada.

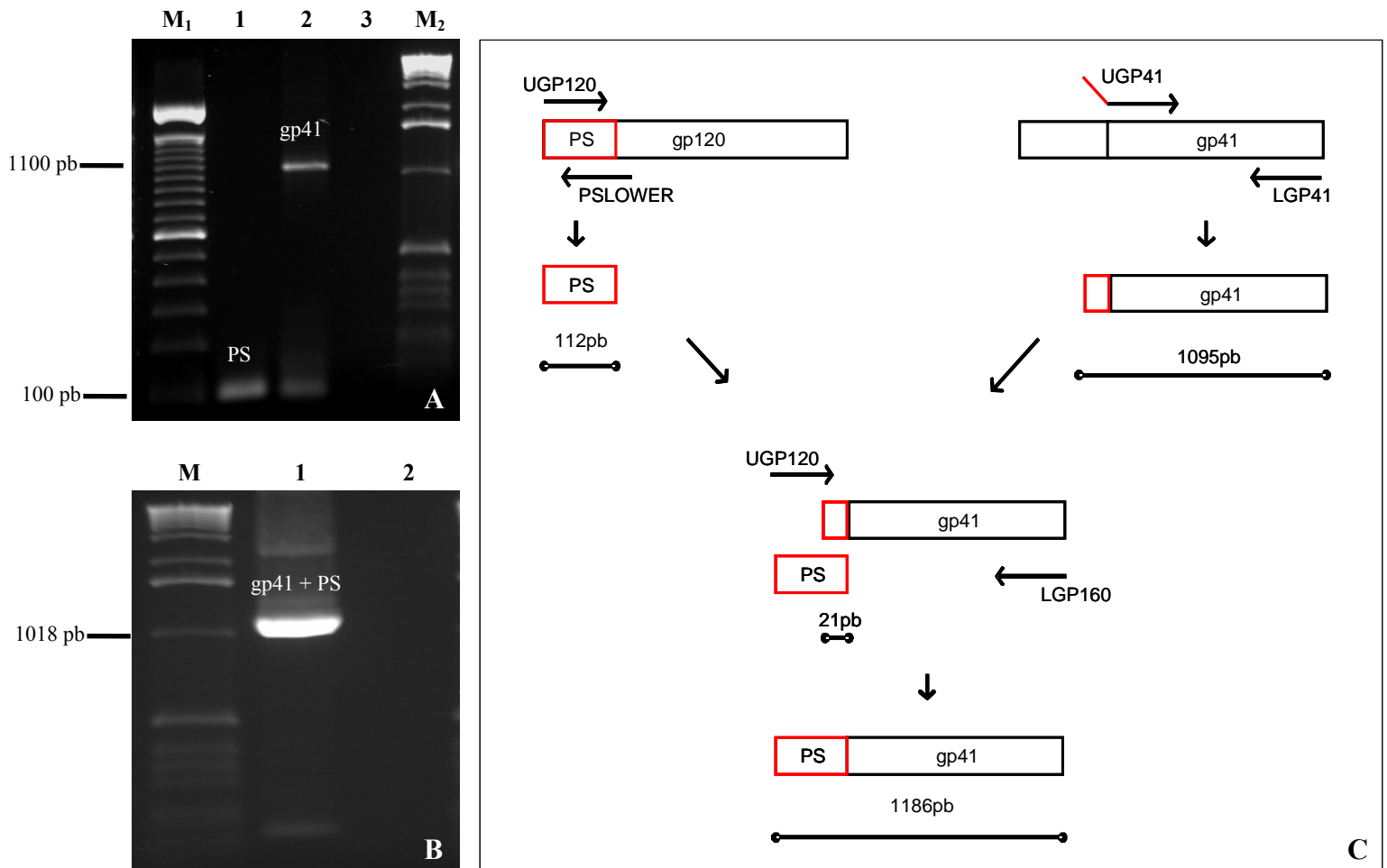


Figura 26. PCR de sobreposição para o acoplamento da região codante do peptídeo sinal de HIV à sequência gênica de gp41. **A.** Análise eletroforética em gel de agarose a 1,0%, corado com brometo de etídeo a 0,5 μ g/mL dos produtos de amplificação obtidos a partir da gp120 e gp 41 clonados. **M₁**: 100bp DNA Ladder (Invitrogen). **M₂**:1kb DNA Ladder (Invitrogen). **Poço 1**: Produto de amplificação do peptídeo sinal (PS), iniciadores: UGP120/PSLOWER. **Poço2**: Produto de amplificação da gp41 contendo uma porção de 21 pb complementar à PSLOWER, iniciadores: UGP41/LGP41. **Poço 3**: Controle negativo sem DNA. **B.** Análise eletroforética em gel de agarose a 1,0%, corado com brometo de etídeo a 0,5 μ g/mL do produto de amplificação obtido a partir anelamento de PS e gp41. **M**: 1kb DNA Ladder (Invitrogen). **Poço 1**: Produto de amplificação da gp41 com peptídeo sinal (gp41+PS), iniciadores: UGP120/LGP160. **Poço 2**: Controle negativo sem DNA. **C.** Diagrama esquemático da estratégia de acoplamento do peptídeo sinal de HIV à gp41 por PCR de sobreposição.

8 SUBCLONAGEM DA GP160, GP140, GP120 E GP41PS EM VETOR DE EXPRESSÃO PARA CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Os fragmentos gênicos relativos a gp160, gp140, gp120, previamente clonados no pGEM[®]-T Easy (Promega), foram re-amplificados com a polimerase *Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen) e, juntamente com o fragmento correspondente à gp41 com o peptídeo sinal foram clonados no vetor de expressão pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen). Os sistemas de ligação foram transformados em células de *E. coli* da linhagem TOP-10. A confirmação da clonagem dos insertos foi feita por PCR com os iniciadores T7 e BGHr.

Com o seqüenciamento das construções recombinantes foi possível determinar o perfil de restrição de cada uma e, com isso, fazer a seleção dos clones bacterianos cujos DNAs plasmidiais possuíam os insertos na orientação correta.

Foram escolhidas endonucleases que cortassem, simultaneamente o vetor e o inserto em apenas um sítio. As construções denominadas como pcDNA3.1/HIS/120, pcDNA3.1/HIS/160 e pcDNA3.1/HIS/140 foram digeridas com *Bgl* II, liberando, na orientação correta fragmentos de aproximadamente 1777 pb. Já os DNAs dos clones transformantes para a construção pcDNA3.1/HIS/41PS foram digeridos com *Nde* I, sendo confirmada a orientação correta caso fosse liberado um fragmento de aproximadamente 727 pb (Figura 27). Foi escolhido um clone de cada construção para ser seqüenciado, de modo a confirmar estar o inserto em fase com o vetor.

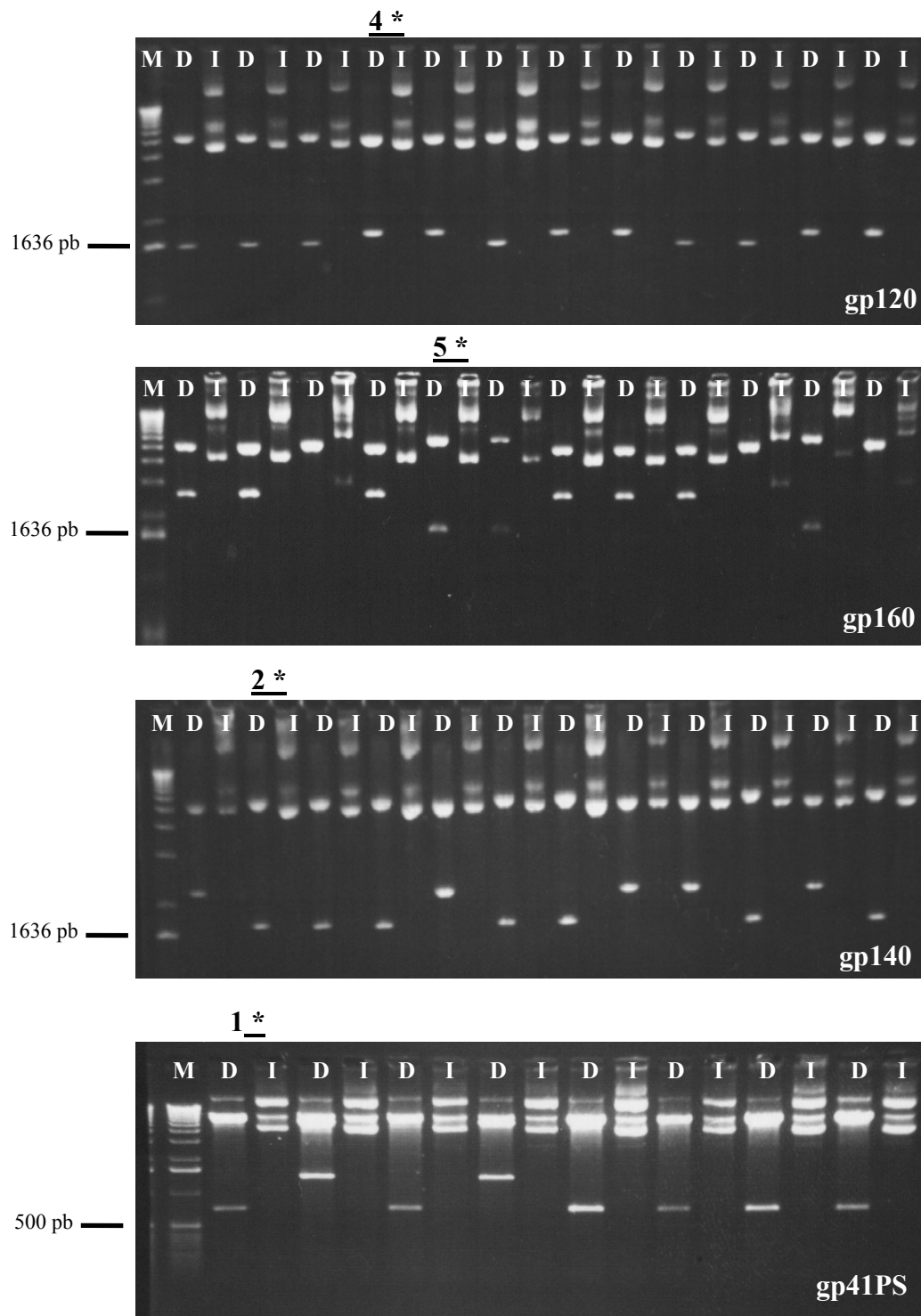


Figura 27. Subclonagem dos fragmentos recombinantes de *env* no vetor pcDNA3.1/V5-His-TOPO. Análise eletroforética em géis de agarose a 1,0%, corados com brometo de etídeo a 0,5µg/mL dos perfis de restrição dos DNA plasmidiais dos clones transformantes de *E. coli*, após clivagem com *Bgl* II (gp120, gp160 e gp140) ou *Nde* I (gp41PS). **M**: 1 kb DNA Ladder (Invitrogen), **D**: plamídeos digeridos, **I**: plamídeos intactos. Os números seguidos dos asteriscos indicam os clones escolhidos para seqüenciamento.

Enquanto eram seqüenciadas as construções relativas as subclonagens, foram realizadas preparações de DNA plasmidial em larga escala para obtenção de material em grande quantidade para as transfecções transientes.

Uma transfecção preliminar (em triplicata) foi feita em CHO-K1 com lipofectamina com as seguintes construções:

- 1- pcDNA3.1/HIS/*lacZ*, denominado de sistema LAC, funcionado como controle positivo, tanto na análise por histoquímica enzimática da eficiência de transfecção, quanto nos ensaios de ELISA e *Western Blotting*, para detecção das proteínas recombinantes;
- 2- pcDNA3.1/HIS/120, pcDNA3.1/HIS/160, pcDNA3.1/HIS/140 e pcDNA3.1/HIS/41PS, denominados respectivamente GP120, GP160, GP140 e GP41PS, transfectados isoladamente;
- 3- Sistema de co-transfecção GP120+GP41PS (1:1).

Quarenta e oito horas após a transfecção, foi feita a coleta dos sobrenadantes de cultura e a preparação dos extratos protéicos totais das células transfectadas, para posterior detecção das proteínas recombinantes por ELISA indireto e *Western Blotting* (WB). A análise da histoquímica enzimática para o sistema LAC mostrou uma eficiência de transfecção muito baixa, média menor que 5%, não sendo detectada a β -galactosidase pelos ensaios de ELISA, nem WB. Também não foi possível detectar as construções recombinantes de *env*.

O seqüenciamento das construções moleculares não evidenciou a presença de erros, estando os insertos em fase com o vetor de expressão. Isso descartou a hipótese de que pudessem existir erros que inviabilizassem expressão dos produtos recombinantes.

Como a eficiência de transfecção com o vetor de expressão foi muito baixa, isto nos leva a crer que as quantidades das proteínas recombinantes também o foram, inviabilizando a sua detecção.

A baixa eficiência de transfecção de CHO dos vetores de expressão pode ser devida a problemas de qualidade do lote de lipofectamina utilizado, uma vez que o controle positivo, a expressão da β -galactosidase, apresentou uma eficiência muito pequena (<5%), bem inferior à média de 42% de eficiência de transfecção de CHO, cujo o lote de

lipofectamina é diferente (Figura 15A). O teste das transfecções por co-precipitação com fosfato de cálcio representa uma alternativa interessante, uma vez que, devido ao seu baixo custo é possível a realização de transfecções em escalas maiores, alterando-se algumas variáveis como, por exemplo, a quantidade de células e de DNA utilizados, assim como a realização de choques osmóticos.

Adicionalmente, existe a expressão do envelope viral de HIV-1, em células CHO, utilizando-se peptídeos sinais de outras proteínas que não do próprio HIV. Jeffs e colaboradores (2004) e Jeffs e colaboradores (2006) utilizaram o peptídeo sinal do ativador do plasminogênio tecidual humano (htPA). A utilização de um peptídeo sinal diferente é visto como um potencializador da expressão. Em CHO, especula-se que os mRNAs codificando *env* contendo a seqüência selvagem do peptídeo sinal de HIV estariam dependentes da presença da proteína viral Rev para o seu transporte do núcleo para o citoplasma da célula, como naturalmente ocorre em um célula infectada pelo HIV. Os transcritos virais de *gag*, *pol* e *env* possuem em suas seqüências o elemento RRE (*rev response element*), ao qual se liga Rev. Desta forma, uma alternativa de otimização da produção do envelope viral de HIV-1 em células CHO é a troca do peptídeo sinal ou a co-expressão das construções recombinantes de *env* juntamente com *rev*. Outra alternativa é o teste de outra hospedeira de expressão como HSG, ou ainda a linhagem de fibroblastos de rim de macaco verde, COS-7. Perales e colaboradores (2005) utilizaram as células COS-7 para a co-expressão de *env* (com o peptídeo sinal do próprio HIV) juntamente com *rev*, não sendo verificada diferença na produção das glicoproteínas do envelope quando *env* é expresso na ausência de *rev*.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

CONCLUSÕES

O presente estudo apontou as células HSG como um bom sistema alternativo para a expressão de proteínas heterólogas em comparação às tradicionalmente empregadas células CHO-K1. A expressão de anticorpos em cultura mostrou-se como um bom sistema repórter para a avaliação de células hospedeiras para produção de proteínas secretadas. A transfecção por co-precipitação com fosfato de cálcio nas células HSG mostrou-se a melhor metodologia para transferência de DNA exógeno, sendo ainda necessários alguns ajustes, uma vez que os choques osmóticos com glicerol e DMSO mostraram-se tóxicos da forma como foram executados.

Foram amplificados e clonados no vetor de expressão para células de mamíferos os segmentos gênicos correspondentes a 4 versões recombinantes das glicoproteínas do envelope viral de HIV-1(gp160, gp140 gp120 e gp41+PS), subtipo C, que provavelmente, de acordo com as nossas análises, utilizam CCR5 como co-receptor. Ainda não foi possível a detecção das glicoproteínas recombinantes, expressas de forma transiente em células CHO-K1, sendo necessários ajustes principalmente na etapa de transfecção.

PERSPECTIVAS

- Estabelecer as condições de concentração e de tempo de tratamento mais adequadas para realização dos choques osmóticos com glicerol e DMSO, visando a otimização dos protocolos de transfecção;
- Testar o potencial das células HSG para produção de proteínas recombinantes usando vetores que contenham com marcas seletivas, visando a obtenção transfectomas estáveis;
- Testar transfecção por co-precipitação com fosfato de cálcio nas células CHO e HSG dos sistemas GP120, GP160, GP140 e GP41PS, variando-se a concentração de DNA e a quantidade de células;
- Promover a construção de outras versões recombinantes das glicoproteínas de HIV-1, como por exemplo, versões gp140 sem o domínio transmembrana da gp41 e/ou

com o sítio de clivagem mutado ou ainda com pontes dissulfeto, para melhor estabilizar a interação gp120 e gp41;

- Promover a troca do peptídeo sinal ou realizar a co-expressão das construções recombinantes de *env* juntamente com *rev*;
- Uma vez eficientemente expressas as versões recombinantes das glicoproteínas de HIV-1, testar a capacidade de reconhecimento do envelope glicoprotéico recombinante por meio dos fragmentos de anticorpos (forma Fab) selecionados por Albuquerque (2005),
- Avaliar a capacidade dos mesmos Fabs em neutralizar o processo de fusão das membranas das células expressando o complexo glicoprotéico e células expressando CD4 e os co-receptores.
- Utilizar as células expressando o complexo glicoprotéico viral recombinante para a seleção de outros anticorpos a partir da biblioteca fragmentos de anticorpos humanos (forma Fab) apresentados na superfície de fagos filamentosos, construída por Dantas-Barbosa e colaboradores (2005).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H. & POBER, J. S. (2002). *Imunologia Celular e Molecular*. Ed Revinter, Brasil, 486pp.
- ABUL-HASSAN, K.; WALMSLEY, R. & BOULTON, M.(2000). Optimization of non-viral gene transfer to human primary retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res.*20(5):361-6.
- AFRAMIAN, D. J.; CUKIERMAN. E.; NIKOLOVSKI, M. S.; MOONEY D. J.; YAMADA, K. M. & BAUM, D. M. D.(2000) The growth and morphological behavior of salivary epithelial cells on matrix protein-coated biodegradable substrata. *Tissue Engineering*, 6(3): 209-216.
- ALBUQUERQUE, F. C. (2005). Isolamento de fragmentos de anticorpos humanos anti-peptídeos derivados da proteína gp41 de HIV-1 a partir de um biblioteca de Fab apresentada na superfície de fagos filamentosos. 99p Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular). Universidade de Brasília
- ARBABI-GHAHROUDI, M.; TANHA, J. & MACKENZIE, R. (2005). Procariotic expression antibodies. *Cancer Meta. Rev.* 24:501-519.
- ASSELBERG, F. A. M & WIDMER, R. (1995). Use of Escherichia coli chromosomal DHFR gene as selection mark in mammalian cells. *J. Biotechnol.* 43: 133-138.
- ATSUMI, T.; IWAKURA, I.; FUJISAWA, I, & UEHA, T.(2001) Reactive oxygen species generation and photo-cytotoxicity of eugenol in solutions of various pH. *Biomaterials*, 22: 1459-1466.
- BÄR, S. & ALIZON M. (2004). Role of the ectodomain of the gp41 transmembrane envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 in late steps of the membrane fusion process. *J Virol.* 78(2):811-820.
- BARBAS, C. F.; BJÖRLING, E.; CHIODI, F.; DUNLOP, N.; CABABA, D.; JONES, T., M.; ZEBEDEE, S.L.; PERSSON, M., M., A.; NARA, P., L.; NORBY, E. & BURTON, D. R. (1992). Recombinant human Fab fragments neutralize human type 1 immunodeficiency virus *in vitro*. *PNAS.* 89: 9939-9943.
- BARRE-SINOUSSE, F.; CHERMANN, J. C.; REY, F.; NUGEYRE, M. T.; CHAMARET, S.; GRUEST, J.; DAUGUET, C.; AXLER-BLIN, C.; VEZINET-BRUN. F.;

- ROUZIOUX, C.; ROZENBAUM, W. & MONTAGNIER, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*.220:868-71.
- BATARD, P. JORDAN, M. & WURM, F.(2001). Transfer of high copy number plasmid into mammalian cells by calcium phosphate transfection. *Gene* . 270:61-68.
- BENDTSEN, J. D.; NIELSEN, H.; VON HEIJNE, G. & BRUNAK, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*. 340(4):783-95.
- BILLCH, A. (2004). AIDSVAX VaxGen. *Curr Opin Investig Drugs*.5 (2):214-21
- BIRNBOIM, H.C. & DOLY, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 7(6):1513-23.
- BOSCH,V. & PAWLITA, M. (1990). Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type Ienv gene product proteolytic cleavage site. *J. Virol*. 64 (5): 2337-2344.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2004). Recomendações para terapia anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/>.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2005). Boletim Epidemiológico - Aids e DST. Ano I - nº 1 - 01ª - 26ª de 2004 - semanas epidemiológicas. Janeiro a Junho de 2004. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/>.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - PROGRAMA NACIONAL DE DST E AIDS. (2005). <http://www.aids.gov.br/>. Acessado em: Jul/2005.
- BRIGIDO, M., M. & MARANHÃO, A. Q. (2002). Bibliotecas apresentadas em fagos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 26:44-51.
- BURTON, D.R.B.; DESROSIERS, R. C.; DOMS, R. W.; KOFF, W. C.; KWONG, P. D.; MOORE, J. P.; NABEL, G.J.; SODROSKI, J.; WILSON, I. A. & WYATT, R. T. (2004). HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nature Immunology*. 5(3): 233 -236.
- BUTLER. M. (2005). Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Appl Microbiol Biotechnol*. 68: 283-291.

- CAMPOS-DA-PAZ, M. (2005). Citotoxicidade induzida pelo extrato de *Pteridium aquilinum* sobre células HSG e OSCC. 90p Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular). Universidade de Brasília
- CAO, H. (2004). Expression, purification, and biochemical characterization of the antiinflammatory tristetraprolin. A zinc-dependent mRNA binding protein affected by posttranslational modifications. *Biochemistry*. 43(43):13724-13738.
- CERQUEIRA, D. M.; AMORIM, R. M. S.; SILVA, R. R.; CAMARA, G. N. L.; BRÍGIDO, M. M. & MARTINS, C. R. F.(2004). Antiretroviral resistance and genetic diversity of human immunodeficiency virus type 1 isolates from the Federal District, Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 99(8): 877-882.
- CHAN, D. C.; FASS, D.; BERGER, J. M. & KIM, P.S. (1997). Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell*. 89(2):263-273.
- CHECK, E. (2003). Back to 'plan A'. *Nature*. 423: 912-914.
- CILLIERS, T.; NHLAPO, J.; COETZER, M.; ORLOVIC, D.;KETAS, T.; OLSON, W. C.; MOORE, J. P.; TRKOLA, A. & MORRIS, L.(2003). The CCR5 and CXCR4 Coreceptors are both used by human immunodeficiency virus type 1 primary isolates from subtype C. *J. Virol*. 77(7):4449-4456.
- COLMAN, P.M. & LAWRENCE, M. C.(2003). The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4(4):309-319.
- COLOMA, M. J.; CLIFT, A.; WIMS, L. & MORRISON, S. L. (2000). The role of carbohydrate in the assembly and function of polymeric IgG. *Mol Immunol*. 37:1081-1090.
- COUTO-FERNANDEZ, J. C.; SILVA-DE-JESUS, C.; VELOSO, V. G.; RACHID, M.; GRACIE, R. S.; CHEQUER-FERNANDEZ, S. L.; OLIVEIRA, S. M.; ARAKAKI-SANCHEZ, D.; CHEQUER, P. J. & MORGADO, M. G. (2005). Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: assessing subtype and drug-resistance associated mutations in HIV-1 infected individuals failing highly active antiretroviral therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.100(1):73-78.
- CSILAGG, C. (1994). HIV-1 subtype C in Brazil. *Lancet*.344: 1354.
- DANIELS, P. J.; GUSTAFSON, S. A.FRENCH, D.; WANG, Y.; DEPONT, W. & MACARTHUR, C.P. (2000). Interferon-mediated block in cell cycle and altered

integrin expression in a differentiated salivary gland cell line (HSG) cultured on matrigel. *J Interf Citok Res.* 20: 1101-1109.

- DANTAS-BARBOSA, C. (2005) Obtenção de anticorpos anti-osteossarcoma por meio de bibliotecas de Fab apresentados na superfície de fagos filamentosos. 167p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular). Universidade de Brasília
- DANTAS-BARBOSA, C.; BRÍGIDO, M. M. & MARANHÃO, A. Q. (2005) Construction of a human Fab phage display library from osteosarcoma patients antibody repertoire. *Genetic and Mol Res.* 4(2):126-140.
- DASS, C. R. (2004). Lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: factors affecting *in vivo* transfection. *J Mol Med.* 82:579-591.
- DE OLIVEIRA, T.; DEFORCHE, K.; CASSOL, S.; SALMINEN, M.; PARASKEVIS, D.; SEEBREGTS, C.; SNOECK, J.; VAN RENSBURG, E. J.; WENSING, A. M.; VAN DE VIJVER, D. A; BOUCHER, C. A.; CAMACHO, R.; & VANDAMME AM. (2005) An automated genotyping system for analysis of HIV-1 and other microbial sequences. *Bioinformatics.* 21(19):3797-3800.
- DEEKS, S. G. (2003) Treatment of antiretroviral-drug-resistant HIV-1 infection. *The Lancet.* 326: 2002-2011.
- DELWART, E. L.; HERRING, B.; LEARN JR., G. H.; RODRIGO, A.G.& MULLINS, J. I.; (2001). Heteroduplex mobility analysis HIV-1 *env* subtyping kit. Protocol version 3.1.
- DUMANS, A. T.; SOARES, M. A.; PIENIAZEK, D.; KALISH, M. L.; VROEY, V.; HERTOGS, K. & TANURI, A. (2002). Prevalence of protease and reverse transcriptase drug resistance mutations over time in drug-naïve human immunodeficiency virus type 1-individuals in Rio de Janeiro, Brazil. *Ant. Age. Chem.* 46(9):3075-3079.
- EAGLE, H.(1955). Nutrition needs of mammalian cells in tissues culture. *Science.* 122:501-504.
- EDINGER, A. L., HOFFMAN, T. L.; SHARRON, M.; LEE, M.;YI, Y.; CHOE, W.; KOLSON, D. L.; MITROVIC, B.; ZHOU, Y.; FAULDS, D.; COLLMAN, R.; HESSELGESSER, J.; HORUK, R. & DOMS.R. W. (1998). An orphan seven-transmembrane domain receptor expressed widely in the brain functions as a coreceptor

- for human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* 72:7934–7940.
- ENDERS, J. F.; WELLER, T. H. & ROBINS F.C. (1949). Cultivation of Lansing strains of poliomyelitis virus in cultures of various human embrionic tissues. *Science.* 109:85.
- ESPARZA, J. & BHAMARAPRAVATI, N. (2000) Accelerating the development and future availability of HIV-1 vaccines: why, when, where, and how? *Lancet* 355:2061–2066
- EWING, B. & GREEN P. (1998a). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 8(3):186-194.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C. & GREEN, P. (1998b). Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8(3):175-185.
- FALLAUX, F. J.; BOUT, A.; VAN DER VELDE, I.; VAN DEN WOLLENBERG, D. J.; HEHIR, K. M.; KEEGAN, J.; AUGER, C.; CRAMER, S. J.; VAN ORMONDT, H., VAN DER EB, A. J.; VALERIO D. & HOEBEN, R. C. (1998) New helper cells and matched early region1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replicant-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther.* 9(13): 1909-1917.
- FENG, Y.; BRODER, C. C.; KENNEDY, P. E. & BERGER, E. A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science.* 272:872-877.
- FENOUILLET, E. & GLUCKMAN, J. C. (1992). Immunological analysis of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein proteolytic cleavage. *Virology.* 187(2):825-828.
- FENOUILLET, E. & JONES, I. M. (1995). The glycosylation of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein (gp41) is important for the efficient intracellular transport of the envelope precursor gp160. *J Gen Virol.* 76(6):1509-1514.
- FIELDEN, M.L.; PERRIN, C.; KREMER, A.; BERGSMA, M.; STUART, M.C.; CAMILLERI, P & ENGBERTS, J. B. F. N. (2001) Sugar-based tertiary amino gemini surfactants with a vesicle-to-micelle transition in the endosomal pH range mediate efficient transfection *in vitro.* *Eur. J. Biochem:* 1269-1279.

- FINNEGAN, C. M.; BERG, W.; LEWIS, G. K. & DE VICO, A. L. (2002). Antigenic properties of the human immunodeficiency virus transmembrane glycoprotein during cell-cell fusion. *J. Virol.* 76(23): 12123-12134.
- FLINT, S. J.; ENQUIST, L. W.; RACANIELLO, V. R. & SKALKKA. (2004). Principles of virology. 2^aEd. ASM press.
- FREEMAN, S.; BIRRELL, H. C.; D'ALESSIO, K.; ERICKSON-MILLER, C.; KIRKLY, K. & CAMILLERI, P. (2001). A comparative study of the asparagine-linked oligosaccharides on siglec-5, siglec-7 and siglec-8, expressed in CHO cell line, and their contribution to ligand recognition. *Eur J Biochem.* 268:1228-1237.
- GAO, F.; MORRISON, S. G.; ROBERTSON, D. L.; THORNTON, C. L.; CRAIG, S.; KARLSSON, G.; SODROSKI, J.; MORGADO, M.; GALVAO-CASTRO, B.; von BRIESEN, H.; BEDDOWS, S. WEBER, J.; SHARP, P. M.; SHAW, G. M. & HAHN, B. (1996). Molecular cloning and analysis of functional envelope genes from human immunodeficiency virus type 1 sequence subtypes A through G. *Journal of Virology.* 70(3): 1651-1667.
- GAO F.; ROBERTSON, D. L.; CARRUTHERS, C. D.; MORRISON, S. G.; JIAN, B.; CHEN, Y.; et al.(1998) A comprehensive panel of near full-length clones and reference sequences for non-subtype B isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.*72:5680–5698
- GEORGE, H. J.; MARCHAND, P.; MURPHY, K.; WIWALL, B. H. DOWLING, R.; GIANNARA, J. HOLLIS, G. F.; TRZASCOS, J. M. & COPELAND, R. A. (1997). Recombinant human 92-kDa type IV collagenase/gelatinase from baculovirus-infected insect cells: expression, purification, and characterization. *Protein Expr Purif.* 10: 154-161.
- GERETTI, A. M. (2006). HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. *Curr. Opin Infec Dis.* 19:1-7.
- GERNGROSS, T. U. (2004). Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nature Biotech.* 22(11): 1409-1414.
- GOTTLIEB, M. S.; SCHROFF, R.; SCHANKER, H. M.; WEISMAN, J. D.; FAN P. T.; WOLF, R. A. & SAXON, A. (1981). *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal

- candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med.* 305(24):1425-1431.
- GRAHAM, F. L.; SMILEY, J.; RUSSEL, W. C. & NAIRN, R.(1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 36(1): 59-74.
- GRAHAM, F. L. & VAN der EB, A. J.(1973) Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus. *Virology.* 54: 536-539.
- GREEN, E. D (2001). Strategies for the systematic sequencing of complex genomes. *Nat Rev Genet.* 2(8):573-83.
- GRUNDNER, C.; LI, Y.; LOUDER, M.; MASCODA, J.; YANG, X; SODROSKY, J. & WYATT, R. (2005). Analysis of the neutralizing antibody response elicited in rabbits by repeated inoculation with trimeric HIV-1 envelope glycoproteins. *Virology.* 331:33-46.
- GRUNDNER, C.; PANCERA, M.; KANG, J.; KOCH, M.; SODROSKI, J. & WYATT, R. (2004). Factors limiting the immunogenicity of HIV-1 gp120 envelope glycoproteins. *Virology.* 330: 233-248.
- HAM, Y.; VENTURA, K. P. ; BLACK, J. E.; CUMMINS JR, S. D.; HALL. S. J. & JACKSON , S. (2000). Productive human immunodeficiency virus-1 infection of the epithelial cell lines of salivary gland origin. *Oral Microbiol Immunol.* 15: 82-88.
- HARRISON, R. G. (1907). Observations on the living developing nerve fiber. *Proc Soc Exp Biol.* 4:140.
- HIGGINS D., THOMPSON J., GIBSON T. THOMPSON J.D., HIGGINS D.G., GIBSON T.J.(1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
- HIV SEQUENCE COMPENDIUM 2005. Leitner, T.; Foley, B.; Hahn, B.; Marx, P.; McCutchan, F.; Mellors, J.; Wolinsky, S. & Korber, B. editors. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory. Disponível em <http://www.hiv.lanl.gov>.
- HOFFMAN, N. G.; SEILLIER-MOISEWITSCH, F.; AHN, J.; WALKER, J. M. & SWANSTROM, R.(2002). Variability in the human immunodeficiency virus type 1

- gp120 Env protein linked to phenotype-associated changes in the V3 loop. *J Virol*.76(8):3852-64.
- HOFMANN-LEHMANN, R.; RASMUSSEN, R. A.; VLASAK, J.; SMITH, B. A.; BABA, T. W.; LISKA, V.; MONTEFIORI, D. C.; MCCLURE, H. M.; ANDERSON, D. C.; BERNACKY, B. J.; RIZVI, T. A.; SCHMIDT, R.; HILL, L. R.; KEELING, M. E.; KATINGER, H.; STIEGLER, G.; POSNER, M. R.; CAVACINI, L. A.; CHOU, T. C. & RUPRECHT, R. M. (2001). Passive immunization against oral AIDS virus transmission: an approach to prevent mother-to-infant HIV-1 transmission? *J Med Primatol*.30(4):190-6.
- HOLLIER, M. J. & DIMMOCK, N. J.(2005). The C-terminal tail of the gp41 transmembrane envelope glycoprotein of HIV-1 clades A, B, C, and D may exist in two conformations: an analysis of sequence, structure, and function. *Virology*. 337:284-296.
- HU, Q.; TRENT, J. O.; TOMARAS, G. D.; WANG, Z.; MURRAY, J. L.; CONOLLY, S. M.; NAVENOT, J. M.; BARRY, A. P.; GREENBERG, M. L. & PEIPER, S. C. (2000). Identification of ENV determinants in V3 that influence the molecular anatomy of CCR5 utilization. *J. Mol. Biol.* 302:359–375.
- HUANG, X. & MADAN, A. (1999). CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. *Genome Research*. 9(9), 868-877
- IAVI: International AIDS Vaccine Initiative. (2006). <http://www.iavi.org>. Último acesso em: Mar/2006.
- IKONOMOU, L.; SCHNEIDER, Y. J. & AGATHOS, S. N.(2003). Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl Microbiol Biotechnol*. 62:1-20.
- INVITROGEN™ life technologies. (2004). pCDNA3.1/V5-HIS[®] TOPO[®] TA Expression Kit instruction manual.
- JAMJIAN, M. C. & MCNICHOLL, I. R. (2004). Enfuvirtide: first fusion inhibitor for treatment of HIV infection. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 61:1242-1247.
- JEFFS, S. A.; GORIUP, S.; KEBBLE, B.; CRANE, D.; BOLGIANO, B.; SATTENNAU, Q.; JONES, S. & HOLMES, H. (2004). Expression and characterization of recombinant oligomeric envelope glycoproteins derived from primary isolates of HIV-1. *Vaccine*. 22:1032-1046.

- JEFFS, S. A.; GORIUP, S.; STACEY, G.; YUEN, C-T & HOLMES, H. (2006). Comparative analysis of HIV-1 recombinant envelope glycoproteins from different culture systems. *Appl Microbiol Biotechnol*.69:1-12.
- JOHANSSON, B.; SHEREFA, K. & SONNERBORG, A. (1994). Multiple enhancer motifs in HIV type 1 strains from Ethiopia. *AIDS Res Hum Retrovir*.11:761-764.
- JOHNSON, V. A.; BRUN-VEZINET, F.; CLOTET, B.; CONWAY, B.; KURITZKES, D. R.; PILLAY, D.; SCHAPIRO, J.; TELENTI, A. & RICHMAN, D. (2005). Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1: 2005. *Top HIV Med*. 13(1):51-57.
- JONES, D.; KROOS, N.; ANEMA, R.; VAN MONTFORT, B.; VOOYS, A. VAN DER KRAATS, S.; VAN DER HELM, E.; SMITS, S.; SCHOUTEN, J.; BROUWER, K.; LAGERWERF, F. VAN BERKEL, P.; OPSTELTEN, D.; LOGTENBERG, T. & BOUT, A. (2003). High-level expression of recombinant IgG in the human cell line PER.C6. *Biotechnol*. 19: 163-168.
- KANDATHIL, A. J.; RAMALINGAM, S.; KANNANGAI, R.; DAVID, S. & SRIDHARAN G.(2005) Molecular epidemiology of HIV. *Indian J Med Res*. 121:333-344.
- KASAMATSU, A.; UZAWA, K.; NAKASHIMA, D.; KOUZU, Y.; ENDO, Y.; KOIKE, H.; YOKOE, H.; HARADA, K.; SATO. M. & TANZAWA, H. (2006). A proteomics approach to characterizing human submandibular gland cell lines by fluorescent two-dimensional differential in-gel electrophoresis. *Int J Mol Med*. 17(2): 253-260.
- KARLE, S.; PLANQUE, S.; NISHIYAMA, Y.; TAGUCHI, H.; ZHOU, Y. X.; SALAS, M.; LAKE, D.; THIAGARAJAN, P.; ARNETT, F.; HANSON, C. V. & PAUL, S. (2004). Cross-clade HIV-1 neutralization by an antibody fragment from a lupus phage display library. *AIDS*.18(2):329-31.
- KITABWALLA, M.; FERRANTELLI, F.; WANG, T.; CHALMERS, A.; KATINGER, H.; STIEGLER, G.; CAVACINI, L. A.; CHOU, T. C. & RUPRECHT, R. M. (2003). Primary African HIV clade A and D isolates: effective cross-clade neutralization with a quadruple combination of human monoclonal antibodies raised against clade B. *AIDS Res Hum Retroviruses*.19(2):125-31.
- KOBAYASHI, K.; KUAWAE, S.; OHYA, T.; OHDA, T.; OHYAMA, M.; OHI, H.; TOMOMITSU, K. & OHMURA, T. (2000). High-level expression of recombinant

- human serum albumina from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation. *J Biosci Bioeng.* 89:55-61.
- KOCH, M.; PANCERA, M.; KWONG, P. D.; KOLCHINSKY, P.; GRUNDNER, C.; WANG, L.; HENDRICKSON, W. A.; SODROSKI, J. & WYATT, R. (2003). Structure-based, targeted deglycosylation of HIV-1 gp120 and effects on neutralization sensitivity and antibody recognition. *Virology.* 313: 387-400.
- KOZAC, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 15(20): 8125- 8148.
- KONING, F. A.; VAN RIJ, R. P. & SCHUITEMAKER, H. (2003). Biological and molecular aspects of HIV-1 coreceptor usage. In HIV SEQUENCE COMPENDIUM (2003). Leitner, T.; Foley, B.; Hahn, B.; Marx, P.; McCutchan, F.; Mellors, J.; Wolinsky, S. & Korber, B. editors. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory.
- KWONG, P. D.; WYATT, R.; ROBINSON, J.; SWEET, R. W.; SODROSKI, J. & HENDRICKSON, W. A. (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature.* 393: 648-659.
- LABAT-MOLEUR, F.; STEFFAN, A. M.; BRISSON, C.; PERRON, H.; FEUGEAS, O.; FURSTENBERGER, P.; OBERLING, F.; BRAMBILLA, E. & BEHR, J. P. (1996). An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene Ther.* 3(11):1010-1017.
- LAM, K.; ZHANG, L.; BEWICK, M. & LAFRENIE, R. M. (2005). HSG cells differentiated by culture on extracellular matrix involves induction of S-adenosylmethionine decarboxylase and ornithine decarboxylase. *J cell Physiol.* 203(3): 353-361.
- LAND, A. & BRAAKMAN, I. (2001). Folding of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in the endoplasmic reticulum. *Biochimie.* 83: 783-790.
- LAPPALAINEN, K.; JAASKELAINEN, I.; SYRJANEN, K.; URTTI, A. & SYRJANEN, S. (1994). Comparison of cell proliferation and toxicity assays using two cationic liposomes. *Pharm Res.* 11(8):1127-31.

- LENZ, O.; DITTMAR, M.; WAGNER, A.; FERKO, B.; VORAUER-UHL, K.; STIEGLEER, G. & WEISSNHORN, W. (2005). Trimeric membrane –anchored gp41 inhibits HIV membrane fusion. *J Biol Chem.* 280(6):4095-4101.
- LEVY, J. A.; SCOTT, I & MCKEWICZ, C.(2003). Protection from HIV/AIDS: the importance of innate immunity. *Clin Immunol.* 108: 167-174.
- MADDON, P.J.; DALGLEISH, A.G.; MCDUGAL, J.S.; CLAPHAM, P.R.; WEISS, R.A. & AXEL, R. (1986). The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell.* 47(3):333-348.
- MAITLAND, H. B. & MAITLAND M. C. (1928). Cultivation of vaccinia virus without tissue culture. *Lancet.* 215: 596.
- MARTOGLIO, B. & DOBBERSTEIN, B. (1998). Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends in Cell Biol.* 8: 410-415.
- MCCARROLL, L. & KING, L. A.(1997). Stable insect cultures for recombinant protein production. *Curr Opin Biotechnol.* 8: 590-594.
- MCNEIL, J. G.; JOHNSTON, M. I.; BIRX, D. L. & TRAMONT, E. C. (2004). HIV vaccine trial justified. *Science.* 303: 961.
- MONTESSORI, V.; PRESS, N.; HARRIS, M.; AKAGI, L. & MONTANER, J. S.G. (2004). Adverse effects of antiretroviral therapy for HIV infection. *Canadian Medical Association Journal.* 170(2): 229-238.
- MOULARD, M.; CHALLOIN, L.; CANARELLI, S.; MABROUK, K. & DARBON, H. (1998). Retroviral envelope glycoprotein processing: structural investigation of the cleavage site. *Biochemistry.* 37: 4510-4517.
- MOULARD, M. & DECROLY, E. (2000). Maturation of HIV envelope glycoprotein precursors by cellular endoproteases. *B.B.A.* 1469:121-132.
- NOWLING, T.; DESLER, M.; KUSZYNSKI, C. & RIZZINO, A. (2002). Transfection of embryonal carcinoma cells at high efficiency using liposome-mediated transfection. *Mol Reprod Dev.*63(3):309-17.
- PATIL, S. D.; RHODES, D. G. & BURGESS, D. J. (2004). Anionic liposomal delivery system for DNA transfection. *AAPSJ.*6(4):e29.
- PATIL, S. D.; RHODES, D. G. & BURGESS, D. J.(2005). Biophysical characterization of anionic lipoplexes. *Biochim Biophys Acta.* 1171:1-11.

- PAU, M; G.; OPHORST, C.; KOLDIJK, M. H.; SCHOUTEN, G.; MEHTALI, M. & UYDEHAAD, F. (2001) The human cell line PER.C6 provides a new manufacturing system for the production of influenza vaccines. *Vaccine*. 19: 2716-2721.
- PERALES, C.; CARRASCO, L. & GONZÁLEZ, M. A. (2005). Regulation of HIV-1 *env* mRNA translation by Rev protein. *Biochim Biophys Acta*. 1743: 169-175.
- PERRIN, L.; KAISER, L. & YERLY, S. (2003). Travel and spread of HIV-1 genetic variants. *Lancet Infect Dis*, 3:22-27.
- PINNADUWAGE, P.; SCHMITT, L. & HUANG, L.(1989). Use of a quaternary ammonium detergent in liposome mediated DNA transfection of mouse L-cells. *Biochim Biophys Acta*. 985(1):33-7.
- POIGNARD, P.; SAPHIRE, E. O.; PARREN, P. W. H. I. & BURTON, D. R. (2001). GP120: biologic aspects of structural features. *Annu. Rev. Immunol*. 19: 253-274.
- POLLAKIS, G.; ABEBE, A.; KLIPHUIS, A.; CHALABY, M. I. M.; BAKKER, M.; MENGISTU, Y.; BROUWER, M.; GOUDSMIT, J.; SCHUITEMAKER, H. & PAXTON, W. A. (2004). Phenotypic and genotypic comparisons of CCR5- and CXCR4-tropic human immunodeficiency virus type 1 biological clones isolated from subtype C-infected individuals. *J. Virol*. 78(6): 2841-2852.
- POTTER, S. J.; CHEW, C. B.; STEAIN, M.; DWYER, D.E. & SAKSENA, N. K. (2004). Obstacles to successful antiretroviral treatment of HIV-1 infection: problems and perspectives. *Indian J. Med. Res*. 119: 217-237.
- PROMEGA (2003). pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy vector systems technical manual.
- PRUSINER, S.R. (2002). Discovering the Cause of AIDS. *Science*. 298:1726-1727.
- PUCK, T. T.; CIECIURA, S. J. & ROBINSON, A.(1958). Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med*. 108(6):945-56.
- QIAO, Z.; KIM, m.; REINHOLD, B.; MONTEFIORI, D.; WANG, J. & REINHERZ, E. L. (2005). Design, expression, and immunogenicity of HIV trimeric envelope fragment adopting a prefusin gp41 configuration. *J. Biol. Chem*. 280(24):23138-23146
- QIAGEN (2001). The QIA*expressionist*: a handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins.

- RIZZUTO, C. D. & SODROSKI, J. (2000). Fine definition of a conserved CCR5-binding region on the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein 120. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16:741–749.
- RIZZUTO, C. D.; WYATT, R.; HERNÁNDEZ-RAMOS, N.; SUN, Y.; KWONG, P. D.; HENDRICKSON, W. A. & SODROSKI, J. (1998). A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* 280:1949–1953.
- ROBEN, P.; BARBAS, S. M.; SANDOVAL, L. LECERF, J. M.; STOLLAR, B. D. SOLOMON, A. & SILVERMAN, G. J. (1996). Repertoire Cloning Lupus Anti-DNA Autoantibodies. *J Clin Invest.* 98: 2827-2837, 1996.
- ROMOREN. K.; FJELD, X. T. L.; POLEO, A. B. S.; SMISTAD, G.; THU, B. J. & EVENSEN, O. (2005). Transfections efficiency and cytotoxicity of cationic liposomes in primary cultures of rainbow trout (*Oncorhynchus mukiss*) gill cells. *Bichin Biophys Acta.* 1717:50-57.
- ROOT, M. J. & HAMER, D.H.(2003) Targeting therapeutics to an exposed and conserved binding element of the HIV-1 fusion element. *PNAS.* 100(9). 5016-5021.
- ROSSER, M. P.; XIA, W.; HARTSELL, S.; MCCAMAN, M.; ZHU, Y.; WANG, S.; HARVEY, S.; BRINGMANN, P. & COBB, R. R.(2005). Transient Transfection of CHO-k1 using serum-free medium in suspension: a rapid mammalian protein expression system. *Prot Expres Purif.* 40: 237-243.
- RUGGIERO, L. A. (2002). Clonagem e expressão de anticorpos recombinantes em células de ovário de hamster chinês (CHO) em cultura. 137p Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular). Universidade de Brasília.
- SALEMI, M.; DE OLIVEIRA, T.; SOARES, A. M.; PYBUS, O.; DUMANS, A. T.; VANDAMME, A.; TANURI, A.; CASSOL, S. & FITCH. W. M. (2005). Different Epidemic Potentials of the HIV-1B and C Subtypes *J Mol Evo.*60: 598-605.
- SAMBROOK, J.& RUSSEL, D. W.(2001).Molecular cloning: a laboratory manual. 3nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SCHELLEKENS, H. (2005). Factors influencing the immunogenicity of therapeutic proteins. *Nephrol Dial Transplant.* 20(6):vi3-vi9.

- SCHIMIDT, F. R. (2004) Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl Microbiol Biotechnol.* 65: 363-372.
- SCHRÖDER, M.; MATISCHAK, K. & FRIEDL, P. (2004). Serum- and protein-free media formulations for the chinese hamster ovary cell line DUKXB11. *J Biotechnol.* 108: 279-292.
- SCHÜLKE, N.; VESANEN, M. S.; SANDERS, R. W.; ZHU, P.; LU, M.; ANSELMA, D. J.; VILLA, A. R.; PARREN, P. W. H. I.; BINLEY, J. M.; ROUX, K. H.; MADDON, P. J.; MOORE, J. P. & OLSON, W. C. (2002). Oligomeric and conformational properties of a proteolytic mature, disulfide stabilized human immunodeficiency virus type 1 gp140 envelope glycoprotein. *J Virol.* 76(15): 7760-7776.
- SCHÜTT, C.; FÜRL, B.; STELTER, F.; JACK, R. S. & WITT, S. (1997). CHO transfectants produce large amounts of recombinant protein in suspension culture. *J Immunol Methods.* 204: 99-102.
- SEGURA, I.; GANZALEZ, M. A.; SERRANO, A.; ABAD, J. L.; BERNAD, A. & RIESE, H. H. (2001). High transfection efficiency of human umbilical vein endothelial cells using an optimized calcium phosphate method. *Anal Biochem.* 296:143-147.
- SERETI I, & LANE H., C. (2001). Immunopathogenesis of human immunodeficiency virus: implications for immune-based therapies. *Clin Infect Dis.* 32(12):1738-1755.
- SHIMIZU, N.; HARAGUCHI, Y.; TAKEUCHI, Y.; SODA, Y.; KANBE, K. & HOSHINO, H. (1999). Changes in and discrepancies between cell tropisms and coreceptor uses of human immunodeficiency virus type 1 induced by single point mutations at the V3 tip of the env protein. *Virology* 259:324-333.
- SHIODA, T., J. LEVY, A. & CHENG-MAYER, C. (1991). Macrophage and T cell-line tropisms of HIV-1 are determined by specific regions of the envelope gp120 gene. *Nature* 349:167-169.
- SHIRASUNA, K.; SATO, M. & MIYAZAKI, T. (1981) A neoplastic epithelial duct cell line established from an irradiated human salivary gland. *Cancer* 1(48):745-752.
- SLEEP, D.; BELFIELD, G. P.; BALANCE, D. J.; STEVEN, J. JONES, S.; EVANS, L. R. MOIR, P. D. & GOODEY, A. R. (1991). *Saccharomyces cerevisiae* strains that overexpress heterologous proteins. *Biotechnology.* 9:183-187.

- SOARES, E. A. J. M.; SANTOS, R. P.; PELLIGRINI, J. A.; SPRINZ, E.; TANURI, A. & SOARES, M. A. (2003a). Epidemiologic and molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 in Southern Brazil. *J Acquir Defic Syndr.* 34(5): 520-526.
- SOARES, M. A.; OLIVEIRA, T.; BRINDEIRO, R. M.; DIAZ, R. S.; SABINO, E. C.; BRÍGIDO, L.; PIRES, I. L.; MORGADO, M. G.; DANTAS, M. C.; BARREIRA, D.; TEIXEIRA, P. R.; CASSOL, S. & TANURI, A. (2003b). A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates in Brazil. *AIDS*,17: 11-21.
- SRIVASTAVA, I. K.; STAMATATOS, L.; LEGG, H.; KAN, H.; FONG, A.; COATES, S. R.; LEUNG, L.; WININGER, M.; DONNELLY, J. J.; ULMER, J. B. & BARNETT, S. W. (2002). Purification and characterization of oligomeric glycoprotein from primary R5 subtype B human immunodeficiency virus. *J Virol.* 76(6):2835-2847.
- STRATAGENE. (2004). SURE Competent Cells manual.
- STRATAGENE. (2004). XL1-Blue Subcloning-Grade Competent Cells manual.
- TAN, K.; LIU, J.; WANG, J.; SHEN, S. & LU, M.(1997). Atomic structure of a thermostable subdomain of HIV-1 gp41. *PNAS.* 94(23):12303-12308.
- TANURI, A.; CARIDEA, E.; DANTAS, M. C. ; MORGADO, M. G.; MELLO, D. L. C.; BORGES, S.; TAVARES, M.; FERREIRA, S. B.; SANTORO-LOPES, G.; MARTINS, C. R. F.; ESTEVES, A. L. C.; DIAZ, R. S.; ANDREO, S. M. S.; FERREIRA, L. A. P.; RODRIGUES, R.; REUTER, T.; CAVALCANTI, A. M. S.; OLIVEIRA, S. M.; BARBOSA, H. B.; TEIXEIRA, P. R. & CHEQUER, P. N. (2002). Prevalence of mutations related to HIV-1 antiretroviral resistance in Brazilian patients failing HAART. *J. Clin. Virol.* 25: 39-46.
- TATE, C. G.; HAASE, J.; BAKER, C.; BOORSMA, M.; MAGNANI, F.; VALIS, Y & WILLIAMS D. C. (2003). Comparison of seven different heterologous protein expression systems for the production of the serotonin transporter. *Biochim Biophys Acta.* 1610: 141-153.
- THOMSON, M. M.; DELGADO, E.; HERRERO, I.; VILLAHERMOSA, M. L.; VAZQUEZ-DE PARGA, E.; CUEVAS, M. T.; CARMONA, R.; MEDRANO, L.; PEREZ-ALVAREZ, L.; CUEVAS, L. & NAJERA, R. (2002). Diversity of mosaic structures and common ancestry of human immunodeficiency virus type 1 BF

- intersubtype recombinant viruses from Argentina revealed by analysis of near full-length genome sequences. *J Gen Virol.* 83(1):107-119.
- TSCHERNING, C.; ALAEUS, A.; FREDRIKSSON, R.; BJØRNDAL, A.; DENG, H.; LITTMAN, D. R.; FENYO, E. M. & ALBERT, J. (1998). Differences in chemokine coreceptor usage between genetic subtypes of HIV-1. *Virology.* 241:181–188.
- TURNER, B. G.; & SUMMERS, M. F. (1999). Structural Biology of HIV. *J. Mol. Biol.* 285:1-32.
- UNAIDS (2005). AIDS epidemic update : 2005. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Disponível em: <http://www.unaids.org>.
- VERAS, S. V. (2006). Caracterização da variabilidade antigênica do gene do envelope (*env*) em amostras de HIV-1 circulantes no Distrito Federal. 95p Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular). Universidade de Brasília
- VERMA, R.; BOLETI, E. & GEORGE, A. J. T.(1998) Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast., insect and mammalian expression systems. *J. Immunol Methods.* 216:165-181.
- VERRIER, F.; BORMAN, M. A.; BRAND, D. & GIRARD, M. (1999). Role of the HIV type 1 glycoprotein120 V3 loop in determining coreceptor usage. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 15:731–743.
- WALSH, G.(2003). Biopharmaceutical benchmarks-2003. *Nature Biotech.* 21(8):865-870.
- WANG, A. T.; QUIGLEY, G. J.; KOLPAK, F. J.; CRAWFORD, J. L.; VAN BOOM, J. H. VAN DER MAREL, G. & RICH, A. . (1979) Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution. *Nature.* 282: 680-686.
- WANG, W.; DUDEK, K. T.; ZHAO, Y. J. BRUMBLAY, H. G.; ESSEX, M. & LEE, T. H. (1998). CCR5 coreceptor utilization involves a highly conserved arginine residue of HIV type 1 gp120. *PNAS* 95:5740–5745.
- WANG, W., DUDEK, K. T.; ESSEX, M. & LEE, T. H. (1999). Hypervariable region 3 residues of HIV type 1 gp120 involved in CCR5 coreceptor utilization: therapeutic and prophylactic implications.*PNAS* 96:4558–4562.
- WEISSENHORN, W.; DESSEN, A.; HARRISON, S. C.; SKEHEL, J. J. & WILEY, D. C. (1997). Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature.*387:426-430.

- WILSON, S. P.; LIU, F.; WILSON, R. E. & HOUSLEY, P. R.(1995). Optimization of calcium phosphate transfection for bovine cromaffin cells: relationship to calcium phosphate formation. *Anal Biochem.* 226: 212-220.
- WILSON, S. P. & SMITH, A.(1997) Addition of glycerol during exposure enhances calcium phosphate transfection. *Anal Biochem.* 246:148-149.
- WU, L.; GERARD, N. P.; WYATT, R.; CHOE, H.; PAROLIN, C.; RUFFING, N.; BORSETTI, A.; CARDOSO, A. A.; DESJARDIN, E.; NEWMAN, W.; GERARD, C. & SODROSKI, J. (1996). CD4-induced interation of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature.* 384: 179-183.
- XIAO, L.; OWEN, S. M.; GOLDMAN, I.; LAL, A. A.; DEJONG, J. J. GOUDSMIT, J.& LAL, R. B. (1998). CCR5 Coreceptor usage of non-syncytium-inducing primary HIV-1 is independent of phylogenetically distinct global HIV-1 Isolates: delineation of consensus motif in the V3 domain that predicts CCR-5 usage. *Virology.* 240:83-92.
- XU, W.; SMITH-FRANKLIN, B. A.; LI, P. L.; WOOD, C.; HE, J.; DU, Q.; BHAT, G. J.; KANKASA, C.; KATINGER, H.; CAVACINI, L. A.; POSNER, M. R.; BURTON, D. R.; CHOU, T. C. & RUPRECHT, R. M.(2001). Potent neutralization of primary human immunodeficiency virus clade C isolates with a synergistic combination of human monoclonal antibodies raised against clade B. *J Hum Virol.* 2:55-61
- ZHANG, L.; HE, T.; HUANG, Y.; CHEN, Z.; GUO, Y.; WU, S.; KUNSTMAN, K. J.; BROWN, R. C.; PHAIR, J. P.; NEUMANN, A. U.; HO, D. D. & WOLINSKY, S. M. (1998). Chemokine coreceptor usage by diverse primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 72(11):9307-9312.
- ZHANG, M.; XIAO, X.; SIDOROV, I. A.; CHOUDHRY, V.; CHAM, F.; ZHANG, P. F.; BOUMA, P.; ZWICK, M.; CHOUDHATY, A.; MONTEFIORI, D. C.; BRODER, C. C., BURTON, D. R.; QUINNAN, G. V. & DIMITROV, D. S. (2004). Identification and characterization of a new cross-reactive human immunodeficiency virus type 1-neutralizing human monoclonal antibody. *J Virol.* 78(17): 9233-9242.
- ZACHAZOVA, V. BECKER, M. L.; ZACHAR, V.; EBBESEN, P. & GOUSTIN, A. S (1995). DNA sequence analysis of the long terminal repeat of the C subtype of human immunodeficiency virus type 1 from Southern Africa reveals a dichotomy between B

subtype and African subtypes on base of upstream NF-IL6 motif. *AIDS Res Hum Retrovir.* 13:719-724.

ZWICK, M. B.; LABRIJN, A. F.; WANG, M.; SPENLEHAUER, C.; SAPHIRE, E. O.; BINLEY, J. M.; MOORE, J. P.; STIEGLER, G.; KATINGER, H.; BURTON, D.R. & PARREN, P. W. (2001). Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J Virol.*(22):10892-905.