



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UniCEUB
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E DA SAÚDE – FACES
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

ANA LUIZA DOS SANTOS MEDEIROS

**ANÁLISE DE ANTÍGENOS DE SUPERFÍCIE DO VÍRUS DA HEPATITE B
(HBSAG) COMO ESTRATÉGIA PROMISSORA PARA FINS BIOMÉDICOS**

BRASÍLIA-DF
2017/2018

ANA LUIZA DOS SANTOS MEDEIROS

**ANÁLISE DE ANTÍGENOS DE SUPERFÍCIE DO VÍRUS DA HEPATITE B
(HBSAG) COMO ESTRATÉGIA PROMISSORA PARA FINS BIOMÉDICOS**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa pela Faculdade de Ciências da Educação e da Saúde – FACES

Orientadora: Prof^a Dra Anabele Azevedo Lima

**BRASÍLIA-DF
2017/2018**

ANÁLISE DE ANTÍGENOS DE SUPERFÍCIE DO VÍRUS DA HEPATITE B (HBSAG) COMO ESTRATÉGIA PROMISSORA PARA FINS BIOMÉDICOS.

Ana Luiza dos Santos Medeiros – UniCEUB, PIC Institucional, aluno bolsista

ana.medeiros@sempreceub.com

Profª Dra Anabele Azevedo Lima – UniCEUB, professor orientador

anabele.lima@ceub.edu.br

Profº titular Dr Bergmann Moraes Ribeiro – UNB, professor colaborador

bergmann@unb.br

Dr Leonardo Assis da Silva – UNB, Pós doutorando colaborador

leocbq@yahoo.com.br

O vírus da hepatite B (HBV) é um membro da família de vírus chamada *Hepadnaviridae*, caracterizado pela presença de DNA envelopado e capacidade de infectar as células hepáticas. Esse vírus infecta mamíferos e se replica nos hepatócitos, podendo evoluir em termos patológicos. De acordo com o Ministério da Saúde, no período de 1999 a 2015 foram notificados em todo o Brasil, 514.678 casos confirmados de hepatites viral, caracterizando um problema de saúde pública. Pesquisas na área da virologia e produção biotecnológica têm sido muito utilizado para expressão de genes heterólogos em células de inseto, como por exemplo, o modelo eucarioto de expressão utilizando baculovírus. Inúmeras proteínas de importância médica e econômica foram expressas em níveis elevados aplicando esse sistema. Sendo assim, o presente trabalho visou analisar a expressão do antígeno de superfície HBsAg fusionado à proteína poliedrina do baculovírus, uma vez que o HBsAg tem um papel fundamental no diagnóstico e prevenção da hepatite B, por ser um antígeno marcador sorológico indicativo de infecção pelo HBV, bem como, o único componente da vacina contra o HBV, e assim, analisar possíveis reações cruzadas entre os diferentes vírus que causam hepatite. Atualmente, não existem indústrias ou empresas nacionais disponíveis para a produção em larga escala do HBsAg, necessitando importar vacinas e kit para diagnóstico. Os resultados foram inconclusivos até o presente momento, demonstrado pelo método ELISA, a partir do soro de pacientes que já tiveram contato, com os vírus da hepatite B, hepatite C, ou citomegalovírus (CMV), em relação ao antígeno construído pelo sistema do baculovírus. Sendo assim, há a necessidade de realizar mais testes sorológicos para verificar a veracidade do experimento e validá-lo estatisticamente. Contudo, sabemos que as hepatites virais são um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo e necessitam de mais pesquisas, visando sempre melhorar as formas de prevenção, diagnóstico e tratamento.

Palavras-chave: baculovírus; vacina; sistema de expressão

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	4
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1 Imunização e produção de antissoro.....	12
3.2 Imunoensaio	12
4. RESULTADOS.....	14
4.1 Imunoensaio.....	14
5. DISCUSSÃO.....	16
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	18
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18

1. INTRODUÇÃO

No século IV a.C, Hipócrates considerado o “pai da medicina”, obteve as primeiras referências quanto a casos epidêmicos de icterícia, onde seus escritos revelavam a possibilidade da epidemia ter origem infecciosa, o fígado como principal órgão afetado e com tendência a cronificação. O termo hepatite foi introduzido pela primeira vez por Bianchi no século XVIII, porém foi no final dos anos trinta que houve a descoberta da sua forma de transmissão, tendo como principal a inoculação parenteral a partir de soro humano (FONSECA, 2010).

Na década de 1960, Blumberg pesquisando proteínas no sangue observou a presença de um antígeno, no soro de um paciente australiano, denominando “antígeno Austrália”, hoje conhecido como antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg). Desde então, os avanços tecnológicos e o aumento no número de pesquisas científicas possibilitaram a descoberta de diferentes vírus capazes de causar hepatites na espécie humana (BRASIL, 2014).

Atualmente, cinco diferentes vírus são reconhecidos como agentes etiológicos para a hepatite viral, são eles: hepatite A (HAV), hepatite B (HBV), hepatite C (HCV), hepatite D ou Delta (HDV) e hepatite E (HEV). Embora possuam características diferentes quanto à sua estrutura molecular, classificação e genoma, os cinco agentes têm tropismo primário pelo tecido hepático, responsável por causar processos inflamatórios, agudos ou crônicos, onde na fase inicial da doença, pode-se apresentar sintomatologias comuns, como náuseas, vômitos, dores de cabeça, mal-estar e perda de apetite. Na fase icterica, pode-se apresentar colúria, acolia e alterações na função hepática (HOUGHTON, 1996).

As hepatites A e E têm como principal via de contágio, fecal-oral ou por meio de águas e alimentos contaminados, que podem resultar em uma hepatite aguda benigna. A disseminação dos dois tipos de vírus está diretamente relacionada com a qualidade do saneamento básico. O HBV tem como transmissão a via parental, principalmente por via sexual, sendo considerada uma infecção sexualmente transmissível (IST), existe também a transmissão vertical, passada da mãe para o filho durante o parto. A hepatite B pode evoluir para uma hepatite crônica, trazendo complicações como cirroses ou tumores. Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde, aproximadamente 5% dos pacientes evoluem para uma cronificação da doença e cerca de 70% de recém-nascidos contaminados por transmissão vertical correm risco de cronificação.

A hepatite C ocorre principalmente por via parenteral e assim como o HBV pode evoluir para uma hepatite crônica, já a transmissão por relações sexuais é pouco frequente, menos de 1%. A hepatite D ou delta é um vírus satélite do HBV que necessita do HBsAg para realizar sua replicação e por isso possui os mesmos mecanismos de transmissão que o HBV. Por apresentar diversas etiologias, características, vias de transmissões distintas e possuir alto risco epidêmico, as hepatites virais são consideradas preocupantes em âmbito global (BRASIL, 2008).

As hepatites virais são responsáveis por cerca de 1,4 milhão de óbitos anualmente em todo o mundo. No Brasil, entre os anos de 2003 e 2007, a taxa de incidência de hepatite A era superior à das demais etiologias (B, C e D), porém, após 2007, apresentou uma queda significativa, atingindo 0,6/100 mil habitantes em 2016. Em contrapartida, nesse mesmo período, as taxas das hepatites B e C apresentaram um considerável aumento. Enquanto, as menores taxas são encontradas para a hepatite D, que se mantiveram constantes em todo o período. No período de 1999 a 2016, foram notificados mais de duzentos mil casos confirmados no de hepatite B no Brasil. Desde 1999, ano em que se iniciaram as notificações compulsórias da doença no Brasil, verificou-se que a taxa de detecção das regiões Sul, Norte e Centro Oeste foram superiores à taxa nacional, estabelecendo assim um foco maior por parte da saúde pública, devido ao seu principal meio de transmissão, além de favorecer a infecção por HDV (BRASIL, 2017).

O HBV pertence à família Hepadnaviridae e a sua partícula viral infecciosa é formada por nucleocapsídeo proteico e envolta por um envelope lipoproteico originado da última célula contendo três formas do antígeno de superfície do vírus (HBsAg). No interior da partícula, é encontrada a enzima DNA polimerase viral, que completa o genoma do vírus durante as infecções. O HBsAg é uma glicoproteína antigênica presente na superfície do envelope do HBV cuja presença no soro do paciente é indicação de uma infecção ativa. Esse antígeno é utilizado em preparações de vacinas e kits diagnósticos, por sua capacidade de ativar uma resposta imunológica (KARRON; COLLINS, 2007).

Atualmente, não existem indústrias ou empresas nacionais disponíveis para a produção escalonável do HBsAg. Perante isso, os insumos são importados tanto para fins vacinais como para o diagnóstico. Assim, o sistema de expressão do antígeno HBsAg em células de inseto proposto anteriormente por Silva (2016) poderá ajudar no desenvolvimento de kits diagnósticos

para a Hepatite B no país, e ser um interessante passo para se pensar em uma produção de antígeno vacinal nacional.

Os baculovírus têm sido utilizados amplamente como vetores de expressão de genes heterólogos em células de inseto nos últimos anos. Deste modo, inúmeras proteínas de importância médica e econômica foram expressas em níveis elevados aplicando esse sistema. A produção do antígeno de superfície HBsAg fusionado à proteína poliedrina do baculovírus é uma estratégia promissora para expressão e purificação destas proteínas em larga escala para a área da saúde humana. O HBsAg tem um papel fundamental no diagnóstico e prevenção da hepatite B. Este antígeno é o marcador sorológico indicativo de infecção presente pelo HBV, bem como, o único componente da vacina contra o HBV (JARVIS, 1997).

Atualmente, não existem indústrias ou empresas nacionais disponíveis para a produção escalonável do HBsAg. Perante isso, os insumos são importados tanto para fins vacinais como para o diagnóstico. Assim, a expressão da porção ‘small’ do antígeno HBsAg (sHBsAg) em células de inseto proposto anteriormente por Silva (2016) poderá ajudar no desenvolvimento de kits diagnósticos para a Hepatite B no país, e ser um interessante passo para se pensar uma alternativa de produção de antígeno vacinal nacional.

Araújo (2011), trabalhando com o HBV, obteve sucesso na construção de um baculovírus recombinante expressando a sHBsAg fusionada a região 5’ do gene da poliedrina do baculovírus AcMNPV (AcPH), porém não obteve o sucesso na fusão à região 3’ do gene da poliedrina. A análise da expressão da proteína recombinante em células de inseto infectadas revelou que a proteína recombinante sHBsAgAcPH foi produzida tanto *in vitro* (células de inseto em cultura) como *in vivo* (larvas de *Spodoptera frugiperda*). Os testes utilizando extratos de células de inseto com o vírus recombinante contendo a proteína sHBsAgAcPH e corpos de oclusão purificados em gradiente de sacarose a partir de cadáveres de insetos, foram capazes de ser reconhecidos em kits de diagnósticos no Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF).

Entretanto, esses corpos de oclusão não possuíam uma forma definida e sua purificação livre de contaminantes não foi possível. A facilidade de produção, isolamento de poliedros recombinantes contendo proteínas de interesse e a natureza estável dos poliedros sugerem que essa abordagem poderá ser uma excelente ferramenta alternativa para vacinação e uso em diagnóstico de vertebrados.

Portando, as hepatites virais são consideradas problema de saúde pública no Brasil e no mundo e necessitam de mais cuidados, visando sempre melhorar as formas de prevenção, diagnóstico e tratamento. Nesse contexto o presente estudo tem como objetivo expressar antígenos derivados do HBV em sistema de expressão eucarioto (baculovírus) para a possível construção de kits diagnósticos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O vírus da hepatite B (HBV) é um membro da família de vírus chamada *Hepadnaviridae*. Apresenta DNA envelopado, e se caracteriza pela capacidade de infectar as células hepáticas. Esse vírus infecta mamíferos e se replica nos hepatócitos por transcrição reversa, a partir de um RNA pré-genômico (El Khouri & Santos, 2004; Lee, 1997; Seeger & Mason, 2000).

A partícula infecciosa do HBV (vírion) é denominada de partícula de Dane (Figura 1). Esta partícula apresenta-se de forma esférica com diâmetro de aproximadamente 42 nm, a qual possui estrutura complexa com envoltório externo lipoproteico e interno. O envoltório externo é formado pela proteína da membrana viral HBs (*s* de *surface*) que constitui o antígeno de superfície do HBV (HBsAg). Internamente ao envelope viral tem-se a proteína HBc (*c* de *core*) que possui 30 a 34 nm de diâmetro, o antígeno do *core* do vírus (HBcAg), o antígeno “e” (HBeAg), o genoma viral e as enzimas DNA-polimerase e transcriptase reversa (Zhang & Cao, 2011) (Figura 1).

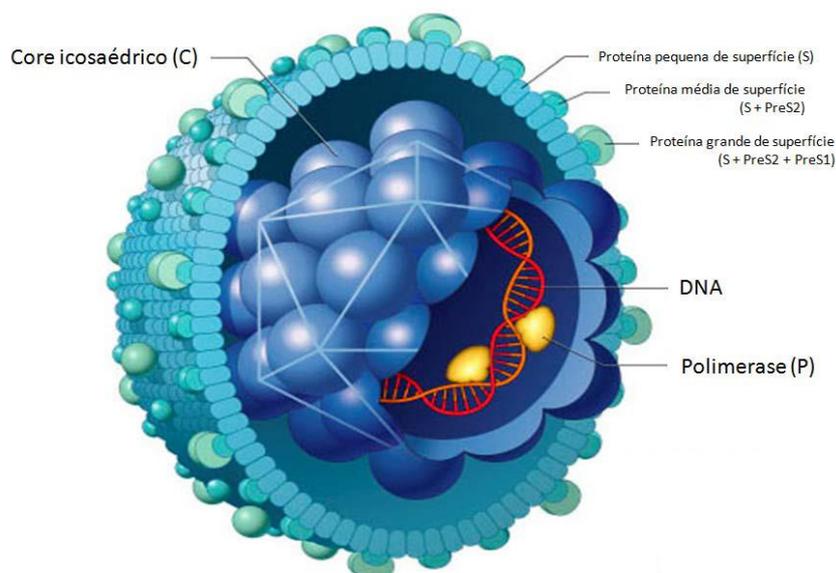


Figura 1. Esquema do HBV. No esquema estão sendo mostrados o nucleocapsídeo icosaédrico constituído por proteínas do *core* (C). O vírus é revestido por um envelope que contém três tipos de proteínas relacionadas entre si, as glicoproteínas S, Pré S1 e S2 de membrana que formam o antígeno de superfície mais imunogênico do HBV, o HBsAg. Fonte: <http://www.hepcentro.com.br/images/HBV.gif>

O HBV apresenta um material genético compacto; uma molécula de DNA circular de fita dupla incompleta, com o tamanho de 3,2 kb (Hatzakis et al, 2006). O seu genoma está organizado em duas cadeias de polaridades invertidas, uma menor e incompleta de polaridade positiva, e outra maior e completa de polaridade negativa (Beck & Nassal, 2007; Bruss, 2004), apresentando quatro ORFs (Seeger & Mason, 2000) designadas de: a) Pré S1\Pré-S2\S com a função de codificação das proteínas que formam o HBsAg e as proteínas L (large), M (middle) e S (small) (Tian et al, 2007); b) Pré-C\C que sintetiza as proteínas do HBcAg e HBeAg (Ganem & Prince, 2004); c) P, responsável pela síntese da DNA polimerase (Lee, 1997) e d) X, com a função de síntese da proteína X, que está provavelmente envolvida na replicação viral e no surgimento do Carcinoma Hepatocelular (Grob, 1998; Liang, 2000) (Figura 2).

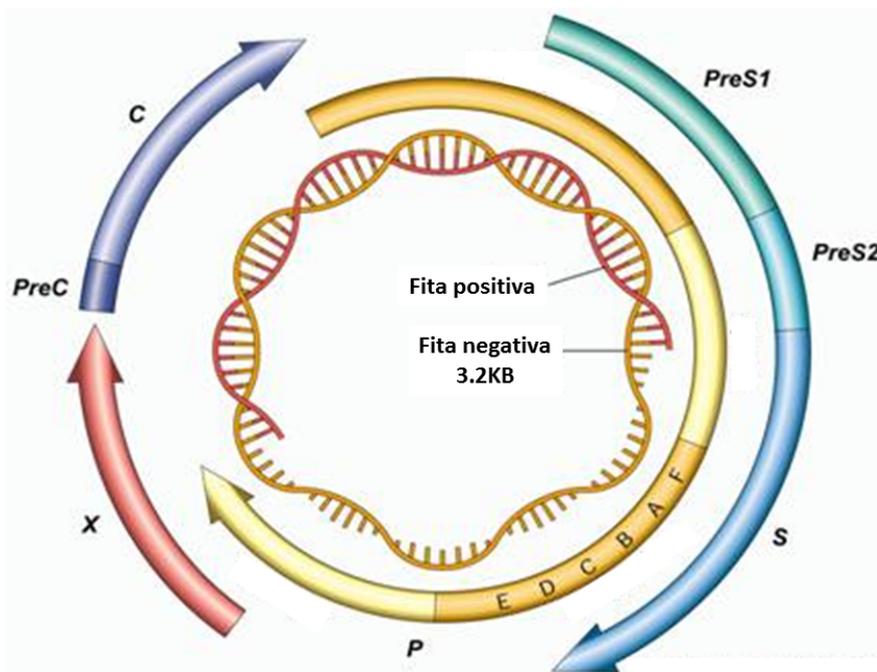


Figura 2. Representação esquemática da organização do genoma HBV. O círculo interno representa o DNA viral, indicado por duas fitas, uma contínua (amarela) de polaridade negativa e de tamanho 3,2kb, e uma descontínua (vermelha) de polaridade positiva. Pode ser observado também as regiões de fase aberta de leitura (ORF): pré- S/S (contém as regiões pré S1, S2 e S), pré-C/C, P e X. Fonte: <http://www.drthuthuy.com/images/genotype02.jpg> (modificado).

Na década de 80, o vírus da hepatite B foi classificado em subtipos de acordo com mudanças específicas de aminoácidos na proteína S, sendo associado com as regiões geográficas de ocorrência. Em 2000, através do sequenciamento da porção S do genoma viral, a classificação resultou em oito grupos genômicos (A a H), que se mantêm até os dias de hoje. Na América do Sul é frequentemente encontrado o grupo F (Arauz-Ruiz et al, 2002).

O ciclo de replicação do VHB se inicia quando o vírus se liga à membrana da célula hospedeira mediado pelas proteínas de envelope. Estudos demonstram que o VHB se liga por meio do domínio Pré-S1 da proteína de envelope à um receptor na membrana plasmática de hepatócitos humanos. Posteriormente, a membrana viral é fundida com a membrana celular, liberando o genoma no interior das células. A polimerase viral converte o dsDNA (DNA de fita dupla) parcial em forma circular dupla covalentemente fechada (cccDNA). Este DNA é transcrito pela RNA Polimerase-II do hospedeiro, e o DNA resultante serve como molde para a propagação de RNA pré-genômico e RNA sub-genômico (Beck & Nassal, 2007). O RNA pré-genômico é bifuncional, servindo tanto como molde para a síntese de DNA viral como

mRNA para a tradução do pré-C, C e P. Os RNAs sub-genômicos funcionam exclusivamente para a tradução das proteínas de envelope e da proteína X (Ganem & Prince, 2004; Hatzakis et al, 2006; Neurath et al, 1986).

A transmissão do HBV ocorre principalmente pela via sanguínea como por exemplo exposição parenteral, exposição percutânea (lesões provocadas por instrumentos perfurantes e cortantes), sexual e vertical (Rizzetto & Ciancio, 2008; Shapiro, 1993). O sangue é considerado o fluido corpóreo com maior incidência de transmissão. No entanto, a transmissão percutânea pode ocorrer, devido ao vírus ser bastante resistente à agentes físicos, como o calor e ser estável à temperatura ambiente por mais de sete dias. Além disso, a sua inoculação indireta também pode ocorrer por meio do compartilhamento de escovas de dente, lâminas de barbear ou de depilar, canudo e cachimbo para uso de drogas, entre outros (Locarnini, 2003; Rapparini et al, 2000).

Apenas uma partícula do HBV é suficiente para infectar o ser humano (Fonseca, 2007), sendo o HBV considerado dez vezes mais infectante que o HCV e 100 vezes mais que o HIV (Komatsu et al, 2010). Estudos revelam que o sangue e os outros fluidos orgânicos de um portador do HBV podem ser infectantes duas a três semanas anteriormente do surgimento dos primeiros sinais da hepatite B, mantendo-se assim durante a fase aguda e crônica da doença (BRASIL, 2008a; Komatsu et al, 2010).

O HBV pode apresentar-se em níveis elevados no sangue e em concentrações inferiores nos outros fluidos orgânicos (Hollinger & Liang, 2001; Margolis et al, 1991), tais como saliva (Davison et al, 1987; Jenison et al, 1987), sêmen (Zhang et al, 1994), secreção vaginal (Darani & Gerber, 1974; Yue et al, 2004), urina (Hourani et al, 1978; Irwin et al, 1975; Tripatzis, 1972), colostro ou leite materno (Lu et al, 2008) e fezes (Davison et al, 1987; Villarejos et al, 1974). Contudo, há a necessidade de uma investigação mais detalhada com relação à transmissão do HBV por meio do aleitamento materno (Zheng et al, 2011).

O diagnóstico da infecção pelo vírus da hepatite B é realizado por meio de exames clínicos e laboratoriais. Dentre os exames laboratoriais, as dosagens bioquímicas das aminotransferases (níveis de alanina aminotransferase-ALT ou transaminase glutâmico pirúvica (TGP) e de aspartato aminotransferase-AST ou transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) são de grande importância, não só para o diagnóstico como também para acompanhamento clínico e tratamento da doença. Entretanto, a detecção dos marcadores

sorológicos do HBV é uma importante ferramenta para a confirmação da infecção (Nascimento et al, 2012).

Testes sorológicos foram desenvolvidos para a identificação dos antígenos virais (HBsAg e HBeAg) e anticorpos (anti-HBs, anti-HBe, anti-HBc total e anti-HBc IgM) (Lai et al, 2003; Peter, 1997). Mais recentemente, testes de biologia molecular para detecção do DNA viral, como a PCR em tempo real, permitem a pesquisa qualitativa e quantitativa do genoma viral (Moreira et al, 2010). Os testes mais utilizados no diagnóstico sorológico são os ensaios imunoenzimáticos (Pawlotsky et al, 2008).

Os achados sorológicos variam nas fases de evolução da doença, e a dinâmica da presença dos marcadores reflete a replicação do vírus e a resposta imune dos infectados (Hoofnagle, 1983). Em indivíduos recentemente infectados, o antígeno de superfície (HBsAg) é o primeiro marcador sorológico a surgir, sendo detectável durante o período de incubação, cerca de duas a sete semanas antes dos sintomas, persistindo por um período de até 180 dias, desaparecendo cerca de quatro a cinco meses após a exposição (da Silva et al, 2012).

Na recuperação da infecção, os títulos de HBsAg desaparecem após seis meses, e emerge o anticorpo específico (anti-HBs) que se mantém detectável no soro por toda a vida do paciente, funcionando como o anticorpo protetor da hepatite B (marcador de imunidade). A positividade para o anti-HBs e a negatividade de todos os outros marcadores correspondem à resposta imune à vacina contra o HBV (Liang, 2000; Okanoué & Minami, 2006; Van Der Eijk et al, 2006). No período denominado de “janela imunológica”, compreendido entre a clarificação do HBsAg e o surgimento do anti-HBs, ambos permanecem indetectáveis, somente o anti-HBc está presente (Gonçales Júnior, 2002).

O antígeno HBc (HBcAg), proteína estrutural do capsídeo viral, presente nos hepatócitos infectados, não é comumente detectado no soro, é um potente imunógeno que induz a formação de anti-HBc e aparece logo após o surgimento do HBsAg (Custer et al, 2004). O anti-HBc total é detectável em pacientes que foram expostos ao HBV, não é um anticorpo protetor, e representa as frações IgM e IgG que são importantes na distinção da infecção atual e passada pelo vírus: a) o anti- HBc IgM é marcador de infecção recente, o único que define a etiologia da infecção como hepatite B aguda e é o primeiro anticorpo a ser detectado cerca de um mês após o aparecimento do HBsAg, e é detectável por cerca de seis meses; b) o anti- HBc IgG é um marcador de longa duração, presente nas infecções agudas, crônicas ou na infecção

antiga pelo vírus B já curada, representa contato prévio com o HBV e memória imunológica (Hollinger, 2008). O anti-HBc total é considerado um marcador de infecção progressa do HBV e pode persistir com anti-HBs em pacientes com quadros de infecção passada com consequente imunidade ao HBV (Gonçales & Cavalheiro, 2006).

Na hepatite crônica, ocorre a persistência de positividade do HBsAg, associada à detecção do antígeno HBeAg que está relacionado à intensa replicação viral e à infecciosidade, e sua presença usualmente se associa à positividade do DNA do HBV, no soro, com alto risco de transmissão da infecção. Pode persistir por dez semanas na fase aguda e, em pacientes crônicos, está associado a um mau prognóstico, refletindo a persistência da infecção viral e maior taxa de transmissão (El Khouri & Santos, 2004). O desaparecimento do HBeAg e o surgimento do anti-HBe sugerem diminuição ou ausência da replicação viral e se associam à negatização do HBV-DNA no soro e à normalização das aminotransferases (Hadziyannis & Vassilopoulos, 2001) (Figura 3)

Afirma-se que a infecção crônica é resolvida quando o paciente apresenta história prévia de hepatite crônica, positividade sorológica para anti-HBc total, HBsAg negativo, níveis normais de ALT e DNA-HBV sérico indetectável, com ou sem soroconversão para anti-HBs (Fonseca, 2007; Paraná et al, 2006).

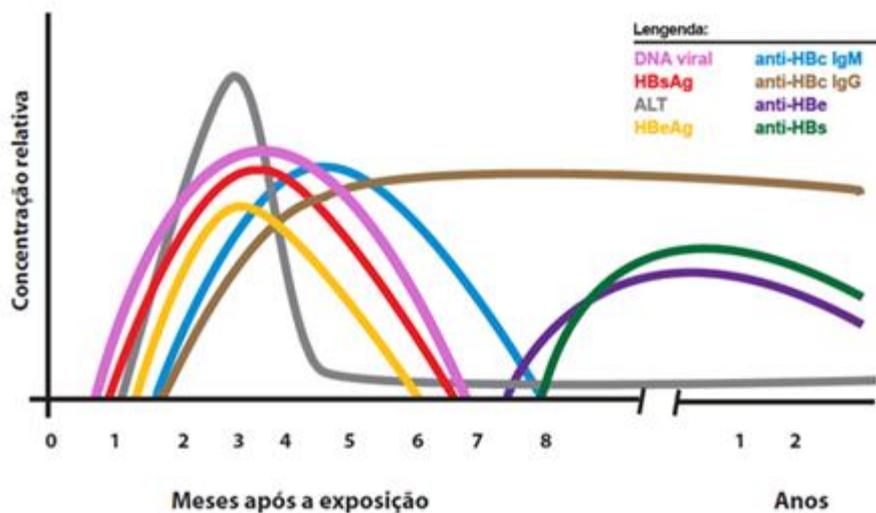


Figura 3. Marcadores sorológicos e molecular da infecção pelo HBV. O primeiro marcador a ser detectado é o DNA viral. Dentre os marcadores sorológicos, o HBsAg é o primeiro que circula, aparecendo aproximadamente um mês após a exposição e desaparecendo cerca de 6 meses para as infecções com cura. Após o HBsAg, aparece o anti-HBc IgM. O anti-HBc IgG

aparece em seguida ao anti-HBc IgM e pode ser detectável por muitos anos após a doença. Neste mesmo período agudo aparece o HBeAg, que indica replicação viral. Nesta fase inicial da infecção também estão aumentados os níveis de alanina aminotransferase (ALT), enzima que indica lesão no fígado. Após o desaparecimento dos antígenos, surgem os anticorpos, representado pelo aparecimento do anti-HBe e o anti-HBs. Fonte: <http://www.saude.gov.br/bvs>.

O tratamento para HBV tem como objetivo prevenir o desenvolvimento da cirrose hepática e/ou Carcinoma Hepatocelular (CHC), por meio da antecipação da soroconversão do HBeAg-positivo em anti-HBe. Diante disso, o tratamento consiste em dois tipos de agentes terapêuticos: Interferon e os análogos de nucleosídeos ou de nucleotídeos (AN). Os interferons compreendem o interferon convencional, de difícil emprego no tratamento da HBV devido à necessidade de altas dosagens diárias, e o interferon peguilado. Os AN compreendem aos medicamentos lamivudina (LVD), o adefovir (ADV) e o entecavir (ETV), que são inibidores de replicação viral, porém o seu uso por longo tempo pode selecionar cepas resistentes.

Vários avanços ocorreram nas últimas décadas no que se refere à prevenção e ao controle das hepatites virais, tais como: melhoras na identificação dos agentes virais, o desenvolvimento de testes laboratoriais específicos, maior eficácia no rastreamento dos indivíduos infectados e o surgimento de vacinas protetoras (Roberto, 2007).

A vacina contra o HBV é a forma mais eficaz para a prevenção da hepatite B e tem proporcionado grande avanço no controle desta enfermidade. (Carvalho & Araújo, 2008). A primeira vacina disponível para prevenir hepatite viral foi contra o HBV, desenvolvida no início dos anos 1980 e feita com plasma humano. Posteriormente, foi substituída por vacinas produzidas por meio da técnica do DNA recombinante. O antígeno utilizado nas vacinas disponíveis atualmente é um HBsAg recombinante produzido em fungo. Esta proteína recombinante é purificada e adsorvida em hidróxido de alumínio, sendo que o produto final contém mais de 95% de proteína HBsAg, menos de 5% de proteínas derivadas do fungo e nenhum DNA do fungo detectável na vacina (Ferreira & Silveira, 2004).

Dentre as ferramentas biotecnológicas disponíveis, os baculovírus, que infectam insetos, podem atuar no controle de insetos-praga (Moscardi, 1999), em sistema de expressão de proteínas heterólogas, assim como, possíveis vetores para terapia gênica (Rohrman, 2011). São vírus pertencentes à família Baculoviridae, caracterizado por possuir um genoma circular de DNA fita dupla, podendo apresentar tamanhos entre 80 e 200 mil pares de bases (pb) como

material genético. Além disso, apresenta um capsídeo protéico em forma de bastonete, constituindo a unidade infectiva do vírus, denominado nucleocapsídeo (Arif, 1986; O'Reilly *et al.*, 1992; Garcia-Maruniak *et al.*, 2004). Uma característica diferenciada do baculovírus é capacidade em produzir dois tipos de vírus fenotipicamente distintos durante o ciclo de infecção: os vírus extracelulares (que causam infecção sistêmica) e os vírus ocluídos (imersos por uma matriz proteica onde as partículas infectivas ou vírions se encontram) (Murphy *et alli.*, 1995).

Além de serem eficientes como bioinseticidas, os baculovírus são também utilizados como sistema de expressão, ou seja, podem expressar genes heterólogos com eficiência. O sistema baseia-se na introdução de genes exógenos no genoma de algum baculovírus de interesse no lugar de um gene não essencial para a replicação, sempre comandado por um promotor considerado forte (O' Reilly *et al.*, 1992, Jarvis, 1997).

Proteínas de importância em diversas áreas, como por exemplo, na medicina e na agricultura, foram expressas em grande quantidade, em cultura de células de insetos usando os baculovírus como vetores de expressão (Ribeiro *et alli.*, 1998). Comparado com outros sistemas de expressão, as vantagens para utilização desses vetores são: expressão de proteínas heterólogas em altas concentrações; a especificidade dos baculovírus, tornando o sistema seguro para ser manipulado; presença de promotores fortemente ativos durante a fase tardia da infecção sem interferência no ciclo viral; capacidade para clonar grande inserções; co-expressão de dois ou mais genes; ambiente eucariótico para expressão de proteínas complexas de eucariotos; simplicidade de manipulação (O' Reilly *et al.*, 1992, Jarvis, 1997; Ribeiro *et al.*, 1998).

Desta forma, a proteína recombinante produzida por Silva (2016), onde a região *s* do antígeno de HBsAg foi fusionado com o gene da poliedrina de baculovírus foi gentilmente cedida para o desenvolvimento deste projeto. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi analisar os antígenos produzidos em testes diagnósticos comumente utilizados nos laboratórios de análises clínicas, que consistem nos testes imunoenzimáticos (ELISA).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho está sendo desenvolvido em colaboração com Universidade de Brasília (UnB), no laboratório de Virologia e Biologia Molecular do Instituto de Biologia – IB, sob orientação do Prof^o Titular Dr Bergmann Morais Ribeiro, Prof^a Dra Anabele de Azevedo Lima e colaboradores. Os resultados apresentados no trabalho são de exclusividade dos parceiros citados.

3.1 Imunização e produção de antissoro

Os cristais de Polh de AcMNPV e os possíveis cristais fusionados com HBsAg na *amino-terminal* (6xhis-HBsAg-Polh) purificados de células de insetos/larva por gradiente de sacarose foram dissolvidos por uma hora a 37 °C em 0.1 M de Na₂CO₃ ou até a dissolução de todos os cristais, neutralizados com 0.1 M de Tris-HCl (pH 7.6), e submetidos a quantificação de proteína total utilizando Quant-iT™ assay kit (Thermo Scientific) seguindo as instruções do fabricante. Os cristais de POLH e os cristais recombinantes foram previamente quantificados por sua totalidade proteica e utilizados para imunização em Camundongos Balb/c de 6-8 semanas por via subcutânea utilizando a concentração de 100µg de proteína total em um volume final de 200µL em intervalos de 15 dias entre cada imunização. A primeira inoculação foi ministrada com adjuvante incompleto de Freund (Sigma Aldrich) na proporção de 1:1, a segunda e a terceira imunização foi ministrada somente com os cristais. Após 15 dias da última imunização, os camundongos foram sacrificados e o sangue periférico obtido por retroorbital para obtenção do soro.

3.2 Imunoensaio

Os cristais fusionados com sHBsAg purificados de larva por gradiente de sacarose foram quantificados utilizando Quant-iT™ assay kit (Thermo Scientific) seguindo as instruções do fabricante. Foram realizados testes sorológicos imunoenzimáticos, ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) direto do tipo *sanduíche*, método que se baseia na interação anticorpo-antígeno. As cavidades da placa de ELISA foram cobertas com 50µL (0,5ng/mL) antígeno sHBsAg fusionada a poliedrina (proteína recombinante). Após incubação de uma hora por 37°C, utilizamos como controle positivo, soro/plasma contendo anticorpos anti-HBsAg comercial e controle negativo, soro/plasma sem anticorpos anti-HBsAg comercial (Wama Diagnóstica) que foram adicionadas 50µL às cavidades juntamente com um conjugado HBsAg marcado com peroxidase, porém o “branco” continha soro/plasma sem anticorpos anti-HBsAg e conjugado. Após a incubação de uma hora por 37°C, ocorre a formação de um complexo

antígeno-anticorpo-antígeno representado pelo conjugado HBsAg marcado com peroxidase, pelo anticorpo anti-HBsAg da amostra e pelo antígeno HBsAg ligado à cavidade da microplaca.

O material não ligado é removido por lavagem de cinco vezes com tampão salino-fosfato (PBS), pH 7,4, contendo Tween 20 como detergente. Um substrato (Tetrametilbenzidina [TMB] + peróxido de hidrogênio) foi adicionado, o qual desenvolve cor azul nas cavidades onde a enzima peroxidase estiver presente, indicando a presença do anticorpo anti-HBsAg. A adição de uma solução de parada da reação enzimática (ácido sulfúrico H₂SO₄ 1,0 M), produz uma mudança de cor da solução para amarela. A absorbância foi então medida a 450 nm em leitor de placa de ELISA. A concentração do anticorpo anti-HBsAg é diretamente proporcional a intensidade da cor da reação. Os resultados foram calculados em relação aos soros controles e densidade óptica (D.O.), cujo valor final é obtido subtraindo da leitura da D.O. do “branco”. O resultado deve ser interpretado de acordo os controles negativos, onde divide se o valor da D.O. da amostra pelo valor do *cut-off*. O teste é considerado reagente se o valor for duas vezes o valor do controle negativo.

Além disso, o teste indireto também foi verificado para analisar a partir do soro de pacientes reagentes para alguns marcadores virais, cedido pelo Laboratório Escola de Análises clínicas do UniCEUB, após aprovação do comitê de ética nº CAAE 77829617.4.0000.0023, foram realizados testes sorológicos imunoenzimáticos, ELISA indireto. Foram testados o antígeno produzido pela estratégia por baculovírus em soro de pacientes reagentes para HBV, HCV e citomegalovírus (CMV), para verificar possíveis reações cruzadas entre esses vírus. Não foram obtidas amostras de soro de pacientes reagentes para hepatite A. Além disso exames prévios utilizando marcadores moleculares detectou apenas IgG no soro dos pacientes.

4. RESULTADOS

4.1 Imunoensaio

Corpos de oclusão produzidos em lagartas *Spodoptera frugiperda* infectadas com os vírus recombinantes (Figura 4) foram testadas contra o Kit Laboratorial anti HBsAg qualitativo e quantitativo da empresa Wama Diagnóstica. Para o teste qualitativo foram avaliadas cinco concentrações diferentes das proteínas totais produzidas neste trabalho (100ng, 200ng, 300ng, 400ng e 500ng), sensibilizadas na cavidade da microplaca de ELISA da marca Costar. Todas as cinco concentrações testadas contra o controle positivo (soro humano positivo para anti-HBsAg) disponível no kit, obtiveram reação positiva. A concentração de 100ng de proteína total dos OBs recombinantes foi selecionada para determinar o valor mínimo detectável em relação a concentração de anticorpo anti-HBsAg em soro (10, 20, 40, 80 e 160 mUI/mL), disponíveis no Kit Laboratorial Anti HBsAg Quantitativo. Utilizamos como controle positivo, soro contendo anticorpos anti-HBsAg e controle negativo, soro sem anticorpos anti-HBsAg disponível no Kit. Todas as cinco concentrações de anticorpo anti-HBsAg em soro testadas reagiram com as proteínas sensibilizadas em microplaca (Figura 4).

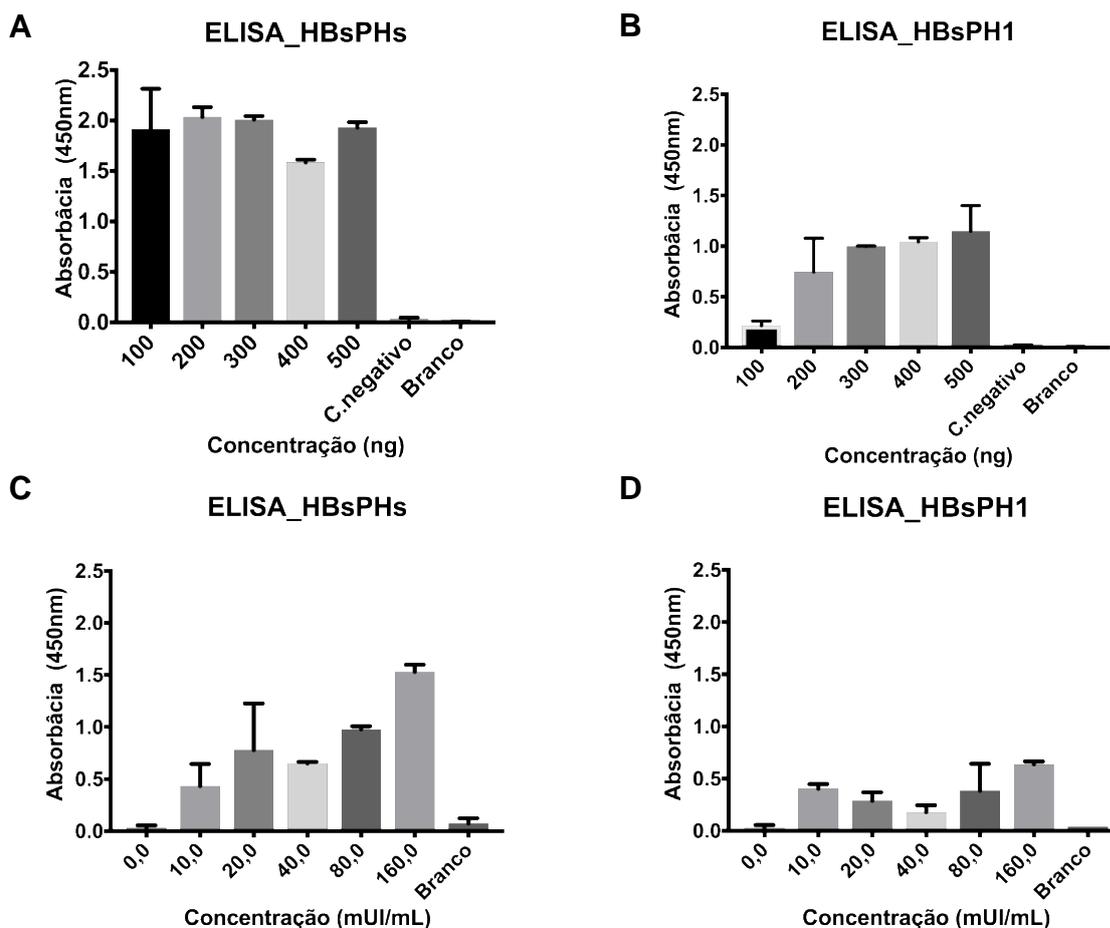


Figura 4. ELISA utilizando Kit Laboratorial Anti HBsAg Qualitativo e Quantitativo da empresa Wama Diagnóstica. Gráfico apresenta o resultado da absorbância (450nm) do imunoenensaio contendo os OBs recombinantes (HBsPHs e HBsPH1). ELISA qualitativo (A e B) com diferentes concentrações da proteína recombinante e quantitativo (C e D) com diferentes concentrações de anti HBsAg em soro comercial. Soro controle negativo (soro humano negativo para anti-HBsAg presente no Kit) e branco (somente substrato cromógeno) Absorbância lida em leitor óptico (spectramax) a 450nm.

O teste de ELISA indireto não foi conclusivo pois apresentou análises de absorbância semelhante e estatística sem significância, inclusive com o controle negativo (Figura 5). Havendo assim, a necessidade de se realizar mais testes de ELISA indireto, com quantidade de soro maior, para identificar possíveis reações cruzadas entre soro de pacientes reagentes com hepatite B, C, A e CMV.

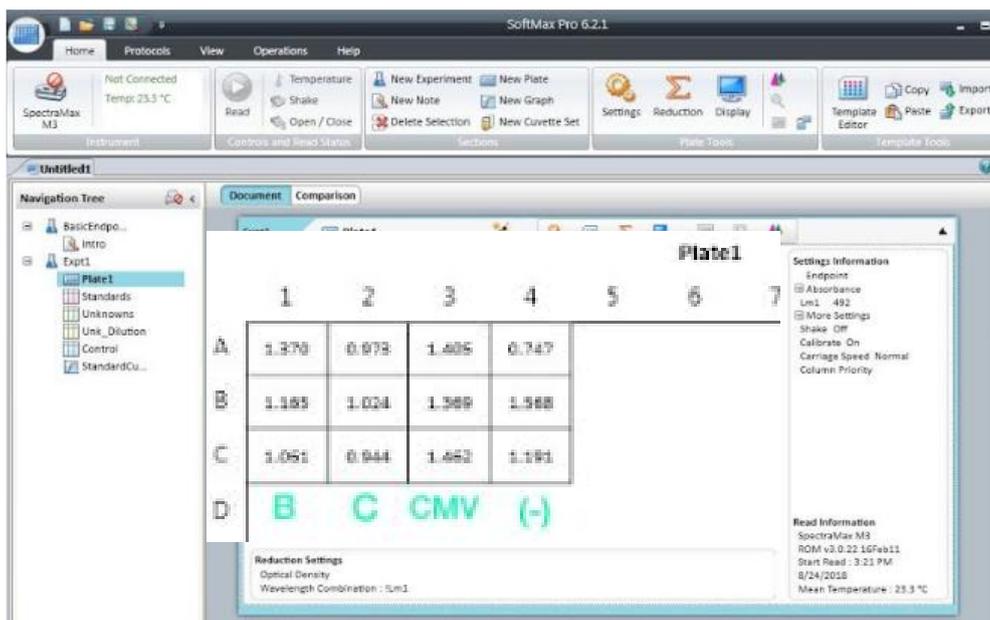


Figura 5: Absorbância registrada pelo programa SoftMax Pro 6.2.1, da reação cruzada entre o antígeno possuindo regiões antigênicas do vírus da hepatite B e soro de pacientes reagentes para hepatite C e CMV. Como controle negativo utilizou-se soro de paciente não reagente para hepatite B.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho foram utilizados baculovírus recombinante expressando a proteína de interesse do gene *sHBsAg* construídos por Silva et al. (2016), para analisar sua imunogenicidade. O vírus recombinante vAcPHHBs, que apresenta o gene *sHBsAg* fusionado na região 3' do gene *polh* do AcMNPV e o vAcHBsPH2, que apresenta o gene *sHBsAg* fusionado na região 5' do *polh* e uma cópia do gene *polh* do AcMNPV.

A glicoproteína de membrana HBsAg presente no envelope do vírus HBV como descrito por Ganem & Schneider (2001) é codificada pelo gene pré sS/S que contém as regiões pré S1, pré S2 e S. A maior subunidade que compõe o HBsAg é a *large S*, com códon de iniciação localizado no início da região pré S1; a subunidade de tamanho intermediário designada de *middle S* é codificada pelas regiões pré S2 e S; a menor subunidade, *small S*, é sintetizada a partir do códon de iniciação localizado no início da região s do HBsAg que é altamente imunogênico. Enquanto na maioria dos kits diagnóstico é utilizado a proteína inteira composta pelas 3 subunidades. Neste trabalho somente a subunidade *small S* foi utilizada. A subunidade *small S* foi reconhecida pelos anticorpos anti-HBsAg comerciais nos testes de

imunoensaio. Lanford et al. (1998), construiu baculovírus (AcMNPV) recombinantes para expressão de proteínas antigênicas de superfície do vírus da hepatite B, com e sem a região pré-S, fusionado e não fusionado.

A utilização de proteínas recombinantes para a produção de teste de detecção antígeno-específica e produção de vacinas vêm sendo ampliada devido a sua segurança e facilidade. Price et al. (1989), utilizou o sistema de expressão baseado em baculovírus AcMNPV e células de inseto para expressar o antígeno de superfície do HBV, HBsAg, e uma glicoproteína do envelope do vírus Influenza A, neuraminidase (NA). As proteínas recombinantes produzidas por recombinação homóloga sob o comando do promotor *polh*, foram testadas em imunoenaios e sua antigenicidade foi comprovada com sucesso.

O diagnóstico laboratorial específico confirmatório utilizado hoje para detecção de infecção pelo HBV é realizado por meio de testes sorológicos como o ensaio imunoenzimático (EIA) e Radioimunoensaio (RIA) que buscam identificar no soro humano, os antígenos HBsAg e HBeAg e os anticorpos anti-HBcAg, anti-HBeAg e anti-HBsAg. Os laboratórios clínicos, devido à alta demanda de diagnóstico para HBV, têm procurado utilizar kits prontos para realizar os testes diagnósticos poupando tempo e diminuindo os custos. Os laboratórios de referência como os Laboratórios Centrais chegam a realizar mais de mil exames dia para HBV, e isso faz com que a necessidade de utilização de kit de fácil execução, baixo risco de manipulação e menor custo aumente significativamente, incentivando as empresas a buscarem novas técnicas (Roberto, 2007). O teste para detecção de HBsAg é estendido para além de casos de pacientes com suspeita de HBV, mas também para acompanhamento da progressão da doença e para segurança de todo sangue doado nos Hemocentros e Bancos de sangue.

A produção de HBsAg utilizando o sistema de expressão em baculovírus é uma ferramenta com potencial para ser utilizada na criação de kits diagnóstico para detecção de HBsAg e Anti-HBs, pois, sua produção é simples e não oferece risco de contaminação viral, como demonstrado nesse trabalho.

A imunodeteção realizada neste trabalho foi testada com sucesso utilizando padrões tais como conjugado HBsAg marcado com peroxidase, substrato cromógeno, solução de parada (*stop*) e soro/plasma como controle negativo e positivo do kit anti HBsAg da empresa Wama Diagnóstica. Esse resultado demonstra que o sHBsAg produzido em inseto e culturas de células é capaz de ser reconhecido por soro contendo anticorpos anti-HBsAg comercial, por enzimaensaio (ELISA), revelando uma alternativa promissora para produção de kits

diagnóstico anti- HBsAg. Isso possibilitaria a produção desses Kits pela indústria nacional, por um menor custo, para utilização em larga escala nos laboratórios e centros de referência.

Como o HBV é um agente biológico de risco 3, com risco a saúde humana principalmente dos trabalhadores que ficam expostos ao vírus como, pesquisadores, agentes de saúde e todos os profissionais que participam dos estudos e produção de manufaturas como kits diagnóstico e vacinas, é preconizado pelo Parlamento Europeu e conselho da União Europeia (7º diretiva especial nos termos do nº 1 do artigo 16º da diretiva 89/391/CEE) que devem ser sempre mantidas as atualizações de melhora e aperfeiçoamento da proteção da saúde e segurança dos trabalhadores por meio de manipulação de vírus recombinantes ou partículas virais mais seguros. O sistema de expressão em baculovírus também proporciona a criação de kits diagnóstico seguros, pois, o baculovírus não é patogênico para o homem, sendo ele incapaz de infectar células humanas, mesmo sendo capaz de transduzir células de mamíferos e fazer entrega gênica (van Oers, 2011; van Oers et al, 2015).

Porém para uma melhor análise da proteína recombinante construída faz-se necessário testar contra soro de pacientes infectados com HBV e novos testes utilizando a técnica de ELISA com os anticorpos agora reconhecendo e diferenciando soro de pacientes infectados com Vírus da hepatite A, B, C (HAV, HBV e HCV) e Citomegalovirus CMV.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo à devida consciência da importância e problemas que a infecção por hepatites viral vem trazendo à população mundial é de suma necessidade o desenvolvimento de estratégias que possibilitam a criação de um diagnóstico preciso e o desenvolvimento de um insumo vacinal. Portanto, a busca por novas estratégias, expressando proteínas antigênicas recombinantes fusionadas a poliedrina, nesse sistema eucarioto de expressão em baculovírus, pode possibilitar futuramente o desenvolvimento de um kit diagnóstico específico, eficiente e com baixo custo, sendo também, uma alternativa viável em futuros estudos na produção de vacinas, já que o presente trabalho apresenta uma estratégia que não desencadeia riscos aos humanos ao mesmo tempo que utiliza regiões antigênicas específicas do vírus.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, A.C.O. Nova abordagem para **expressão da partícula sSHbsAg do antígeno HBsAg do vírus da Hepatite B em células de inseto**. 2011. 81 f. Dissertação (mestrado) do programa de pós-graduação em Patologia molecular da Universidade de Brasília, Brasília, 2011.
- ARIF, B. M. The structure of the viral genome. In: DOERFLER, W; BOHM, P. **The Molecular Biology of Baculoviruses**. 131. ed.; Berlim: Springer-Verlag, 1986. p. 21-29,
- ASPINALL, E. J. *et al.* Hepatitis B prevention, diagnosis, treatment and care: [revisão]. *Occupational medicine. Occupational Medicine*: Oxford, v. 61, p. 531-540, Dez. 2011.
- BARON, J. L. *et al.* Activation of a Nonclassical NKT Cell Subset in a Transgenic Mouse Model of Hepatitis B Virus Infection. **Immunity**: San Francisco, CA, v. 16, p. 583-594, Abr. 2002.
- BARROS, M. C. **Expressão de proteínas do vírus da dengue em células de inseto utilizando o sistema baculovírus de expressão**. 2007. 108 f. Dissertação (mestrado) do programa de pós-graduação em Patologia molecular da Universidade de Brasília, Brasília, 2007.
- BRASIL. **A B C D E do Diagnóstico para as Hepatites Virais**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.
- BRASIL. **Diagnóstico de hepatites virais**, Brasília: Ministério da saúde, 2014.
- BRASIL. **Hepatites virais: o Brasil está atento**, Brasília: Ministério da saúde, 2008.
- BRASIL. Manual técnico para diagnóstico das hepatites virais, Brasília: Ministério da Saúde, 2015.
- BRASIL. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Hepatite Viral Crônica B e Coinfecções**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
- CALIENDO, A. M. *et al.* Multilaboratory evaluation of real-time PCR tests for hepatitis B virus DNA quantification. **Journal of clinical microbiology**: Atlanta, GA, v. 49, p. 2854-2858, Ago. 2011.
- CARVALHO, A. M. C.; ARAÚJO, T. M. E. Análise da produção científica sobre Hepatite B na pós-graduação de enfermagem: [revisão]. **Revista Brasileira de Enfermagem**: Teresina, PI, v. 61, p. 518-522, 2008.
- CASTRO, M. E. B. *et al.* Biologia Molecular de Baculovírus e seu uso no Controle Biológico de Pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**: Brasília, DF, v. 34, p. 1733-1761, Out. 1999.
- CHANG, J. H. *et al.* An improved baculovirus insecticide producing occlusion bodies that contain Bacillus Thuringiensis insect toxin. **Journal of Invertebrate Pathology**: New York, NY, v. 84, p. 30-37, Set. 2003.

- FERREIRA, C.T.; SILVEIRA T.D. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. **Revista brasileira de epidemiologia**: Porto Alegre, RS, v. 7, p. 473-487, Dez. 2004.
- FERREIRA, R. C. *et al.* Prevalence of hepatitis B virus and risk factors in Brazilian non-injecting drug users. **Journal of medical virology**: New York, NY, v. 81, p. 602-609, Abr. 2009.
- FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 5. ed.; Philadelphia: Lippincott-Raven, 2007.
- FONSECA, J.C.F. Histórico das hepatites virais: [revisão]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**: Manaus, AM, v. 43, p. 322-330, Maio. 2010.
- FUNG, J. *et al.* Hepatitis B Surface Antigen Seroclearance: Relationship to Hepatitis B e-Antigen Seroclearance and Hepatitis B e-Antigen-Negative Hepatitis. **The American journal of gastroenterology**: Londres, v. 109, p. 1764-1770, Nov. 2014.
- FUNK, C. J.; BRAUNAGEL, S. C.; ROHRMANN, G. F. Baculovirus structure. In: MILLER, L. K. **The baculoviruses**. 1. ed.; New York: Plenum Press, 1997. p. 7- 32.
- GARCIA - MARUNIAK, A. G. *et al.* Sequence analysis of the genome of the Neodiprion sertifer nucleopolyhedrovirus. **J Virology**: Beltimore, MD, v. 78, p. 7036-7051, Jul. 2004.
- GERLICH, W. H. Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now. **Virology jornal**: Londres, v. 10, p. 239, Jan. 2013.
- GONÇALVES JUNIOR, F. L. Hepatite por Vírus B: História Natural da Infecção. In: FOCACCIA, R. **Tratado de Hepatites Virais e Doenças Associadas**. 3. ed.; São Paulo: Atheneu, 2013. p. 327-339.
- GROB, P. Hepatitis B: virus, pathogenesis and treatment. **Vaccine**: Guildford, Surrey, UK, v. 16, p. S11-S16, Nov. 1998.
- GUIDOTTI, L. G. *et al.* Intracellular Inactivation of the Hepatitis B Virus by Cytotoxic T Lymphocytes. **Immunity**: Cambridge, MA, v. 4, p. 25-36, Jan. 1996.
- GUIDOTTI, L. G. *et al.* Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. **Science**: New York, NY, v. 284, p. 825-9, Abr. 1999.
- HAAS-STAPLETON, E. J., WASHBURN, J. O., VOLKMAN, L. E. P74 mediates specific binding of Autographa californica M nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to primary cellular targets in the midgut epithelia of *Heliothis virescens* larvae. **Journal of Virology**: Baltimore, MD, v. 78, p. 6786–6791, Jul. 2004.
- HOLLINGER, F.B; LIANG, T.J. Hepatitis B virus. In: KNIPE, D.M, *et al.* **Fields Virology**. 4. ed.; Philadelphia: Lippincott-Raven, 2001. p. 2971–3036.
- HORTON, M. H.; BURAND, J.P. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. **Journal of Virology**: Baltimore, MD, v. 67, p.1860-1868, Abr. 1993.
- HOUGHTON, M. Hepatitis C virus. In: FIELDS, B.N; KNIPE, D.M; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 3. ed.; Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. p. 1035 - 1058.

- ISMAIL, A. M. *et al.* Performance characteristics and comparison of Abbott and artus real-time systems for hepatitis B virus DNA quantification. **Journal of clinical microbiology**: Washington, DC, v. 49, p. 3215-21, Set. 2011.
- JARVIS, D. Baculovirus expression vectors. In: MILLER, L. K. **The Baculoviruses**. 1. ed.; New York: Plenum Press, 1997. p. 389 – 431.
- Je, Y. H. Baculovirus Expression Vectors that Incorporated the Foreign into Viral Occlusion Bodies. **Biotechniques**: Londres, UK, v. 34, p. 81-87, Jan. 2003.
- KAKIMI, K. *et al.* Cutting Edge: Inhibition of Hepatitis B Virus Replication by Activated NK T Cells Does Not Require Inflammatory Cell Recruitment to the Liver. **The Journal of Immunology**: Baltimore, MD, v. 167, p. 6701-6705, Dez. 2001.
- KARRON, R.A; COLLINS, P.L. Hepatitis C Virus. In: FIELDS, B.N; KNIPE, D.M; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 5. ed.; Philadelphia: Lippincott-Raven, 2007. p. 1527-1542.
- KAWATANI, T. *et al.* Incidence of hepatitis virus infection and severe liver dysfunction in patients receiving chemotherapy for hematologic malignancies. **European Journal of Haematology**: Copenhagen, DK, v. 67, p. 45-50, Jul. 2001.
- LAU, G. K. K. High hepatitis B virus (HBV) DNA viral load as the most important risk factor for HBV reactivation in patients positive for HBV surface antigen undergoing autologous hematopoietic cell transplantation. **Blood**: Washington, DC, v. 99, p. 2324–2330, Abr. 2002.
- LEE, J. M.; AHN, S. H. Quantification of HBsAg: basic virology for clinical practice. **World Journal of gastroenterology**: Beijing, CN. v. 17, p. 283-289, Jan. 2011.
- LEE, W. M. Hepatitis B virus infection. **New England journal of medicine**: Boston, MA, v. 337, p. 1733-1745, Dez. 1997.
- LIANG, T. J. Hepatitis B: the virus and disease. **Hepatology**: Baltimore, MD, v. 49, p. S13-21, Maio. 2009.
- MARUYAMA, T. *et al.* The serology of chronic hepatitis B infection revisited. **The Journal of clinical investigation**: New Haven, CT, v. 91, p. 2586-95, Jun. 1993.
- MATOS, M. A. D. *et al.* Occult hepatitis B virus infection among injecting drug users in the Central-West Region of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**: Rio de Janeiro, RJ, v. 108, p. 386-389, Maio 2013.
- MCCLARY, H. *et al.* Relative Sensitivity of Hepatitis B Virus and Other Hepatotropic Viruses to the Antiviral Effects of Cytokines. **Journal of Virology**: Baltimore, MD, v. 74, p. 2255-2264, 1 Mar. 2000.
- MELLO, F. C. A. *et al.* Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. **BMC microbiology**, Londres, UK, v. 7, p. 103, Nov. 2007.
- MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual review of entomology**: Polo Alto, CA, v. 44, p. 257-289, Fev. 1999.
- MURPHY, F. A. **Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses**. 1. ed. New York: Springer-Verlag Wien, 1995. p.104-113.
- OCANA, S. *et al.* Diagnostic strategy for occult hepatitis B virus infection. **World journal of gastroenterology**: Beijing, CH, v. 17, p. 1553-7, Mar. 2011.

- O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus Expression Vector: A Laboratory Manual**. 74. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1992.
- REHERMANN, B. *et al.* Hepatitis B virus (HBV) sequence variation of cytotoxic T lymphocyte epitopes is not common in patients with chronic HBV infection. **The Journal of clinical investigation**: New Haven, CT, v. 96, p. 1527-34, Set. 1995.
- REHERMANN, B.; NASCIMBENI, M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. **Nature reviews Immunology**: Londres, UK, v. 5, p. 215-29, Mar. 2005.
- RIBEIRO, B. M.; SOUZA, M. L.; KITAJIMA, E.W. Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus de insetos. In: ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 481-507.
- ROTHER, E. Revisão Sistemática x Revisão Narrativa. **Acta Paulista de Enfermagem**: São Paulo, SP, v. 20, p. 5 - 6, Abr/Jun. 2007.
- SABLON, E.; SHAPIRO, F. Advances in molecular diagnosis of HBV infection and drug resistance. **International journal of medical sciences**: Australia, v. 2, p. 8-16, Jan. 2005.
- SEEGER, C.; MASON, W. S. Hepatitis B Virus Biology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 64, p. 51-68, Mar. 2000.
- SILVA, C. *et al.* The influence of occult infection with hepatitis B virus on liver histology and response to interferon treatment in chronic hepatitis C patients. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**: Campinas, SP, v. 8, p. 431-439, 2004.
- SILVA, L.A. **Expressão de antígenos virais fusionados a uma proteína formadora de corpos de oclusão de um vírus de inseto**. 2016. 92 f. Tese (doutorado) do programa de pós-graduação em Patologia molecular da Universidade de Brasília, Brasília, 2016.
- SITNIK, R.; PINHO, J. Hepatitis B virus genotypes and precore and core mutants in Brazilian patients. **Journal of Clinical Microbiology**: Washington, DC, v. 42, p. 2455-2460, Jun. 2004.
- TATEMATSU, K. *et al.* A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. **Journal of virology**: Washington, DC, v. 83, p. 10538-47, Out. 2009.
- THIMME, R. *et al.* CD8+ T Cells Mediate Viral Clearance and Disease Pathogenesis during Acute Hepatitis B Virus Infection. **Journal of Virology**: Washington, DC, 77, p. 68-76, Jan. 2003.
- TRAN, T. T. H.; TRINH, T. N.; ABE, K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. **Journal of virology**: Washington, DC, v. 82, n. 11, p. 5657-63, Jun. 2008.
- VAN OERS, M. M.; PIJLMAN, G. P.; VLAK, J. M. Thirty years of baculovirus--insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology. **Journal of General Virology**: Londres, UK, v. 96, p. 6-23, Jan. 2015.
- ZHANG, Q; CAO, G. Genotypes, mutations, and viral load of hepatitis B virus and the risk of hepatocellular carcinoma. **Hepatitis Monthly**: Shanghai, v. 11, p. 86-91, Fev. 2011.