

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS
INSTITUTO CARLOS CHAGAS**

CAMILA BORGES SUAREZ

**OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES COM POTENCIAL
APLICABILIDADE PARA IMUNODIAGNÓSTICO DE HEPATITE B E HEPATITE C
ATRAVÉS DA TÉCNICA *DE PHAGE DISPLAY*.**

CURITIBA

2011

CAMILA BORGES SUAREZ

**OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES COM POTENCIAL APLICABILIDADE
PARA IMUNODIAGNÓSTICO DE HEPATITE B E HEPATITE C ATRAVÉS DA TÉCNICA DE
PHAGE DISPLAY.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Processos Biotecnológicos, Setor de
Tecnologia, Universidade Federal do Paraná,
como requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Processos Biotecnológicos.

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Krieger
Co-orientadora: Dr.^a Daniela Parada Pavoni

CURITIBA

2011

Aos meus pais e exemplos de vida, Selma e Gregório, por todo amor e incentivo.

Aos meus irmãos Carolina e Felipe pelo apoio incondicional.

Ao meu noivo Rafael por seu amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Marco Aurélio Krieger por acreditar neste projeto, por sua dedicação incansável à pesquisa e desenvolvimento e por todos os ensinamentos compartilhados nesta caminhada.

À Dra. Daniela Parada Pavoni pelo acolhimento no Instituto Carlos Chagas, por todo conhecimento científico transmitido, por sua ajuda constante e sua paciência nos diversos desafios que se apresentaram.

À melhor parceira de projeto e grande pesquisadora, Tahiana Brandalize, por seu carinho, por todos os momentos em que me apoiou e por suas preciosas contribuições a este projeto.

Ao Dr. Carlos Ricardo Soccol e Dra. Luciana Vandenberghe, por seus papéis fundamentais no início de minha jornada científica e pelo apoio ao desenvolvimento deste projeto no Programa de Processos Biotecnológicos.

Aos doutores Stenio Fragoso Perdigão, Fabrício Marchini e Christian Probst pelos ensinamentos transmitidos em diversos momentos.

À Andreia Dallabona, pela amizade, carinho e instruções preciosas.

Aos colegas Miriam Zambenedetti, Maykol Noll, Rita Rampazzo, Cheysa Biondo, Juliane Rocha, Carla Lima, Josiane Cardoso, Ana Kalb, Fernanda Kugeratski, Suzana Carstensen, Paola Celedon, Michel Batista, Henrique Preti e Paulo Arauco pelos ensinamentos e pela amizade.

À equipe de preparo do Instituto Carlos Chagas, Nilson, Vanessa, Tânia, Silvio, Diego e Rafael, por toda a ajuda, compreensão e parceria.

Finalmente, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e a Deus, que me deu força para persistir em meus ideais e concretizar mais esta etapa em minha vida.

*“E o versado na ciência dos números poderá
falar-vos do mundo dos pesos e das medidas,
mas não vos poderá levar até lá,*

*Porque a visão de um homem não empresta
asa a outro homem.*

*E assim como cada um de vós se mantém
isolado na consciência de Deus, assim cada
um deve ter sua própria compreensão de
Deus e sua própria interpretação das coisas
da Terra.” (GIBRAN KHALIL GIBRAN)*

RESUMO

O Ministério da Saúde tem a hemovigilância como uma de suas áreas estratégicas de atuação, com o objetivo de direcionar ações visando reduzir os incidentes transfusionais, dentre os quais, devido à gravidade, podemos destacar: infecção por HBV/Hepatite B e infecção por HCV/Hepatite C, que totalizam 350 e 170 milhões de pacientes crônicos no mundo, respectivamente. Portanto, é obrigatória a realização de exames laboratoriais de alta sensibilidade para detecção destes patógenos, em todas as doações, sendo que o sangue e seus derivados não podem ser transfundidos antes da obtenção de resultados finais de triagem não-reagentes. Estima-se que o mercado mundial de kits de diagnóstico movimenta cerca de 25 bilhões de dólares anualmente e o Brasil, em particular, estima-se possuir um saldo comercial negativo em reativos de diagnóstico da ordem de 200 milhões de dólares, explicitando a alta dependência do país por importações para suprir a demanda interna de diversos programas de saúde pública. Com base nestes dados, o presente trabalho foi desenvolvido para a triagem de três bibliotecas comerciais (Ph.D. 7, Ph.D. 12 e Ph.D. C7C, *New England Biolabs*) construídas pela técnica de *Phage Display* para a obtenção de peptídeos recombinantes com potencial aplicabilidade no imunodiagnóstico de hepatite B e hepatite C. Após a realização de três ciclos de seleção (*bio-panning*), foi realizado o seqüenciamento dos peptídeos obtidos e, através da análise dos mesmos por ferramentas de bioinformática e da realização de estudos de afinidade por ensaios imunoenzimáticos, foi possível selecionar três peptídeos de potencial aplicabilidade para testes de imunodiagnóstico do vírus da hepatite B e dez para o vírus da hepatite C.

ABSTRACT

Aiming to direct actions in order to reduce post-transfusional incidents, such as hepatitis B and C viruses infection (which total 350 and 170 million chronic patients in the world, respectively), the Brazilian Ministry of Health has hemovigilance as one of its strategic areas of action. Therefore, it is mandatory to carry out laboratory tests of high sensitivity for the detection of these pathogens in all donations and the blood and its derivatives can not be transfused prior to obtaining final results of non-reactive screening. It is estimated that the worldwide market for diagnostic kits moves around 25 billion dollars annually and Brazil in particular, is estimated to have a negative trade balance in diagnostic reagents of 200 million dollars, which results in a high national dependence on imports to meet Brazilian demand for many public health programs. Based on these data, this work was developed in order to obtain recombinant peptides with potential applicability in the immunodiagnosis of hepatitis B and hepatitis C through the screening of three commercial libraries of random peptides (Ph.D. 7, Ph.D. 12 e Ph.D. C7C, *New England Biolabs*) constructed using the Phage Display technology. After performing three rounds of screening (bio-panning), all peptides screened were sequenced and the data obtained was analyzed by bioinformatics tools and immunoassays affinity studies. As a result, it was possible to select three peptides with potential applicability in immunodiagnostic tests for hepatitis B virus and ten peptides for hepatitis C virus testing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Gráfico da evolução do comércio de reagentes de diagnóstico. Brasil 1997-2004.	4
Figura 2 – Distribuição mundial de infecção pelo vírus da hepatite B.	6
Figura 3 – Estrutura do vírus da hepatite B.	8
Figura 4 – Representação gráfica do genoma do vírus da hepatite B (HBV).	9
Figura 5 – Ciclo de vida do vírus da hepatite B (HBV).	11
Figura 6 – Evolução clínica e sorológica após a infecção pelo vírus da hepatite B.	15
Figura 7 – Prevalência mundial da infecção pelo vírus da hepatite C.	17
Figura 8 – Modelo da estrutura do HCV (a) e proteínas codificadas pelo genoma do vírus (b).	19
Figura 9 – Ciclo de vida do vírus da hepatite C (HCV).	23
Figura 10 – Progressão natural da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) e sua evolução de acordo com as características dos indivíduos.	25
Figura 11 – Cinética de evolução dos marcadores sorológicos na hepatite C.	25
Figura 12 – O ciclo do método de <i>Phage Display</i>	29
Figura 13 – A dinâmica de seleção do <i>Phage Display</i> : no decorrer dos ciclos de seleção aumenta a representatividade de fagos específicos à molécula-alvo e reduz a diversidade da biblioteca utilizada a cada ciclo, havendo sempre a presença de fagos inespecificamente ligados.	30
Figura 14 – Representação esquemática do bacteriófago M13.	32
Figura 15 – Ciclo de vida do fago filamentosso M13.	33
Figura 16 – Representação linear dos genes e produtos gênicos de fagos filamentosos.	34
Figura 17 – Diagrama esquemático do modo de fusão de peptídeos às proteínas de superfície pIII, pVIII e pVI de vetores de <i>Phage Display</i>	36
Figura 18 – Esquema geral para <i>Phage Display</i> utilizando vetores fago e fagomídeo.	38
Figura 19 – Ilustração do processo global de seleção de peptídeos randômicos de potencial aplicabilidade por <i>Phage Display</i>	44

Figura 20 – Mapa do genoma do vetor M13KE.....	45
Figura 21 – Representação esquemática das bibliotecas Ph.D. 7, Ph.D. 12 e Ph.D. C7C (<i>New England Biolabs</i>).....	46
Figura 22 – Esquema representativo da organização das etapas de <i>bio-panning</i>	46
Figura 23 – Representação dos locais de anelamento dos iniciadores utilizados para o seqüenciamento dos insertos dos clones de fagos selecionados.....	61
Figura 24 – Interface do programa ClustalW.....	62
Figura 25 – Conjunto de bancos de dados de seqüências não-redundantes de proteínas (a: hepatite B, b: hepatite C) utilizados para o BLASTP dos clones selecionados versus as proteínas dos alvos de seleção.....	68
Figura 26 – Representação esquemática do ensaio imunoenzimático dos clones selecionados frente ao <i>pool</i> de anticorpos monoclonais (MAbs) utilizados para seleção no <i>bio-panning</i>	69
Figura 27 – Representação esquemática do ensaio imunoenzimático de abertura de <i>pool</i> para avaliação dos anticorpos monoclonais (MAbs) sobre a seleção dos fagos.....	70
Figura 28 – Mapa do vetor pMAL-pIII utilizado para a subclonagem dos peptídeos selecionados.....	74
Figura 29 – Localização dos sítios de restrição dos produtos de PCR purificados.....	76
Figura 30 – Resultado do teste da diluição de fagos ser utilizada nos ensaios imunoenzimáticos de <i>outputs</i> e clones individuais.....	84
Figura 31 – Resultado da titulação do <i>output</i> de fagos e do ensaio imunoenzimático para avaliação da afinidade ao alvo do <i>pool</i> de fagos resultantes do <i>bio-panning</i> das bibliotecas Ph.D. 12 (A), Ph.D. 7 (B) e Ph.D. C7C (C) para hepatite B.....	85
Figura 32 – Resultado da titulação do <i>output</i> de fagos e do ensaio imunoenzimático para avaliação da afinidade ao alvo do <i>pool</i> de fagos resultantes do <i>bio-panning</i> das bibliotecas Ph.D. 12 (A), Ph.D. 7 (B) e Ph.D. C7C (C) para hepatite C.....	87
Figura 33 – Avaliação do <i>output</i> de fagos obtidos no experimento controle do <i>bio-panning</i> utilizando estreptavidina como alvo para os peptídeos da biblioteca Ph.D. C7C.....	89
Figura 34 – Alinhamento dos peptídeos selecionados a partir do experimento controle do <i>bio-panning</i> com alvo de estreptavidina.....	90
Figura 36 – Perfil aminoacídico dos peptídeos selecionados para hepatite C a partir das bibliotecas Ph.D. 12, Ph.D. 7 e Ph.D. C7C.....	98
Figura 37 – Alinhamento dos peptídeos obtidos para as três bibliotecas comerciais frente à seleção com MAbs de hepatite C com presença a presença majoritária da seqüência Prolina-Triptofano-Prolina (PWP).....	103

Figura 38 – Ensaio imunoenzimático dos clones selecionados de diferentes representatividades para HBV a partir das bibliotecas Ph.D. 12 (A), Ph.D. 7 (B) e Ph.D. C7C (C) frente ao <i>pool</i> de MAbS utilizado no <i>bio-panning</i>	112
Figura 39 – Ensaio imunoenzimático dos clones selecionados de diferentes representatividades para HCV a partir das bibliotecas Ph.D. 12 (A), Ph.D. 7 (B) e Ph.D. C7C (C) frente ao <i>pool</i> de MAbS utilizado no <i>bio-panning</i>	116
Figura 40 – Ensaio imunoenzimático para avaliação individual dos MAbS de hepatite B utilizados para o <i>bio-panning</i> das bibliotecas Ph.D. 12, Ph.D. 7 e Ph.D. C7C.....	120
Figura 41 – ELISA para avaliação da afinidade dos peptídeos selecionados frente aos MAbS de hepatite C utilizados para o <i>bio-panning</i> da biblioteca Ph.D. 12.....	122
Figura 42 – ELISA para avaliação da afinidade dos peptídeos 1C_7, 5C_7 e 8C_7 selecionados frente aos MAbS de hepatite C utilizados para o <i>bio-panning</i> da biblioteca Ph.D. 7.....	123
Figura 43 – ELISA para avaliação da afinidade dos peptídeos 11C_7 e 12C_7 selecionados frente aos MAbS de hepatite C utilizados para o <i>bio-panning</i> da biblioteca Ph.D. 7.....	124
Figura 44 – ELISA para avaliação da afinidade dos peptídeos selecionados frente aos MAbS de hepatite C utilizados para o <i>bio-panning</i> da biblioteca Ph.D. C7C.....	125
Figura 45 – Alinhamento da seqüência aminoacídica majoritária YPWP selecionada para o vírus da hepatite C frente à proteína do capsídeo viral (<i>core</i>).	126
Figura 46 – ELISA preliminar frente a soros de pacientes utilizando como representante o peptídeo 23C_12.	127
Figura 47 – Gel de agarose 1% dos insertos amplificados dos clones selecionados de potencial aplicabilidade.	129
Figura 48 – Gel de agarose 1% do vetor pMAL-pIII digerido e não-digerido.....	130
Figura 49 – Gel representativo de 8% de poliacrilamida utilizado para visualização e purificação das digestões dos insertos.....	130
Figura 50 – Exemplo de gel de 8% de poliacrilamida não-desnaturante utilizado para triagem das colônias amplificadas contendo os insertos.....	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição das infecções e/ou das doenças com triagem laboratorial normatizada, de acordo com o ano de publicação da norma específica.	2
Tabela 2 – Especificações dos anticorpos monoclonais utilizados como moléculas-alvo nos ciclos de <i>bio-panning</i>	48
Tabela 3 – Lista de abreviaturas dos aminoácidos com suas respectivas cores segundo o programa ClustalW.	63
Tabela 4 – Seqüências dos <i>iniciadores</i> utilizados para a amplificação dos insertos.	75
Tabela 5 – Programa de PCR utilizado para a amplificação das seqüências a serem subclonadas no vetor pMAL-pIII.	75
Tabela 6 – Seqüências dos <i>iniciadores</i> desenhados para a avaliação dos clones por PCR de colônia.	81
Tabela 7 – Programa de PCR utilizado para a amplificação do DNA das colônias de bactérias transformadas e selecionadas por <i>toothpick</i>	81
Tabela 8 – Seqüência de tradução dos peptídeos selecionados no experimento controle do <i>bio-panning</i>	90
Tabela 9 – Seqüências e tradução dos peptídeos de potencial aplicabilidade pré-selecionados para hepatite B a partir da biblioteca Ph.D. 12.	94
Tabela 10 – Seqüências e tradução dos peptídeos de potencial aplicabilidade pré-selecionados para hepatite B a partir da biblioteca Ph.D. 7.	95
Tabela 11 – Seqüências e tradução dos peptídeos de potencial aplicabilidade pré-selecionados para hepatite B a partir da biblioteca Ph.D. C7C.	96
Tabela 12 – Seqüências e tradução dos peptídeos de potencial aplicabilidade pré-selecionados para hepatite C a partir da biblioteca Ph.D. 12.	99
Tabela 13 – Seqüências e tradução dos peptídeos de potencial aplicabilidade pré-selecionados para hepatite C a partir da biblioteca Ph.D. 7.	100

Tabela 14 – Seqüências e tradução dos peptídeos de potencial aplicabilidade pré-selecionados para hepatite C a partir da biblioteca Ph.D. C7C.....	101
Tabela 15 – BLASTP e classificação dos peptídeos selecionados frente aos anticorpos monoclonais de HBV.....	106
Tabela 16 – BLASTP e classificação dos peptídeos selecionados frente aos anticorpos monoclonais de HCV.....	108
Tabela 17 – Clones selecionados para realização de ELISA frente ao <i>pool</i> de MAbs de HBV utilizados no <i>bio-panning</i>	111
Tabela 18 – Peptídeos de potencial aplicabilidade selecionados para o vírus da hepatite B.	114
Tabela 19 – Clones selecionados para realização de ELISA frente ao pool de MAbs de HCV utilizados no <i>bio-panning</i>	115
Tabela 20 – Peptídeos de potencial aplicabilidade selecionados para o vírus da hepatite C.	118

LISTA DE SIGLAS

AIDS -	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ALT -	Alanina Aminotransferase
Anti-HBc -	Anticorpo contra o antígeno central da hepatite B
Anti-HBs -	Anticorpo contra o antígeno de superfície da hepatite B
ANVISA -	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARFP -	<i>Alternate Reading Frame Protein</i>
BRATS -	Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde
BSA -	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CBR -	<i>Critical Binding Residues</i>
cccDNA -	<i>Covalently-Closed-Circular DNA</i>
CTL -	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte</i>
DNA -	Ácido Desoxiribonucleico
DR1 -	<i>Direct Repeat 1</i>
dsDNA -	<i>Double-Stranded DNA</i>
EIA -	Ensaio Imunoenzimático
ELISA -	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
HAI -	Hemaglutinação Indireta
HBcAg -	Antígeno central do do vírus da Hepatite B
HbeAg -	Antígeno <i>e</i> do vírus da hepatite B
HBsAg -	Antígeno de superfície do vírus da Hepatite B
HBV -	Vírus da Hepatite B
HBx -	Proteína X do vírus da hepatite B
HCC -	<i>Hepatocellular Carcinoma</i>
HCV -	Vírus da Hepatite C
HIV -	Vírus da Imunodeficiência Humana
HTLV -	Vírus T-linfotrópico humano
IgG -	Imunoglobulina G
IgM -	Imunoglobulina M
Kd -	Constante de Dissociação
MAbs-	<i>Monoclonal Antibodies</i>

MBP -	<i>Maltose Binding Protein</i>
mRNA -	RNA mensageiro
NANBH -	Hepatite Não-A e Não-B
NAT -	<i>Nucleic Acid-Amplification Testing</i>
NCR -	<i>Non-Codifying Region</i>
NEB -	<i>New England Biolabs</i>
NS -	<i>Non-Structural</i>
nt -	Nucleotídeos
OMS -	Organização Mundial da Saúde
ORF -	<i>Open Reading Frames</i>
PCR -	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG -	Polietilenoglicol
pgRNA -	RNA pré-genômico
Ph.D. -	<i>Phage Display</i>
POC -	<i>Point-Of-Care</i>
PS -	<i>Packaging Signal</i>
rcDNA -	DNA genômico dupla-fita circular-relaxado
RdRP -	RNA-dependent RNA polymerase
RNA -	Ácido Ribonucleico
RP -	<i>Replicative Form</i>
ssDNA -	<i>Single-Stranded DNA</i>
TMA -	<i>Transcription-Mediated Amplification</i>
TMB -	Tetrametilbenzidina

SUMÁRIO

1	Justificativa	1
2	Introdução	6
2.1	Hepatite B	6
2.1.1	Vírus da Hepatite B	7
2.1.2	Infecção pelo Vírus da Hepatite B	12
2.1.3	Triagem Sorológica da Hepatite B	14
2.2	Hepatite C	16
2.2.1	Vírus da Hepatite C	17
2.2.2	Infecção Pelo Vírus da Hepatite C	21
2.2.3	Triagem Sorológica da Hepatite C	26
2.3	Phage Display	27
2.3.1	Fagos Filamentosos	31
2.3.2	Vetores de Phage Display	37
2.3.3	Biblioteca de Peptídeos	39
3	OBJETIVOS	42
3.1	OBJETIVO GERAL DO PROJETO	42
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO PROJETO	42
4	MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1	<i>Bio-panning</i> das Bibliotecas de Peptídeos Randômicos	44
4.1.1	Bibliotecas de Peptídeos Randômicos	45
4.1.2	Sensibilização dos Imunotubos	47
4.1.3	Adição das bibliotecas randômicas de peptídeos	49

4.1.4	Preparo dos inóculos de amplificação e de titulação	50
4.1.5	Eluição dos fagos ligantes	51
4.1.6	Amplificação da solução de fagos eluídos	52
4.1.7	Titulação da solução de fagos eluídos	52
4.1.8	Precipitação dos fagos amplificados	53
4.1.9	Preparo da solução final de fagos	54
4.1.10	Titulação da solução final de fagos	54
4.1.11	Manutenção da cepa de <i>Escherichia coli</i> K12 ER 2738	55
4.1.12	Controle do experimento de <i>bio-panning</i> com alvo de estreptavidina	55
4.2	Seleção e Amplificação de clones resultantes do <i>Bio-panning</i>	56
4.3	Avaliação da Eficiência da Seleção do <i>Bio-panning</i> das bibliotecas de peptídeos.....	57
4.3.1	Avaliação dos títulos de fagos presentes nos <i>outputs</i> dos ciclos de seleção.....	57
4.3.2	Ensaio imunoenzimático dos <i>outputs</i> dos ciclos de seleção	58
4.4	Precipitação e extração do material genético dos clones de fagos PRÉ-selecionados	59
4.5	Análise dos clones Pré-selecionados	60
4.5.1	Seqüenciamentos dos clones de fagos pré-selecionados.....	60
4.5.2	Alinhamento das seqüências os clones de fagos pré-selecionados.....	61
4.6	Propagação dos clones Pré-selecionados.....	64
4.6.1	Propagação dos clones pré-selecionados e pools de <i>outputs</i> dos <i>bio-pannings</i>	65
4.6.2	Precipitação dos clones pré-selecionados e <i>outputs</i> propagados	65
4.6.3	Preparo da solução final de clones pré-selecionados e <i>outputs</i> propagados.....	66
4.6.4	Titulação da solução final de clones e <i>outputs</i> propagados	66
4.7	Avaliação da especificidade e Afinidade dos clones Pré-selecionados	67
4.7.1	Avaliação da especificidade dos clones pré- selecionados frente aos bancos de dados de proteínas.....	67

4.7.2	Avaliação da afinidade dos clones selecionados frente aos anticorpos monoclonais utilizados no <i>bio-panning</i>	69
4.8	Avaliação Preliminar dos Peptídeos Selecionados de Potencial Aplicabilidade para o Imunodiagnóstico em Ensaio Imunoenzimático frente a Amostras de Soros de Pacientes	71
4.9	Transferência dos peptídeos com potencial aplicabilidade para o vetor pMAL-pIII	72
4.9.1	Amplificação das seqüências a serem transferidas para o vetor pMAL-pIII	74
4.9.2	Digestão dos produtos de PCR	75
4.9.3	Purificação dos produtos de PCR digeridos	76
4.9.4	Preparo do vetor pMAL-pIII (digestão e purificação)	77
4.9.5	Reação de ligação	78
4.9.6	Reação de transformação	79
4.9.7	Seleção por PCR de colônia.....	80
4.9.8	Seqüenciamento das colônias selecionadas	82
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
5.1	<i>Avaliação da Eficiência da seleção</i>	83
5.1.1	<i>Bio-panning</i> para moléculas-alvo de hepatite B	84
5.1.2	<i>Bio-panning</i> para moléculas-alvo de hepatite C	86
5.2	Controle do Processo de <i>Bio-Panning</i>	89
5.3	Análise dos Clones Pré-Selecionados	91
5.3.1	Análise dos Clones Pré-Selecionados para Hepatite B.....	92
5.3.2	Análise dos Clones Pré-Selecionados para Hepatite C.....	97
5.4	Avaliação da Especificidade e Afinidade dos Clones Selecionados	104
5.4.1	Avaliação dos clones selecionados frente aos bancos de dados de proteínas dos vírus da hepatite B e da hepatite C	104
5.4.2	Avaliação dos clones selecionados frente aos pools de anticorpos monoclonais utilizados no <i>bio-panning</i>	110

5.4.3	Avaliação da afinidade dos clones selecionados como de potencial aplicabilidade frente aos anticorpos monoclonais isoladamente em ensaio imunoenzimático.....	118
5.5	Avaliação Preliminar dos Peptídeos Selecionados como de Potencial Aplicabilidade para o Imunodiagnóstico em Ensaio Imunoenzimático frente a Amostras de Soros de Pacientes	127
5.6	Transferência dos peptídeos de potencial aplicabilidade para o vetor pMAL-pIII	128
6	CONCLUSÃO	133
	REFERÊNCIAS.....	134
	ANEXOS	140
	ANEXO A – BLASTP 2.2.22 dos Clones Selecionados para Hepatite B em Todas as Bibliotecas	140
	ANEXO B - BLASTP 2.2.22 dos Clones Selecionados para Hepatite C em Todas as Bibliotecas	143

1 JUSTIFICATIVA

Há aproximadamente uma década a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) iniciou uma discussão sobre a criação de um sistema de hemovigilância brasileiro visando aumentar a segurança das transfusões sanguíneas através da redução do risco sanitário associado a incidentes transfusionais.

Este processo teve início com a criação de uma série de normas e manuais técnicos com o objetivo de fornecer as informações necessárias para o desenvolvimento do sistema de hemovigilância, definindo conceitos, uma estrutura e o fluxo da informação, de modo a estabelecer o real perfil epidemiológico destes incidentes (ANVISA, 2004).

Apesar de o processo transfusional ter sido desenvolvido há mais de um século com a descoberta e descrição do sistema ABO por Landsteiner em 1900, a hemoterapia passou por drásticas mudanças após identificação da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), levando à adoção de medidas de triagem clínica, epidemiológica e laboratorial de doadores, reduzindo significativamente o risco de obtenção de doenças por transfusão sanguínea (ANVISA, 2004).

No Brasil a atividade hemoterápica foi regulamentada pela primeira vez em 1965 quando o Ministério da Saúde criou a Comissão Nacional de Hemoterapia, a qual estabeleceu medidas de proteção a doadores e receptores através de decretos, portarias e resoluções, além de disciplinar o fornecimento de matéria-prima para a indústria de fracionamento plasmático e importação e exportação de sangue e hemoderivados (JUNQUEIRA et al., 2005)

A primeira lei que dispunha sobre o exercício da atividade hemoterápica foi a lei nº. 4.701 que dava bases à Política Nacional do Sangue. Contudo, foi apenas em 1986/1987, quando a transfusão sanguínea foi responsável por 8,8% dos casos de AIDS notificados pelo Ministério da Saúde, que os serviços de hemoterapia passaram a ter normas técnicas específicas (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição das infecções e/ou das doenças com triagem laboratorial normatizada, de acordo com o ano de publicação da norma específica.

Ano	Doença de Chagas	Sífilis	Hepatite B	Infecção pelo HIV	Malária	Hepatite C	Infecção pelos HTLV I e 2
1969	Portaria CNH 4	Portaria CNH 4					
1975			Resolução CNH 1				
1987				Resolução Ciplan 09			
1988	Lei n.º 7.649; Decreto-Lei n.º 95.721	Lei n.º 7.649; Decreto-Lei n.º 95.721	Lei n.º 7.649; Decreto-Lei n.º 95.721	Lei n.º 7.649; Decreto-Lei n.º 95.721	Lei n.º 7.649; Decreto-Lei n.º 95.721		
1989	Portaria MS n.º 721	Portaria MS n.º 721	Portaria MS n.º 721	Portaria MS n.º 721	Portaria MS n.º 721		
1993	Portaria MS n.º 1.376	Portaria MS n.º 1.376	Portaria MS n.º 1.376	Portaria MS n.º 1.376	Portaria MS n.º 1.376	Portaria MS n.º 1.376	Portaria MS n.º 1.376
1994	Portaria MS n.º 2.135	Portaria MS n.º 2.135	Portaria MS n.º 2.135	Portaria MS n.º 2.135		Portaria MS n.º 2.135	Portaria MS n.º 2.135
1996				Portaria MS n.º 2.009 *			
2002	RDC n.º 343	RDC n.º 343	RDC n.º 343	RDC n.º 343	RDC n.º 343	RDC n.º 343	RDC n.º 343
2004	RDC n.º 153	RDC n.º 153	RDC n.º 153	RDC n.º 153	RDC n.º 153	RDC n.º 153	RDC n.º 153

- Obrigatória
- Obrigatória em regiões endêmicas
- Sem normalização
- Recomendada

* Testes anti-HIV I e anti-HIV 2

FONTE: ANVISA, 2004.

O Ministério da Saúde tem a hemovigilância como uma de suas áreas estratégicas de atuação, com o objetivo de direcionar ações visando reduzir os incidentes transfusionais.

Incidentes transfusionais são quaisquer agravos ocorridos durante ou após a transfusão sanguínea e a ela relacionados. Eles podem ser imediatos, ocorrendo durante a transfusão ou até vinte e quatro horas depois, ou tardios, aqueles que ocorrem depois de decorridas vinte e quatro horas da transfusão.

Devido à gravidade, pode-se destacar as seguintes doenças resultantes de incidentes transfusionais tardios: infecção por HBV/Hepatite B, infecção por HCV/Hepatite C, infecção pelo HIV/AIDS, sífilis, malária, infecção pelo HTLV I/II e doença de Chagas, todas de

investigação obrigatória na triagem sorológica (ANVISA, 2004).

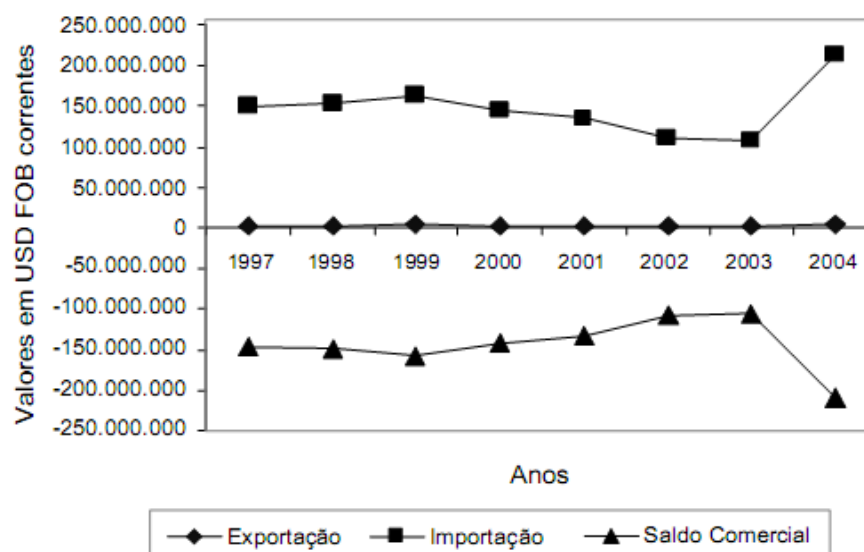
As infecções pós-transfusionais pelos vírus da hepatite B (HBV) e da hepatite C (HCV) podem ser consideradas as causas mais comuns de hepatite (ROSINI et al., 2003).

A infecção por estes vírus pode evoluir para casos crônicos e até mais graves, como cirrose e carcinoma hepatocelular (KAO et al., 2002) e estima-se que cerca de 7% da população mundial (350 milhões de pessoas) sejam doentes crônicos de hepatite B e 3% (170 milhões de pessoas) tenham hepatite C crônica (ZOU et al., 2000).

A regulamentação técnica de atividade hemoterápica atualmente em vigor, ANVISA RES nº57 (revogou a RDC nº. 153 em 17/12/2010), determina que todo doador deve ser submetido a uma triagem clínico-epidemiológica e laboratorial para liberação, ou não, do sangue coletado para uso. Entretanto, é importante ressaltar que estas análises não permitem estabelecer diagnósticos de certeza, devendo os casos positivos/reactivos ou duvidosos serem avaliados por profissionais técnicos capacitados.

Portanto, em todas as doações, é obrigatória a realização de exames laboratoriais de alta sensibilidade, sendo que o sangue e seus derivados não podem ser transfundidos antes da obtenção de resultados finais de triagem não-reagentes, para: infecção pelo vírus da Hepatite B, infecção pelo vírus da Hepatite C, infecção pelo HIV I e HIV II, doença de Chagas, sífilis e HTLV-I e HTLV-II.

Estima-se que o mercado mundial de kits de diagnóstico movimenta cerca de 25 bilhões de dólares anualmente e o Brasil, em particular, possui um saldo comercial negativo em reagentes de diagnóstico da ordem de 200 milhões de dólares (Figura 1), explicitando a alta dependência do país por importações para suprir a demanda interna de diversos programas de saúde pública, como por exemplo, o Programa de Sangue e Hemoderivados (GADELHA, 2006).



USD FOB: Dólares americanos, *Free on Board*

Figura 1 – Gráfico da evolução do comércio de reagentes de diagnóstico. Brasil 1997-2004.

FONTE: GADELHA, 2006.

Deste modo, ressalta-se a grande demanda por iniciativas na área de desenvolvimento de tecnologias nacionais voltadas para novos reagentes de imunodiagnóstico que possam substituir os insumos importados, reduzindo gastos e, conseqüentemente, viabilizando a maior utilização dos testes de diagnóstico em todo território nacional.

No caso das hepatites virais, a triagem sorológica dos doadores é atualmente realizada através de testes de detecção dos anticorpos e/ou antígenos virais por ensaios imunoenzimáticos (EIA), como o teste ELISA (*Enzime-Linked Immunosorbent Assay*). Contudo, novas tecnologias têm sido desenvolvidas visando aumentar a segurança transfusional, como os testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAT – *Nucleic Acid-Amplification Testing*), desenvolvidos para a detecção de RNA e DNA de agentes infecciosos virais e que possibilitam detectar amostras de sangue que seriam negativas nos testes sorológicos convencionais, devido à baixa carga viral e aos baixos níveis de anticorpos presentes no período de janela imunológica (BRATS, 2007).

Outras tecnologias em desenvolvimento são: ensaios de microarranjo líquido

multiteste e os métodos para utilização no local de tratamento (POC – *Point-of-care*). O microarranjo líquido multiteste baseia-se na utilização de microesferas de cerca de cinco micrômetros de diâmetro recobertas com anticorpos específicos dos antígenos-alvo e vice-versa, as quais são incubadas com as amostras de soro e detectadas por uma molécula repórter, de modo que quando as microesferas são expostas a feixes de laser ocorre a emissão de fluorescências específicas para cada antígeno testado na plataforma, possibilitando detectar e discriminar simultaneamente a presença de diferentes agentes virais em uma mesma amostra.

Os métodos para utilização no local de tratamento (POC – *Point-of-care*) aplicam tecnologias nas áreas de micro-fluídica e nanotecnologia que permitem integrar rápido processamento da amostra, com alto desempenho de detecção de um analito. Em ambos os casos, aliado ao desenvolvimento da técnica, deverá haver a pesquisa por insumos de potencial aplicabilidade nos testes nacionais que irão efetivamente implementar esta tecnologia (YAGER et al., 2008).

Para isto, podem ser utilizadas diversas técnicas de prospecção de biomoléculas. Neste contexto, a técnica de *Phage Display* apresenta-se como uma alternativa. Ela consiste em apresentar peptídeos ou proteínas na superfície de fagos filamentosos para seleção *in vitro* de moléculas com características desejáveis a partir de uma biblioteca contendo uma grande coleção de variantes.

No caso de *Phage Display* utilizando bibliotecas de peptídeos, é possível selecionar peptídeos que mimetizem funcionalmente o ligante nativo de anticorpos, enzimas ou receptores. Como as partículas de fago selecionadas possuem ligação direta entre fenótipo e genótipo, o peptídeo de interesse pode então ser sintetizado artificialmente ou subclonado e utilizado em testes de imunodiagnóstico, conferindo a esta técnica uma grande aplicabilidade no desenvolvimento de novos insumos para produção de tecnologias nacionais e internacionais de diagnóstico (BARBAS, 2001).

2 INTRODUÇÃO

2.1 HEPATITE B

A infecção pelo vírus da hepatite B possui distribuição mundial. Estima-se que mais de 2 bilhões de pessoas da população global tenham sido infectadas. Destes, aproximadamente 360 milhões evoluíram para a forma crônica da infecção e possuem alto risco de sofrerem doenças graves como cirrose hepática e câncer de fígado. A quantidade de mortes anuais causadas pela infecção por este vírus é estimada entre 500.000 – 700.000 mortes em todo o mundo (OMS, 2005).

A distribuição mundial do HBV segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) é apresentada na Figura 2.



Figura 2 – Distribuição mundial de infecção pelo vírus da hepatite B.

FONTE: Adaptado de OMS, 2002.

2.1.1 Vírus da Hepatite B

O vírus da hepatite B é o protótipo da família Hepadnaviridae e possui tropismo pela célula hepática. Seu hospedeiro natural é o ser humano, mas vírus com material genético similar já foram isolados de animais como: marmotas, esquilos, garças, gansos e outros tipos de pássaros. Apesar de possuírem preferência pelas células hepáticas, já foram encontradas partículas de DNA deste vírus nos rins, pâncreas e células mononucleares (FONSECA, 2007).

Segundo ZUCKERMAN (1996) o HBV possui três formas principais: partículas pequenas, esféricas e pleomórficas de 20 a 22 nm de diâmetro, formas tubulares de mesmo diâmetro e formas de 42 nm com envoltório duplo. Estas partículas de 42 nm são os vírions da hepatite B, os quais possuem um nucleocapsídeo denso de 27 nm cercado por um envelope. Já as partículas de 22 nm e as tubulares de mesmo diâmetro são antígenos de superfície produzidos em excesso pelos hepatócitos infectados (Figura 3).

As partículas de 22 nm e tubulares são formadas majoritariamente por quantidades equimolares das formas não-glicosilada (p 24) e glicosilada (gp 27) de uma proteína de superfície, além de uma minoria de componentes denominados proteínas intermediárias (gp 33 e gp 36), as quais contêm o domínio pré-S2, que formam uma extensão N-terminal glicosilada de 55 resíduos de aminoácidos.

A superfície do vírion possui uma composição similar, além das grandes proteínas de superfície (gp 39 e gp 42), as quais incluem ambas as regiões pré-S1 e pré-S2. Estas grandes proteínas de superfície não são encontradas nas partículas esféricas de 22 nm (podendo estar presentes nas formas tubulares em indivíduos com alta viremia) e sua detecção no soro está relacionada à viremia. Acredita-se que o domínio que se liga especificamente ao receptor do HBV no hepatócito resida dentro da região pré-S1.

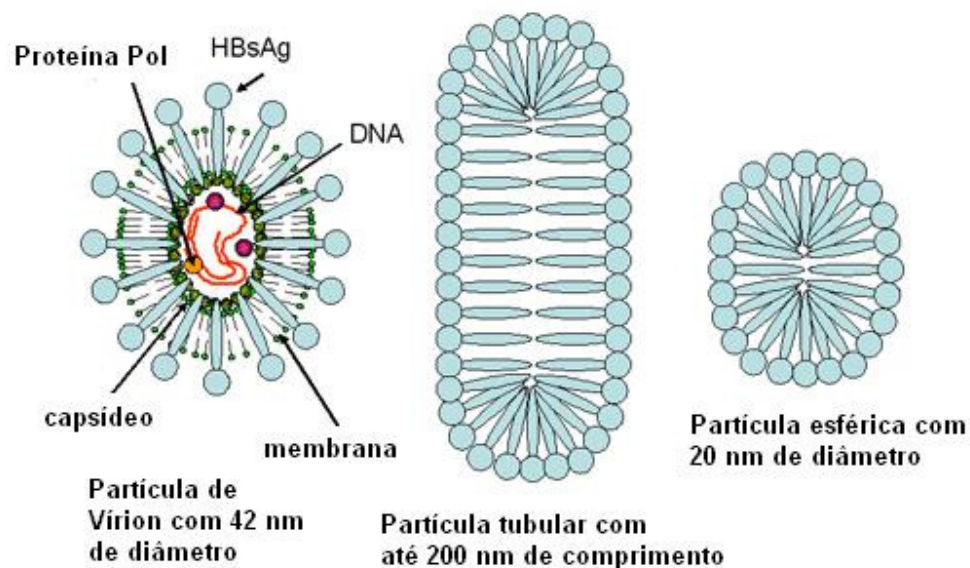


Figura 3 – Estrutura do vírus da hepatite B.

FONTE: Adaptado de ZUCKERMAN, 1996.

O HBV possui um genoma de DNA circular contendo cerca de 3.200 nucleotídeos, sendo apenas parcialmente dupla fita. Uma das fitas é completa (a fita longa ou fita L) e de polaridade negativa. A fita complementar (fita curta ou fita S) é incompleta e de polaridade positiva, com extensão variável a partir de sua extremidade 5' de cerca de 250 nucleotídeos. O nucleocapsídeo do vírion é formado pelo genoma viral cercado pelo antígeno central (HBcAg). A extremidade incompleta 3' da fita S encontra-se associada à molécula de DNA polimerase sendo capaz de completar sua fita quando ocorre fornecimento de desoxinucleosídeos trifosfatos (DELIUS et al., 1983).

Após o DNA viral integrar-se ao genoma do hepatócito, a síntese protéica do HBV é direcionada por quatro quadros de leitura aberta (*ORFs – Open Reading Frames*): as proteínas do envelope (HBsAg grande, média e mais abundante) a partir das seqüências dos genes S, pré-S1 e pré-S2, o antígeno e (HBeAg) e HBcAg (*core – central*) a partir da seqüência do gene C e do gene pré-C, a proteína DNA polimerase a partir do gene P e a proteína transativadora X a partir do gene X (Figura 4).

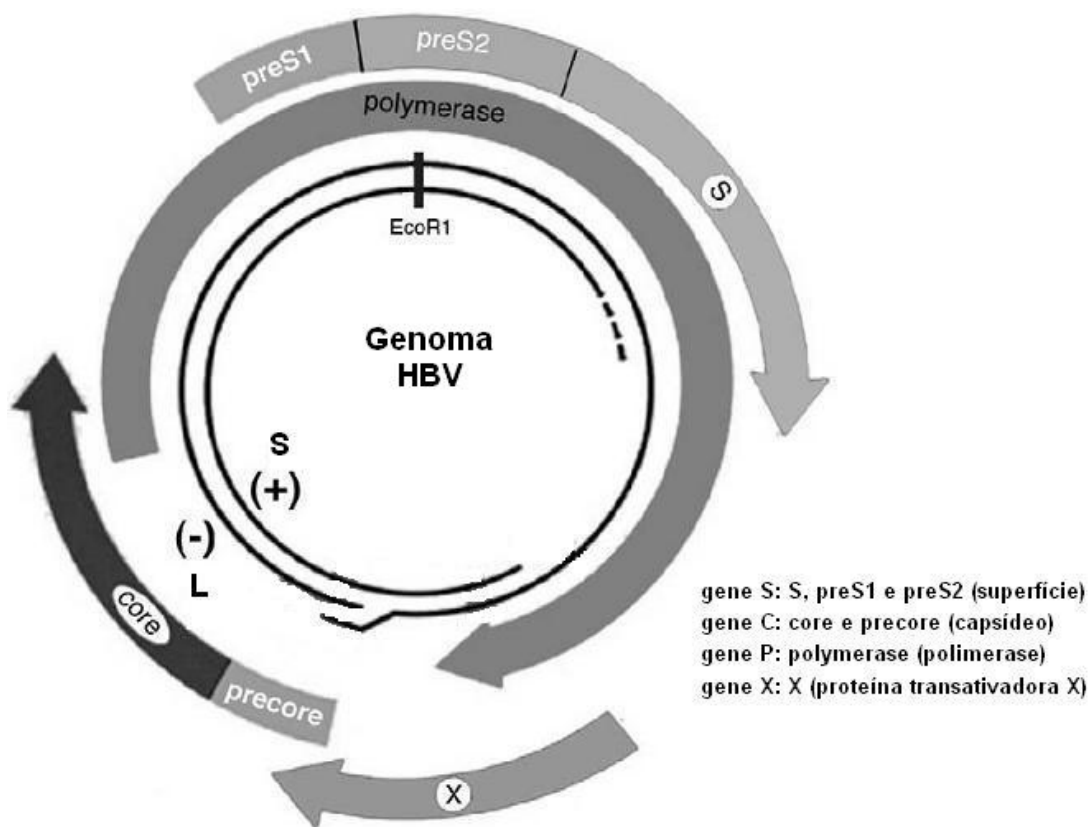


Figura 4 – Representação gráfica do genoma do vírus da hepatite B (HBV).

FONTE: LOCARNINI, 2002.

A replicação do HBV inicia-se com a ligação do envelope do vírion a um receptor celular ainda não identificado. Acredita-se que a maior proteína da superfície do antígeno (mais especificamente o domínio pré-S1 dela) esteja envolvida nesta ligação. Dentro da célula infectada, o capsídeo viral deve ser desmontado e o DNA genômico dupla-fita circular-relaxado (rcDNA) é transferido para o núcleo celular. Este transporte é mediado pelas próprias partículas do capsídeo até o poro nuclear, onde a polimerase viral liga-se covalentemente ao genoma e media a transferência e liberação do genoma viral. No núcleo ocorre a reparação do DNA (rcDNA) em cccDNA, o qual permanece no núcleo na forma de minicromossomos, os maiores moldes transcricionais do vírus (KANN, 1997).

No caso do HBV, a DNA polimerase não é responsável pelo reparo do DNA, o qual é realizado pela maquinaria da célula hospedeira. O cccDNA presente nos minicromossomos serve de molde para a transcrição de quatro conjuntos de RNA utilizando a RNA polimerase II

da célula hospedeira. Estes RNAs são então traduzidos para produzir as proteínas virais denominadas: antígeno central da hepatite B (HBcAg ou proteína do nucleocapsídeo), antígeno *e* solúvel e secretado da hepatite B (HBeAg), proteína DNA polimerase e proteínas do envelope viral, as quais expressam o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) e a proteína X da hepatite B (HBx). O RNA pré-genômico (pgRNA) além de servir de mRNA para as proteínas polimerase e do nucleocapsídeo, atua também como molde para a transcrição reversa do genoma (Figura 5) (SUMMERS et al, 1982).

Apesar de ser um vírus cujo material genético é DNA, todos os Hepadnaviridae replicam seu genoma por transcrição reversa do pgRNA e, ao contrário de outros retrovírus, eles não dependem da integração de seu material genético ao do hospedeiro para possuírem um ciclo de vida produtivo (LOCARNINI, 2002).

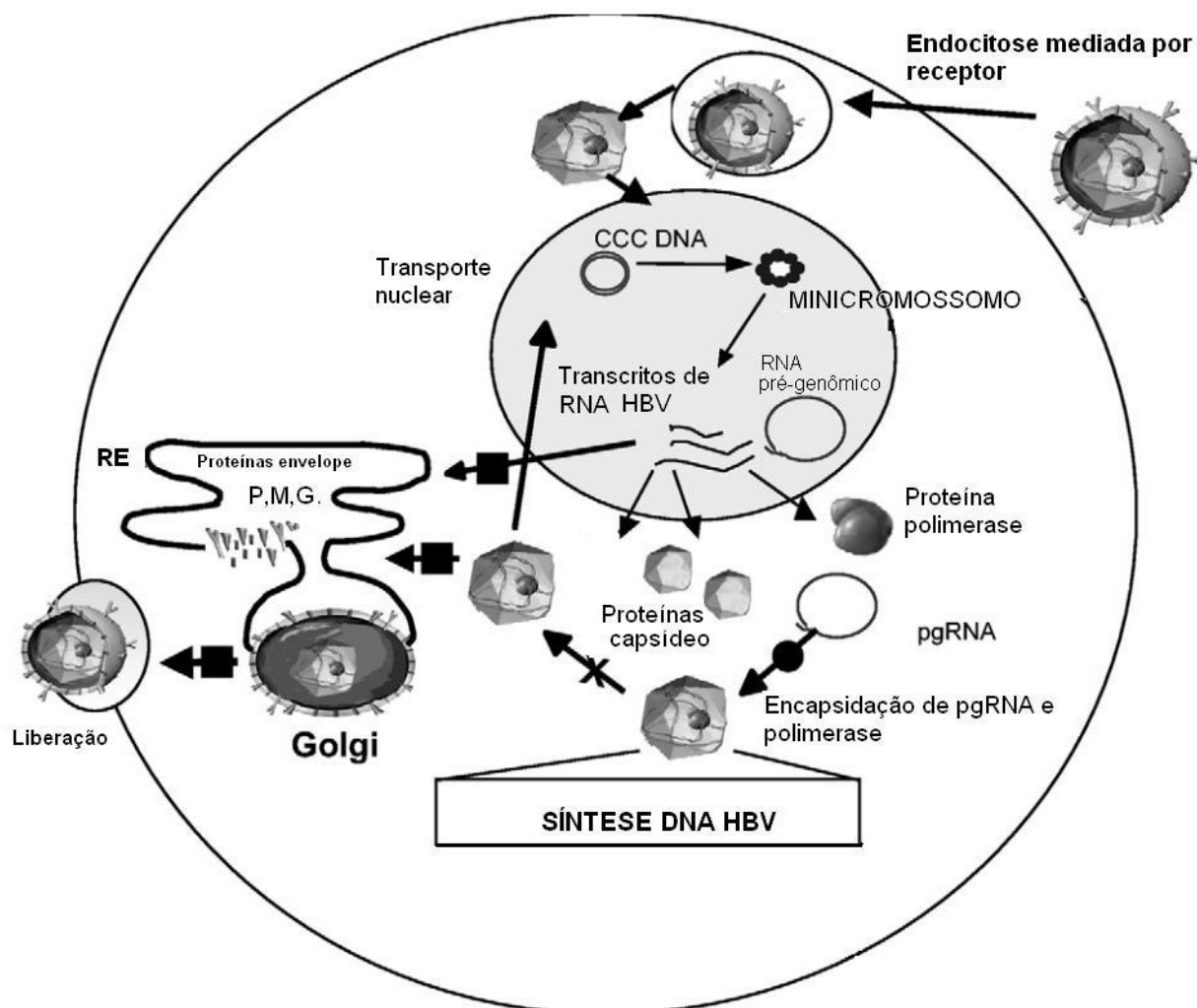


Figura 5 – Ciclo de vida do vírus da hepatite B (HBV).

FONTE: Adaptado de LOCARNINI, 2002.

O HBV possui dois importantes motivos *cis*-direcionados: ϵ , um RNA com estrutura em laço-haste (*stem-loop*) requerido durante o empacotamento do RNA e a repetição direta 1 (DR1 - *direct repeat 1*), um elemento de 12 nucleotídeos (nt) importante para a iniciação da fita negativa. A replicação dos hepadnavírus ocorre através de transcrição reversa do pgRNA e é mediada pela polimerase viral, a qual é igualmente necessária para o empacotamento deste pré-genoma através de sua interação com o sinal de empacotamento de RNA ϵ (TAVIS et al., 1994).

Os genes *core* e polimerase são essenciais à replicação viral, enquanto as proteínas

do envelope são indispensáveis para o envelopamento do nucleocapsídeo. As proteínas HBx e HBeAg são expressas durante a infecção natural pelo vírus e suas funções ainda não são totalmente compreendidas. Acredita-se que a proteína HBx seja necessária para que ocorram infecções *in vivo*, sendo dispensável para replicação do vírus em células transfectadas (BLUM, 1992).

2.1.2 Infecção pelo Vírus da Hepatite B

O HBV foi formalmente classificado em quatro diferentes subtipos que foram então subdivididos de acordo com o determinante antigênico de HBsAg, podendo eles ser: adw (adw2 e adw4), ayw (ayw1, ayw2, ayw3 e ayw4), adr (adrq+ e adrq-) e ayr. Outra classificação baseia-se na origem filogenética dos vírus isolados, designando seis genótipos de HBV (de A a F) com divergência total de genoma superior a 8%. Em seguida foi identificado o genótipo G, o qual possui uma inserção de 36 nucleotídeos no gene *core* e o genótipo H, descoberto na Nicarágua, México e Califórnia com provável origem no genótipo F (ZEKRI, 2007).

Os diferentes genótipos de hepatite B possuem distribuições geográficas distintas. O genótipo A é prevalente no noroeste da Europa e Estados Unidos, os genótipos B e C na Ásia, o genótipo D na bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Índia, o genótipo E na África Ocidental, o genótipo F nas Américas Central e do Sul, o genótipo G nos Estados Unidos e França e o genótipo H no México e América do Sul (LIAW & CHU, 2009).

O vírus da hepatite B (HBV) pode ser transmitido via parental (secreções transcutâneas e mucosas) e via sexual (presença de vírus nas secreções vaginais e sêmen), existindo ainda a transmissão vertical que ocorre quando a mãe transmite o vírus via placenta ao seu filho (perinatal) (ANVISA, 2004).

A maioria das infecções por HBV (90-95%) em adultos são transientes, enquanto que cerca de 90% das infecções perinatais são crônicas. Um possível modelo de imunorregulação, geralmente aplicado à infecções virais transientes por vírus citocidais (interação lítica com a célula hospedeira), é o fato de a resposta mediada por linfócitos-T citotóxicos (CTL – *cytotoxic T-lymphocyte*) reconhecer rapidamente epítomos de proteínas virais apresentados na superfície das células infectadas pelo complexo tipo I de histocompatibilidade. Quando isto ocorre, muitas células são mortas antes da produção de

vírus começar. Além disto, o controle do vírus pode ocorrer pela rápida produção de anticorpos neutralizadores de vírus e pela proteção local de células suscetíveis através da ação de interferons e citocinas, os quais podem induzir resistência à infecção nas células próximas (SEEGER & MASON, 2000).

Contudo, no caso de infecções transientes por hepadnavirus, é mais complexo definir um modelo de imunorregulação para a infecção, a qual geralmente ocorre em um período assintomático de incubação de 1 a 6 meses, acompanhado de alto título de viremia que pode perdurar por várias semanas. Durante este período o sistema imune pode ser considerado incapaz ou não-ativado para conseguir controlar a infecção, ocorrendo a infecção de toda a população de hepatócitos. Esta ausência de sintomas nas primeiras semanas de pacientes infectados com o HBV sugere um atraso na ativação da resposta imune, ocasionando a disseminação do vírus a partir de alguns poucos hepatócitos para toda a população de hepatócitos do fígado. Em seguida, ocorre rapidamente a remoção do vírus do soro, geralmente em poucas semanas, com remoção concomitante ou posterior dos hepatócitos infectados do fígado (SEEGER & MASON, 2000).

Em infecções crônicas por HBV, nas quais ocorre infecção não-citocidal dos hepatócitos, a replicação do vírus continua a ocorrer no fígado e é possível detectar intermediários replicativos do genoma viral através da análise do DNA extraído de material de biópsia do fígado. Dentre os marcadores replicativos do vírus no soro pode-se incluir o DNA do HBV, a proteína de superfície (HBsAg) e o antígeno solúvel e da hepatite B (HBeAg), o qual é secretado por hepatócitos infectados. Durante a replicação, o genoma viral pode integrar-se ao DNA cromossomal dos hepatócitos e estas células podem persistir havendo expansão clonal. A soroconversão para anti-HBs raramente ocorre após o término da replicação viral, mas é comum que ainda haja presença de HBsAg durante uma segunda fase de cronicidade devido à expressão do genoma viral integrado ao da célula (ZUCKERMAN, 1996).

A infecção por HBV possui três fases distintas. A primeira delas é a imunotolerância, na qual ocorre presença sérica de HBsAg, HBeAg, altos títulos de HBV-DNA (10^{5-10} cópias/mL), ALT (alanina aminotransferase, enzima produzida no fígado) normal ou ligeiramente elevada, mínima lesão hepática e curso assintomático. Na segunda fase, denominada imunoativa ou de hepatite crônica B, ocorre presença sérica HBeAg (HBV selvagem) ou anti-HBe+ (HBV selvagem residual ou mutante pré-core), altos títulos de HBV-DNA e doença hepática ativa. A terceira fase, conhecida como não-replicativa, é caracterizada pela presença no soro de HBsAg, anti-HBe, títulos baixos de HBV-DNA, ALT

normal, mínima lesão histológica hepática e curso assintomático, motivo pelo qual ela pode ser denominada de fase de portador inativo de HBV pois a maioria de seus portadores não manifestam quaisquer sintomas (FONSECA, 2007).

2.1.3 Triagem Sorológica da Hepatite B

O período de incubação, caracterizado pelo intervalo entre a exposição efetiva do hospedeiro suscetível a um determinado agente biológico e o início dos sinais clínicos específicos da doença neste hospedeiro, no caso do HBV, é de em média 75 dias, podendo variar entre 30 a 180 dias. Após o período de incubação, o primeiro marcador sorológico detectável é o HBsAg, seguido por anticorpos contra o antígeno central do HBV (anti-HBc) (FONSECA, 2007)

Em cerca de 80 a 90% dos pacientes infectados é possível identificar no sangue os anticorpos anti-HBs por meses ou anos, o que indica formação de imunidade para a doença. Deste total de infectados, em torno de 5 a 10% cronicam (não ocorre desenvolvimento de imunidade), sendo que, caso a infecção ocorra durante a gestação, parto ou amamentação, a probabilidade de cronicidade aumenta para cerca de 85%, havendo manifestação bem mais precoce da doença. Dos casos crônicos, estima-se que a metade evolui para manifestação da doença avançada, como cirrose e carcinoma hepatocelular (ANVISA, 2004).

Dentre os principais marcadores sorológicos da hepatite B pode-se destacar: HBsAg (antígeno de superfície), anti-HBs, anti-HBc (anticorpo contra o antígeno do capsídeo – *core*), HBeAg (antígeno *e*) e anti-HBe. A fase aguda é caracterizada pela presença de HBsAg e de anti-HBc (IgM), enquanto que a presença de anti-HBc (IgG), antígeno *e* (HBeAg), anti-HBe e anti-HBs podem ser utilizadas em caso de valor prognóstico de hepatite B crônica (Figura 6) (ANVISA, 2004).

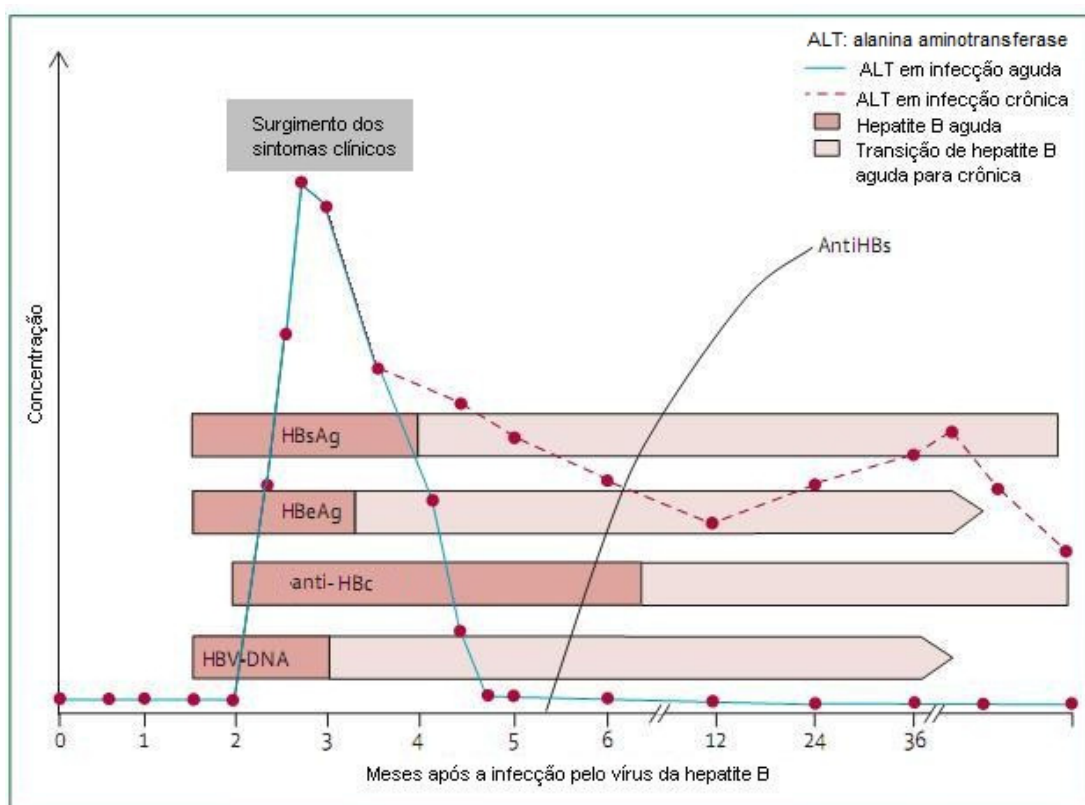


Figura 6 – Evolução clínica e sorológica após a infecção pelo vírus da hepatite B.

FONTE: Adaptado de LIAW & CHU, 2009.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004), o diagnóstico sorológico baseia-se na detecção de três marcadores sorológicos: do antígeno de superfície do HBV (HBsAg), do anticorpo (IgG e IgM) contra o antígeno do capsídeo viral (anti-HBc) e do anticorpo contra o HBsAg (anti-HBs), sendo este último de grande relevância na determinação da evolução para cura e para avaliar resposta vacinal (ANVISA, 2004).

Quando ocorre cura, o HBsAg é negativo enquanto o anti-HBc e anti-HBs são positivos. A hepatite B possui vacina, a qual é composta por uma proteína recombinante do antígeno de superfície HBsAg e, em caso de vacinação, ocorre o surgimento de anti-HBs e não surge anti-HBc.

Atualmente, os testes disponíveis na hemorrede brasileira para triagem sorológica do vírus da hepatite B baseados na detecção do antígeno de superfície podem ser realizados por ensaio imunoenzimático (EIA) ou por hemaglutinação (HAI – hemaglutinação indireta, técnica

baseada na propriedade que a presença de anticorpos possui de produzir aglutinação específica na presença de glóbulos vermelhos), sendo que o EIA deve ser o método de escolha devido ao seu melhor desempenho em termos de sensibilidade. Além da detecção do antígeno, existem testes para detecção dos anticorpos anti-HBs e anti-HBc e, neste caso, a única metodologia disponível é o ensaio imunoenzimático. A legislação vigente no Brasil para hemovigilância determina que sejam realizados ambos os testes (detecção de antígeno e de anticorpo), sendo que os marcadores de hepatite B a serem pesquisados são o HBsAg e o anti-HBc (ANVISA, 2004).

2.2 HEPATITE C

Em meados dos anos 1970 foi noticiado no mundo que todo o abastecimento de sangue estava contaminado com um agente desconhecido que causava hepatite pós-transfusional não-A e não-B (NANBH). Apenas em 1989 que as primeiras seqüências do vírus da hepatite C (HCV) foram descritas (LINDENBACH & RICE, 2005).

O vírus da hepatite C é o maior causador de doenças hepáticas, carcinoma hepatocelular (*HCC – hepatocellular carcinoma*) e prognóstico para transplante de fígado. Estima-se que cerca de 170 milhões de pessoas estejam infectadas com o vírus, sendo que sua prevalência varia de acordo com a localização geográfica. Neste contexto podemos destacar a América do Norte com 2% da população infectada, 3-4% em países do Mediterrâneo e da Ásia e mais de 10% em regiões da África Central e Egito (THOMSON, 2009).

As diferentes prevalências do vírus da hepatite C no mundo estão representadas na Figura 7.

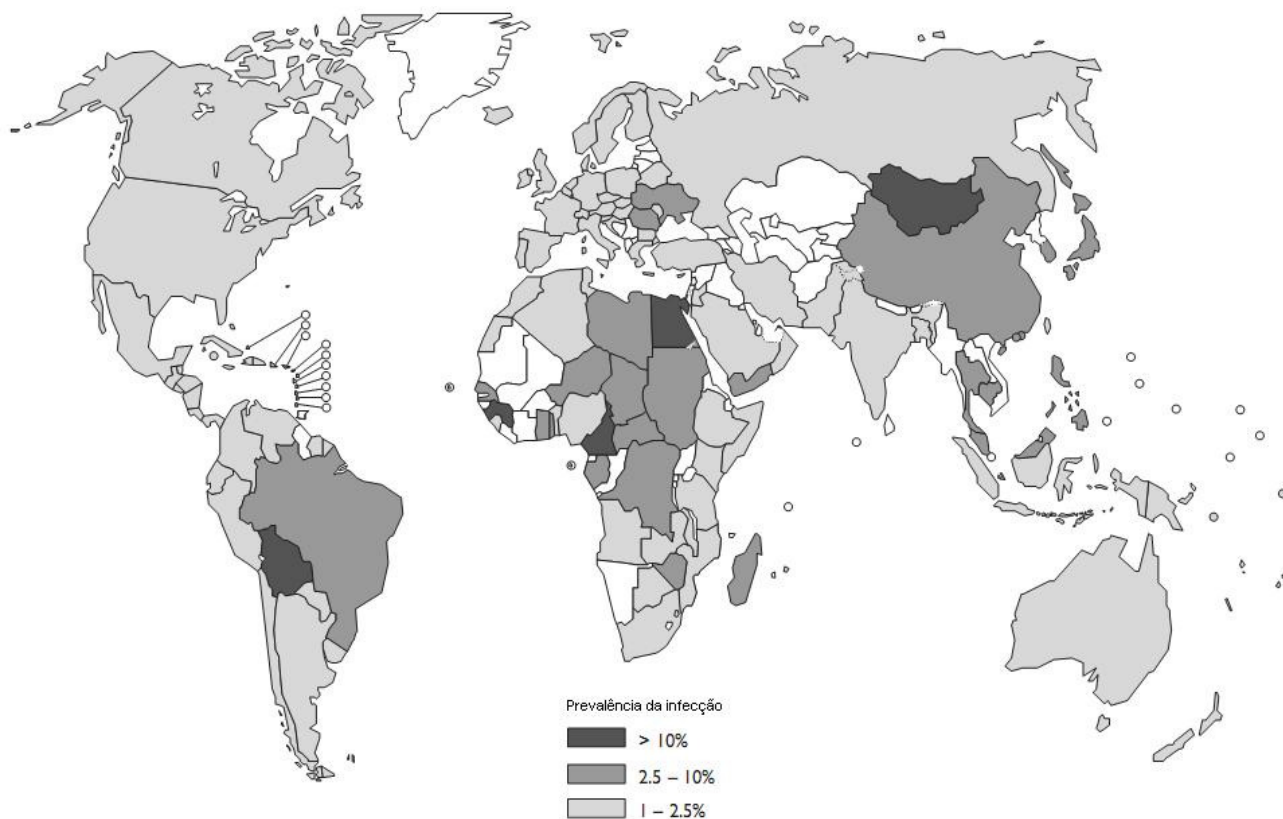


Figura 7 – Prevalência mundial da infecção pelo vírus da hepatite C.

FONTE: Adaptado de OMS, 2002.

2.2.1 Vírus da Hepatite C

O vírus da hepatite C (HCV) é um vírus da família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivirus*. Os membros desta família compartilham algumas estruturas básicas e características virológicas. Todos eles são envelopados em uma bicamada lipídica nas quais estão ancoradas duas ou mais proteínas do envelope. O envelope circunda o nucleocapsídeo, o qual é composto por várias cópias de uma pequena proteína básica (do capsídeo ou *core*) e contém o RNA genômico (CHEVALIEZ & PAWLOTSKY, 2006).

O HCV é um vírus pequeno (aproximadamente 50 nm), envelopado e cujo genoma é um RNA de polaridade positiva e simples fita. Ele possui grande habilidade em enganar ambas as respostas imune inata e adaptativa e a maioria dos indivíduos expostos a ele tornam-se cronicamente infectados (THOMSON, 2009).

Segundo THOMSON (2009) o genoma do HCV possui aproximadamente 9.600 nucleotídeos e, como outros membros da família dos flavivírus, o genoma viral é composto de uma região 5' não-codificadora (NCR – *non-codifying region*), um único e longo quadro de leitura aberta (*ORF – Open Reading Frame*) que possui a seqüência codificadora para uma poliproteína precursora de cerca de 3.000 aminoácidos e uma região 3' não-codificadora (NCR). A poliproteína do HCV é co- e pós-traducionalmente processada por proteases celulares e virais para produzir as proteínas maduras estruturais e não estruturais.

O terço amino-terminal da poliproteína codifica as proteínas estruturais do virion: a proteína altamente básica do capsídeo (*core*) e as glicoproteínas E1 e E2. Na região não-estrutural, existe uma pequena proteína integrante da membrana, NS1 (p7), cuja suposta função seria de canal iônico. O restante do genoma codifica para as proteínas não-estruturais (NS – *non-structural*): NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B, as quais coordenam os processos intracelulares envolvidos no ciclo de vida do vírus (Figura 8) (LINDENBACH & RICE, 2005).

As proteínas não-estruturais amadurecem por clivagens de peptidases-sinal (proteínas integrais de membrana localizadas no retículo endoplasmático responsáveis pela clivagem do peptídeo sinal e liberação da proteína para dobramento e exportação) entre Core/E1, E1/E2 e E2/NS1. Dentro da região não-estrutural (NS), a junção NS1/NS2 também é clivada por peptidases-sinal, ocorrendo maiores processamentos proteolíticos na região NS por ação de duas enzimas virais: a autoprotease, a qual cliva entre a junção NS2/NS3 e a serina protease NS3/NS4A, a qual cliva em todos os sítios à jusante.

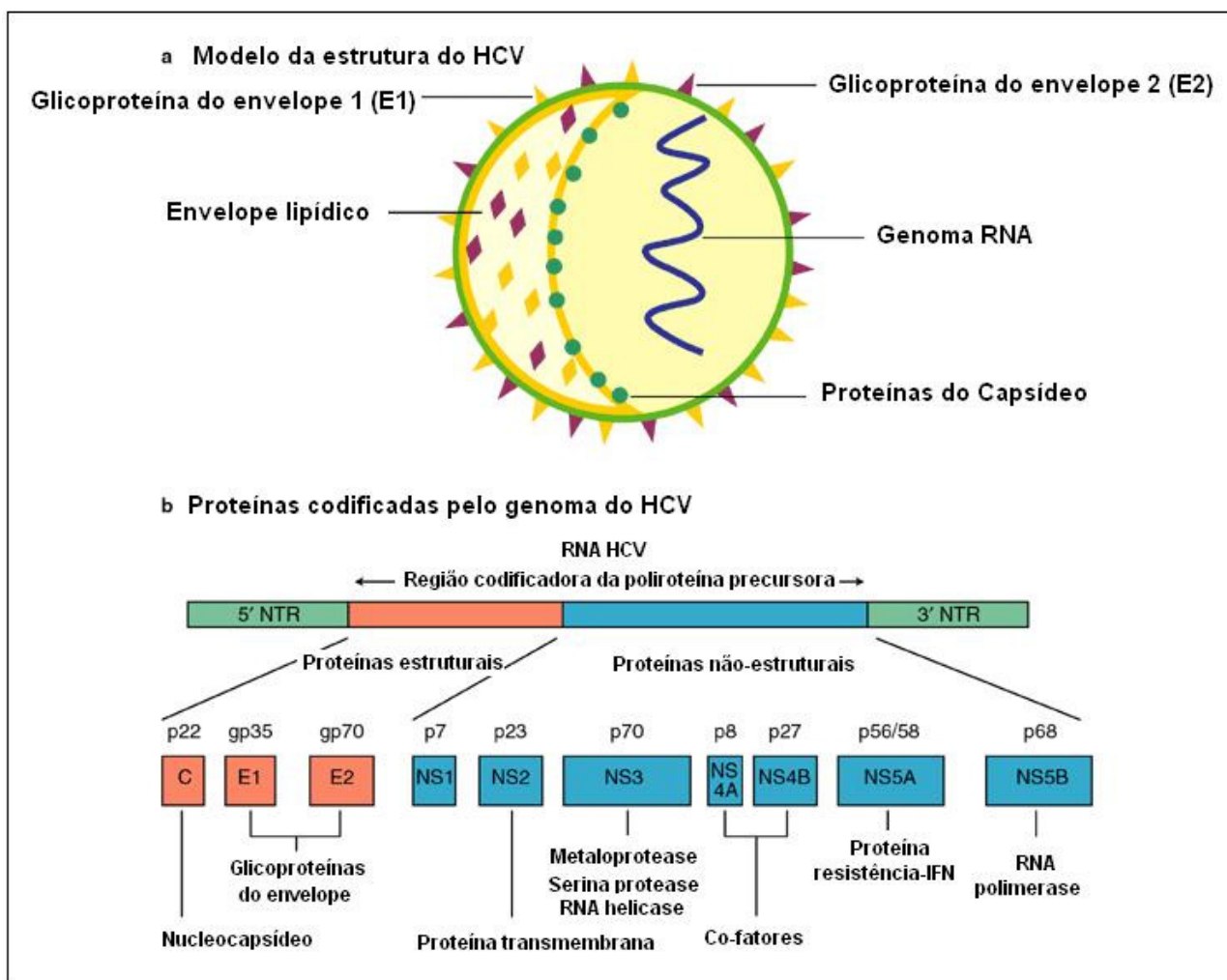


Figura 8 – Modelo da estrutura do HCV (a) e proteínas codificadas pelo genoma do vírus (b).

FONTE: Adaptado de ANZOLA & BURGOS, 2003.

O mecanismo de replicação do HCV é semelhante ao de outros vírus RNA simples-fita positivos: após a entrada do vírus e sua desencapsidação no citoplasma da célula hospedeira, o genoma viral serve como molde pra a síntese da fita complementar (negativa) da molécula de RNA. A fita negativa serve, por sua vez, de molde para a síntese da progênie de moléculas de RNA fitas-positivas. Apesar de não haver registro da detecção de intermediários de DNA no soro ou nas células hepáticas de indivíduos infectados, foram detectadas fitas de RNA antígeno (negativo) em alguns pacientes, indicando a presença de RNAs intermediários durante a replicação. (EROGLU, 2000).

Cada uma das proteínas codificadas pela ORF do HCV possui um papel específico em seu ciclo de vida. A proteína *core* (p22) é a proteína formadora do capsídeo viral e está envolvida na ligação ao RNA e sua localização no núcleo, associação com o retículo endoplasmático e membranas externas mitocondriais. Além de sua função estrutural na formação do capsídeo, esta proteína interage com diversas proteínas celulares durante o ciclo de vida viral e possui funções pró- e anti-apoptóticas e está relacionada com danos ao tecido hepático e progressão de fibroses (CHEVALIEZ & PAWLOTSKY, 2006).

As duas glicoproteínas do envelope, E1 e E2, são componentes essenciais do vírion, sendo que a proteína E2 possui um papel crucial nas etapas iniciais de infecção, pois é através dela que ocorre a ligação do vírus a diversos componentes do complexo receptor. A proteína F (*frameshift*) ou ARFP (*alternate reading frame protein* – proteína de quadro de leitura alternado) é gerada pela mudança no quadro de leitura da região N-terminal da proteína equivalente à região *core* da poliproteína de HCV. Apesar de sua função não ser ainda bem compreendida, por terem sido encontrados anticorpos anti-peptídeos presentes na proteína F em pacientes crônicos, acredita-se que ela esteja envolvida na persistência viral (CHEVALIEZ & PAWLOTSKY, 2006).

A pequena proteína (63 aminoácidos) NS1 é uma proteína integral da membrana essencial para a infectividade do vírus, pois intermedeia a transfecção do cDNA do HCV nas células hepáticas. Deste modo, alguns estudos afirmam que a proteína p7 pertence a uma família de viroporinas e agiria como um canal iônico de cálcio (GONZALEZ & CARRASCO, 2003).

A proteína NS2 é uma proteína transmembrana não-glicosilada que contém duas seqüências sinais internas responsáveis pela associação à membrana do retículo endoplasmático. Em conjunto com o domínio amino-terminal da proteína NS3, a protease NS2-3 forma uma metaloprotease zinco-dependente que cliva o sítio de ligação entre as proteínas NS2 e NS3 e, após sua clivagem da proteína NS3, ela perde sua função protease e é degradada pelo proteassoma (FRANCK et al., 2005).

A proteína NS3 é uma proteína viral multifuncional que contém um domínio serina protease em seu terceiro domínio N-terminal e um domínio helicase/NTPase em dois terços de seus domínios C-terminais. Sua atividade protease depende do cofator NS4A, sendo que o complexo NS3-4A possui também propriedades que afetam a interação do vírus com as vias

e proteínas da célula sugerindo uma ligação direta com a patogenia da infecção, o que torna este complexo um alvo popular de terapias anti-HCV (PAWLOTSKY, 2006).

A proteína NS4B é uma proteína integral de membrana localizada próxima ao retículo endoplasmático contendo ao menos quatro domínios transmembrana e uma alfa-hélice anfipática responsável pela associação à membrana, servindo como âncora para o complexo de replicação (ELAZAR et al., 2004).

A proteína NS5A é uma zinco-metaloproteína fosforilada com importante função na replicação viral e regulação das vias celulares. Sua região N-terminal possui uma alfa-hélice anfipática necessária e suficiente para a localização e para a montagem do complexo de replicação, o que possui papel fundamental no ciclo de vida viral através da regulação da troca de replicação para montagem uma vez que suas formas hiperfosforiladas mantêm a função do complexo de replicação em um estado de montagem inativo (PENIN et al., 2004a).

Já a proteína NS5B RdRP (*RNA-dependent RNA polymerase* – RNA polimerase RNA-dependente) pertence a uma classe de proteínas de membrana denominadas de “ancoradas pela cauda”, pois sua região C-terminal forma um domínio em alfa-hélice transmembrana responsável pelo direcionamento pós-traducional para o lado citosol do retículo endoplasmático. A estrutura cristalográfica da NS5B revela que a RdRP possui uma estrutura clássica de “dedos, palma e polegar”, na qual a interação entre os domínios dos dedos e polegar resultam em um sítio catalítico completamente cercado que assegura a síntese das fitas negativas e positivas dos RNAs de HCV (LESBURG et al., 1999).

2.2.2 Infecção Pelo Vírus da Hepatite C

O genoma do HCV apresenta uma notável variação em sua seqüência devido à falta de atividade corretora da NS5B RdRP. Já foram descritos mais de 90 genótipos distribuídos em seis tipos principais numerados de 1 a 6 e em subtipos (a, b, c, ...) de acordo com a identidade de seqüências existentes no mundo. Além dos genótipos, o HCV existe em seus hospedeiros como uma seleção de variantes geneticamente distintas, mas intimamente relacionadas às quais podemos nos referir como “quasiespécies” (PENIN, 2004b).

O ciclo de vida do HCV inicia com a ligação das partículas virais à célula hospedeira

através de uma interação específica entre as glicoproteínas do envelope do vírus e receptores celulares. As partículas ligadas são internalizadas por endocitose mediada por receptores. Após liberado o genoma viral do nucleocapsídeo (desencapsidação) e subsequente tradução através do retículo endoplasmático rugoso, a proteína NS4B induz a formação de vesículas membranosas (referidas também como teia membranosas). Estas membranas servem como estrutura para o complexo de replicação viral e, após a amplificação do genoma do HCV e expressão de suas proteínas, ocorre a montagem da progênie de virions e liberação da mesma (Figura 9) (CHEVALIEZ & PAWLITSKY, 2006).

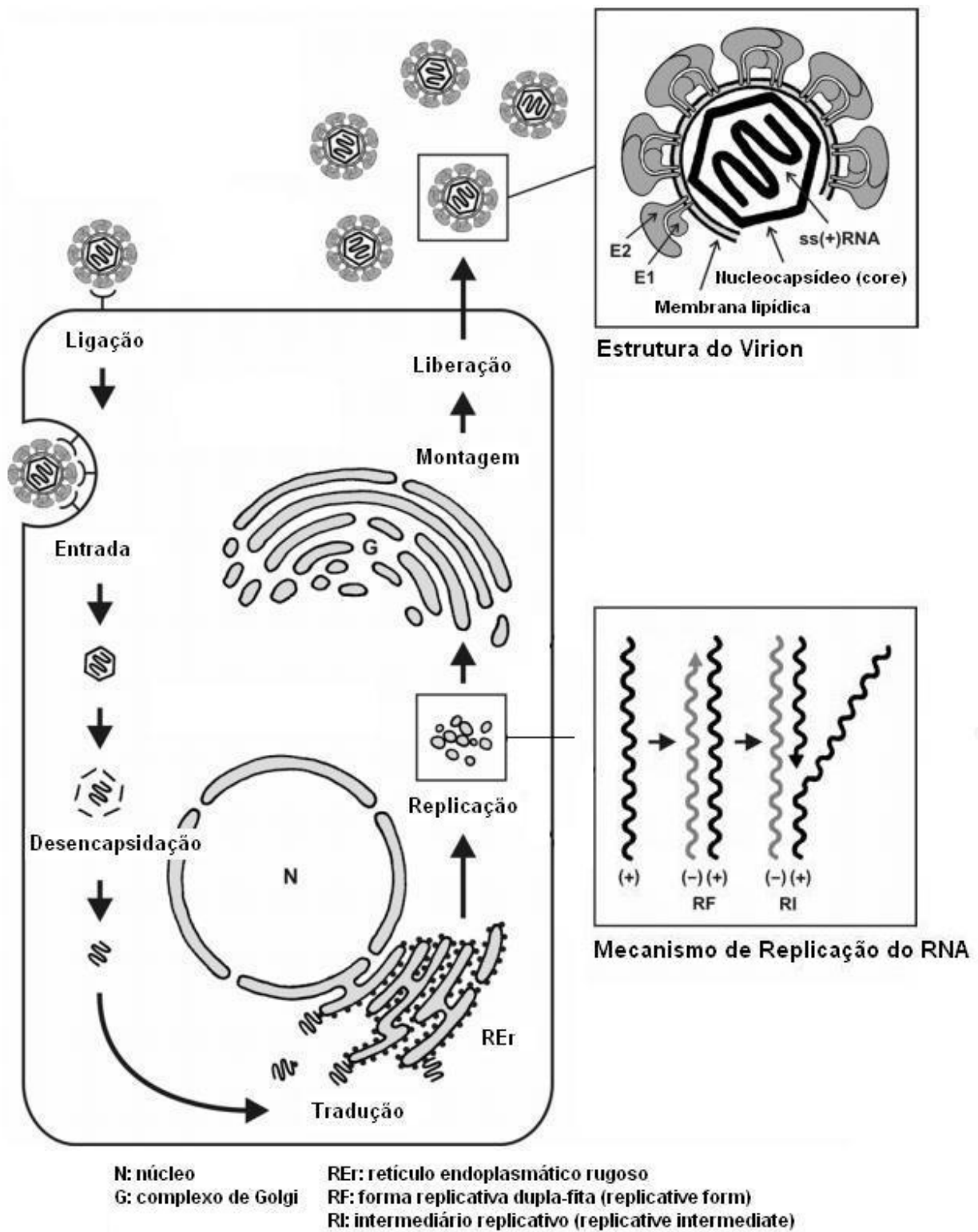


Figura 9 – Ciclo de vida do vírus da hepatite C (HCV).

FONTE: Adaptado de CHEVALIEZ & PAWLOTSKY, 2006.

Difícilmente a infecção pelo vírus da hepatite C é diagnosticada durante a fase aguda da infecção, sendo que suas manifestações clínicas ocorrem geralmente entre 7 a 8 semanas após a exposição ao vírus e a maioria das pessoas não apresenta sintoma algum ou apenas sintomas leves. Na maioria dos casos a infecção torna-se crônica e pode ser caracterizada por um longo período assintomático. Estima-se que de 74 a 86% das pessoas tenham a forma persistente da viremia acompanhada de diferentes graus de inflamação hepática e fibrose. Estudos da infecção do HCV sugerem que 50 por cento (ou mais) dos hepatócitos abriguem o vírus. (LAUER & WALKER, 2001).

Seu perfil epidemiológico é tão complexo quanto a história natural da doença ocasionada por este vírus, o qual circula no sangue em baixos títulos. O HCV é transmitido através do sangue infectado e seus hemoderivados, o que pode ocorrer por meio do uso de drogas injetáveis, exposição percutânea (como por tatuagens e acidentes com materiais biológicos), transfusão sanguínea e contato sexual ou doméstico com pessoas infectadas pelo vírus. Quando comparada à hepatite B, sua transmissão vertical é rara, entretanto, gestantes com alta carga viral de HCV ou co-infectadas com HIV apresentam maior risco de transmissão da doença para os recém-nascidos (ANVISA, 2004).

O curso da infecção pelo vírus da hepatite C varia muito entre indivíduos. Alguns fatores reduzem o risco de progressão da doença, como ser do sexo feminino e ter sido infectado pelo vírus ainda jovem, e outros aumentam o risco, como: consumo de álcool, idade avançada de infecção, ser do sexo masculino e co-infecção com outros vírus (Figura 10). Pessoas cujo perfil contenha fatores redutores de risco não apresentam doença hepática progressiva antes de 30 ou mais anos após terem sido infectadas. Contudo, cerca de 20% dos pacientes com hepatite crônica irão, eventualmente, desenvolver cirrose em 20 anos ou menos após sua infecção com HCV, especialmente em caso de abuso de álcool e co-infecção com o vírus da imunodeficiência humana ou com HBV. Uma vez que houve o desenvolvimento de cirrose, existe um risco de 1 a 4% ao ano de surgimento de carcinoma hepatocelular (LAUER & WALKER, 2001).

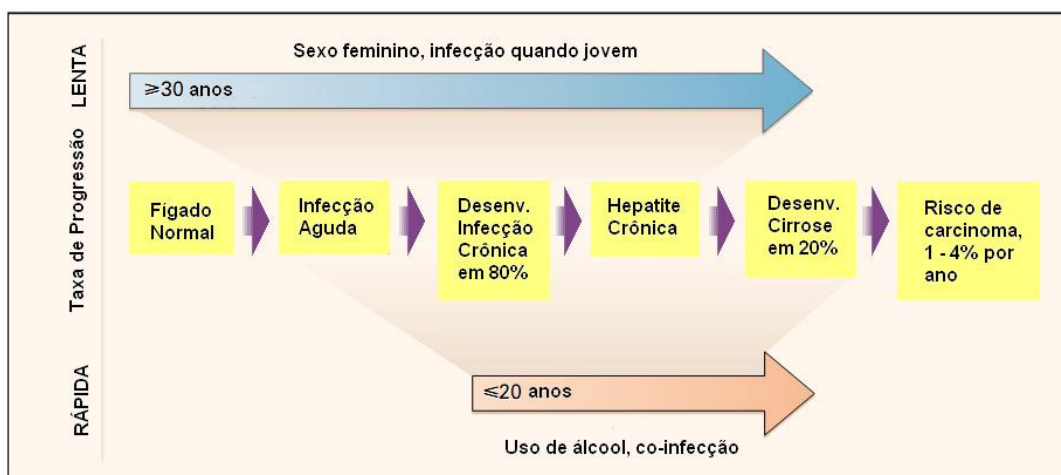


Figura 10 – Progressão natural da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) e sua evolução de acordo com as características dos indivíduos.

FONTE: Adaptado de LAUER & WALKER, 2001.

Na infecção pelo vírus da hepatite C, o principal marcador sorológico é o anticorpo anti-HCV, o qual pode ser detectado após 70 dias da infecção, aproximadamente (Figura 11). Como a dosagem de alanina aminotransferase (ALT), enzima liberada no sangue quando há dano à membrana do hepatócito, é variável ao longo do tempo, apenas os métodos de biologia molecular que permitem a identificação do RNA viral possibilitam detectar precocemente a infecção (ANVISA, 2004).

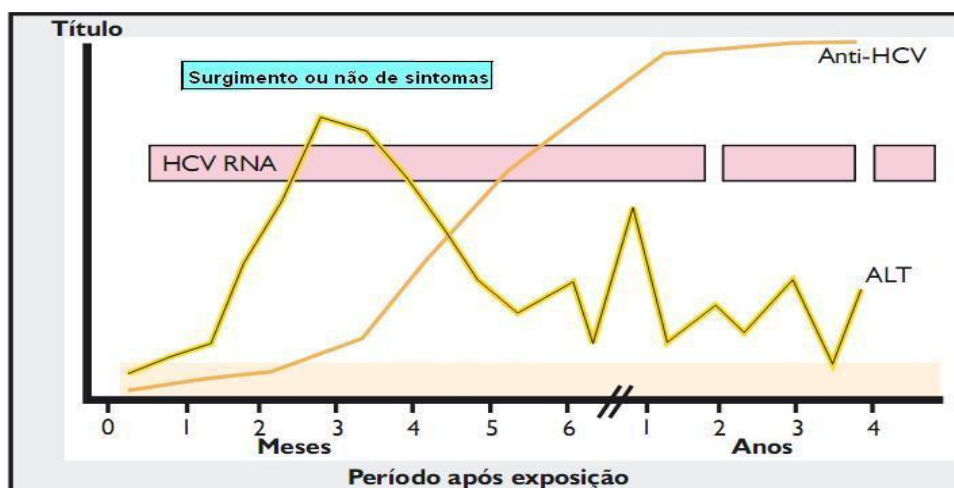


Figura 11 – Cinética de evolução dos marcadores sorológicos na hepatite C.

FONTE: Adaptado de ANVISA, 2004.

2.2.3 Triagem Sorológica da Hepatite C

A triagem sorológica da infecção pelo HCV pode ser feita com base na detecção de anticorpos ou na detecção do RNA viral por metodologias moleculares, sendo que esta última possui grande importância para a definição da hepatite C crônica. Para a detecção de anticorpos anti-HCV são utilizados ensaios imunoenzimáticos (EIA), sendo que já foram desenvolvidas três gerações (com aumento de sensibilidade e especificidade): a primeira geração possuía apenas a proteína recombinante c100-3 (NS4), a segunda geração possuía, além do antígeno c100-3, as proteínas recombinantes do *core* (c22) e c33 (NS3) e a terceira geração que, além de incorporar os antígenos NS4, *core*, NS3, substituiu alguns antígenos por peptídeos sintéticos e acrescentou um antígeno para a região NS5, reduzindo a janela imunológica do HCV de 82 para 70 dias (ANVISA, 2004).

Os ensaios imunoenzimáticos de terceira geração atualmente disponíveis na hemorrede brasileira têm alta sensibilidade para detectar indivíduos infectados que realizaram soroconversão completa, além de alta especificidade. Contudo, em caso de doadores infectados com carga viral indetectável, que representariam um risco adicional de transmissão viral, é necessário que a estratégia de triagem seja a combinação do EIA com um teste de detecção de ácido nucléico viral amplificado (NAT – *Nucleic Acid-Amplification Testing*) (BRATS, 2007).

O princípio das técnicas de amplificação é sintetizar grandes quantidades de genoma viral (amplicons) em uma reação enzimática cíclica. Desta forma, os amplicons podem ser detectados por diversos métodos e as quantidades de genoma viral nas amostras clínicas podem ser quantificadas. O método de reação em cadeia da polimerase (PCR – *polymerase chain reaction*) utiliza diversas temperaturas e uma enzima DNA polimerase termoestável para a formação de amplicons de DNA dupla-fita, sendo que no caso do RNA do HCV é necessária uma etapa de transcrição reversa para sintetizar a fita complementar do DNA (cDNA) a ser utilizado como molde. Além da PCR, pode ser utilizado o método de Amplificação Mediada por Transcrição (TMA – *Transcription-Mediated Amplification*), no qual ocorre uma reação isotérmica em que são utilizadas duas enzimas, uma transcriptase reversa e uma T7 RNA polimerase para a produção autocatalítica isotérmica de transcritos de RNA (PAWLITSKY, 2002).

2.3 PHAGE DISPLAY

O método de *Phage Display* é uma ferramenta de grande aplicabilidade para a seleção e engenharia de polipeptídios com uma função desejada. Se o DNA dos fragmentos codificadores de um determinado polipeptídio for fusionado ao gene de uma proteína de superfície de um bacteriófago (fago) filamentosos, o gene de fusão pode ser encapsulado dentro das partículas do fago, de modo que o mesmo apresente o polipeptídio fusionado à sua proteína de superfície, estabelecendo uma ligação física entre genótipo e fenótipo (SIDHU, 2000).

Este método foi descrito pela primeira vez em 1985 por Smith, Scott e colaboradores através da apresentação de polipeptídios na superfície de bacteriófagos M13-derivados para mapeamento de epítomos de anticorpos através da triagem de bibliotecas randômicas de peptídeos. Desde então tem sido utilizado para identificar a ligação de polipeptídios a uma grande variedade de alvos biológicos em diferentes aplicações médicas e técnicas (SERGEEVA & KOLONIN, 2006).

A técnica de *Phage Display* é uma forma de seleção *in vitro* muito eficiente de produzir grandes quantidades e variedades (da ordem de bilhões de moléculas) de peptídeos e proteínas além de selecionar aquelas variantes que possuam propriedades de interesse. Por isto, o *Phage Display* pode ser utilizado para o estudo de interações ligante-proteína, estudos de sítios de ligação de receptores e anticorpos, bem como para melhorar ou modificar a afinidade de proteínas aos seus parceiros de ligação (AZZAZY, 2002).

Sua estratégia baseia-se em dois conceitos fundamentais: o primeiro é que fagos (vírus que infectam bactérias) podem ser utilizados para vincular reconhecimento de proteínas à replicação de DNA. Isto é possível, pois os genes codificadores da proteína ou peptídeo apresentados na superfície do fago estão contidos dentro do mesmo. O segundo conceito baseia-se na clonagem de grandes bibliotecas de seqüências de DNA em fagos, tornando possível a seleção de fagos individuais de acordo com a interação da proteína apresentada no mesmo com um ligante cognato seguido de amplificação do mesmo por infecção em bactérias (BARBAS, 2001).

Em um ciclo de *Phage Display*, partindo-se de uma biblioteca de seqüências

variantes de DNA codificadoras para peptídeos ou proteínas, é feita a clonagem destas seqüências nos genomas de fagos ou fagomídeos na forma de fusões aos genes das proteínas de superfície. Em seguida, a biblioteca de fagos apresentando em sua superfície os diferentes peptídeos ou proteínas é exposta à molécula alvo ocorrendo a captura dos fagos com a especificidade adequada. Os fagos não-ligantes são lavados (podendo ainda permanecer ligados alguns fagos inespecíficos) e os fagos ligantes são eluídos com a interrupção da ligação entre eles e o alvo. Faz-se então a amplificação dos fagos eluídos através da infecção de células hospedeiras bacterianas para utilização como biblioteca enriquecida para o ligante do alvo em mais uma etapa de seleção (*bio-panning*), a qual é repetida até obter-se menor diversidade e uma população com maior especificidade ao alvo. Após as etapas de seleção, a população final de fagos deve ser selecionada e analisada individualmente (Figura 12) (WILLATS, 2002).

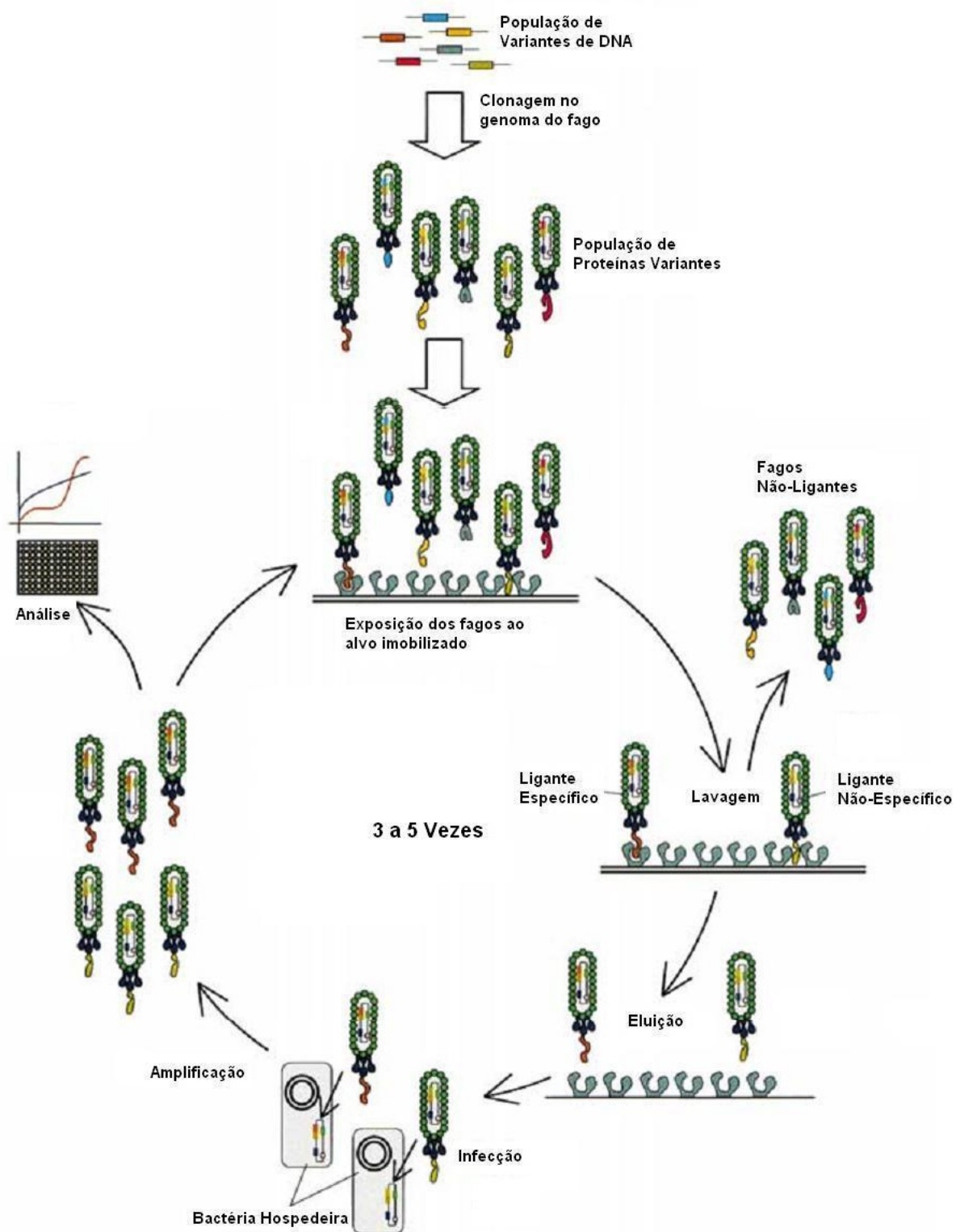


Figura 12 – O ciclo do método de *Phage Display*.

FONTE: Adaptado de WILLATS, 2002.

Esta estratégia é adotada pela natureza em sistemas imunes. Neste caso, grandes repertórios imunes ou bibliotecas de moléculas tornam possível o reconhecimento de diversas entidades presentes no ambiente. Em consequência, pode-se afirmar haver uma ligação entre reconhecimento protéico e replicação, uma vez que células produtoras de anticorpos são estimuladas à divisão a partir de interações de seus receptores celulares com o antígeno em questão, resultando em um sistema capaz de gerar, com eficiência, espécies moleculares capazes de reconhecer especificamente diversas formas moleculares (SMITH & PETRENKO, 1997).

Em uma seleção bem-sucedida deve ocorrer um aumento na quantidade de fagos específicos para a molécula-alvo através dos sucessivos ciclos de seleção (*bio-panning*), com conseqüente redução na diversidade dos fagos e baixa presença de fagos inespecíficos (Figura 13) (KONTHUR & CRAMERI, 2003).

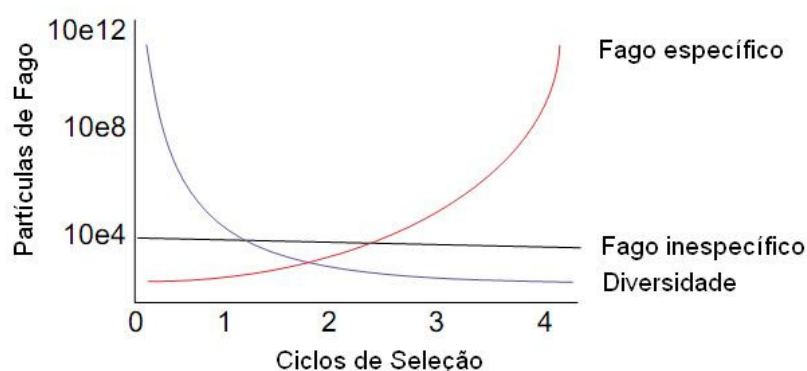


Figura 13 – A dinâmica de seleção do *Phage Display*: no decorrer dos ciclos de seleção aumenta a representatividade de fagos específicos à molécula-alvo e reduz a diversidade da biblioteca utilizada a cada ciclo, havendo sempre a presença de fagos inespecificamente ligados.

FONTE: Adaptado de KONTHUR & CRAMERI, 2003.

2.3.1 Fagos Filamentosos

Bacteriófagos filamentosos (gênero *Inovirus*) são um grupo de vírus contendo um genoma de DNA circular simples fita encapsulado dentro de um longo cilindro de proteínas do capsídeo. A maioria deles utiliza algum tipo de *pilus* bacteriano para facilitar o processo de infecção. A classe Ff de fagos filamentosos (fl, fd e M13) tem sido a mais extensivamente estudada e, como o próprio nome indica, estes bacteriófagos utilizam a extremidade do *pilus* conjugativo F como um receptor e, portanto, são específicos para bactérias Gram-negativas contendo o plasmídeo F (F – *fertility factor*, fator de fertilidade) (WEBSTER, 2001).

Os fagos Ff não matam seus hospedeiros durante a infecção produtiva. O DNA viral fita simples é replicado através de um intermediário dupla-fita por junção dos componentes codificadores bacterianos e virais. As proteínas do capsídeo são todas sintetizadas como proteínas integrais da membrana e permanecerão na membrana até serem montadas ao redor do DNA. Esta montagem ocorre em sítios específicos do envelope da bactéria, nos quais a membrana citoplasmática encontra-se em contato próximo com as membranas externas e, durante este processo, o DNA viral é extrusado através do sítio de montagem associado à membrana, quando proteínas do fago ligantes ao DNA são removidas e as proteínas do capsídeo são empacotadas ao redor do DNA. Este processo ocorre até acabar o DNA, de modo que há pouca ou nenhuma restrição com relação ao tamanho do DNA empacotado, sendo que a bactéria tolera este processo relativamente bem, continuando a crescer e se dividir em um período de tempo aproximadamente 50% superior ao das bactérias não-infectadas. Existe um salto de produção de fagos de cerca de 1.000 partículas produzidas na primeira geração após a infecção e, em seguida, a bactéria produz cerca de 100-200 partículas por geração e, após muitas gerações, pode-se chegar a títulos de 10^{11-12} partículas por mililitro (WEBSTER, 2001).

Os fagos Ff possuem genomas 98% idênticos, seus produtos gênicos são intercambiáveis e são empacotados em partículas de cerca de 10 nm de diâmetro e aproximadamente 1 µm de comprimento, contendo proteínas estruturais, incluindo a proteína g8p (gene pVIII), a maior proteína de superfície (contendo cerca de 2.700 cópias) e responsável pela estrutura tridimensional extremamente alongada e helicoidal. Em uma das extremidades do fago encontram-se de 3 a 5 cópias de cada proteína pVII e pIX, duas das

menores proteínas traduzidas (33 e 32 resíduos, respectivamente) (Figura 14). O processo de montagem do fago se inicia na extremidade pVII-pIX e, na ausência de uma das proteínas, o mesmo é interrompido. A extremidade protuberante da partícula contém cerca de 5 cópias de cada proteína pIII e pVI, ambas necessárias para o fago se desprender da membrana celular. A proteína pVI é degradada em células que não possuem pIII, o que sugere que estas proteínas juntam-se à membrana celular antes da incorporação às partículas do fago (LOWMAN, 1997).

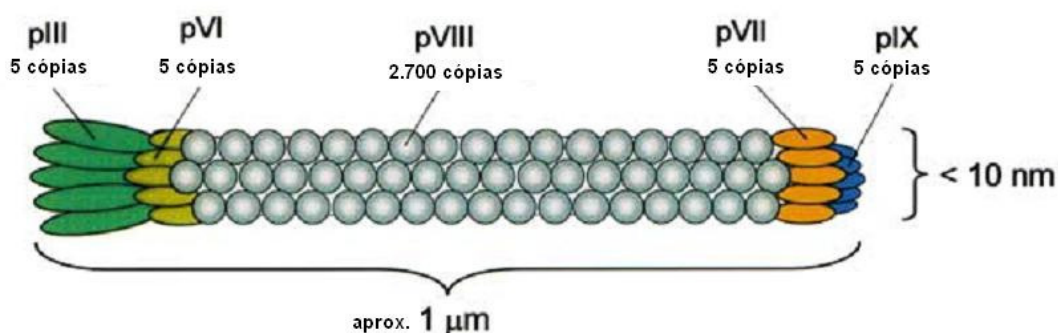


Figura 14 – Representação esquemática do bacteriófago M13.

FONTE: Adaptado de WILLATS, 2002.

A primeira etapa do ciclo celular do fago consiste em ligar a proteína pIII (g3p) à extremidade do *pilus* F da bactéria, seguida pela ligação à proteína hospedeira TolA, formando um complexo que resulta na despolimerização das proteínas de superfície do fago, deposição das mesmas na membrana citoplasmática (o envelope bacteriano possui membranas internas e externas separadas pelo periplasma), onde elas permanecem para futuro reaproveitamento, e entrada do ssDNA no citoplasma. O ssDNA é então convertido pelas enzimas do hospedeiro em dsDNA (Forma Replicativa, *replicative form*-RF), que servirá de molde para a expressão dos genes do fago e para síntese do ssDNA. A progênie do ssDNA, envolta por dímeros pV servirá de precursora do virion. A conversão do complexo pV-ssDNA em partículas virais e subsequente secreção das mesmas para fora da célula é mediada por um complexo multimérico, formado pelas proteínas pI, pXI, pIV e a proteína hospedeira citoplasmática tioredoxina, que atravessa ambas as membranas. Este processo envolve a remoção dos dímeros pV e sua substituição pelas cinco proteínas de superfície que residem transitoriamente na membrana citoplasmática (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX) (Figura 15). O tubo oco que reveste todo o ssDNA é composto por milhares de cópias da maior proteína

de superfície de 50 resíduos, denominada pVIII, a qual forma uma estrutura contínua de alfa-hélice contendo cinco resíduos amino-terminais expostos na superfície e sua extremidade carboxi-terminal na superfície interna da hélice em contato com grupos fosfato da ssDNA viral. Este filamento é unido por interações hidrofóbicas entre subunidades adjacentes (RUSSEL et al., 2004)

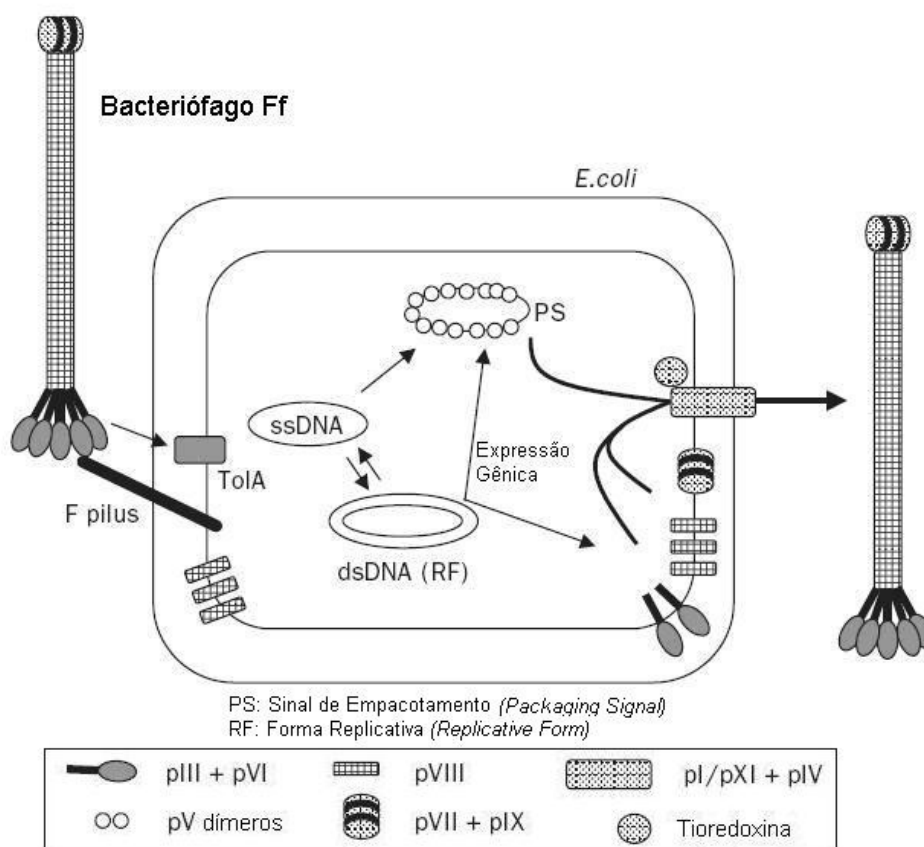


Figura 15 – Ciclo de vida do fago filamentososo M13.

FONTE: Adaptado de RUSSEL et al., 2004.

O genoma de fita simples do fago é orientado dentro da partícula do mesmo. Isto é determinado pelo sinal de empacotamento (PS – *packaging signal*), localizado na região intergênica (IG) não-codificadora do genoma. O sinal de empacotamento é um *hairpin* imperfeito, porém extremamente estável, localizado na extremidade pVII-pIX da partícula, necessário para a encapsidação do ssDNA circular nas partículas virais. Algumas

substituições de aminoácidos nas proteínas pVII, pIX e pI possibilitam a encapsidação do ssDNA sem o sinal de empacotamento, contudo, não se sabe se o DNA é orientado aleatoriamente nestas partículas ou se pequenas regiões duplex serviriam como um PS secundário (RUSSEL et al., 2004).

A proteína pII do fago é codificada pelo gene II e se liga à região intergênica localizada entre os genes IV e II/X do dsDNA para formar uma incisão na fita positiva, iniciando a replicação por proteínas da célula hospedeira (Figura 16). O gene V codifica para a proteína pV de ligação do ssDNA e os genes VII e IX codificam as duas pequenas proteínas localizadas na extremidade do fago que é externalizada primeiro no processo de montagem. O gene VIII codifica para a maior proteína de revestimento e os genes III e VI codificam as proteínas pIII e pVI, localizadas na outra extremidade da partícula viral e responsáveis pela mediação do término de montagem, liberação do vírus e infecção. O gene I codifica duas proteínas de membrana citoplasmática, pI e pIX, e o gene IV codifica pIV, que junto com a pI e pIX, forma um canal multimérico de membrana externa através do qual o fago sai da bactéria (RUSSEL et al., 2004).

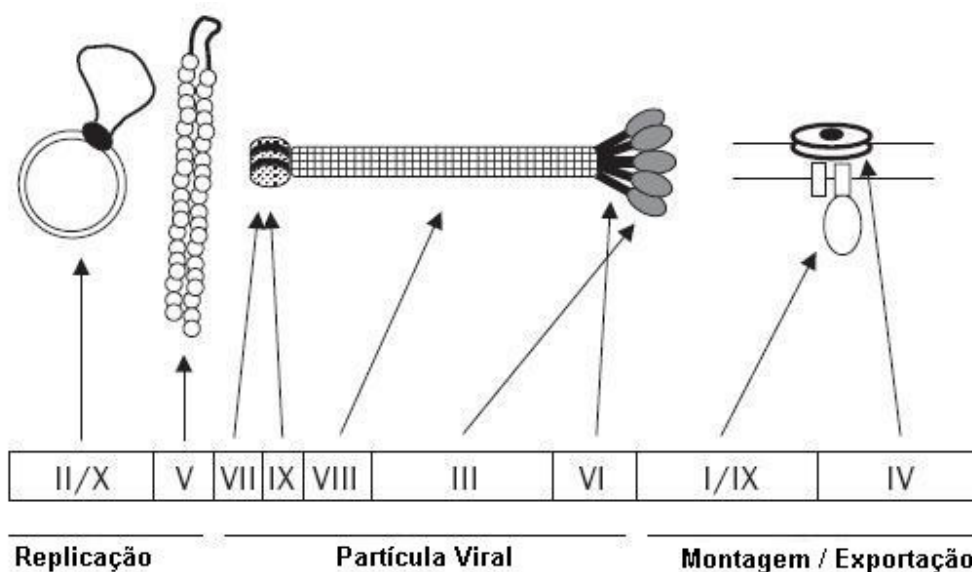


Figura 16 – Representação linear dos genes e produtos gênicos de fagos filamentosos.

FONTE: Adaptado de RUSSEL et al., 2004.

Os *pili* são uma estrutura expressa durante a fase log do crescimento celular, cuja montagem ocorre em temperaturas acima de 34°C. Portanto, para que o processo de infecção seja bem sucedido, é preciso obter uma cultura com alta densidade celular ainda na fase log e com incubação em temperaturas na faixa de montagem dos *pili*. Como os *pili* são uma estrutura presente em baixa quantidade na superfície celular e apresentam-se como alvo relativamente pequeno para ligação, a taxa e eficiência de infecção de uma cultura bacteriana é diretamente proporcional à quantidade de fagos presentes. A primeira progênie de partículas de fago surge no sobrenadante da cultura aproximadamente dez minutos após a infecção (para incubação a 37°C). A quantidade de fagos aumenta exponencialmente por quarenta minutos e, após este período, esta taxa torna-se linear. São produzidos cerca de mil fagos por célula na primeira hora.

Os polipeptídios a serem apresentados na superfície do fago podem ser fusionados a três proteínas de superfície: pIII, pVIII ou pVI. Nas duas primeiras proteínas, eles são sintetizados com peptídeos sinais N-terminais, os quais são clivados da cadeia polipeptídica quando eles forem inseridos na membrana interna da célula (Figura 17). Um único segmento de aminoácidos das proteínas pIII e pVIII abrange a membrana interna, separando um segmento periplasmático N-terminal de um curto segmento citoplasmático C-terminal e é nesta etapa que as proteínas são incorporadas em virions. Em alguns vetores pIII, o polipeptídio a ser apresentado substitui o domínio N-terminal da pIII, produzindo uma proteína híbrida que pode ser incorporada no virion, mas que deve ser suplementada por moléculas completas de pIII para ser infectiva. O mesmo ocorre quando se deseja apresentar grandes peptídeos (com mais de oito resíduos de aminoácidos) fusionados à proteína pVIII. Neste caso, só ocorrerá produção de fago caso seja suplementado com moléculas pVIII selvagens, produzindo novamente partículas em mosaico. Para a fusão à proteína pVI é necessário apenas que ambos os quadros de leitura sejam fusionados corretamente em seu domínio C-terminal (SMITH & PETRENKO, 1997).

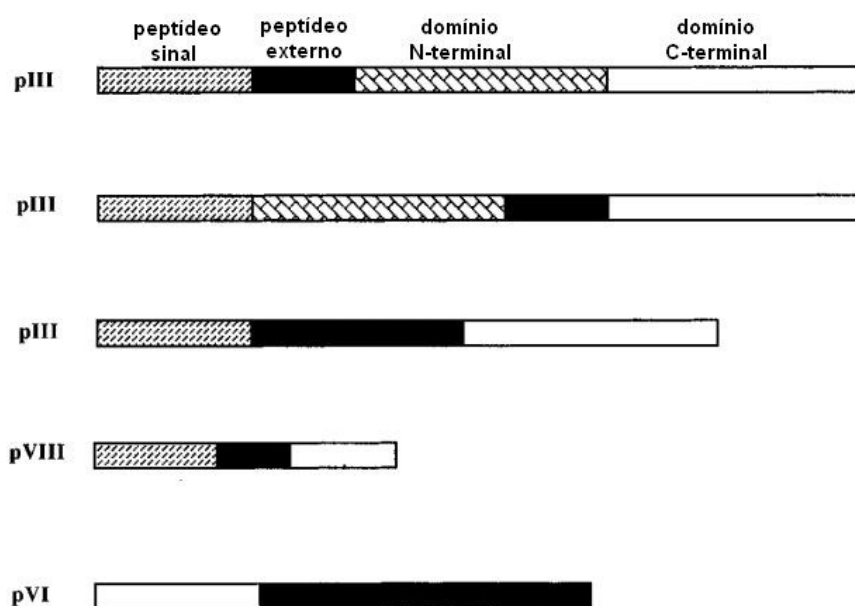


Figura 17 – Diagrama esquemático do modo de fusão de peptídeos às proteínas de superfície pIII, pVIII e pVI de vetores de *Phage Display*.

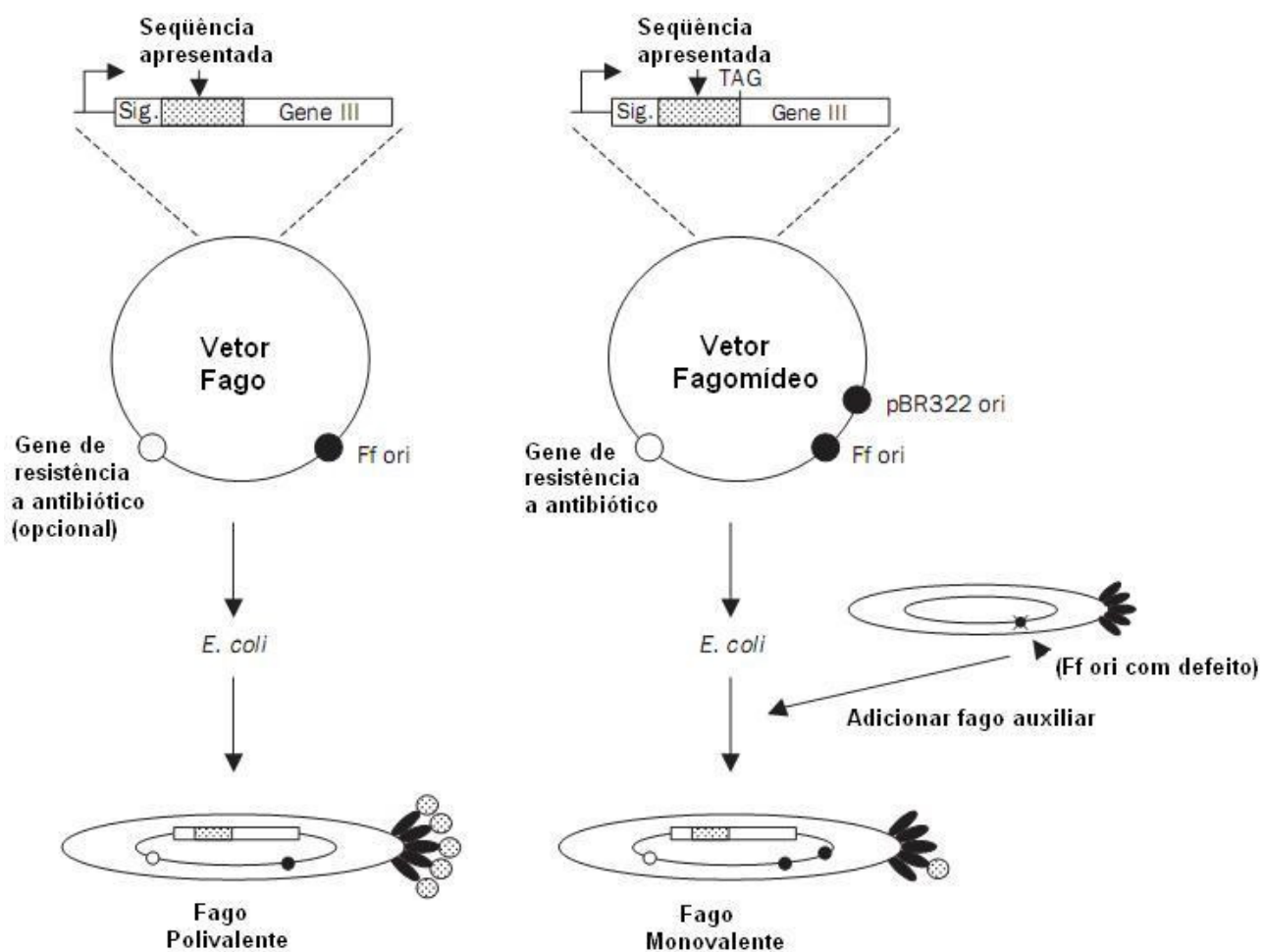
FONTE: Adaptado de SMITH & PETRENKO, 1997.

As proteínas pVIII e pIII ainda são as mais utilizadas para apresentação de moléculas. A proteína pVIII é a proteína de superfície mais abundante e a inserção seqüências para apresentação normalmente se dá na extremidade N-terminal, entre a seqüência sinal e a seqüência de codificação da proteína madura. É possível apresentar apenas seqüências curtas de peptídeos (6-8 resíduos) por cópia de pVIII, já partículas maiores não conseguem ser empacotadas. Para isto, seria necessária um vetor fagomídeo, resultando em virions híbridos, ou mesmo modificar a proteína pVIII para o *display* de polipeptídios. A proteína pIII está presente em cinco cópias na extremidade final do fago, possui capacidade de apresentar grandes insertos, é compatível com *display* monovalente e possui diversos vetores disponíveis. Apesar de aceitar insertos muito maiores que a pVIII, ela pode ter sua infectividade dramaticamente reduzida devido a isto. Neste caso, pode-se de maneira similar, utilizar vetores fagomídeos para produzir um virion híbrido. (RUSSEL et al., 2004).

2.3.2 Vetores de Phage Display

Proteínas podem ser apresentadas utilizando-se vetores baseados na seqüência natural de fagos Ff ou utilizando vetores fagomídeos baseados em plasmídeos e que contêm apenas o gene da proteína de fusão (e nenhum outro gene do fago). Em vetores de fago, a seqüência heteróloga que será apresentada é inserida diretamente na seqüência codificadora para a proteína que irá fazer sua apresentação. Uma vez inserido na bactéria, todos os fagos produzidos irão apresentar a proteína heteróloga (exemplos: vetores fUSE e M13KE) (RUSSEL et al., 2004).

Em vetores fagomídeos faz-se a clonagem do gene de fusão da proteína que será apresentada em um pequeno plasmídeo sob controle de um promotor fraco. Além da origem de replicação do plasmídeo (pBR322), o vetor possui também uma origem Ff para permitir a produção de vetores fita simples e sua subsequente encapsidação nas partículas do fago. Para isto, a bactéria *E. coli* contendo o plasmídeo é infectada com um fago auxiliar (*helper phage*), o qual consiste em nada mais que um fago Ff com origem de replicação comprometida, o que torna ineficaz sua encapsidação. Deste modo, as células infectadas expressam todas as proteínas do fago selvagem, as quais estão presentes no genoma do fago auxiliar, bem como uma pequena quantidade da proteína de fusão codificada pelo fagomídeo, de modo que as partículas de fago sejam secretadas por células que contêm ambas as proteínas, geralmente com aquelas do fago selvagem consideravelmente em maior quantidade (Figura 18). Vários vetores fagomídeos possuem um códon âmbar (TAG) interposto entre a seqüência a ser apresentada e o gene III para permitir a expressão solúvel da proteína transferindo o vetor para uma cepa não-supressora. (RUSSEL et al., 2004).



Sig: peptídeo sinal

Figura 18 – Esquema geral para *Phage Display* utilizando vetores fago e fagomídeo.

FONTE: Adaptado de RUSSEL et al., 2004.

Como o genoma do fago auxiliar é encapsulado de modo muito ineficaz, quase todas as partículas contêm o genoma do fagomídeo, preservando a ligação entre proteína apresentada e gene. A grande vantagem dos vetores fagomídeos está em seu tamanho pequeno e na sua facilidade de clonagem quando comparados às dificuldades de clonagem em vetores fago relacionadas a alterações indesejadas na estrutura complexa de sobreposição de genes, promotores e terminadores. Isto resulta na possibilidade de bibliotecas muito maiores para vetores fagomídeos.

Além disto, a escolha do tipo de vetor está relacionada à escolha de apresentação

desejada, polivalente ou monovalente. Os vetores fagos convencionais irão geralmente produzir *displays* polivalentes, a menos que haja proteólise extensiva das proteínas apresentadas. Em vetores fagomídeos com apresentação de fusões na proteína pVIII, apenas uma fração das 2.700 cópias da pVIII presentes na superfície do fago farão *display* da seqüência inserida, apresentando um *display* tipicamente polivalente. Entretanto, quando se utiliza um promotor fraco para a apresentação de uma proteína fusionada, pode-se obter o chamado *display* monovalente. Neste caso, dez por cento ou menos partículas farão o *display* de uma cópia da proteína fusionada, uma porcentagem muito pequena apresentará duas cópias e a grande maioria restante irá apresentar apenas a proteína selvagem do fago.

Esta valência de *display* afeta diretamente a capacidade de discriminar ligantes de diferentes afinidades. *Display* polivalente de proteínas fusionadas pode impedir a identificação dos clones de maior afinidade, pois a multivalência confere uma aparente alta afinidade em clones ligados fracamente. Portanto, a apresentação monovalente permite uma seleção baseada unicamente na afinidade e é desta forma, a opção preferencial em diversos estudos cujo objetivo é a seleção da espécie de uma biblioteca que apresenta a mais forte ligação. Contrariamente, para aplicações em que se deseja selecionar inicialmente clones raros e de baixa afinidade, como seleção *de novo* de peptídeos para um determinado alvo, a estratégia de utilizar polivalência aumenta as chances de isolar esses clones. Uma estratégia comum, portanto, é iniciar os ensaios com *display* polivalente e na seqüência prosseguir com *display* monovalente de acordo com a maturação da afinidade do polipeptídeo apresentado.

2.3.3 Biblioteca de Peptídeos

Bibliotecas de peptídeos são formadas por um grande número de peptídeos de um determinado tamanho, cujas seqüências foram geradas randomicamente para variar a posição dos resíduos de aminoácidos. Estes peptídeos podem possuir também resíduos fixos que fornecem suporte para estruturas secundárias, como pontes dissulfeto e alfa-hélices. Existem diversos tipos de bibliotecas de peptídeos, todas com o objetivo de fazer a apresentação de epítomos variáveis, abrangendo um número mínimo de resíduos estruturalmente similares (SCOTT, 2001a).

Estas bibliotecas são pesquisadas em busca de seqüências que se liguem a uma determinada molécula-alvo durante sua triagem. Estes ligantes podem ser encontrados

devido ao número crítico limitado de resíduos (CBR – *Critical Binding Residues*) que são necessários para que haja a ligação com a molécula-alvo. Por exemplo, duas proteínas podem cada uma contribuir com vinte resíduos de aminoácido em sua interface de ligação, porém apenas entre quatro e sete resíduos são responsáveis pela maior parte da energia de ligação para a formação do complexo, sendo que os demais resíduos contribuem formando estruturas que promovem interações entre os resíduos críticos de ligação e através de múltiplos contatos de menor energia. Isto possibilita a utilização de peptídeos contendo os resíduos críticos de superfícies de epítomos ou parátomos (local de ligação de um epítomo) para seleção de moléculas-alvo (SCOTT, 2001b).

Os peptídeos podem se ligar a anticorpos, enzimas, receptores e até mesmo outros peptídeos, geralmente, próximo ao sítio “natural” de ligação da molécula, agindo como um mimetizante funcional do ligante nativo. Esta característica dos peptídeos pode estar relacionada também à existência do mesmo tipo de ligação entre seus resíduos e os resíduos críticos do ligante nativo, neste caso eles também seriam mimetizantes estruturais do epítomo do ligante nativo, podendo ser utilizados para estudos de delineamento de inibidores e agonistas bio-reativos e de mimetizadores imunogênicos. Assim, os peptídeos poderiam ser utilizados como haptenos imunológicos (substâncias não-proteináceas com propriedade de antigenicidade, mas não de imunogenicidade), estimulando a produção de anticorpos contra um epítomo-alvo (CASEY et al., 2009).

Já foram descritos peptídeos mimetizantes de epítomos de proteínas, carboidratos, ácidos nucléicos e outras substâncias não-proteináceas, conferindo aos mesmos um grande potencial de uso para o desenvolvimento de novas drogas, diagnósticos e vacinas (ZWICK et al., 1998).

Diversos estudos têm sido realizados para triagem de bibliotecas de peptídeos utilizando anticorpos monoclonais (MAbs – *Monoclonal antibodies*) produzidos contra imunógenos protéicos e não-protéicos, isolando peptídeos mimetizantes que reajam com estes MAbs. Em muitos casos, estes ligantes peptídicos são também mimetizantes imunogênicos do antígeno-alvo para um MAb específico contra o qual a seleção de peptídeos foi realizada, sendo que, se fosse utilizado o fago completo como imunógeno ou se apenas o peptídeo apresentado no fago fossem utilizados em um conjugado protéico para imunização, o soro imune resultante reagiria com o antígeno-alvo. Assim, a resposta policlonal induzida por um peptídeo mimetizante-imunogênico irá ligar ao mesmo antígeno-alvo reconhecido pelos MAbs utilizados para a seleção do peptídeo e isto tem sido feito com sucesso para uma grande variedade de antígenos (ZWICK, SHEN & SCOTT, 1998).

O conceito de utilizar peptídeos como haptenos epítipo-mimetizantes para produzir resposta altamente direcionada a um alvo é muito promissora, e em diversos estudos, o mesmo sucesso não foi obtido com o uso de peptídeos sintéticos desenhados como mimetizantes imunogênicos. Isto pode ser devido a uma relação entre as características específicas dos peptídeos (além de suas seqüências) e sua afinidade de ligação aos anticorpos, sem necessariamente mimetizar por completo um epítipo, de modo que utilizar uma grande biblioteca de peptídeos para realizar a triagem pode ser o processo mais efetivo para encontrar ligantes imunogênicos para os epítipos-alvo (ZWICK, SHEN & SCOTT, 1998).

Os sistemas de *displays* recombinantes são codificados por oligonucleotídeos degenerados que são introduzidos no genoma de vetores fago ou fagomídeos. Cada resíduo variável (X) na seqüência da biblioteca de peptídeos é geralmente codificado por um códon degenerado NNK ou NNS (onde N é A, G, C ou T, K é G ou T e S é G ou C), representando 32 códons que codificam todos os 20 aminoácidos mais o códon âmbar de finalização. Os peptídeos ligantes são identificados nas bibliotecas de *display* recombinante através de seleção por afinidade em experimentos de captura de fagos. Os clones são escolhidos a partir de frações selecionadas com alta afinidade, alto rendimento de fagos (comparado ao controle de fagos) e testado por ensaios imunoenzimáticos para análise da evolução da seleção. A seqüência dos aminoácidos do peptídeo apresentado pelo clone selecionado pode ser facilmente obtida por seqüenciamento de DNA, no qual seqüências majoritariamente presentes (seqüências de aminoácidos compartilhadas por diferentes peptídeos) podem normalmente ser deduzidas comparando as seqüências de peptídeos de um número de clones selecionados. Estas seqüências consenso são importantes, pois geralmente são formadas pelos aminoácidos que conferem afinidade de ligação à molécula-alvo (SCOTT, 2001a).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL DO PROJETO

Obter através da técnica de *Phage Display* peptídeos recombinantes com potencial aplicabilidade para o imunodiagnóstico de hepatite B e hepatite C.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO PROJETO

- ❖ Realizar a triagem (*bio-panning*) de três bibliotecas randômicas de peptídeos comerciais (NEB - *New England Biolabs*) contendo peptídeos de sete resíduos de aminoácidos (Ph.D. 7), de doze resíduos de aminoácidos (Ph.D. 12) e de sete resíduos de aminoácidos com estrutura cíclica (Ph.D. C7C) utilizando como alvo um *pool* de anticorpos monoclonais para hepatite B e outro *pool* de anticorpos monoclonais para hepatite C;
- ❖ Avaliar a eficiência de seleção do *bio-panning* das bibliotecas Ph.D. 7, Ph.D.12 e Ph.D. C7C através de titulação viral ao término de cada ciclo de seleção e da realização de ensaio imunoenzimático (ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*);
- ❖ Selecionar clones do *pool* de fagos resultantes do *bio-panning* de cada biblioteca randômica de peptídeos;
- ❖ Extrair e seqüenciar o material genético do *pool* de fagos selecionados e amplificados para hepatite B e hepatite C;
- ❖ Validar a seleção do *pool* de fagos através da realização do uso de ferramentas de bioinformática para validação da especificidade de seleção e alinhamento dos clones obtidos frente às proteínas de hepatite B e hepatite C;
- ❖ Propagar e determinar o título viral dos clones individuais validados para realização de testes de afinidade ao alvo;
- ❖ Avaliar a afinidade dos clones de fagos selecionados aos *pools* de anticorpos monoclonais de hepatite B e de hepatite C utilizados para a seleção através de ensaio imunoenzimático (ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*);

- ❖ Transferir os peptídeos com potencial aplicabilidade no imunodiagnóstico de hepatite B e de hepatite C para o vetor pMAL-pIII (*New England Biolabs*) por subclonagem.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 *BIO-PANNING* DAS BIBLIOTECAS DE PEPTÍDEOS RANDÔMICOS

O processo global de seleção de peptídeos de potencial aplicabilidade por *Phage Display*, cujas metodologias estão descritas nas seções a seguir, esta representado pela Figura 19.

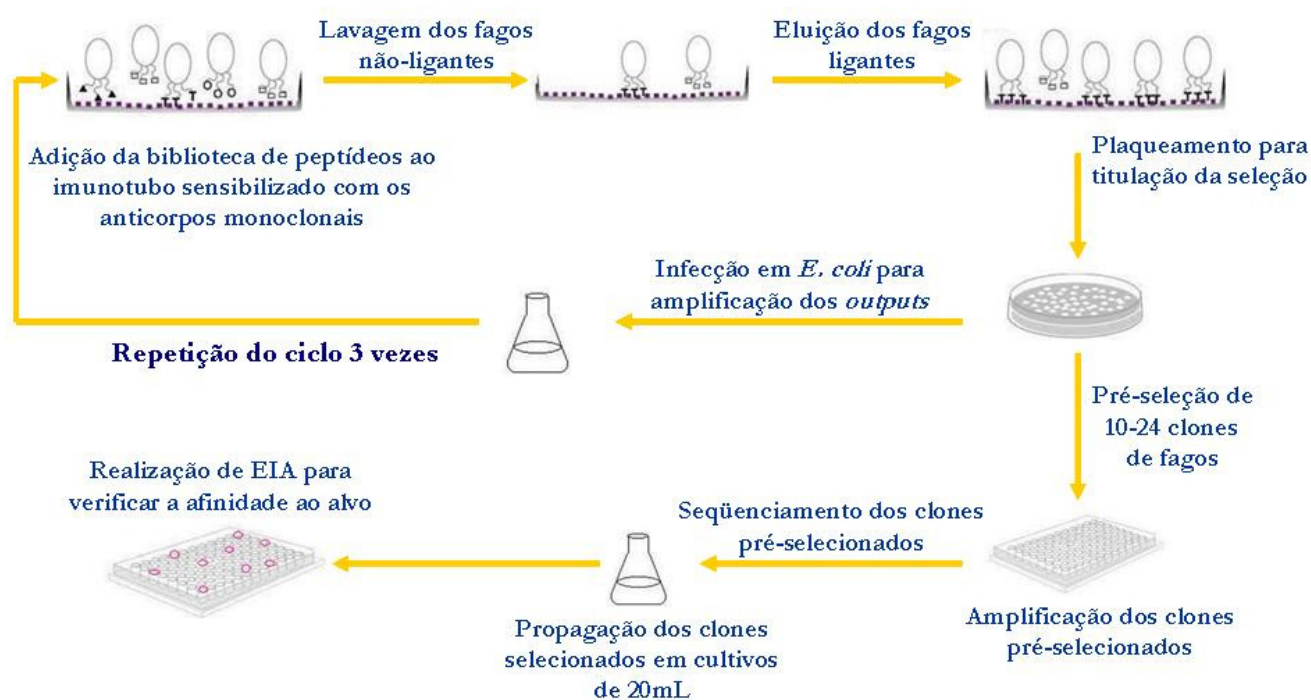


Figura 19 – Ilustração do processo global de seleção de peptídeos randômicos de potencial aplicabilidade por *Phage Display*.

FONTE: A autora (2011).

4.1.1 Bibliotecas de Peptídeos Randômicos

Os *bio-pannings* foram realizados utilizando três bibliotecas comerciais fabricadas pela *New England Biolabs* (NEB), as quais utilizam um sistema de *Phage Display* que tem como vetor o fago M13 modificado para *display* pentavalente de peptídeos como fusão N-terminal da pequena proteína de superfície pIII, presente em cinco cópias em uma das extremidades do virion M13 maduro.

A construção das bibliotecas em questão é feita de modo a apresentar peptídeos curtos o suficiente (até 50 resíduos de aminoácidos) para não afetar a função de infectividade relacionada à proteína pIII, tornando possível que suas cinco cópias apresentem o peptídeo em questão sem atenuação mensurável de sua atividade infectiva.

A valência reduzida da proteína pIII (presente em cinco cópias) quando comparada a bibliotecas construídas com peptídeos/proteínas fusionados à proteína pVIII (presente em aproximadamente cem cópias) tornam o sistema mais adequado para a descoberta de ligantes de maior afinidade, com constante de dissociação (Kd) de 10 μ M ou mais.

O vetor M13KE é um vetor tipo selvagem, cujas funções foram mantidas, porém o gene da proteína de superfície que será utilizada para a apresentação do peptídeo foi modificado para conter sítios para enzimas de restrição a serem usadas na clonagem destes fragmentos (Figura 20).

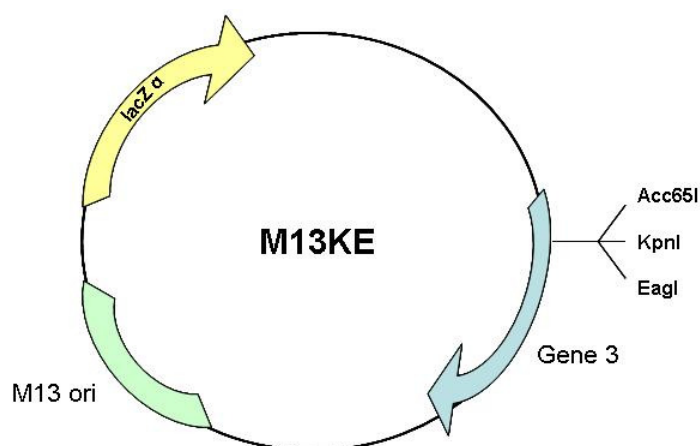


Figura 20 – Mapa do genoma do vetor M13KE.

FONTE: Adaptado de SCOTT & BARBAS, 2001.

As bibliotecas de peptídeos randômicos utilizadas continham heptapeptídeos lineares (Ph.D. 7), dodecapeptídeos lineares (Ph.D. 12) e heptapeptídeos cíclicos (Ph.D. C7C), esta última com um par de resíduos de cisteína, os quais são oxidados durante a montagem do fago, formando uma ponte dissulfeto o que resulta em uma estrutura em *loop*. Todas as bibliotecas possuem complexidade da ordem de 2×10^9 clones independentes e uma curta seqüência de ligação (*linker*) Gly-Gly-Gly-Ser entre o peptídeo apresentado e a proteína pIII, sendo que nas bibliotecas Ph.D. 7 e Ph.D. 12 o primeiro resíduo da fusão peptídeo-pIII é a primeira posição randomizada, enquanto que a primeira posição randomizada da biblioteca Ph.D. C7C é precedida pelos aminoácidos Ala-Cys (Figura 21).

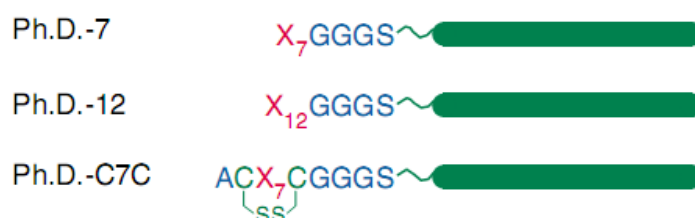


Figura 21 – Representação esquemática das bibliotecas Ph.D. 7, Ph.D. 12 e Ph.D. C7C (New England Biolabs).

FONTE: Manual Técnico Ph.D.TM Phage Display Libraries – PROTEIN TOOLS (New England Biolabs – NEB).

Cada biblioteca foi pesquisada para um pool de MAbs de hepatite B e um pool de MAbs de hepatite C, totalizando seis bio-pannings, cada um com três ciclos de seleção (Figura 22).

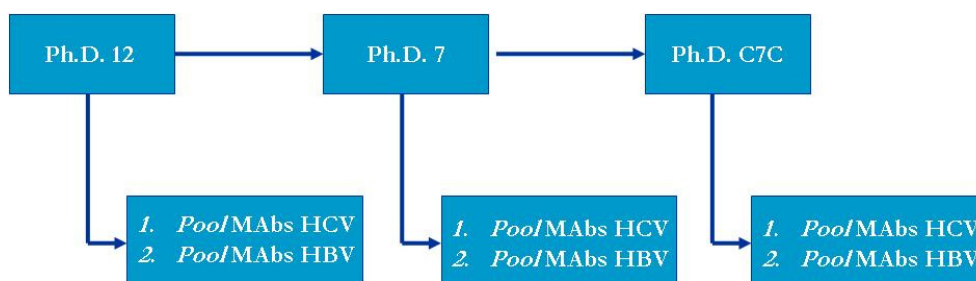


Figura 22 – Esquema representativo da organização das etapas de *bio-panning*.

FONTE: A autora (2011).

Todos os procedimentos foram realizados segundo manual técnico do fabricante Ph.D.TM *Phage Display Libraries – PROTEIN TOOLS* (New England Biolabs- NEB), com as devidas adaptações para adequá-lo aos objetivos do projeto.

As bibliotecas utilizadas apresentam seus peptídeos fusionados à proteína pIII do fago, podendo ter sua infectividade atenuada, e possuem a inserção da seqüência de clonagem de peptídeos-lacZ α próxima à origem de replicação da fita positiva, resultando em um ciclo de replicação mais longo. Portanto, quando utilizados para seleção, caso ocorra a contaminação de qualquer etapa com fagos selvagens presentes no ambiente, por menor que seja a quantidade destes, no decorrer de sucessivos ciclos de *bio-panning* os fagos selvagens poderão se tornar maioria dentre o *pool* de fagos resultantes.

Para prevenir que isto ocorresse, todas as etapas dos ciclos de *bio-panning* foram realizadas em cabine de fluxo laminar e as soluções utilizadas foram esterilizadas a cada ciclo.

4.1.2 Sensibilização dos Imunotubos

Nas etapas de seleção do *bio-panning* foram utilizados anticorpos monoclonais em *pool* para hepatite B e para hepatite C visando selecionar ligantes altamente específicos. A escolha dos anticorpos monoclonais foi baseada nas proteínas atualmente utilizadas nos ensaios imunoenzimáticos empregados na hemorrede brasileira para a triagem dos marcadores sorológicos de HBV e de HCV.

Os anticorpos monoclonais utilizados são IgGs produzidas em camundongos e foram obtidos junto à empresa *Fitzgerald Industries*. Suas especificações estão presentes na Tabela 2.

Tabela 2 – Especificações dos anticorpos monoclonais utilizados como moléculas-alvo nos ciclos de *bio-panning*.

Doença	Anticorpo	Imunógeno
Hepatite B (HBV)	Anti-HBcAg (10-H50D, clone M372915)	Antígeno do capsídeo (HBcAg)
	Anti-HBcAg (10-H50B, Clone M41058)	Antígeno do capsídeo (HBcAg)
	Anti-HBsAg (10-H05G, Clone M701079)	Antígeno da superfície (HbsAg)
	Anti-HBsAg (10-H05H, Clone M701077)	Antígeno da superfície (HbsAg)
Hepatite C (HCV)	Anti-HCV Core	Proteína recombinante (Epitopo: a.a 70-90)
	Anti-HCV NS4	Proteína recombinante
	Anti-HCV NS3	Proteína recombinante (Epitopo a.a. 1350-1460)
	Anti-HCV NS5a	Proteína recombinante (Epitopo a.a. 2190-2300)

Os *pools* de anticorpos monoclonais foram utilizados para sensibilizar imunotubos marca NUNC (modelo StarTubes Immuno™ Tubes) de volume total de 5 mL.

Visando aumentar a estringência dos sucessivos ciclos de seleção do *bio-panning* com o objetivo de selecionar ligantes altamente específicos, a cada ciclo foi reduzida a quantidade de anticorpos monoclonais utilizados na sensibilização dos imunotubos.

No primeiro ciclo foram adicionados 5 µg/mL de cada MAb (totalizando, em *pool*, 20 µg/mL), no segundo ciclo foi adicionado 1 µg/mL de cada MAb (totalizando, em *pool*, 4 µg/mL) e no terceiro ciclo foi adicionado 0,5 µg/mL de cada MAb (totalizando, em *pool*, 2 µg/mL). Estas quantidades de anticorpos monoclonais foram preparadas em 1,5 mL de *Coating Buffer* (solução 0,1M NaHCO₃, pH 8,6, autoclavada).

Após transferir as soluções de sensibilização para os imunotubos, os mesmos foram selados com parafilm e incubados a 4°C (em câmara fria) sob leve agitação em agitador orbital, *overnight*.

Uma vez realizada a sensibilização do imunotubo, a solução de sensibilização foi removida e o excesso de líquido residual foi descartado vertendo o tubo sobre um papel-toalha. Em seguida foi feito o bloqueio do imunotubo para que não houvesse quaisquer ligações inespecíficas de peptídeos às paredes do imunotubo.

Para o bloqueio do imunotubo fez-se a adição de 4 mL de solução de *Blocking Buffer* (solução 0,1M NaHCO₃, pH 8,6, 5 mg/mL de BSA, filtrado em filtro 0,22 µm). Em seguida o imunotubo foi selado com parafilm e incubado por 1 hora a 4°C (em câmara fria) sob leve agitação e agitador orbital.

Uma vez sensibilizado e bloqueado, o imunotubo foi lavado seis vezes com 4 mL de solução TBST 0,1% (solução 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% v/v Tween 20, autoclavada), vertendo o imunotubo em um papel-toalha a cada lavagem. Este processo deve ser executado rapidamente para evitar que o imunotubo seque.

Foram realizados três ciclos de *bio-panning* para cada biblioteca e para cada doença. No primeiro ciclo a concentração de TBST nas etapas de lavagem foi de 0,1%, pois se recomenda o uso de baixas concentrações de detergente nos ciclos iniciais quando, devido à especificidade da interação, são esperados baixos títulos de fagos na eluição dos ligantes. Contudo, nos dois ciclos seguintes a concentração de TBST nas etapas de lavagem foi de 0,5%, com o objetivo de reduzir interações hidrofóbicas inespecíficas entre os fagos e as moléculas-alvo e entre os fagos e o agente bloqueador (BSA – *Bovine Serum Albumin*, albumina de soro bovino), o que poderia resultar em um aumento de ligações de *background*.

4.1.3 Adição das bibliotecas randômicas de peptídeos

A cada ciclo de seleção o *pool* de fagos torna-se mais enriquecido para as seqüências com afinidade ao alvo. Mantendo um *input* com concentração constante (2×10^{11} fagos) pode-se obter um aumento sucessivo no número de fagos com a seqüência de interesse até um ponto em que a maioria dos clones selecionados apresenta esta seqüência. Isto ocorre, de acordo com a estringência do processo, após dois ou três ciclos do *bio-panning*. Se não surgir uma seqüência prevalente após o terceiro ciclo, podem ser realizados um quarto e quinto, porém provavelmente a seleção será de baixa afinidade.

Foi feita uma diluição de 100 vezes da representatividade da biblioteca em 1 mL de

solução TBST 0,1% (solução 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% v/v Tween 20, autoclavada). Por exemplo, deve-se adicionar 2×10^9 fagos para uma biblioteca de complexidade de 2×10^{11} .

Neste caso, as bibliotecas Ph.D. 7 (NEB *Catalog* #E8102L) e Ph.D. C7C (NEB *Catalog* #E8121L) são fornecidas com 2×10^{13} fagos/mL e foi, portanto, adicionado 10 μ L de cada a 1mL de TBST 0,1%. Já a biblioteca Ph.D. 12 (NEB *Catalog* #E8111L) é fornecida com 1×10^{13} fagos/mL e fez-se a adição de 20 μ L a 1mL de TBST 0,1%.

Os tubos foram selados com parafilm, agitados gentilmente por inversão e incubados por 1 hora a 100 rpm em temperatura ambiente (em *shaker* a 25°C). Após o período de incubação, a solução contendo a biblioteca de peptídeos foi descartada, e em seguida o imunotubo foi vertido em um papel-toalha para remoção de líquido residual.

Na seqüência o imunotubo deve ser lavado dez vezes com 4 mL de solução TBST 0,1% (solução 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% v/v Tween 20, autoclavada), vertendo o imunotubo em um papel-toalha a cada lavagem. Este processo deve ser executado rapidamente para evitar que o imunotubo seque.

Conforme explicado anteriormente, no segundo e terceiro ciclo de *bio-panning* nas etapas de lavagem foi utilizado TBST 0,5%.

A adição das bibliotecas comerciais de peptídeos randômicos é feita apenas no primeiro ciclo de *bio-panning*. No segundo e terceiro ciclo o *input* de fagos adicionados é o *output* amplificado de fagos ligantes eluídos no ciclo anterior. Neste caso, após a titulação do *output* de fagos amplificados, foi calculado o volume do mesmo a se adicionado de modo que houvesse um *input* de 2×10^{11} fagos em 1 mL de TBST 0,1%.

4.1.4 Preparo dos inóculos de amplificação e de titulação

Três etapas do processo de *bio-panning* requerem o preparo de inóculos de bactérias: a etapa de amplificação dos fagos eluídos, a etapa de titulação parcial dos fagos eluídos e a etapa de titulação final dos fagos eluídos amplificados.

A bactéria fornecida junto às bibliotecas comerciais é a *Escherichia coli* K12 ER2738

(NEB Catalog #E4104S), genótipo $F'proA^+B^+ lac^q \Delta(lacZ)M15 zzf::Tn10(Tet^R)/ fhuA2 glnV \Delta(lac-proAB) thi-1 \Delta(hsdS-mcrB)5$, uma cepa F+ robusta e particularmente adequada para a propagação de fagos M13. O fator F desta cepa possui um mini-transposon de resistência a tetraciclina, assim, as células contendo o fator F podem ser selecionadas utilizando meio com tetraciclina.

Para o preparo do inóculo para a amplificação dos fagos eluídos (*output* do ciclo) é feita a inoculação de uma colônia de *E.coli* K12 ER2738 em 20 mL de meio de cultivo LB (meio Luria Bertani, LB: 10 g/L de bacto-triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de NaCl, autoclavado) em um frasco Erlenmeyer de 250 mL. Incubar em *shaker* a 37°C e 220 rpm até a cultura atingir fase pré-logarítmica ($D.O._{600\text{ nm}} = 0,01 - 0,05$). Acompanhar crescimento medindo a D.O. em espectrofotômetro.

Para o preparo dos inóculos de titulação final e de titulação parcial foi feita a inoculação de uma colônia de *E.coli* K12 ER2738 em 10 mL de meio de cultivo LB tet (meio Luria Bertani, LB: 10 g/L de bacto-triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de NaCl, autoclavado, adicionado 20 µg/mL de tetraciclina) em um frasco Erlenmeyer de 100 mL. Incubar em *shaker* a 37°C e 220 rpm por 1,5 – 2,5 horas, até o cultivo atingir $D.O._{600\text{ nm}} = 0,5$. Acompanhar crescimento medindo a D.O. em espectrofotômetro.

4.1.5 Eluição dos fagos ligantes

Para a eluição dos fagos selecionados existe a possibilidade de utilizar uma solução de um ligante para o alvo em TBS, caracterizando uma eluição por competição, ou de modo mais inespecífico, pode ser realizada a eluição ácida dos ligantes, com subsequente neutralização da solução de fagos eluídos. No presente projeto optou-se por utilizar a eluição ácida visando evitar a manipulação de antígenos virais necessários para a eluição por competição.

Para a eluição dos fagos ligantes ao alvo foi feita a adição de 1 mL de tampão de eluição (solução 0,2 M Glicina-HCl pH 2,2, 1 mg/mL BSA) a cada imunotubo, em seguida o tubo é selado e incubado sob agitação branda e temperatura ambiente (em *shaker* a 100 rpm e 25°C) por 10 a 20 minutos. Após a incubação a solução de eluição foi neutralizada com a adição de 150 µL de solução 1 M Tris-HCl pH 9,1.

A partir da solução neutralizada de fagos eluídos, 10 µL foram reservados para titulação, 90 µL foram estocados a -20°C caso fosse necessária alguma repetição e o restante foi utilizado para amplificação do *output* a ser utilizado no ciclo seguinte (para 1º e 2º ciclos).

4.1.6 Amplificação da solução de fagos eluídos

Para que o *input* dos ciclos de *bio-panning* seja da ordem de 10^{11} fagos, é necessário que o *output* de cada ciclo seja amplificado ao término do mesmo. Cada *bio-panning* consistiu em três ciclos de seleção, no primeiro ciclo o *input* de fagos foi a própria biblioteca, no segundo ciclo foi o *output* amplificado do ciclo anterior, no terceiro ciclo foi o *output* amplificado do ciclo anterior e, como não foi feito um quarto ciclo, o *output* do terceiro ciclo não precisou ser amplificado.

Para a amplificação do *output* faz-se a infecção do inóculo de *E. coli* K12 ER 2738 em fase pré-logarítmica (20 mL de meio LB em um Erlenmeyer de 250 mL) com a solução neutralizada de fagos eluídos (aproximadamente 1 mL). Em seguida a cultura infectada é incubada sob agitação vigorosa (em *shaker* a 220 rpm) por 4,5 horas a 37°C.

4.1.7 Titulação da solução de fagos eluídos

Foram preparados em meio LB 100 µL de diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-4} da solução neutralizada de fagos eluídos não-amplificados (90 µL de LB + 10 µL de cada diluição).

Em seguida foi dispensado 3 mL de Top Agar (10 g/L de bacto-triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de NaCl, 1 g/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 7 g/L de agarose, autoclavado) fundido em microondas em quatro tubos de ensaio estéreis, por *output* de fagos. Ou seja, para o *output* do ciclo de *bio-panning* do HBV foram utilizados quatro tubos e para HCV mais quatro tubos. Cada tubo foi utilizado para plaquear uma diluição do *output*. No caso da titulação parcial, são preparadas placas para as titulações de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} .

Utilizando o inóculo de *E. coli* K12 ER2738 de 10 mL (D.O._{600 nm}=0,5), para cada

diluição a ser plaqueada, foram transferidos 200 µL do cultivo a um tubo de 1,5 mL. Em seguida foram adicionados 10 µl de cada diluição dos fagos ao seu respectivo tubo contendo o inóculo, agitado rapidamente em vortex e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos.

Após a incubação, as células infectadas foram transferidas para os tubos de ensaio contendo 3 mL de Top Agar mantidos a 45°C, agitadas rapidamente em vortex e vertidas imediatamente em placas (pré-aquecidas por no mínimo uma hora a 37°C) de LB/IPTG/Xgal (Meio LB/IPTG/Xgal: meio LB, 15 g/L ágar, 50 µg/mL IPTG, 40 µg/mL Xgal. Autoclavado e mantido na ausência de luz).

As placas, após o Top Agar contendo as bactérias infectadas solidificar, foram então invertidas e incubadas em estufa a 37°C *overnight*. A contagem das colônias azuis foi feita preferencialmente nas diluições cujas placas continham até 100 colônias. Em seguida o número de colônias foi multiplicado pelo inverso da diluição e dividido pelo volume plaqueado, de modo a fornecer o título de fagos em unidades formadoras de colônias (pfu – *plaque forming units*, unidades formadoras de placas) por mL.

4.1.8 Precipitação dos fagos amplificados

Uma vez amplificado os *outputs* de fagos eluídos, a cultura foi transferida para tubos de centrifuga e centrifugada por 10 minutos a 12.000 g e 4°C para a remoção das células bacterianas. O sobrenadante foi então transferido para um novo tubo de centrifuga contendo 1/6 do volume (aproximadamente 3,33 mL) de solução de precipitação (solução 2,5 M NaCl, 20% v/v PEG).

Os tubos foram vedados com parafilm e agitados vigorosamente por cerca de 1 minuto. Em seguida eles foram colocados em um isopor com gelo e incubados *overnight* a 4°C em câmara fria para precipitação dos fagos em suspensão.

Na seqüência os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 12.000 g e 4°C. O sobrenadante foi descartado. Novamente os tubos foram centrifugados nas mesmas condições para remoção do líquido residual com o auxílio de uma pipeta.

4.1.9 Preparo da solução final de fagos

Os *pellets* resultantes da etapa de precipitação foram ressuspensos em 1 mL de TBS (solução 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, autoclavada) e a solução foi transferida para tubos de 1,5 mL. Os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 5 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos de 1,5 mL.

Os fagos foram re-precipitados com 1/6 do volume (aproximadamente 166 µL) de solução de precipitação (solução 2,5M NaCl, 20% v/v PEG), agitados e incubados em gelo por 1 hora. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. A centrifugação foi repetida e o líquido residual foi removido com o auxílio de uma pipeta.

Os *pellets* foram ressuspensos em 200 µL de TBS + 0,2% NaN₃ para o preparo da solução final de fagos amplificados. Esta solução foi titulada para cálculo do volume a ser adicionado nos ciclos seguintes do *bio-panning*

4.1.10 Titulação da solução final de fagos

Foram preparados em meio LB 100 µL de diluições seriadas de 10⁻⁸ a 10⁻¹¹ da solução final de fagos amplificados (90 µL de LB + 10 µL de cada diluição).

Em seguida foi dispensado 3 mL de Top Agar (10 g/L de bacto-triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de NaCl, 1 g/L MgCl₂.6H₂O, 7 g/L de agarose, autoclavado) fundido em microondas em quatro tubos de ensaio estéreis, por *output* de fagos. Ou seja, para o *output* do ciclo de *bio-panning* do HBV foram utilizados quatro tubos e para HCV mais quatro tubos. Cada tubo foi utilizado para plaquear uma diluição do *output*. No caso da titulação final, são preparadas placas para as titulações de 10⁻⁸, 10⁻⁹, 10⁻¹⁰ e 10⁻¹¹.

Utilizando o inóculo de *E. coli* K12 ER2738 de 10 mL (D.O._{600 nm}=0,5), para cada diluição a ser plaqueada, foram transferidos 200 µL do cultivo a um tubo de 1,5 mL. Em seguida foram adicionados 10 µL de cada diluição dos fagos ao seu respectivo tubo contendo o inóculo, agitado rapidamente em vortex e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos.

Após a incubação, as células infectadas foram transferidas para os tubos de ensaio contendo 3 mL de Top Agar mantidos a 45°C, agitadas rapidamente em vortex e vertidas imediatamente em placas (pré-aquecidas por no mínimo uma hora a 37°C) de LB/IPTG/Xgal (Meio LB/IPTG/Xgal: meio LB, 15 g/L ágar, 50 µg/mL IPTG, 40 µg/mL Xgal. Autoclavado e mantido na ausência de luz).

As placas, após o Top Agar contendo as bactérias infectadas solidificar, foram então invertidas e incubadas em estufa a 37°C *overnight*. A contagem das colônias azuis foi feita preferencialmente nas diluições cujas placas continham até 100 colônias. Em seguida o número de colônias foi multiplicado pelo inverso da diluição e dividido pelo volume plaqueado, de modo a fornecer o título de fagos em unidades formadoras de colônias (pfu – *plaque forming units*, unidades formadoras de placas) por mL.

4.1.11 Manutenção da cepa de *Escherichia coli* K12 ER 2738

A bactéria *E. coli* K12 ER2738 (NEB Catalog # E4104S) foi fornecida em meio contendo 50% de glicerol. Seu estoque foi mantido a -70°C, sendo que a cada novo *bio-panning* foi retirada uma nova alíquota de 5 µL.

A alíquota de 5 µL foi inoculada em 100 µL de meio LB e incubado por 2 horas a 37°C, em seguida o cultivo foi plaqueado por esgotamento em placa LB tet (LB contendo 20 µg/mL de tetraciclina) e incubado *overnight* a 37°C em estufa.

A placa estoque foi utilizada para o preparo dos inóculos e mantida a 4°C no escuro, sendo descartada ao término de cada *bio-panning*.

4.1.12 Controle do experimento de *bio-panning* com alvo de estreptavidina

Com o objetivo de verificar se todas as etapas do *bio-panning* estavam sendo realizadas corretamente, foi realizado um ensaio de controle do processo. Para isto, no *bio-panning* da biblioteca Ph.D. C7C, foi realizado o 1º ciclo sensibilizando o imunotubo com 30 µg/mL de estreptavidina, o 2º ciclo com 15 µg/mL e o 3º ciclo com 7,5 µg/mL de

sensibilização, utilizando também 0,1 µg/mL de estreptavidina na solução de bloqueio para complexar qualquer biotina ou proteína biotilada presente no BSA.

Todas as etapas do *bio-panning* foram realizadas conforme descrito nas etapas anteriores, exceto a eluição, a qual foi realizada com uma solução 0,1 mM de biotina em TBS por 30 minutos.

Após a realização dos três ciclos de seleção (enriquecimento/amplificação) espera-se obter uma seqüência majoritária de peptídeos ligantes à estreptavidina que inclua o motivo His-Pro-Gln (HPQ)

4.2 SELEÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE CLONES RESULTANTES DO *BIO-PANNING*

Após o preparo da solução final de fagos do terceiro ciclo de *bio-panning* (*output* não-amplificado), foi feita a inoculação de uma colônia de *E.coli* K12 ER2738 em 10 mL de meio de cultivo LB tet em um frasco Erlenmeyer de 100 mL. O cultivo foi incubado em *shaker* a 37°C e 220 rpm *overnight*.

A partir do inóculo foi preparada uma diluição 1:100 do mesmo em meio LB. Utilizando placas com 24 poços, fez-se a transferência de 1 mL do inóculo diluído para cada poço da placa.

Utilizando a placa de titulação parcial do terceiro ciclo do *bio-panning* de melhor diluição (em média 100 colônias), com o auxílio de um palito de madeira autoclavado, foram inoculadas 10 a 24 colônias (escolhidas de locais distantes da placa para selecionar clones diferentes) nos poços contendo o inóculo. Recomenda-se realizar esta seleção com placas de titulação com até três dias e armazenadas em geladeira.

Além da seleção das colônias de cada biblioteca, nesta etapa foi também realizada a amplificação em cultivos de 1 mL dos clones do controle de *bio-panning* (estreptavidina) para seqüenciamento e de duplicadas dos *outputs* não-amplificados do primeiro, segundo e terceiro ciclo de *bio-panning* para a realização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Para os *outputs* dos ciclos foram inoculados 10 µL dos fagos eluídos não-amplificados em cada poço

de 1 mL de inóculo.

As placas foram incubadas a 37°C por 4,5-5 horas sob agitação (em *shaker* a 200 rpm). Após a amplificação dos clones, os cultivos foram transferidos para tubos de 1,5 mL e centrifugados a 14.000 rpm por 1 minuto para remoção das células bacterianas. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos de 1,5 mL e centrifugados nas mesmas condições novamente.

Fez-se a transferência de 80% da parte superior do sobrenadante final para um novo tubo de 1,5 mL, no qual os clones selecionados foram mantidos em estoque a 4°C para sua utilização nas etapas posteriores de análise.

Como foram selecionados de 10-24 clones do *output* não-amplificado do terceiro ciclo do *bio-panning* das bibliotecas Ph.D 7, Ph.D 12 e Ph.D. C7C, foram obtidos até 72 clones de potencial aplicabilidade para hepatite B e 72 para hepatite C.

4.3 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA SELEÇÃO DO *BIO-PANNING* DAS BIBLIOTECAS DE PEPTÍDEOS

4.3.1 Avaliação dos títulos de fagos presentes nos *outputs* dos ciclos de seleção

Foi realizada uma análise quantitativa do *bio-panning* das bibliotecas pela comparação do título de fagos presentes nos *outputs* dos ciclos consecutivos de seleção de modo a avaliar se houve um aumento consistente de fagos selecionados a cada ciclo, considerando também o aumento de estringência do processo com a redução da quantidade de alvo a sensibilização (20 µg/mL, 4 µg/mL e 1µg/mL) e com o aumento da concentração de detergente (0,1% no 1º ciclo e 0,5% no 2º e 3º ciclo) utilizada nas etapas de lavagem a cada ciclo .

4.3.2 Ensaio imunoenzimático dos *outputs* dos ciclos de seleção

Adicionalmente à análise do título de fagos, foi feita uma análise qualitativa dos *outputs* de fagos obtidos na seleção (*bio-panning*) através da realização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) dos mesmos frente aos anticorpos monoclonais utilizados para a seleção, de modo a verificar se houve um aumento na afinidade de ligação no decorrer dos ciclos de seleção.

Para isto, foram utilizadas placas de 96 poços da marca *Corning* com alta capacidade de ligação. As placas foram sensibilizadas com 16 µg/mL de cada *pool* de anticorpos monoclonais (4 µg/mL de cada MAB) utilizados na etapa de *bio-panning* (Tabela 2), diluídos em *Coating Buffer* (solução 0,1 M NaHCO₃, pH 8,6, autoclavada).

Os poços a serem utilizados foram sensibilizados com 100 µL da solução de sensibilização, a placa foi selada com microfilme e incubada *overnight* a 4°C (em câmara fria). A solução de sensibilização foi descartada e o líquido residual foi removido batendo a placa contra um papel-toalha.

Em seguida foram adicionados 200 µL de solução de bloqueio (solução 0,1 M NaHCO₃, pH 8,6, 5 mg/mL de BSA, filtrado em filtro 0,22 µm) a cada poço a ser utilizado, além de preencher uma placa adicional com solução de bloqueio, para ser utilizada no preparo das diluições dos *outputs* de fagos amplificados. As placas foram seladas e incubadas a 4°C (em câmara fria) por 1 – 2 horas.

A solução de bloqueio foi removida e a placa foi lavada seis vezes com solução de lavagem (solução 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5% v/v Tween 20, autoclavada), batendo a placa contra um papel-toalha entre as lavagens.

Na placa bloqueada para o preparo das diluições dos *outputs* de fagos foram preparadas diluições seriadas até 10⁻⁹ fagos/100 µL em solução de lavagem. Foram então transferidos 100 µL, em duplicata das diluição 10⁻⁹ dos *outputs* de cada um dos três ciclos de seleção. A placa foi selada e incubada a temperatura ambiente por 1 – 2 horas em agitador orbital. Em seguida a placa foi lavada seis vezes com solução de lavagem e batida contra um papel-toalha entre as lavagens.

Conforme recomendação do fabricante, foi preparada uma diluição 1:25.000 de HRP/anti-M13 conjugado monoclonal (*GE Healthcare Code 27-9421-01*) em solução de

bloqueio. Foram adicionados 200 μL da diluição do conjugado a cada poço e incubado por 1 hora a temperatura ambiente em agitador orbital.

Após lavar a placa seis vezes com solução de lavagem, batendo a mesma contra um papel-toalha entre as lavagens, foram adicionados a cada poço 100 μL de substrato peroxidase TMB (tetrametilbenzidina, fabricante *KPL, Catalog # 50-77-04*). As placas foram incubadas por 10 minutos e a reação de revelação foi interrompida com a adição de 100 μL de ácido sulfúrico 2 M. A absorbância das reações foi medida em comprimento de onda de 450 nm em leitora de placas Biotek EL 800.

4.4 PRECIPITAÇÃO E EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO DOS CLONES DE FAGOS PRÉ-SELECIONADOS

A partir dos estoques de cultivo de clones isolados de cada biblioteca, foi feita a transferência de 500 μL de cada clone para um tubo de 1,5 mL, adicionados 200 μL de solução de precipitação (solução 2,5 M NaCl, 20% v/v PEG) e homogeneizado por inversão por 30 segundos. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 15 minutos.

Os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e a centrifugação foi repetida uma vez para remoção do líquido residual com o auxílio de uma pipeta.

Os *pellets* de fagos precipitados foram ressuspensos em 100 μL de tampão iodeto (solução 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 4 M iodeto de sódio, estocado em temperatura ambiente e na ausência de luz) agitando o tubo vigorosamente.

Foram adicionados 250 μL de etanol absoluto (mantido a -20°C) e os tubos foram homogeneizados por inversão. Em seguida os tubos foram incubados por 15 minutos a temperatura ambiente (um período curto de incubação irá favorecer a precipitação do DNA fita-simples do fago, deixando a maior parte de suas proteínas em solução).

Os tubos foram centrifugados a 14.000 g por 10 minutos a 4°C, os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* foram lavados com 500 μL de etanol 70% (mantido a -20°C), lavando o material algumas vezes com a ponteira. Em seguida, os tubos foram centrifugados

novamente nas mesmas condições, o sobrenadante foi descartado e o líquido residual foi eliminado vertendo os tubos sobre um papel-toalha.

Os *pellets* de DNA foram secos em Termomixer Comfort® Eppendorf a 55°C por aproximadamente 15 minutos e ressuspensos em 30 µL de tampão TE (solução 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM Na₂EDTA pH 8,0, autoclavado).

O material genético foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000® e os tubos foram armazenados a -20°C.

4.5 ANÁLISE DOS CLONES PRÉ-SELECIONADOS

4.5.1 Seqüenciamentos dos clones de fagos pré-selecionados

O material genético extraído dos clones selecionados foi enviado para seqüenciamento pela empresa Macrogen (Coréia). O tipo de seqüenciamento utilizado foi *Single Extention* sob condições “*BigDye™ terminator*” e as reações foram purificadas usando precipitação por etanol e seqüenciadas utilizando “*Automatic Sequencer 3730xl*”.

Para o seqüenciamento foi utilizado o iniciador de seqüenciamento 96 (5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3') (Figura 23), sintetizado pelo Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP) e as seqüências foram localizadas e traduzidas utilizando o programa EditSeq (DNASTAR).

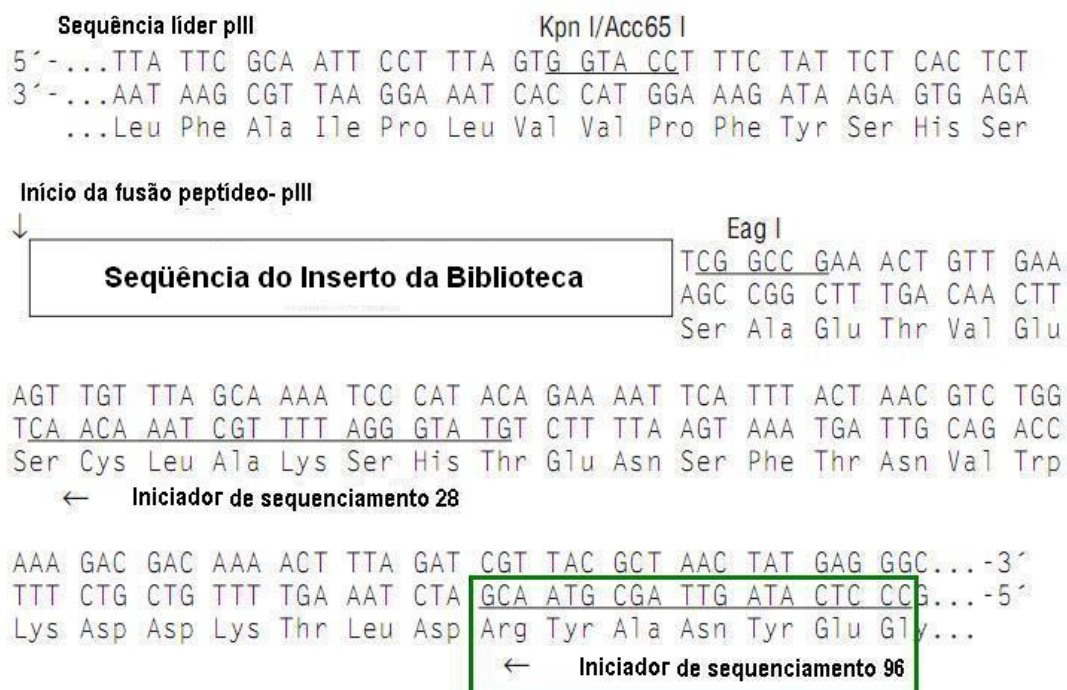


Figura 23 – Representação do local de anelamento do iniciador utilizado para o seqüenciamento dos insertos dos clones de fagos selecionados.

FONTE: Adaptado de Manual Técnico Ph.D.TM Phage Display Libraries – PROTEIN TOOLS (New England Biolabs – NEB).

4.5.2 Alinhamento das seqüências os clones de fagos pré-selecionados

Para melhor visualizar o perfil aminoacídico dos clones selecionados a partir de cada biblioteca para hepatite B e para hepatite C, foi utilizado o programa ClustalW (EMBL – EBI) (Figura 24).

As seqüências foram inseridas, para visualização, por biblioteca e por doença, totalizando seis conjuntos de peptídeos mais o conjunto formado pelos clones isolados do controle do *bio-panning* com alvo de estreptavidina.

STEP 1 - Enter your input sequences

Enter or paste a set of sequences in any supported format:

Or, upload a file:

STEP 2 - Set your Pairwise Alignment Options

Alignment Type: Slow Fast

The default settings will fulfill the needs of most users and, for that reason, are not visible.

(Click here, if you want to view or change the default settings.)

STEP 3 - Set your Multiple Sequence Alignment Options

The default settings will fulfill the needs of most users and, for that reason, are not visible.

(Click here, if you want to view or change the default settings.)

STEP 4 - Submit your job

Be notified by email *(Tick this box if you want to be notified by email when the results are available)*

Figura 24 – Interface do programa ClustalW.

FONTE: Disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

Na Tabela 3 estão listadas as abreviaturas dos aminoácidos com a indicação das cores aferidas a cada um deles pelo programa Clustal W.

Tabela 3 – Lista de abreviaturas dos aminoácidos com suas respectivas cores segundo o programa ClustalW.

Aminoácido	Símbolo		Cores (ClustalW)
Alanina	A	Ala	
Arginina	R	Arg	
Asparagina	N	Asn	
Ác. Aspártico	D	Asp	
Cisteína	C	Cys	
Glutamina	Q	Gln	
Ác. Glutâmico	E	Glu	
Glicina	G	Gly	
Histidina	H	His	
Isoleucina	I	Ile	
Leucina	L	Leu	
Lisina	K	Lys	
Metionina	M	Met	
Fenilalanina	F	Phe	
Prolina	P	Pro	
Serina	S	Ser	
Treonina	T	Thr	
Triptofano	W	Trp	
Tirosina	Y	Tyr	
Valina	V	Val	

Após a visualização em ClustalW, foi feito um alinhamento local de proteínas utilizando BLASTP 2.2.22 (ATSCHUL et al., 1997; ATSCHUL et al., 2005), no qual foram alinhadas as seqüências de todos os clones uns frente aos outros, com o objetivo de verificar

os resíduos de aminoácido majoritariamente presentes entre clones, bem como para identificar clones que tenham sido selecionados inespecificamente em todas as bibliotecas ou para ambas as doenças.

4.6 PROPAGAÇÃO DOS CLONES PRÉ-SELECIONADOS

O alinhamento das seqüências peptídicas selecionadas permitiu verificar a existência majoritária de algumas seqüências obtidas a partir de cada biblioteca para ambas as doenças.

Nesta etapa foram descartados os clones que foram selecionados inespecificamente para ambas as doenças (HBV e HCV), e foram escolhidos de três a cinco clones de maior representatividade para serem propagados e analisados por ensaio imunoenzimático (ELISA) frente aos anticorpos monoclonais utilizados para seleção no processo de *bio-panning*.

Além dos clones de maior representatividade presentes na seleção analisada, foram propagados também clones de baixa representatividade na biblioteca (discordantes das seqüências predominantes) para verificar se a presença destas seqüências aminoacídicas repetidamente presentes em diversos clones estava diretamente relacionado à afinidade ao alvo, além do *output* do terceiro ciclo de *bio-panning* de cada biblioteca, o qual foi utilizado como controle positivo por possuir o *pool* de representantes de maior afinidade, e dois clones obtidos pela técnica de *Phage Display* para seleção de alvos contra sífilis e HTLV-I utilizados como controle negativo do ensaio imunoenzimático.

Foram, portanto, propagados de sete a nove clones selecionados e *outputs* de fagos por biblioteca para cada doença, totalizando cerca de 42 propagações de fagos para a realização das etapas posteriores de seleção.

4.6.1 Propagação dos clones pré-selecionados e pools de outputs dos *bio-pannings*

Para cada clone ou *output* a ser amplificado foi inoculada uma colônia de *E. coli* K12 ER2738 em 20 mL de meio LB (meio Luria Bertani, LB: 10 g/L de bacto-triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de NaCl, autoclavado) em um frasco tipo Erlenmeyer de 250 mL. O cultivo foi incubado a 37°C e 220 rpm (em *shaker*) até a cultura atingir fase pré-logarítmica ($D.O_{600\text{ nm}} = 0,01 - 0,05$). O crescimento foi acompanhado medindo a D.O. em espectrofotômetro.

Ao atingir a densidade ótica adequada, foi adicionado 5 μL da respectiva solução final de fago amplificado (etapa descrita em 3.2) e incubado por 4,5 – 5 horas a 37°C e 220 rpm (em *shaker*).

4.6.2 Precipitação dos clones pré-selecionados e *outputs* propagados

Uma vez amplificado os *outputs* e clones de fagos eluídos, a cultura foi transferida para tubos de centrifuga e centrifugada por 10 minutos a 12.000 g e 4°C para a remoção das células bacterianas. O sobrenadante foi então transferido para um novo tubo de centrífuga contendo 1/6 do volume (aproximadamente 3,33 mL) de solução de precipitação (solução 2,5 M NaCl, 20% v/v PEG).

Os tubos foram vedados com parafilm e agitados vigorosamente por cerca de 1 minuto. Em seguida eles foram colocados em um isopor com gelo e incubados *overnight* a 4°C em câmara fria para precipitação dos fagos em suspensão.

Na seqüência os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 12.000 g e 4°C. O sobrenadante foi descartado. Novamente os tubos foram centrifugados nas mesmas condições para remoção do líquido residual com o auxílio de uma pipeta.

4.6.3 Preparo da solução final de clones pré-selecionados e *outputs* propagados

Os *pellets* resultantes da etapa de precipitação foram ressuspensos em 1 mL de TBS (solução 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, autoclavada) e a solução foi transferida para tubos de 1,5 mL. Os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 5 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos de 1,5 mL.

Os fagos foram re-precipitados com 1/6 do volume (aproximadamente 166 µL) de solução de precipitação (solução 2,5 M NaCl, 20% v/v PEG), agitados e incubados em gelo por 1 hora. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. A centrifugação foi repetida e o líquido residual foi removido com o auxílio de uma pipeta.

Os *pellets* foram ressuspensos em 50 µL de TBS para o preparo da solução final de fagos propagados a ser utilizada nos ensaios imunoenzimáticos (ELISA).

4.6.4 Titulação da solução final de clones e *outputs* propagados

Foram preparados em meio LB 100 µL de diluições seriadas de 10^{-8} a 10^{-11} da solução de fagos propagados (90 µL de LB + 10 µL de cada diluição).

Em seguida foi dispensado 3 mL de Top Agar (meio Top Agar: 10 g/L de bacto-triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de NaCl, 1 g/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 7 g/L de agarose, autoclavado) fundido em microondas em quatro tubos de ensaio estéreis, por clone ou *output* de fagos. Ou seja, foram preparados quatro tubos por clone ou *output* a ser titulado. Cada tubo foi utilizado para plaquear uma diluição do *output*. No caso da titulação final são preparadas placas para as titulações de 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} e 10^{-11} .

Utilizando o inóculo de *E. coli* K12 ER2738 de 10 mL ($D.O_{600\text{ nm}}=0,5$), para cada diluição a ser plaqueada, foram transferidos 200 µL do cultivo a um tubo de 1,5 mL. Em seguida foram adicionados 10 µL de cada diluição dos fagos ao seu respectivo tubo contendo

o inóculo, agitado rapidamente em vortex e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos.

Após a incubação, as células infectadas foram transferidas para os tubos de ensaio contendo 3 mL de Top Agar mantidos a 45°C, agitadas rapidamente em vortex e vertidas imediatamente em placas (pré-aquecidas por no mínimo uma hora a 37°C) de LB/IPTG/Xgal (Meio LB/IPTG/Xgal: meio LB, 15 g/L ágar, 50 µg/mL IPTG, 40 µg/mL Xgal. Autoclavado e mantido na ausência de luz).

As placas, após o Top Agar contendo as bactérias infectadas solidificar, foram então invertidas e incubadas em estufa a 37°C *overnight*. A contagem das colônias azuis foi feita preferencialmente nas diluições cujas placas continham até 100 colônias. Em seguida o número de colônias foi multiplicado pelo inverso da diluição e dividido pelo volume plaqueado, de modo a fornecer o título de fagos em unidades formadoras de colônias (pfu – *plaque forming units*, unidades formadoras de placas) por mL.

4.7 AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE E AFINIDADE DOS CLONES PRÉ-SELECIONADOS

4.7.1 Avaliação da especificidade dos clones pré- selecionados frente aos bancos de dados de proteínas

A especificidade dos clones aos alvos utilizados para a seleção foi avaliada através de ferramenta de busca de alinhamentos locais de proteínas (BLASTP – *Basic Local Alignment Search Tool for Proteins*). Isto foi realizado utilizando os bancos de dados disponíveis de seqüências não-redundantes de proteínas (nr: *non-redundant protein sequences*) para os vírus da hepatite B e da hepatite C frente às seqüências dos clones selecionados (Figura 25).

Set	Set
Non-redundant protein sequences (nr)	Non-redundant protein sequences (nr)
hepatitis B-type viruses (taxid:10404)	Hepatitis C virus (taxid:11103)
mammalian hepatitis B-type viruses (taxid:10405)	Hepatitis C virus genotype 1 (taxid:41856)
Hepatitis B virus (taxid:10407)	Hepatitis C virus subtype 1b (taxid:31647)
HBV (taxid:10407)	Hepatitis C virus subtype 1a (taxid:31646)
HBV genotype C (taxid:489466)	Hepatitis C virus genotype 3 (taxid:356114)
HBV genotype A (taxid:489455)	Hepatitis C virus subtype 3a (taxid:356426)
HBV genotype H (taxid:489493)	Hepatitis C virus genotype 2 (taxid:40271)
HBV genotype B (taxid:489460)	Hepatitis C virus genotype 6 (taxid:42182)
HBV genotype D (taxid:489483)	Hepatitis C virus genotype 5 (taxid:33746)
HBV genotype E (taxid:489484)	Hepatitis C virus subtype 5a (taxid:31654)
Non-human HBV (taxid:489494)	Hepatitis C virus genotype 4 (taxid:33745)
HBV genotype G (taxid:489492)	Hepatitis C virus subtype 2b (taxid:31650)
HBV genotype F (taxid:489491)	HCV (taxid:11103)
HBV genotype A2 (taxid:489451)	Recombinant HCV viruses (taxid:578319)
HBV genotype A3 (taxid:489452)	HCV-H (taxid:11108)
HBV genotype A1 (taxid:489450)	HCV-Hun (taxid:36390)
Leontodon sp. HBV s.n. (taxid:379647)	Hepatitis C virus (isolate HCV-K3a/650) (taxid:356416)
	Hepatitis C virus (isolate HCV-476) (taxid:31643)
	Hepatitis C virus (isolate HCV-KF) (taxid:31644)

Figura 25 – Conjunto de bancos de dados de seqüências não-redundantes de proteínas (a: hepatite B, b: hepatite C) utilizados para o BLASTP dos clones selecionados versus as proteínas dos alvos de seleção.

Como os peptídeos pré-selecionados para as três bibliotecas possuíam seqüências muito curtas para alinhamento (entre sete e doze resíduos de aminoácidos), os parâmetros do BLASTP foram ajustados para adequar o alinhamento habilitando a opção de ajustar automaticamente para seqüências curtas (aumenta o *threshold* e reduz o número de resíduos necessários para iniciar um alinhamento). Além disto, devido à grande quantidade de peptídeos a serem avaliados, optou-se por exibir apenas 50 resultados de alinhamento para cada peptídeo pré-selecionado.

4.7.2 Avaliação da afinidade dos clones selecionados frente aos anticorpos monoclonais utilizados no *bio-panning*

Primeiramente foi realizado um ensaio imunoenzimático (ELISA) dos clones selecionados por biblioteca e doença. Para isto foram selecionados de três a seis representantes de maior representatividade, de um a dois clones de baixa frequência, todos propagados em cultivos de 20 mL, com o objetivo de verificar se a presença de uma seqüência de resíduos de frequência majoritária estava diretamente relacionada à afinidade ao alvo (Figura 26).

Neste ELISA foi utilizado o *output* do terceiro ciclo de *bio-panning* de cada biblioteca como controle positivo (por possuir o *pool* de representantes de maior afinidade), dois clones obtidos pela técnica de *Phage Display* para seleção de alvos contra sífilis e HTLV-I e um clone de HBV ou de HCV (doença oposta à seleção) foram utilizados como controle negativo do ensaio imunoenzimático.

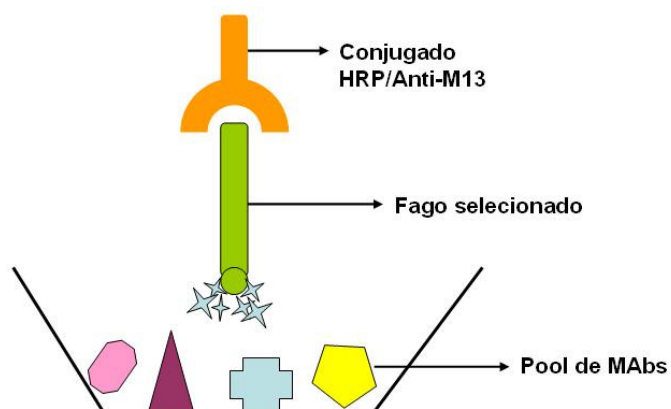


Figura 26 – Representação esquemática do ensaio imunoenzimático dos clones selecionados frente ao *pool* de anticorpos monoclonais (MABs) utilizados para seleção no *bio-panning*.

FONTE: A autora (2011).

Os clones que apresentaram melhor afinidade ao alvo no primeiro ELISA foram então submetidos a um segundo ensaio imunoenzimático (ELISA de abertura de *pools*), no qual eles foram testados frente a cada anticorpo monoclonal separadamente, com o objetivo de detectar se a afinidade estava relacionada a algum alvo do *pool* em específico (Figura 27).

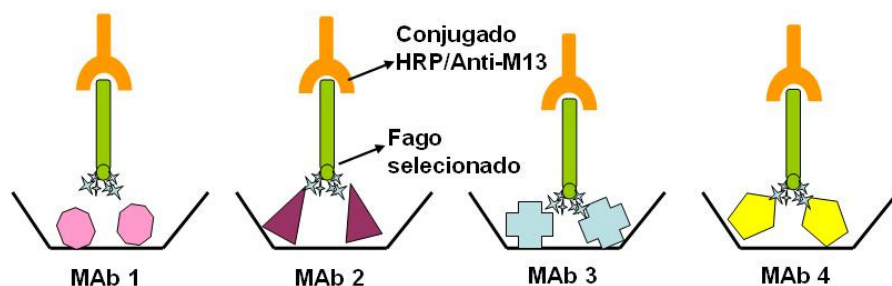


Figura 27 – Representação esquemática do ensaio imunoenzimático de abertura de *pool* para avaliação dos anticorpos monoclonais (MAbs) sobre a seleção dos fagos.

FONTE: A autora (2011).

Foram utilizadas placas de 96 poços da marca *Corning* com alta capacidade de ligação. No ELISA dos clones selecionados os poços foram sensibilizados com 16 $\mu\text{g/mL}$ de cada *pool* de anticorpos monoclonais (4 $\mu\text{g/mL}$ de cada MAb) utilizados na etapa de *bio-panning* (Tabela 2), diluídos em *Coating Buffer* (solução 0,1 M NaHCO_3 , pH 8,6, autoclavada), enquanto que no ELISA de abertura dos *pools* os poços foram sensibilizados com 16 $\mu\text{g/mL}$ de cada MAb separadamente diluídos em *Coating Buffer*.

Os poços a serem utilizados foram sensibilizados com 100 μL da solução de sensibilização, a placa foi selada com microfilme e incubada *overnight* a 4°C (em câmara fria). A solução de sensibilização foi descartada e o líquido residual foi removido batendo a placa contra um papel-toalha.

Em seguida foram adicionados 200 μL de solução de bloqueio (solução 0,1 M NaHCO_3 , pH 8,6, 5 mg/mL de BSA, filtrado em filtro 0,22 μm) a cada poço a ser utilizado, além de preencher uma placa adicional com solução de bloqueio, para ser utilizada no preparo das diluições dos fagos a serem testados. As placas foram seladas e incubadas a 4°C (em câmara fria) por 1 – 2 horas.

A solução de bloqueio foi removida e a placa foi lavada seis vezes com solução de lavagem (solução 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5% v/v Tween 20, autoclavada), batendo a placa contra um papel-toalha entre as lavagens.

Na placa bloqueada para o preparo das diluições dos fagos foram preparadas diluições seriadas até 10^{-10} fagos/100 μL em solução de lavagem. Foram então transferidos 100 μL , das diluições 10^{-10} e 10^{-9} dos fagos selecionados. A placa foi selada e incubada a

temperatura ambiente por 1 – 2 horas em agitador orbital. Em seguida a placa foi lavada seis vezes com solução de lavagem, batendo a placa contra um papel-toalha entre as lavagens.

Conforme recomendação do fabricante, foi preparada uma diluição 1:25.000 de HRP/anti-M13 conjugado monoclonal (*GE Healthcare Code 27-9421-01*) em solução de bloqueio. Foram adicionados 200 µL da diluição do conjugado a cada poço e incubado por 1 hora a temperatura ambiente em agitador orbital.

Após lavar a placa seis vezes com solução de lavagem, batendo a placa contra um papel-toalha entre as lavagens, foram adicionados a cada poço 100 µL de substrato peroxidase TMB (tetrametilbenzidina, fabricante *KPL, Catalog # 50-77-04*). As placas foram incubadas por 10 minutos e a reação de revelação foi interrompida com a adição de 100 µL de ácido sulfúrico 2 M. A absorbância das reações foi medida em leitora de placas Biotek EL 800.

4.8 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DOS PEPTÍDEOS SELECIONADOS DE POTENCIAL APLICABILIDADE PARA O IMUNODIAGNÓSTICO EM ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO FRENTE A AMOSTRAS DE SOROS DE PACIENTES

Uma vez obtidos os peptídeos de potencial aplicabilidade, foi escolhido o peptídeo 23C_12 selecionado para hepatite C a partir da biblioteca Ph.D. 12, o qual obteve desempenho satisfatório nos ensaios imunoenzimáticos anteriores, para a realização de um ELISA frente a três *pools* de amostras de pacientes positivas e três *pools* de amostras de pacientes negativas para HCV.

Neste ensaio, foi utilizada como controle positivo uma solução do *pool* dos anticorpos monoclonais para hepatite C, contendo 5 µg/mL de cada MAb, preparada em TBST 0,5%.

Foram testadas diluições 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 e 1:3200 de cada *pool* de amostras de pacientes preparadas em TBST 0,5%. Para cada diluição a ser testada foi sensibilizado um poço com 100 µL de *Coating Buffer* contendo 1×10^{10} fagos e as placas foram seladas com microfilme e incubadas *overnight* a 4°C (em câmara fria).

A solução de sensibilização foi descartada e o líquido residual foi removido batendo a

placa contra um papel-toalha. Em seguida foram adicionados 200 µL de solução de bloqueio (solução 0,1 M NaHCO₃, pH 8,6, 5 mg/mL de BSA, filtrado em filtro 0,22 µm) a cada poço a ser utilizado. As placas foram seladas e incubadas a 4°C (em câmara fria) por 1 – 2 horas.

A solução de bloqueio foi removida e a placa foi lavada seis vezes com solução de lavagem (solução 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5% v/v Tween 20, autoclavada), batendo a placa contra um papel-toalha entre as lavagens.

Após preparar as diluições dos *pools* de amostras, foram então transferidos 100 µL das mesmas para cada poço sensibilizado e 100 µL da solução do controle positivo (um controle positivo por *pool* de amostra testado). As placas foram seladas e incubadas a temperatura ambiente por 1 – 2 horas em agitador orbital. Em seguida as placas foram lavadas seis vezes com solução de lavagem, batendo as placas contra um papel-toalha entre as lavagens.

Conforme recomendação do fabricante, foram preparadas diluições 1:25.000 de anti-human IgG-peroxidase em solução de bloqueio (para as amostras de soro) e 1:25.000 anti-mouse IgG-peroxidase em solução de bloqueio (para o controle positivo realizado com MAb's produzidos em camundongos). Foram adicionados 200 µL da diluição do conjugado a seu respectivo poço, as placas foram seladas e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente em agitador orbital.

Após lavar as placas seis vezes com solução de lavagem, batendo as placas contra um papel-toalha entre as lavagens, foram adicionados a cada poço 100 µL de substrato peroxidase TMB (tetrametilbenzidina, fabricante *KPL, Catalog # 50-77-04*). As placas foram incubadas por 10 minutos e a reação de revelação foi interrompida com a adição de 100 µL de ácido sulfúrico 2 M. A absorbância das reações foi medida em leitora de placas Biotek EL 800.

4.9 TRANSFERÊNCIA DOS PEPTÍDEOS COM POTENCIAL APLICABILIDADE PARA O VETOR PMAL-PIII

Com base nos resultados preliminares obtidos pelo teste de *pools* de soros de pacientes, foi analisada a necessidade de obter estes peptídeos em um meio onde não

houvesse a interferência de todos os artefatos relacionados à presença do fago.

Além disto, apesar de os estoques amplificados de fagos poderem ser armazenados a 4°C por diversas semanas, caso os clones selecionados sejam estocados por maiores períodos de tempo, ocorrerão reduções nos títulos de fagos, os quais terão que ser novamente amplificados e titulados para sua utilização em ensaios.

Assim, para a futura realização de mais estudos sobre ligação/inibição das seqüências selecionadas, como uma alternativa à síntese química, é possível realizar a expressão das mesmas como fusões solúveis monovalentes à Proteína de Ligação à Maltose (MBP – *Maltose Binding Protein*) através do vetor pMAL-pIII.

Este vetor foi desenhado para a rápida subclonagem das seqüências selecionadas a partir de bibliotecas construídas em sistema utilizando fago M13KE. As mesmas enzimas utilizadas para a clonagem dos insertos da biblioteca (Acc65I e EagI) são utilizadas para transferir a seqüência do fago M13KE para o pMAL-pIII.

Como o sítio de restrição da enzima Acc65I está presente na seqüência promotora da proteína pIII do M13KE, o fragmento de inserto transferido possui uma porção desta seqüência promotora. Quando subclonadas em pMAL-pIII, a seqüência líder completa é regenerada, resultando na secreção da fusão peptídeo-MBP no periplasma, com remoção concomitante da seqüência promotora da proteína pIII (Figura 28). A extremidade N-terminal da fusão é, portanto, idêntica à fusão peptídeo-pIII expressa a partir do M13KE, duplicando precisamente o contexto do peptídeo apresentado na biblioteca, porém fusionados como proteína solúvel e monovalente.

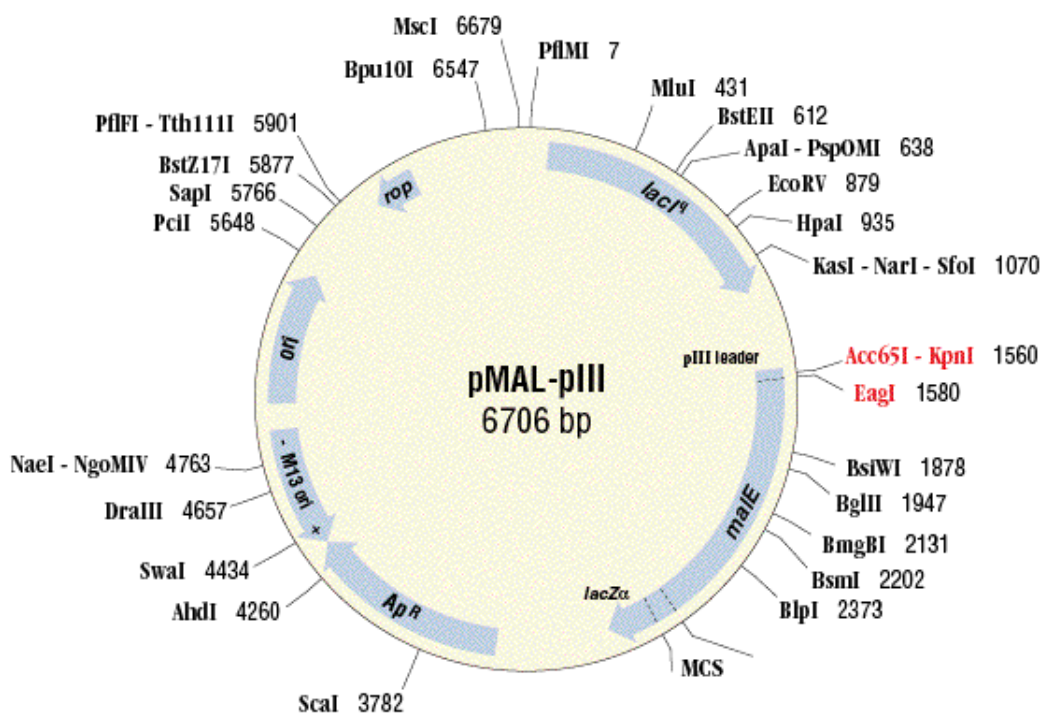


Figura 28 – Mapa do vetor pMAL-pIII utilizado para a subclonagem dos peptídeos selecionados.

FONTE: Disponível em <http://www.neb.com/nebecomm/products/productN8101.asp>.

4.9.1 Amplificação das seqüências a serem transferidas para o vetor pMAL-pIII

A amplificação do material genético dos clones selecionados foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) a partir de 20 ng do DNA extraído anteriormente para seqüenciamento (item 3.4) utilizando os iniciadores descritos na Tabela 4.

Em um tubo de 200 μ L foram adicionados: 5 μ L tampão 10X, 1 μ L de dNTP 10 mM, 2 μ L de $MgSO_4$ 50 mM, 0,2 μ L de platinum Taq DNA polimerase *high-fidelity*, 1 μ L do iniciador 96 gIII 10 μ M, 1 μ L do iniciador M1KE *extension* 10 μ M, 20 ng de DNA *template* e água ultrapura até completar o volume de 50 μ L. Em seguida os tubos foram acondicionados em termociclador Biocycler e o programa da Tabela 5 foi executado.

Tabela 4 – Seqüências dos *iniciadores* utilizados para a amplificação dos insertos.

Iniciadores	Seqüência
96 gIII	5´- CCCTCATAGTTAGCGTAACG –3´
M13KE <i>extension</i>	5´- CATGCCCGGGTACCTTTCTATTCTC – 3´

Tabela 5 – Programa de PCR utilizado para a amplificação das seqüências a serem subclonadas no vetor pMAL-pIII.

Etapa	Temperatura	Tempo	Nº. de Ciclos
Desnaturação	94°C	2 min	1
Desnaturação	94°C	30 seg	35
Anelamento	50°C	30 seg	
Extensão	68°C	30 seg	
Finalização	68°C	10 min	1
Finalização	4°C	10 min	1

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit comercial *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche). Os amplicons obtidos continham entre 162-177 pares de bases, de acordo com o tamanho do peptídeo contido no inserto (7 a 12 resíduos de aminoácidos).

4.9.2 Digestão dos produtos de PCR

A digestão dos produtos de PCR purificados foi realizada em um volume final de reação de 50 µL, utilizando as enzimas Acc65I (NEB Catalog #R0599S) e EagI (NEB Catalog #R0505M) (Figura 29).

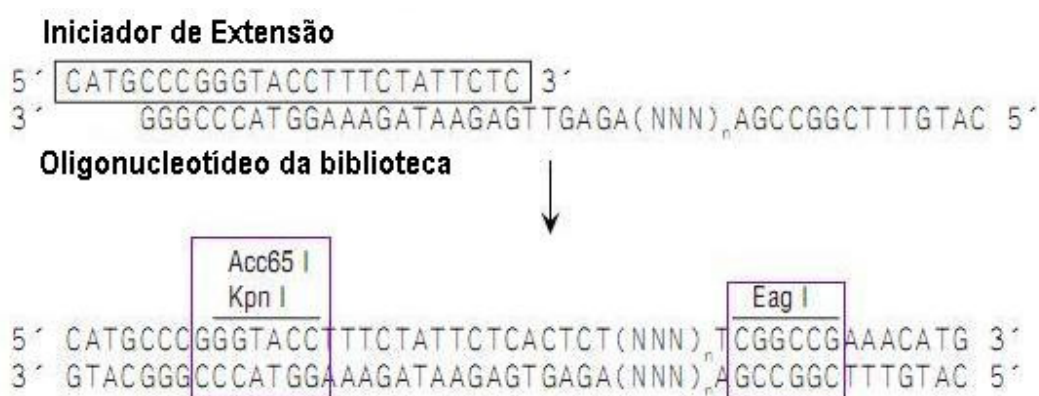


Figura 29 – Localização dos sítios de restrição dos produtos de PCR purificados.

FONTE: Adaptado de Manual Técnico Ph.D.TM Phage Display Libraries – PROTEIN TOOLS (New England Biolabs – NEB).

Em um tubo de 1,5 mL foram adicionados 4 μ L de 10X NEBuffer 3 (NEB Catalog #B7003S), 0,4 μ L de EagI (50.000 U/mL), 2 μ L de Acc65I (10.000 U/mL), 0,5 μ L de BSA (10 mg/mL). O volume da reação foi completado para 50 μ L adicionando 43,1 μ L do produto de PCR purificado.

A reação foi incubada a 37°C por 4 horas em Termomixer Comfort Eppendorf e interrompida por incubação a 65°C por 10 minutos.

4.9.3 Purificação dos produtos de PCR digeridos

Os produtos de PCR digeridos foram purificados em gel 8% de poliacrilamida não-desnaturante, pois após a ação das enzimas de restrição, o produto de PCR foi clivado em três fragmentos de aproximadamente 12 pb, de 48 a 63 pb e de 102 pb.

Primeiramente foi preparado um gel 8% de poliacrilamida contendo 2,36 mL de acrilamida (33/0,9%), 1 mL de TBE 10X (solução Tris-base 890 mM, ácido bórico 890 mM, EDTA 2 mM), 70 μ L de APS 10% (solução de persulfato de amônio 10%), 7 μ L de TEMED (tetrametiletilenodiamina) e 6,56 mL de água ultrapura.

No gel foi aplicado todo o volume de produto de PCR digerido. Após a eletroforese a banda contendo o DNA com a seqüência desejada (aproximadamente 50 pb) foi excisada com auxílio de um bisturi (as bandas não foram submetidas à luz UV para não comprometer a eficiência de ligação) e transferida para um tubo de 1,5 mL.

Com o auxílio de uma ponteira de 1 mL com a extremidade derretida, as bandas excisadas foram maceradas. Fez-se a adição de 1 mL de solução *Crush and Soak* (solução NH₄OAc 500 mM, SDS 0,1%, EDTA 0,1 mM) (SAMBROOK & RUSSEL, 2006) e os tubos foram incubados *overnight* a 37°C.

Os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C e foram transferidos aproximadamente 400 µL do sobrenadante para um novo tubo. Foram adicionados mais 350 µL da solução *Crush and Soak* ao tubo contendo a banda, ele foi agitado em vortex e a centrifugação foi repetida. Foram coletados mais 200 µL e transferidos para o novo tubo.

Em seguida, foram adicionados 100 µL de NaOAc 3 M e incuba-se por, no mínimo, 30 minutos a 4°C. Após a incubação os tubos foram centrifugados a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, foram adicionados 300 µL de etanol absoluto (mantido a -20°C), homogeneizado e incubado a 4°C por 20 minutos.

O tubo foi centrifugado a 14.000 rpm por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi lavado com 300 µL de etanol 70% (mantido a -20°C) e foi repetida a etapa de centrifugação. O *pellet* foi seco a 37°C em Termomixer Comfort Eppendorf e ressuspenso em 20 µL de TE (solução 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM Na₂EDTA pH 8,0, autoclavado).

O material genético foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 e os tubos foram armazenados a -20°C.

4.9.4 Preparo do vetor pMAL-pIII (digestão e purificação)

O vetor pMAL-pIII (NEB Catalog #N8101S) foi submetido à digestão com as mesmas enzimas e nas mesmas condições que os amplicons das seqüências a serem subclonadas. Para isto foi utilizado 1 µg de vetor e o volume da reação de digestão foi completado para 50

μL com água ultrapura.

O vetor digerido foi purificado a partir de um gel de agarose 1%. Após a eletroforese, a banda do vetor foi excisada e colocada dentro de uma ponteira de 1000 μL (contendo filtro que foi previamente lavado duas vezes com 500 μL de água ultrapura, por centrifugação) encaixado em um tubo de 1,5 mL.

As ponteiras encaixadas nos tubos foram centrifugadas a 6.000 rpm por 5 minutos. Esta centrifugação foi repetida mudando o sentido do tubo até que a maior parte do gel fosse depositada no fundo do tubo de 1,5 mL, em seguida, os filtros foram descartados e o volume de gel filtrado foi medido.

Fez-se a adição de cerca de 10% em volume de solução 3 M de acetato de sódio. Os líquidos foram homogeneizados por inversão, foram adicionados 3 volumes de etanol absoluto (mantido a -20°C) e novamente invertidos. Procedeu-se incubação em gelo por 30 minutos.

As soluções foram centrifugadas por 15 minutos a 4°C e 14.000 rpm. Após descartar o sobrenadante, foi adicionado 1 mL de etanol 70% (mantido a -20°C) e a centrifugação foi repetida. O sobrenadante foi descartado e o líquido residual foi seco vertendo cuidadosamente o tubo sobre um papel-toalha.

O *pellet* foi seco em Termomixer Comfort Eppendorf a 37°C e ressuspendido em 20 μL de TE (solução 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM Na_2EDTA pH 8,0, autoclavado).

O vetor digerido purificado foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 e os tubos foram armazenados a -20°C .

4.9.5 Reação de ligação

As reações de ligação foram realizadas em tubos de 1,5 mL segundo recomendações do fabricante da T4 DNA Ligase (Invitrogen). Para isto foram adicionados 4 μL de tampão ligase 5X, 1 μL de T4 DNA ligase e uma proporção 1:10 fmol de vetor:inserto, completando o volume final de reação para 20 μL com água ultrapura.

Os tubos foram incubados *overnight* a 16°C e mantidos a 4°C até sua utilização.

4.9.6 Reação de transformação

Para a transformação foram preparadas células de *E. coli* K12 ER2738 eletrocompetentes. Para o preparo destas células, foi feita a inoculação de 6 litros de meio LB com 10 mL por litro de uma cultura *overnight* da bactéria incubada a 37°C sob agitação. O meio foi incubado a 37°C com agitação vigorosa (250 rpm) até atingir $D.O_{600nm} = 0,5 - 1,0$.

Os frascos foram incubados em gelo por 30 minutos e as células foram coletadas por centrifugação a 5.000 g por 15 minutos a 4°C. Após descartar o sobrenadante, o *pellet* foi ressuspenso em 1 litro de água milli-Q (mantida refrigerada), repetiu-se a etapa de centrifugação e o sobrenadante foi descartado.

Cada *pellet* foi ressuspenso em 500 mL de água milli-Q refrigerada, transferidos para um mesmo frasco e centrifugados como anteriormente. Novamente o sobrenadante foi descartado e os *pellets*, ressuspenso em 120 mL de solução autoclavada 10% glicerol em água (refrigerada), transferidos para um mesmo tubo e centrifugados por 8.000 g a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado o máximo possível sem que houvesse perturbação do *pellet*, o qual foi ressuspenso em 12 mL da solução 10% glicerol (refrigerada).

O *pellet* ressuspenso foi alíquotado em 100 µL e imediatamente congelado em banho de gelo seco e etanol. As alíquotas foram mantidas a -80°C.

Para iniciar a transformação, foram deixadas em gelo cubetas de eletroporação e tubos de centrífuga de 1,5 mL. As reações de ligação foram descongeladas e foram adicionados 2 µL de cada no fundo de um tubo de 1,5 mL reservado em gelo.

Após retirar as alíquotas de células de *E. coli* K12 ER2738 eletrocompetentes a serem utilizadas do freezer -80°C, as mesmas foram rapidamente transferidas para gelo e 50 µL foram adicionados à cubeta contendo a reação de ligação, tão logo as células descongelaram. As cubetas foram posicionadas no eletroporador Gene Pulser II Biorad, no qual foi dado um pulso de 25 µF, 200 Ω e 2,5 kV.

Dado o pulso as cubetas foram imediatamente colocadas em gelo e receberam 1 mL de meio SOC (meio SOC: bactotripton 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 5M 2 ml/L, KCl 0,5 M 5 ml/L, MgCl₂ 1M 10 ml/L, MgSO₄ 10 ml/L, glicose 1M 10 ml/L). O conteúdo final da

cubeta foi transferido para um tubo de 15 mL e a cubeta foi lavada com mais 2 mL de meio SOC para recolher o máximo possível de células.

Os tubos de 15 mL foram incubados em *shaker* por 1 hora a 37°C e 220 rpm. Em seguida foram adicionados 7 mL de meio LB. A partir deste cultivo final, foram transferidos 120 µL para um tubo de 1,5 mL (diluição 10⁰) e foram preparadas diluições 10⁻¹ e 10⁻². Todas as diluições foram plaqueadas por esgotamento em placa LB amp (meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina). As placas foram invertidas e incubadas *overnight* em estufa a 37°C.

4.9.7 Seleção por PCR de colônia

Para a rápida triagem dos clones obtidos em cada placa resultante da transformação, foi realizada uma PCR dos clones isolados.

Primeiramente foi feita uma *master plate* em placas LB amp com a seleção de clones obtidos nas placas de transformação de melhor diluição (foram selecionadas placas que continham em média 50 colônias). Para isto os clones foram selecionados por *toothpick*, que consiste em, utilizando um palito de madeira estéril, transferir colônias selecionadas da placa das diluições da transformação para uma *master plate*. Estas placas foram invertidas e incubadas *overnight* a 37°C. Foi preparada uma *master plate* contendo 10 colônias para cada inserto de peptídeo subclonado.

A partir das *master plates* dos peptídeos subclonados em vetor pMAL-pIII, para verificar se havia presença de inserto, foi realizada uma reação de PCR com o material genético de duas colônias de cada *master plate* de peptídeos.

Para realização da PCR de colônia foram desenhados dois iniciadores (Tabela 6) que anelam em regiões do vetor pMAL-pIII. O primeiro anela cerca de 100 pb à montante do local de clonagem do inserto e outro cerca de 100 pb à jusante do mesmo local.

Tabela 6 – Seqüências dos *iniciadores* desenhados para a avaliação dos clones por PCR de colônia.

Iniciadores	Seqüência
pMAL-pIII FWR	5'- TGTGTGGAATTGTGAGCGGATAAC -3'
pMAL-pIII RVS	5'- TGTGCCCAGAAGATAATGTCAGG -3'

Estes iniciadores foram desenhados utilizando o programa PrimerSelect (DNASTAR) com base na seqüência do genoma do vetor pMAL-pIII. Os iniciadores utilizados foram sintetizados pelo Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP).

Para a PCR de colônia, com o auxílio de um palito de madeira estéril, cada colônia foi transferida para um tubo de 200 µL e em seguida foram adicionados por tubo: 1,5 µL tampão 10X, 1,5 µL de dNTP 2,5 mM, 0,45 µL de MgCl₂ 50 mM, 0,3 µL de Taq DNA polimerase, 0,3 µL do iniciador pMAL-pIII FWR 10 µM, 0,3 µL do iniciador pMAL-pIII RVS 10 µM e 10,65 µL de água ultrapura (volume final de 15 µL). Em seguida os tubos foram acondicionados em termociclador Biocycler e o programa da Tabela 7 foi executado.

Tabela 7 – Programa de PCR utilizado para a amplificação do DNA das colônias de bactérias transformadas e selecionadas por *toothpick*.

Etapa	Temperatura	Tempo	Nº. de Ciclos
Desnaturação	94°C	2 min	1
Desnaturação	94°C	30 seg	35
Anelamento	50°C	30 seg	
Extensão	72°C	30 seg	
Finalização	72°C	10 min	1
Finalização	4°C	10 min	1

Os produtos de PCR foram analisados em gel 8% de poliacrilamida não-desnaturante, utilizando como controle o produto de PCR de colônias da transformação de bactérias com o vetor pMAL-pIII sem inserto.

4.9.8 Seqüenciamento das colônias selecionadas

As colônias que apresentaram o inserto por análise em gel 8% de poliacrilamida foram enviadas para seqüenciamento para confirmar a presença e seqüência do inserto.

As colônias selecionadas após a PCR foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio LB amp (LB contendo 100 µg/mL de ampicilina) e incubadas *overnight* a 37°C e 220 rpm (em *shaker*). Após a incubação o cultivo foi transferido para um tubo de 1,5 mL, centrifugado 2 minutos a 14.000 rpm para precipitação das células e descartado o sobrenadante. Este processo foi feito repetidamente utilizando apenas um tubo de 1,5 mL por cultivo, de modo a concentrar todas as células em apenas um tubo.

A partir das células precipitadas foi utilizado o kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) para a extração e purificação dos plasmídeos. O material genético extraído foi enviado para seqüenciamento pela empresa Macrogen (Coréia). O tipo de seqüenciamento utilizado foi *Single Extention* sob condições "*BigDye™ terminator*" e as reações foram purificadas usando precipitação por etanol e seqüenciadas utilizando "*Automatic Sequencer 3730xl*".

Para o seqüenciamento foi utilizado o iniciador pMAL-pIII FWR, sintetizado pelo Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP) e as seqüências foram localizadas e traduzidas utilizando o programa EditSeq (DNASTAR).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA SELEÇÃO

A avaliação da eficiência de seleção dos ciclos de *bio-panning* foi composta por duas análises.

A primeira foi uma análise quantitativa do título de fagos presentes no *output* de cada ciclo de *bio-panning*. Esta análise permitiu avaliar se, mesmo aumentando a estringência do processo através da redução da quantidade de alvo nas etapas de sensibilização (20 µg/mL, 4 µg/mL e 2 µg/mL do *pool* de MAbs, ou seja, 5 µg/mL, 1 µg/mL e 0,5 µg/mL de cada MAb) e elevando a concentração de detergente (0,1% no 1º ciclo e 0,5% no 2º e 3º ciclo) a cada ciclo, para um mesmo *input* de fagos a cada etapa (2×10^{11} fagos), a quantidade de fagos ligantes aumentava a cada ciclo, indicando o enriquecimento da seleção para um alvo.

A segunda análise, qualitativa, consistiu na comparação dos sinais obtidos através de ensaio imunoenzimático (ELISA) dos *pools* de fagos presentes nos *outputs* de cada ciclo de *bio-panning* frente aos anticorpos monoclonais utilizados para a seleção dos mesmos, o que permitiu avaliar se o *pool* de fagos obtidos a cada etapa era enriquecido com um ligante de maior afinidade ao alvo.

Para a realização do ensaio imunoenzimático foi inicialmente feito um teste da melhor diluição de fagos a ser adicionada para leitura da absorbância. Este teste foi feito com o *output* de HBV para a biblioteca Ph.D. 12 e foram adicionadas as diluições 1×10^{10} (1EXP10), 1×10^9 (1EXP09), 1×10^8 (1EXP08), 1×10^7 (1EXP07) e 1×10^6 (1EXP06) de fagos (Figura 30).

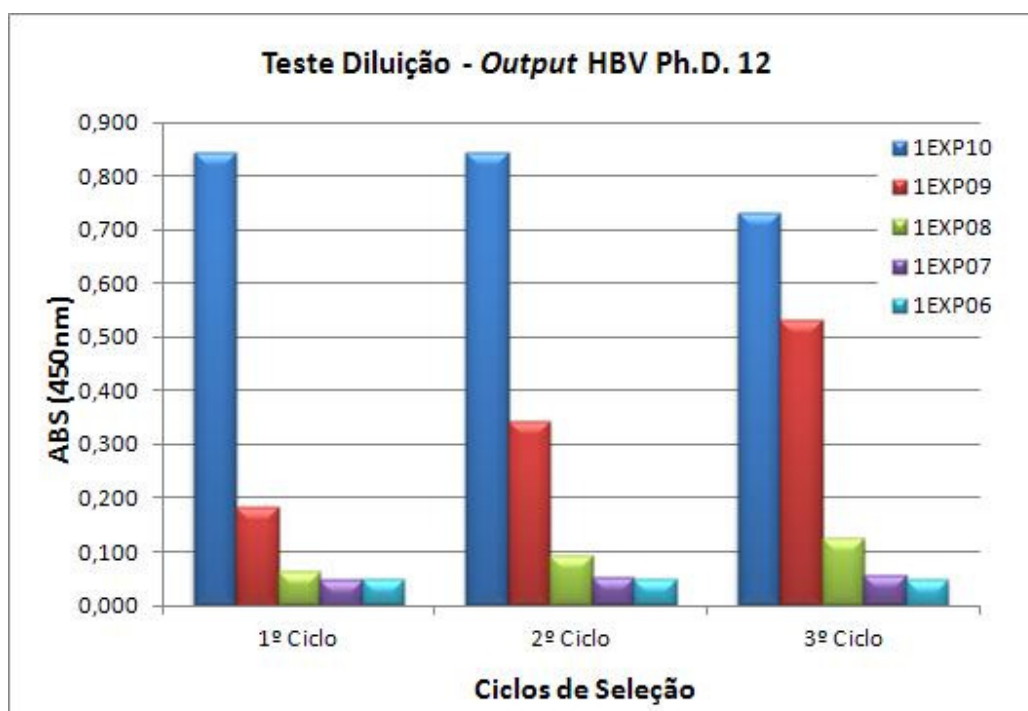


Figura 30 – Resultado do teste da diluição de fagos a ser utilizada nos ensaios imunoenzimáticos de *outputs* e clones individuais.

Com base no resultado apresentado na Figura 30, optou-se por utilizar a diluição de 1×10^9 fagos, por apresentar um sinal satisfatório em leitura a 450 nm e apresentar reprodutibilidade na leitura das diluições, perceptível também na diluição 1×10^8 , porém esta apresenta sinal muito baixo a 450 nm.

5.1.1 *Bio-panning* para moléculas-alvo de hepatite B

Os resultados da avaliação dos títulos de fagos obtidos a cada ciclo de seleção e da afinidade ao alvo (ensaio imunoenzimático) para as bibliotecas Ph.D. 12, Ph.D 7 e Ph.D. C7C utilizando MAb (anticorpos monoclonais - *Monoclonal Antibodies*) para o vírus da hepatite B estão representados na Figura 31 a seguir.

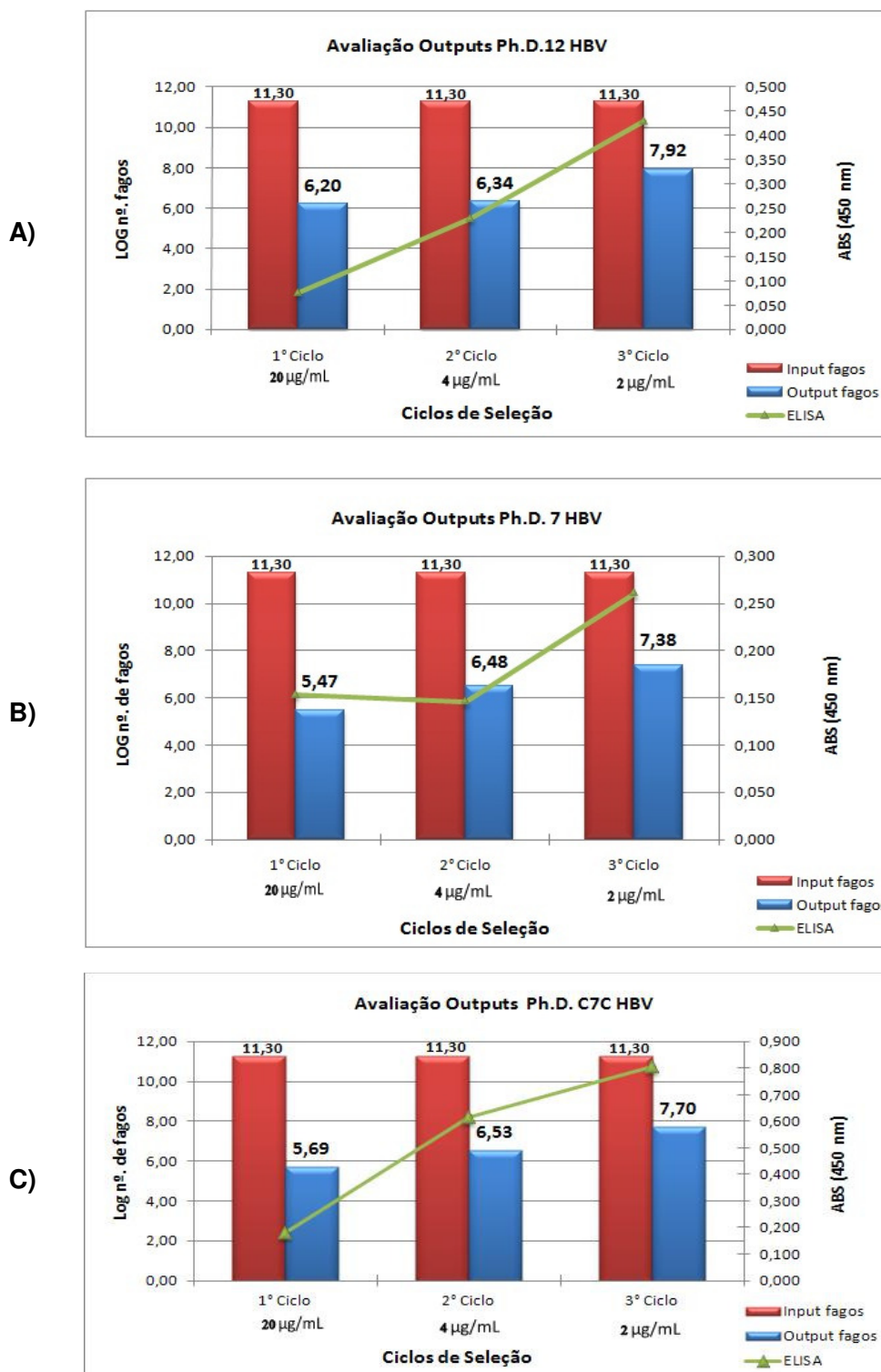


Figura 31 – Resultado da titulação do *output* de fagos e do ensaio imunoenzimático para avaliação da afinidade ao alvo do *pool* de fagos resultantes do *bio-panning* das bibliotecas Ph.D. 12 (A), Ph.D. 7 (B) e Ph.D. C7C (C) para hepatite B.

A análise do título de fagos eluídos a cada etapa de seleção permite verificar um aumento de aproximadamente cem vezes (dois logs) na quantidade de fagos selecionados, para todas as bibliotecas, após três ciclos de seleção, o que indica enriquecimento do *pool* de fagos selecionados para ligantes específicos.

Isto pode ser considerado um resultado bastante satisfatório ao ponderarmos que este enriquecimento ocorreu concomitantemente com o aumento das condições de estringência do processo, pela redução da quantidade de alvos na seleção e pelo aumento da concentração de detergente nas etapas de lavagem.

Para as bibliotecas Ph.D. 12 e Ph.D. C7C, o ensaio imunoenzimático indicou que os *pools* de fagos eluídos a cada ciclo apresentaram um aumento de afinidade ao alvo, detectado por aumento da absorvância, o qual indica que o *pool* enriquecido possuía ligantes das moléculas-alvo.

Na biblioteca Ph.D. 7, apesar da indicação de afinidade ao alvo mensurada no ELISA ter se mantido constante nos dois primeiros ciclos, ele apresentou um aumento significativo no *pool* de fagos eluídos do terceiro ciclo, demonstrando que o *pool* de fagos enriquecidos possui afinidade ao alvo.

5.1.2 *Bio-panning* para moléculas-alvo de hepatite C

Os resultados da avaliação dos títulos de fagos obtidos a cada ciclo de seleção e da afinidade ao alvo (EIA) para as bibliotecas Ph.D. 12, Ph.D 7 e Ph.D. C7C utilizando MAb para o vírus da hepatite C estão representados nas Figura 32 a seguir.

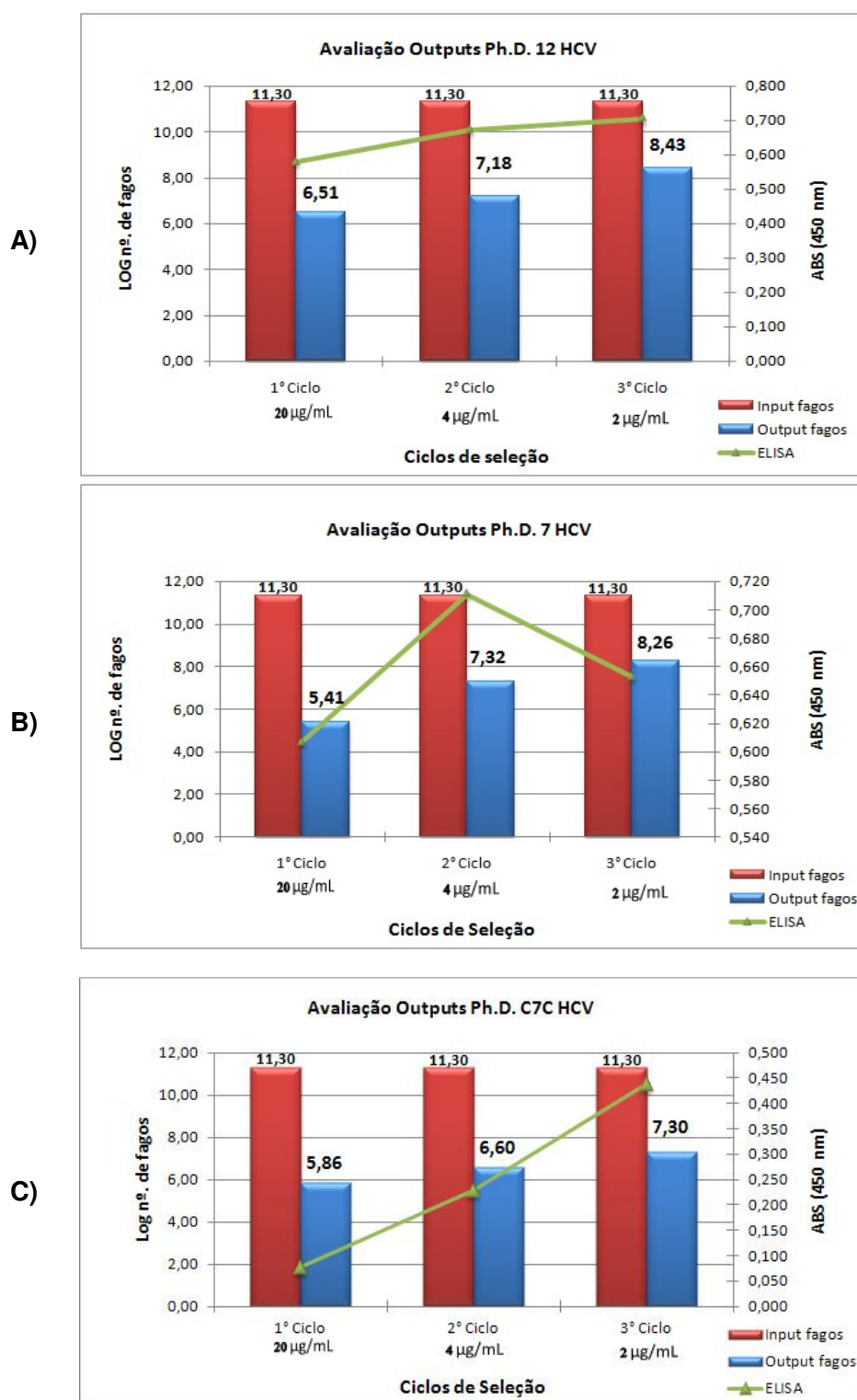


Figura 32 – Resultado da titulação do *output* de fagos e do ensaio imunoenzimático para avaliação da afinidade ao alvo do *pool* de fagos resultantes do *bio-panning* das bibliotecas Ph.D. 12 (A), Ph.D. 7 (B) e Ph.D. C7C (C) para hepatite C.

A análise quantitativa dos fagos obtidos a partir das bibliotecas Ph.D. 12 e Ph.D. 7 possibilitou identificar um aumento de, aproximadamente cem vezes no *output* após três ciclos de seleção, ocorrendo, portanto, um enriquecimento de fagos selecionados com especificidade aos alvos. Este enriquecimento ocorreu também para a biblioteca Ph.D. C7C, porém na ordem de cerca de 10 vezes.

Os fagos selecionados no primeiro e segundo ciclo apresentaram um aumento discreto de afinidade ao alvo quando avaliados por ensaio imunoenzimático. Quando os *pools* de fagos foram analisados com relação a sua afinidade ao alvo, pôde-se evidenciar para a biblioteca Ph.D. 12 um leve aumento gradativo na afinidade no decorrer dos três ciclos, porém com uma intensidade de sinal (absorbância) bastante significativa para a diluição de fagos utilizada. Para a biblioteca Ph.D. 7, houve um aumento de afinidade ao alvo do primeiro para o segundo ciclo de *bio-panning*, com o declínio do sinal de afinidade no terceiro ciclo, um resultado inesperado haja vista o enriquecimento (amplificação) do *pool* eluído a cada ciclo de seleção que favorece a presença dos representantes de maior afinidade. Deste modo, uma possibilidade seria alguma interferência no ensaio imunoenzimático que gerou este leve decréscimo no sinal da absorbância de 0,711 no segundo ciclo para 0,653 no terceiro ciclo do *bio-panning*.

O *pool* de peptídeos selecionado a partir da biblioteca Ph.D. C7C foi a população que apresentou maior aumento de leitura de absorbância a cada ciclo, indicando que o *pool* de fagos enriquecidos a cada ciclo possuía peptídeos de maior afinidade.

Dadas as condições de estringência incrementadas no decorrer das etapas de seleção, a análise do título dos *outputs* de fagos selecionados para o vírus da hepatite C pode ser considerada satisfatória. Adicionalmente, a avaliação conjunta da afinidade ao alvo através de ensaio imunoenzimático permitiu concluir que a população de fagos selecionada é enriquecida para peptídeos que reconheçam as moléculas-alvo contra as quais foram selecionados.

5.2 CONTROLE DO PROCESSO DE *BIO-PANNING*

Foi realizado o *bio-panning* da biblioteca Ph.D C7C, com o objetivo de avaliar se o protocolo experimental seguido estava apropriado, o que foi avaliado através da análise das seqüências dos peptídeos obtido após três ciclos de seleção utilizando como alvo estreptavidina.

Os *outputs* de fagos eluídos a cada ciclo de seleção do *bio-panning* foram titulados para avaliação de enriquecimento para uma determinada população de peptídeos ligantes à molécula-alvo (estreptavidina) (Figura 33).

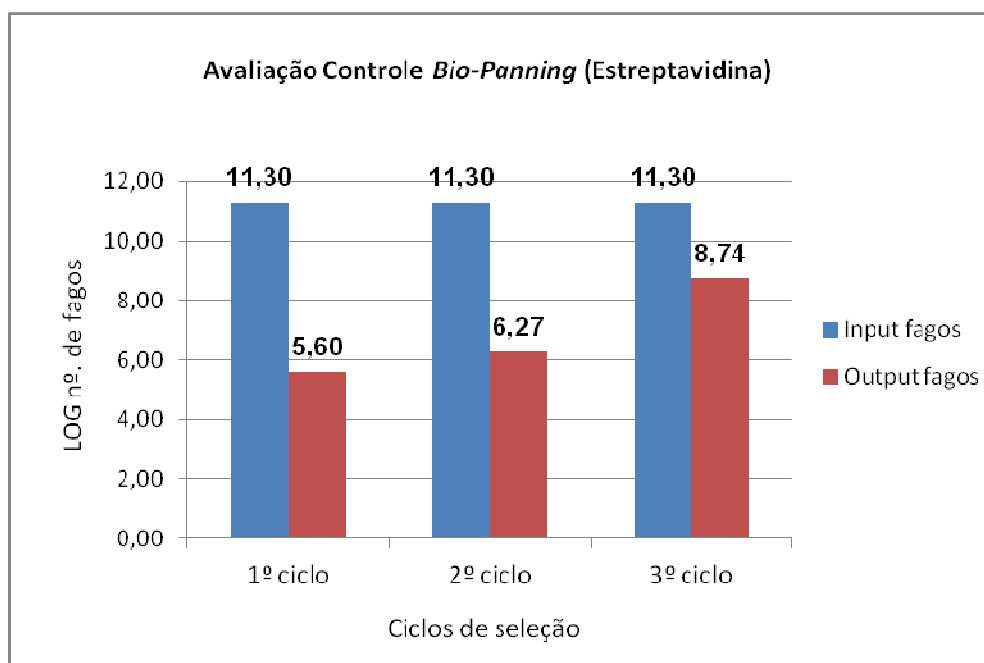


Figura 33 – Avaliação do *output* de fagos obtidos no experimento controle do *bio-panning* utilizando estreptavidina como alvo para os peptídeos da biblioteca Ph.D. C7C.

Após verificar que houve enriquecimento da seleção da ordem de 3 logs (mil vezes), foram selecionados doze clones, os quais foram amplificados em cultivos de 1 mL, tiveram seu material genético extraído e seqüenciado. A tradução das seqüências de insertos obtidos é apresentada na Tabela 8.

Tabela 8 – Seqüência de tradução dos peptídeos selecionados no experimento controle do *bio-panning*.

Clone	Seqüências	Tradução
1	TCTGCTTGTCATCCGCAGTTTCTTTCTCTTTGCGGTGGAGGT	HPQFLSL
2	TCTGCTTGTCATCCTCAGTTTTGGTTCGATTTGCGGTGGAGGT	HPQFWSI
3	TCTGCTTGTCATCCTCAGTTTTGGTTCGATTTGCGGTGGAGGT	HPQFWSI
4	TCTGCTTGTTGGTACTTATTCTCATCCTCAGTGCGGTGGAGGT	GTYSHPQ
5	TCTGCTTGTTGGTACTTATTCTCATCCTCAGTGCGGTGGAGGT	GTYSHPQ
6	TCTGCTTGTCATCCTCAGTTTTGGTTCGATTTGCGGTGGAGGT	HPQFWSI
7	TCTGCTTGTCATCCTCAGTTTTGGTTCGATTTGCGGTGGAGGT	HPQFWSI
8	TCTGCTTGTCATCCGCAGTTTCTTTCTCTTTGCGGTGGAGGT	HPQFLSL
9	TCTGCTTGTCATCCTCAGTTTCTGCCTCTTGCGGTGGAGGT	HPQFLPL
10	TCTGCTTGTCATCCTCAGTTTCTGCCTCTTTGCGGTGGAGGT	HPQFLPL
11	TCTGCTTGTCATCGCATTCTTTCTCTTGCGGTGGAGGT	HRISFS
12	TCTGCTTGTCATCCGCAGTTTCTTTCTCTTGCGGTGGAGGT	HPQFLSL

Os peptídeos traduzidos foram alinhados com o programa ClustalW para localização de seqüências consenso e os resultados são apresentados na Figura 34.

Ph. D. C7C - Controle

```

GTYSHPQ - - - -
GTYSHPQ - - - -
- - - - HPQFWSI
- - - - HPQFWSI
- - - - HPQFWSI
- - - - HPQFWSI
- - - - HPQFLSL
- - - - HPQFLSL
- - - - HPQFLSL
- - - - HPQFLPL
- - - - HPQFLPL
- - - - HRISFS -

```

Figura 34 – Alinhamento dos peptídeos selecionados a partir do experimento controle do *bio-panning* com alvo de estreptavidina.

Após a realização dos três ciclos de seleção (enriquecimento/amplificação), onze dos doze peptídeos cujas seqüências foram traduzidas, apresentaram majoritariamente a seqüência HPQ, confirmando a eficiência do *bio-panning*.

5.3 ANÁLISE DOS CLONES PRÉ-SELECIONADOS

Foram selecionados 24 clones de cada biblioteca para hepatite B. Para hepatite C foram selecionados 24 clones das bibliotecas Ph.D. 12 e Ph.D. C7C e 14 clones da biblioteca Ph.D. 7, todos eles a partir do *output* de fagos eluídos não-amplificados do terceiro ciclo de *bio-panning*.

Esta foi a primeira seleção (pré-seleção) realizada de moléculas de potencial aplicabilidade para o imunodiagnóstico. Para analisar esta seleção, todos os clones foram seqüenciados e tiveram a seqüência de seus peptídeos traduzidas para identificação da presença de seqüências altamente representativas (presentes em alta freqüência dentre os peptídeos selecionados).

Como no processo de *bio-panning* foram utilizados como alvo *pools* de anticorpos monoclonais que reconhecem as proteínas atualmente utilizadas nos ensaios imunoenzimáticos empregados na hemorrede brasileira para a triagem dos marcadores sorológicos de HBV e de HCV, é esperado que, apesar da obtenção de seqüências majoritárias presentes em diferentes peptídeos, haja igualmente uma variedade de diferentes peptídeos devido aos diferentes alvos.

Os peptídeos foram nomeados com números, seguidos pela letra B para clones de hepatite B e C para clones de hepatite C e separados com um traço pela biblioteca da qual foram selecionados (7, 12, C7C).

Inicialmente as seqüências aminoacídicas dos clones pré-selecionados foram analisadas com o auxílio do programa ClustalW para rápida identificação de peptídeos de alta representatividade. Em seguida, foi realizado um alinhamento local utilizando BLASTP 2.2.22 (ATSCHUL et al., 1997; ATSCHUL et al., 2005) das seqüências selecionadas para cada

doença, de todas as bibliotecas, umas frente às outras.

Este alinhamento de todos os peptídeos uns versos os outros possibilitou identificar apenas um clone que havia sido selecionado para ambas as doenças, inespecificamente, e identificar exatamente as regiões de alinhamento dos clones pré-selecionados. Este estudo de alinhamento, cujo detalhamento está disponível no Anexo A e Anexo B, confirmou os resultados visualizados pelo ClustalW (ítems a seguir) e pela análise de seqüenciamento.

5.3.1 Análise dos Clones Pré-Selecionados para Hepatite B

Para hepatite B, foram selecionados 24 clones de peptídeos em cada biblioteca. Todos os clones foram amplificados em cultivos de 1 mL, tiveram seu material genético extraído e seqüenciado.

De um total de 72 clones, em 11 não foi possível identificar inserto através de seqüenciamento e foram descartados. Portanto, foram obtidos 22 clones para a biblioteca Ph.D. 12, 23 clones para a biblioteca Ph.D. 7 e 16 clones para a biblioteca Ph.D. C7C.

As seqüências aminoacídicas dos clones foram visualizadas utilizando o programa CustalW, para identificação da presença de seqüências majoritárias dentre os resíduos de aminoácidos dos peptídeos selecionados (Figura 35). As seqüências destes clones são apresentadas nas Tabelas 9, 10 e 11.

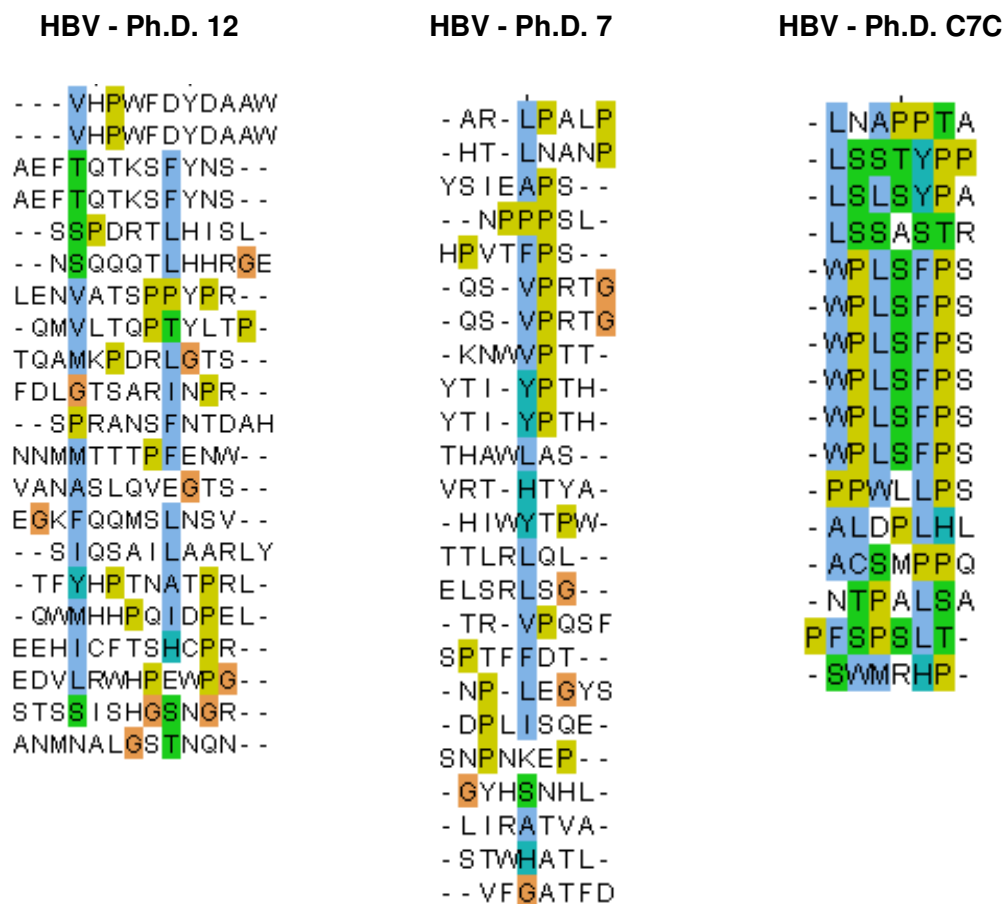


Figura 35 – Perfil aminoacídico dos peptídeos selecionados para hepatite B a partir das bibliotecas Ph.D. 12, Ph.D. 7 e Ph.D. C7C.

Tabela 9 – Seqüências e tradução dos peptídeos de potencial aplicabilidade pré-selecionados para hepatite B a partir da biblioteca Ph.D. 12.

HBV Ph.D. 12		
Clone	Seqüência nucleotídica	Seqüência aminoacídica
>25B_12	TCTACTTCTAGTATTTCTCATGGGTCTAATGGTCGG	STSSISHGSNGR
>26B_12	ACGCAGGCGATGAAGCCGGATCGGCTGGGTACTAGT	TQAMKPDR LGTS
>27B_12	GTTTCATCCGTGGTTTGATTATGATGCTTAGGCTTGG	VHPWFDYDA.AW*
>28B_12	AATAATATGATGACGACGACGCCGTTTGAGAATTGG	NNMMTTTTPFENW
>29B_12	AGTTCTCCTGATCGGACGTTGCATTAGATTTTCGTTG	SSPDRTLH.ISL*
>30B_12	ACGTTTTATCATCCTACGAATGCTACGCCGCGTCTT	TFYHPTNATPRL
>31B_12	CTTGAGAATGTGGCTACGAGTCCGCCTTATCCTCGG	LENVATSPPYPR
>32B_12	GCGAATATGAATGCGCTGGGTTCTACTAATCAGAAT	ANMNALGSTNQN
>33B_12	GCGGAGTTTACTCAGACTAAGAGTTTTTATAATTCG	AEFTQTKSFYNS
>34B_12	GAGGGGAAGTTTCAGCAGATGTCTCTGAATTCTGTG	EGKFQQMSLNSV
>35B_12	AGTCCGCGTGCTAATTCGTTTAATACTGATGCGCAT	SPRANSFNTDAH
>36B_12	CAGTGGATGCATCATCCTCAGATTGATCCGGAGCTG	QWMHHPQIDPEL
>37B_12	AATTCTCAGCAGCAGACTCTGCATCATCGTGGTGAG	NSQQQTLHHRGE
>38B_12	GCGGAGTTTACTCAGACTAAGAGTTTTTATAATTCG	AEFTQTKSFYNS
>39B_12	CAGATGGTGCTTACGCAGCCTACGTATCTTACGCCT	QMVLTQPTYLTP
>40B_12	GAGGAGCATATTTGTTTTACTAGTCATTGTCCGCGT	EEHICFTSHCPR
>41B_12	TCGATTCAGAGTGCTATTCTGGCTGCGAGGCTTTAT	SIQSAILAARLY
>42B_12	TTTGATCTTGGTACGAGTGCTCGGATTAATCCGCGT	FDLGT SARINPR
>43B_12	GTTTCATCCGTGGTTTGATTATGATGCTTAGGCTTGG	VHPWFDYDA.AW*
>44B_12	GAGGATGTGCTGCGGTGGCATCCTGAGTGGCCGGGT	EDVLRWHPEWPG
>45B_12	GTTGCGAATGCGTTCGTTGCAGGTTGAGGGGACTTCG	VANASLQVEGTS

* Os clones 27B_12, 29B_12 e 43B_12 apresentaram em suas seqüências aminoacídicas *stop-codons* (representados por pontos). Contudo, os *stop-codons* (TAG) são suprimidos por glutamina na *E. coli* ER2738 (glnV). Ou seja, se a biblioteca foi amplificada nesta bactéria ou qualquer bactéria glnV (também denominada supE), o códon TAG deve ser considerado um códon de glutamina no momento da tradução.

Tabela 10 – Seqüências e tradução dos peptídeos de potencial aplicabilidade pré-selecionados para hepatite B a partir da biblioteca Ph.D. 7.

HBV Ph.D. 7		
Clone	Seqüência nucleotídica	Seqüência aminoacídica
>1B_7	CATCCGGTTACTTTTCCTTCG	HPVTFPS
>2B_7	GTTCGGACGCATACTTATGCG	VRTHTYA
>3B_7	TATAGTATTGAGGCTCCGTCT	YSIEAPS
>4B_7	GCTCGTCTTCCTGCGCTGCCG	ARLPALP
>5B_7	AAGAATTGGGTTCTACTACG	KNWVPTT
>6B_7	CATACTCTTAATGCGAATCCG	HTLNANP
>7B_7	GTGTTTGGTGC GACTTTTGAT	VFGATFD
>8B_7	TTGATTCGTGCGACTGTGGCT	LIRATVA
>9B_7	GATCCTCTGATTTCCGAGGAG	DPLISQE
>10B_7	TATACTATTTATCCGACGCAT	YTIYPH
>11B_7	tAATCCTCTTGAGGGTTATAGT	NPLEGYS
>12B_7	ACGCATGCTTGGTTGGCGTCG	THAWLAS
>13B_7	TCGCCGACGTTTTTTGATACT	SPTFFDT
>14B_7	CAGTCGGTTCGAGGACTGGG	QSVPRTG
>15B_7	CAGTCGGTTCGAGGACTGGG	QSVPRTG
>16B_7	GGTTATCATAGTAATCATCTG	GYHSNHL
>17B_7	AGTAATCCGAATAAGGAGCCT	SNPNKEP
>18B_7	CATATTTGGTATACGCCGTGG	HIWYTPW
>19B_7	TATACTATTTATCCGACGCAT	YTIYPH
>20B_7	AATCCGCCGCCTTAGAGTTTG	NPPP.SL*
>21B_7	ACTCGTGTGCCACAGTCTTTT	TRVPQSF
>22B_7	TCAACGTGGCATGCTACGCTT	STWHATL
>23B_7	ACGACGCTTCGGCTGCAGCTG	TTLRLQL
>24B_7	GAGCTGTCTCGTCTGTCCGGG	ELSRLSG

* Vide legenda Tabela 9.

Tabela 11 – Seqüências e tradução dos peptídeos de potencial aplicabilidade pré-selecionados para hepatite B a partir da biblioteca Ph.D. C7C.

HBV Ph.D. C7C		
Clone	Seqüência nucleotídica	Seqüência aminoacídica
>46B_C7C	GCTTGTCTTTTTCGCCTAGTCTGACTTGC	PFSPSLT
>47B_C7C	GCTTGTTGGCCGCTTTCTTTTCCTTCTTGC	WPLSFPS
>48B_C7C	GCTTGTCTGAGTTCTACGTATCCTCCTTGC	LSSTYPP
>49B_C7C	GCTTGTCTGAATGCTCCGCCTACTGCGTGC	LNAPPTA
>50B_C7C	GCTTGTTTGAGTTTCGGCTTCTACTCGTTGC	LSSASTR
>51B_C7C	GCTTGTCTGTCTCTGTGCGTATCCTGCGTGC	LSLSYPA
>52B_C7C	GCTTGTTGGCCGCTTTCTTTTCCTTCTTGC	WPLSFPS
>53B_C7C	GCTTGTTGGCCGCTTTCTTTTCCTTCTTGC	WPLSFPS
>54B_C7C	GCTTGTGCGCTGGATCCTCTGCATCTTTGC	ALDPLHL
>55B_C7C	GCTTGTCTCCTTGGCTTCTTCCTTCGTGC	PPWLLPS
>56B_C7C	GCTTGTTGGCCGCTTTCTTTTCCTTCTTGC	WPLSFPS
>57B_C7C	GCTTGTGCTTGTCTATGCCGCCTCAGTGC	ACSMPPQ
>58B_C7C	GCTTGTTGGCCGCTTTCTTTTCCTTCTTGC	WPLSFPS
>59B_C7C	GCTTGTTGGCCGCTTTCTTTTCCTTCTTGC	WPLSFPS
>60B_C7C	GCTTGTAATACTCCTGCTCTGTCTGCTTGC	NTPALSA
>61B_C7C	GCTTGTTCTTGGATGCGGCATCCTTCGTGC	SWMRHPS

Pela visualização do perfil aminoacídico dos peptídeos pré-selecionados, pode-se observar que houve seleção de seqüências majoritariamente presentes somente para a biblioteca Ph.D. C7C, enquanto que para as demais bibliotecas não foi observado o enriquecimento de seqüências específicas.

O alinhamento dos peptídeos selecionados a partir da biblioteca Ph.D. C7C para HBV demonstrou a presença de um peptídeo com alta representatividade dentre os selecionados, com a seqüência Triptofano-Prolina-Leucina-Serina-Fenilalanina-Prolina (WPLSFP) bastante conservada.

Comparando estas informações com um aumento no título de fagos eluídos nos consecutivos ciclos do *bio-panning* e aumento da absorbância destes fagos quando testados

em ensaio imunoenzimático, pode-se concluir que a pré-seleção de clones a partir do *output* do 3º ciclo foi mais bem sucedida para a biblioteca Ph.D. C7C e que é possível que os anticorpos monoclonais utilizados na seleção reconheçam com maior afinidade os peptídeos de sete resíduos de aminoácido com estrutura cíclica presentes na biblioteca Ph.D. C7C.

Apesar de ser esperada uma variedade de peptídeos pré-selecionados devido à utilização de um *pool* de MAbs no *bio-panning*, a obtenção de diversos peptídeos de seqüências diferentes pode ser um indicativo de baixa seleção de clones para hepatite B. Ou seja, pode haver a possibilidade de não terem sido selecionados a partir das bibliotecas Ph.D. 12, Ph.D. 7 e Ph.D. C7C clones com especificidade satisfatória para hepatite B.

A partir destes resultados, foi realizado um BLASTP dos clones pré-selecionados frente a bancos de dados das proteínas do vírus da hepatite B, com o objetivo de verificar possíveis alinhamentos das seqüências dos peptídeos pré-selecionados às proteínas contra as quais foram produzidos os anticorpos monoclonais utilizados no *bio-panning* e a especificidade dos peptídeos selecionados, visando a seleção de clones de potencial aplicabilidade.

5.3.2 Análise dos Clones Pré-Selecionados para Hepatite C

Para hepatite C, foram selecionados 24 clones de peptídeos para as bibliotecas Ph.D.12 e Ph.D. C7C e 14 clones para a biblioteca Ph.D. 7. Todos os clones foram amplificados em cultivos de 1 mL, tiveram seu material genético extraído e seqüenciado.

De um total de 62 clones, em 3 clones não foi possível identificar inserto através de seqüenciamento e eles foram eliminados, resultando em 23 clones para a biblioteca Ph.D. 12, 14 clones para a biblioteca Ph.D. 7 e 22 clones para a biblioteca Ph.D. C7C. As seqüências destes clones são apresentadas nas Tabelas 12, 13 e 14.

Em seguida, os clones visualizados utilizando o programa CustalW, para avaliação da presença majoritária de seqüências específicas dentre os resíduos de aminoácidos dos peptídeos selecionados (Figuras 36).

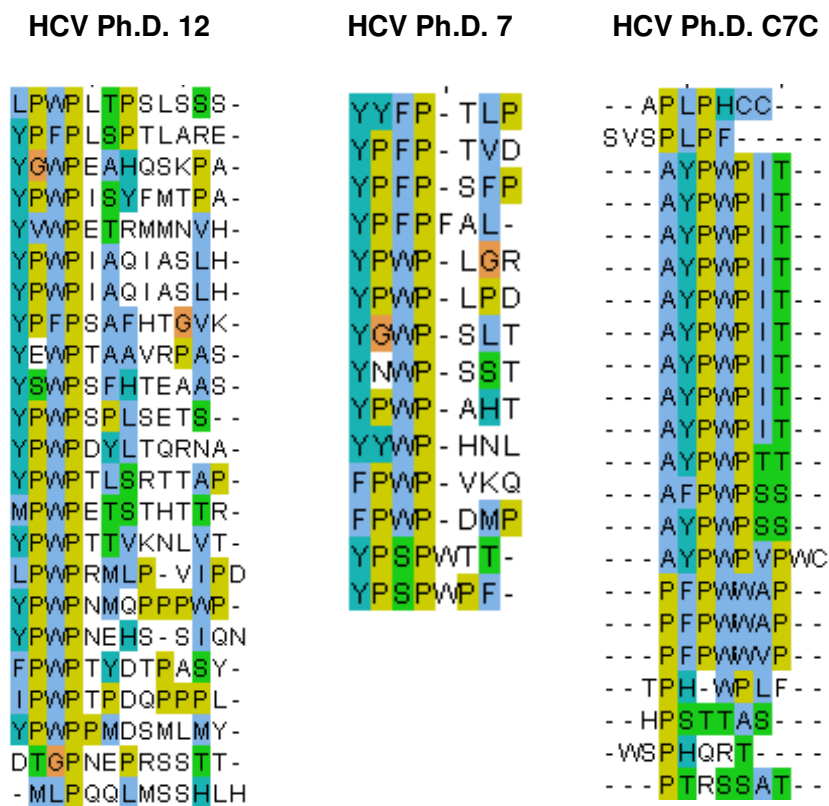


Figura 36 – Perfil aminoacídico dos peptídeos selecionados para hepatite C a partir das bibliotecas Ph.D. 12, Ph.D. 7 e Ph.D. C7C.

Tabela 12 – Seqüências e tradução dos peptídeos de potencial aplicabilidade pré-selecionados para hepatite C a partir da biblioteca Ph.D. 12.

HCV Ph.D. 12		
Clones	Seqüência nucleotídica	Seqüência aminoacídica
>15C_12	TATGTTTGGCCTGAGACGCGTATGATGAATGTGCAT	YVWPETRMNVH
>16C_12	CTTCCTTGGCCGTTGACTCCTTCTCTTAGTTTCGTCG	LPWPLTPSLSSS
>17C_12	TATGGGTGGCCTGAGGCTCATCAGTCGAAGCCGGCG	YGWPEAHQSKPA
>18C_12	GATACGGGGCCTAATGAGCCGCGTTCTTCTACGACG	DTGPNPRSSSTT
>19C_12	GATACGGGGCCTAATGAGCCGCGTTCTTCTACGACG	YPWP.SPLSETS*
>20C_12	TATGAGTGGCCTACTGCTGCTGTGCGGCCGGCTAGT	YEWPTAAVRPAS
>21C_12	TATCCTTGGCCTCCTATGGATTCTATGCTGATGTAT	YPWPPMDSMLMY
>22C_12	TATCCGTGGCCGAATGAGCATAGTAGTATTCAGAAT	YPWPNEHSSIQN
>23C_12	TATCCGTGGCCGACGCTGAGTCGTACTACGGCTCCG	YPWPTLSRRTTAP
>24C_12	TATCCTTGGCCTATTGCGCAGATTGCGTCGCTGCAT	YPWPPIAQIASLH
>25C_12	TTTCCTTGGCCGACTTATGATACTCCGGCGAGTTAT	FPWPTYDTPASY
>26C_12	TATCCTTGGCCTATTGCGCAGATTGCGTCGCTGCAT	YPWPPIAQIASLH
>27C_12	TATCCTTGGCCGGATTATCTGACGCAGCGGAATGCG	YPWPDYLTQRNA
>28C_12	TTGCCGTGGCCGAGGATGCTTCCGGTTATTCCTGAT	LPWPRMLPVIPTD
>29C_12	TATCCGTGGCCTATTTCTATTTTATGACGCCTGCG	YPWPISYFMTPA
>30C_12	TATCCGTTTCCGTCGGCGTTTCATACTGGTGTGAAG	YPFPSAFHTGVK
>31C_12	TATTCGTGGCCGTCTTTTCATACGGAGGCGGCTTCT	YSWPSFHTEAAS
>32C_12	ATTCCGTGGCCGACTCCTGATCAGCCTCCTCCTCTT	IPWPTPDQPPPL
>33C_12	TATCCTTTTCCGCTTAGTCCTACGCTTGCGCGTGAG	YPFPLSPTLARE
>34C_12	TATCCGTGGCCTAATATGCAGCCGCTCCTTGGCCT	YPWPNMQPPPWP
>35C_12	TATCCTTGGCCGACGACTGTTAAGAATCTGGTTACT	YPWPTTVKNLVT
>36C_12	ATGCCTTGGCCGGAGACGTCTACGCATACTACGAGG	MPWPETSTHTTR
>37C_12	ATGCTTCCTCAGCAGTTGATGTCTAGTCATTTGCAT	MLPQQLMSSHLH

* Vide legenda Tabela 9.

Tabela 13 – Seqüências e tradução dos peptídeos de potencial aplicabilidade pré-selecionados para hepatite C a partir da biblioteca Ph.D. 7.

HCV Ph.D. 7		
Clone	Seqüência nucleotídica	Seqüência aminoacídica
>1C_7	TATCCGTGGCCGCTGGGTAGG	YPWPLGR
>2C_7	TATGGTTGGCCGTCTCTTACG	YGWPSLT
>3C_7	TATTATTGGCCGCATAATCTGG	YYWPHNL
>4C_7	TATTATTTTCCTACTCTTCCG	YYFPTLP
>5C_7	TTTCCGTGGCCTGTGAAGCAG	FPWPVKQ
>6C_7	TATCCGTGCGCCTTGGACTACG	YPSPWTT
>7C_7	TATCCGTCTCCTTGGCCTTTT	YPSPWPF
>8C_7	TATCCTTGGCCTGCGCATACT	YPWPAHT
>9C_7	TATAATTGGCCTTCTTCGACT	YNWPSST
>10C_7	TATCCGTTTCCTTCGTTTCCG	YPFPSFP
>11C_7	TATCCTTGGCCGCTTCCTGAT	YPWPLPD
>12C_7	TATCCTTTTCCTACTGTTGAT	YPFPTVD
>13C_7	TTTCCGTGGCCGGATATGCCG	FPWPDMP
>14C_7	TATCCGTTTCCTTTTGCGTTG	YPFPFAL

Tabela 14 – Seqüências e tradução dos peptídeos de potencial aplicabilidade pré-selecionados para hepatite C a partir da biblioteca Ph.D. C7C.

HCV Ph.D. C7C		
Clone	Seqüência nucleotídica	Seqüência aminoacídica
>38C_C7C	GCTTGTGCTCCTTTGCCTCATTGTTGTTGC	APLPHCC
>39C_C7C	GCTTGTGCTTTTCCTTGGCCTAGTTCGTGC	AFPWPSS
>40C_C7C	GCTTGTGCTTATCCTTGGCCTATTACTTAC	AYPWPIT
>41C_C7C	GCTTGTGCTTATCCTTGGCCTATTACTTAC	AYPWPIT
>42C_C7C	GCTTATCCTTGGCCTGTTTCCTTGGTGTTC	AYPWPVPC
>43C_C7C	GCTTGTGCTTATCCTTGGCCTATTACTTAC	AYPWPIT
>44C_C7C	GCTTGTGCTTATCCTTGGCCTATTACTTAC	AYPWPIT
>45C_C7C	GCTTGTGCTTATCCTTGGCCTATTACTTAC	AYPWPIT
>46C_C7C	GCTTGTGCTTATCCTTGGCCTATTACTTAC	AYPWPIT
>47C_C7C	GCTTGTACTCCTCATTGGCCGTTGTTTTGC	TPHWPLF
>48C_C7C	GCTTGTCCCTACGCGTTCGTCCGCTACTTGC	PTRSSAT
>49C_C7C	GCTTGTGCTTATCCTTGGCCTATTACTTAC	AYPWPIT
>50C_C7C	GCTTGTGCTTATCCTTGGCCTATTACTTAC	AYPWPIT
>51C_C7C	GCTTGTCCCTTTCCGTGGTGGGTTCCCTTGC	PFPWWVP
>52C_C7C	GCTTGTGCTTATCCTTGGCCTATTACTTAC	AYPWPIT
>53C_C7C	GCTTGTGCTTATCCTTGGCCTATTACTTAC	AYPWPIT
>54C_C7C	GCTTGTGCTTATCCTTGGCCTACTACTTGC	AYPWPIT
>55C_C7C	GCTTGTCCCTTTCCGTGGTGGGCTCCGTGC	PFPWWAP
>56C_C7C	GCTTGTGCTTATCCTTGGCCTATTACTTAC	AYPWPIT
>57C_C7C	GCTTGTCCCTTTCCGTGGTGGGCTCCGTGC	PFPWWAP
>58C_C7C	GCTTGTGCGTATCCGTGGCCTTCGTTCGTGC	AYPWPSS
>59C_C7C	GCTTGTTCCTTTCTCCTCTTCCTTTTGC	SVSPLPF

Os peptídeos pré-selecionados para as três bibliotecas utilizando anticorpos monoclonais para hepatite C apresentaram grande similaridade (evidenciada na Figura 36), havendo regiões peptídicas majoritariamente presentes para as bibliotecas Ph.D. 12 e Ph.D. 7 e, um peptídeo cuja seqüência completa foi de grande freqüência dentre os selecionados para a biblioteca Ph.D. C7C.

Os clones da biblioteca Ph.D. 12 possuíam majoritariamente a seqüência Tirosina-Prolina-Triptofano-Prolina (YPWP) e alguns deles apenas a seqüência Prolina-Triptofano-Prolina (PWP). Os peptídeos selecionados a partir da biblioteca Ph.D. 7 também possuíam em grande representatividade os aminoácidos Prolina-Triptofano-Prolina (PWP), podendo a mesma ser precedida por Tirosina (YPWP) ou Fenilalanina (FPWP).

O alinhamento dos peptídeos selecionados a partir da biblioteca Ph.D. C7C identificou a presença majoritária de um peptídeo com a seqüência Alanina-Tirosina-Prolina-Triptofano-Prolina-Isoleucina-Treonina (AYPWPIT), o qual compartilha a seqüência Tirosina-Prolina-Triptofano-Prolina (YPWP) altamente representada nos outros peptídeos selecionados para todas as bibliotecas. Além destes resíduos de aminoácidos, a seqüência Prolina-Fenilalanina-Prolina (PFP) também estava presente com relativa representatividade para esta biblioteca.

Estes resultados, quando comparados com os títulos de fagos eluídos nos consecutivos ciclos do *bio-panning* e com aumento da absorbância destes fagos quando testados em ensaio imunoenzimático, permitem concluir que para hepatite C os *bio-pannings* das três bibliotecas comerciais foram satisfatórios para a obtenção de peptídeos com possível alta afinidade aos anticorpos monoclonais de HCV utilizados no processo de seleção.

Além disto, a presença majoritária da seqüência Prolina-Triptofano-Prolina (PWP) em alta representatividade em diversos peptídeos diferentes selecionados a partir das bibliotecas Ph.D. 12, Ph.D. 7 e Ph.D. C7C indica a relevância específica desta seqüência (Figura 37). O impacto dos diferentes complementos da seqüência PWP nos diversos peptídeos selecionados foi avaliado nas etapas posteriores através do desempenho dos mesmos em ensaios imunoenzimáticos com representantes de cada biblioteca, detalhados nos itens a seguir.

A partir destes resultados, foi realizado um BLASTP dos clones pré-selecionados frente a bancos de dados das proteínas do vírus da hepatite C, com o objetivo de verificar possíveis alinhamentos das seqüências dos peptídeos pré-selecionados às proteínas contra as quais foram produzidos os anticorpos monoclonais utilizados no *bio-panning* e a especificidade dos peptídeos selecionados, visando a seleção de clones de potencial aplicabilidade.


```

10-7/1-7 -- YPFPSFP-----
33-12/1-12 -- YPFPLSPTLARE-
4-7/1-7 -- YFP TLP-----
12-7/1-7 -- YFPPTVD-----
14-7/1-7 -- YPFPFAL-----
30-12/1-12 -- YPFPSAFHTGVK-
6-7/1-7 -- YPSPWTT-----
7-7/1-7 -- YPSWVPF-----
55-C7C/1-7 --- PFPWWAP-----
57-C7C/1-7 --- PFPWWAP-----
51-C7C/1-7 --- PFPWWVP-----
38-C7C/1-7 -- APLPHCC-----
59-C7C/1-7 SVSPLPF-----
1-7/1-7 -- YPWLGR-----
15-12/1-12 -- YWVPETRMNVH-
2-7/1-7 -- YGWPSL--T----
9-7/1-7 -- YNWPSS--T----
31-12/1-12 -- YSWPSFH-TEAAS
20-12/1-12 -- YEWP TAA-VRPAAS
17-12/1-12 -- YGWPEAHQSKPA-
3-7/1-7 -- YWPHNL-----
27-12/1-12 -- YPWPDYLTQRNA-
50-C7C/1-7 -AYPWPIT-----
56-C7C/1-7 -AYPWPIT-----
49-C7C/1-7 -AYPWPIT-----
46-C7C/1-7 -AYPWPIT-----
45-C7C/1-7 -AYPWPIT-----
44-C7C/1-7 -AYPWPIT-----
43-C7C/1-7 -AYPWPIT-----
41-C7C/1-7 -AYPWPIT-----
40-C7C/1-7 -AYPWPIT-----
24-12/1-12 -- YPWP I A Q I A S L H-
26-12/1-12 -- YPWP I A Q I A S L H-
29-12/1-12 -- YPWP I S Y F M T P A-
35-12/1-12 -- YPWPTT- VKNLVT
54-C7C/1-7 -AYPWPTT-----
39-C7C/1-7 -AFPWPS--S-----
58-C7C/1-7 -AYPWPS--S-----
19-12/1-11 -- YPWSP L S E T S--
42-C7C/1-9 -AYPWPVPWC-----
23-12/1-12 -- YPWPTLSRTTAP-
8-7/1-7 -- YPWP-AHT-----
22-12/1-12 -- YPWPNEHSSIQN-
21-12/1-12 -- YPWP P M D S M L M Y-
34-12/1-12 -- YPWP N M Q P P P W P-
11-7/1-7 -- YPWP L P D-----
32-12/1-12 -- I P W P T P D Q P P P L-
5-7/1-7 -- FPWPVKQ-----
25-12/1-12 -- FPWP TY D T P A S Y-
13-7/1-7 -- FPWPD M - P-----
28-12/1-12 -- LPWPRMLPVI P D-
18-12/1-12 -- D T G P N E P R S S T T-
48-C7C/1-7 ----- P T--RSSAT-
36-12/1-12 -- MPWPETSHTTR-
37-12/1-12 -MLPQQLMSSHLH--
53-C7C/1-7 -WSPHQRT-----
52-C7C/1-7 -- H P S T T A S-----
16-12/1-12 -- LPWPLTPSLSSS-

```

Figura 37 – Alinhamento dos peptídeos obtidos para as três bibliotecas comerciais frente à seleção com MAbs de hepatite C com a presença majoritária da seqüência Prolina-Triptofano-Prolina (PWP).

5.4 AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE E AFINIDADE DOS CLONES SELECIONADOS

A avaliação da especificidade dos clones individuais aos alvos foi feita segundo dois critérios: utilizando meta-análise das seqüências dos clones obtidos frente a bancos de dados de seqüências não-redundantes de proteínas utilizando ferramenta de busca de alinhamentos locais de proteínas (BLASTP) e por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) frente ao *pool* de anticorpos monoclonais utilizados para seleção e frente a cada MAb isoladamente.

Estas avaliações consistiram em uma segunda etapa de seleção, com o objetivo de reduzir o número de peptídeos de potencial aplicabilidade a serem testados nas etapas seguintes de seleção.

5.4.1 Avaliação dos clones selecionados frente aos bancos de dados de proteínas dos vírus da hepatite B e da hepatite C

Para a busca dos bancos de dados foram adicionadas apenas uma entrada para cada peptídeo identificado, ou seja, os peptídeos repetidos foram eliminados. Em seguida, foram inseridas 52 seqüências para busca nos bancos de dados de HBV e 49 seqüências para busca nos bancos de HCV.

As seqüências peptídicas de ambas os vírus foram também submetidas ao alinhamento frente ao banco de dados uma da outra, ou seja, os peptídeos de HBV foram submetidos ao banco de dados de HCV e vice-versa. Os peptídeos que não alinharam com proteínas da doença incorreta foram classificados como ESPECÍFICOS e aqueles que reconheceram proteínas da doença contra a qual não foram selecionados foram denominados INESPECÍFICOS. Contudo, é válido ressaltar que, devido à curta seqüência dos peptídeos selecionados (apenas de sete a doze resíduos de aminoácidos), a especificidade é um critério bastante relativo, pois possivelmente estes peptídeos alinhariam inespecificamente com proteínas de quaisquer bancos de dados

Outro parâmetro considerado foi a razão entre a quantidade de vezes que um peptídeo foi identificado em uma biblioteca e a quantidade total de peptídeos selecionados da biblioteca. Por exemplo, um peptídeo que estava presente em 4 cópias dentre 24

selecionados possui representatividade $(4 \div 24) = 0,167$. Este parâmetro foi denominado representatividade (Represent.) e possui valores entre 1 e 0, sendo que quanto mais próximo de 1, maior a representatividade daquele clone (maior número de vezes ele estava presente dentre os selecionados).

Os resultados do alinhamento são apresentados nas Tabelas 15 e 16, as quais apresentam também os valores de E (medida de confiabilidade do valor de alinhamento, *score*) para os alinhamentos realizados.

Tabela 15 – BLASTP e classificação dos peptídeos selecionados frente aos anticorpos monoclonais de HBV.

BLASTP HBV RESUMIDO						
nº.	Clone	Seqüências	Represent.	E value	Proteínas	Especif.
1	>1B_7	HPVTFPS	0,04	691	HbcAg	Inesp.
2	>2B_7	VRTHTYA	0,04	384	Pol	Inesp.
3	>3B_7	YSIEAPS	0,04	515	HbsAg	Inesp.
4	>4B_7	ARLPALP	0,04	159	HbsAg, Xprot.	Inesp.
5	>5B_7	KNWVPTT	0,04	691	HbsAg	Inesp.
6	>6B_7	HTLNANP	0,04	66	HbsAg	Esp.
7	>7B_7	VFGATFD	0,04	515	HbsAg	Esp.
8	>8B_7	LIRATVA	0,04	159	Pol	Inesp.
9	>9B_7	DPLISQE	0,04	1244	HbsAg, Pol	Inesp.
10	>10B_7	YTIYPTH	0,08	286	Pol	Inesp.
11	>11B_7	NPLEGYS	0,04	691	HbsAg, Pol	Esp.
12	>12B_7	THAWLAS	0,04	213	Xprot, Pol	Inesp.
13	>13B_7	SPTFFDT	0,04	384	HbsAg	Inesp.
14	>14B_7	QSVPRTG	0,08	927	Pol, HbsAg	Inesp.
15	>16B_7	GYHSNHL	0,04	927	HbsAg	Esp.
16	>17B_7	SNPNKEP	0,04	37	HbsAg	Esp.
17	>18B_7	HIWYTPW	0,04	1669	Pol	Inesp.
18	>20B_7	NPPP.SL	0,04	88	HbsAg, Xprot.	Esp.
19	>21B_7	TRVPQSF	0,04	515	HbsAg, Pol	Inesp.
20	>22B_7	STWHATL	0,04	213	Xprot, HbsAg, HbcAg	Inesp.
21	>23B_7	TTLRLQL	0,04	118	Xprot, Pol	Esp.
22	>24B_7	ELSRLSG	0,04	159	Pol, HbcAg	Esp.
23	>25B_12	STSSISHGSNGR	0,04	159	Pol, HbsAg	Esp.
24	>26B_12	TQAMKPDRLGTS	0,04	66	HbsAg	Esp.
25	>27B_12	VHPWFDYDA.AW	0,08	1244	Xprot, Pol, HbsAg	Inesp.
26	>28B_12	NNMMTTTTPFENW	0,04	159	Xprot, HbsAg	Inesp.
27	>29B_12	SSPDRTLH.ISL	0,04	49	Pol	Esp.
28	>30B_12	TFYHPTNATPRL	0,04	88	HbcAg, Pol	Esp.
29	>31B_12	LENVATSPPYPR	0,04	213	Pol, Xprot, HbsAg	Inesp.
30	>32B_12	ANMNALGSTNQN	0,04	2239	HbsAg, Pol	Inesp.
31	>33B_12	AEFTQTKSFYNS	0,08	118	Pol, HbsAg	Inesp.
32	>34B_12	EGKFQQMSLNSV	0,04	66	Pol, HbcAg	Esp.
33	>35B_12	SPRANSFNDAH	0,04	11	HbsAg	Esp.
34	>36B_12	QWMHHPQIDPEL	0,04	213	HbcAg	Esp.
35	>37B_12	NSQQQTLHHRGE	0,04	20	HbsAg, Pol	Esp.
36	>39B_12	QMVLTQPTYLTP	0,04	515	Pol, HbsAg	Inesp.
37	>40B_12	EEHICFTSHCPR	0,04	286	Xprot, Pol, HbcAg	Inesp.
38	>41B_12	SIQSAILAARLY	0,04	88	Xprot	Inesp.
39	>42B_12	FDLGTSARINPR	0,04	88	Pol	Inesp.

40	>44B_12	EDVLRWHPEWPG	0,04	213	HbsAg, HbcAg, Pol	Inesp.
41	>45B_12	VANASLQVEGTS	0,04	1669	HbsAg	Inesp.
42	>46B_C7C	PFSPSLT	0,04	159	HbsAg	Esp.
43	>47B_C7C	WPLSFPS	0,25	691	HbsAg	Inesp.
44	>48B_C7C	LSSTYPP	0,04	159	HbsAg, Xprot.	Esp.
45	>49B_C7C	LNAPPTA	0,04	213	HbsAg, Pol, Xprot	Inesp.
46	>50B_C7C	LSSASTR	0,04	515	Pol, Xprot	Inesp.
47	>51B_C7C	LSLSYPA	0,04	691	Pol	Esp.
48	>54B_C7C	ALDPLHL	0,04	515	Pol, HbcAg	Inesp.
49	>55B_C7C	PPWLLPS	0,04	213	Pol	Esp.
50	>57B_C7C	ACSMPPQ	0,04	384	HbsAg, Pol	Inesp.
51	>60B_C7C	NTPALSA	0,04	384	HbsAg, HbcAg	Inesp.
52	>61B_C7C	SWMRHP	0,04	384	HbcAg	Esp.

Onde: Nomenclatura clones: nº clone+B+_Biblioteca;
HBsAg: proteína de superfície do HBV;
HBcAg: proteína do capsídeo do HBV;
Xprot: proteína X do HBV;
Pol: proteína polimerase do HBV.

Tabela 16 – BLASTP e classificação dos peptídeos selecionados frente aos anticorpos monoclonais de HCV.

BLASTP HCV RESUMIDO						
nº.	Clone	Seqüências	Represent.	E value	Proteínas	Especif.
1	>1C_7	YPWPLGR	0,07	3.0	Polyp, Core	Esp.
2	>2C_7	YGWPSLT	0,07	137	Polyp, NS3	Esp.
3	>3C_7	YYWPHNL	0,07	137	Core	Inesp.
4	>4C_7	YYFPTLP	0,07	102	Polyp	Esp.
5	>5C_7	FPWPVKQ	0,07	18	Polyp, Core	Esp.
6	>6C_7	YPSPWTT	0,07	184	E1, Polyp	Inesp.
7	>7C_7	YPSPWPF	0,07	137	Core, Polyp	Inesp.
8	>8C_7	YPWPAHT	0,07	42	Core, Polyp	Esp.
9	>9C_7	YNWPSST	0,07	184	Polyp	Inesp.
10	>10C_7	YPFPSFP	0,07	800	Polyp, E2	Inesp.
11	>11C_7	YPWPLPD	0,07	13	Core	Esp.
12	>12C_7	YPFPTVD	0,07	800	E2, Polyp	Esp.
13	>13C_7	FPWPDMP	0,07	137	Polyp, Core	Esp.
14	>14C_7	YPPFAL	0,07	800	Core	Esp.
15	>15C_12	YVWPETRMNVH	0,04	42	NS5a	Esp.
16	>16C_12	LPWPLTPSLSSS	0,04	76	E1, Polyp	Esp.
17	>17C_12	YGWPEAHQSKPA	0,04	331	Core, Polyp	Inesp.
18	>18C_12	DTGPNEPRSSTT	0,04	4.0	Core, Polyp	Esp.
19	>19C_12	YPWP.SPLSETS	0,04	42	NS3, Polyp, Core	Esp.
20	>20C_12	YEWPTAAVRPAS	0,04	76	Polyp, Pol	Esp.
21	>21C_12	YPWPPMDSMLMY	0,04	9.7	Core, Polyp	Esp.
22	>22C_12	YPWPNEHSSIQN	0,04	32	Core	Esp.
23	>23C_12	YPWPTLSRTTAP	0,04	23	Core, Polyp	Esp.
24	>24C_12	YPWPPIAQLSLH	0,08	9.7	Core, Polyp	Esp.
25	>25C_12	FPWPTYDTPASY	0,04	42	Core, Polyp	Esp.
26	>27C_12	YPWPDYLTQRNA	0,04	18	Core, Polyp	Esp.
27	>28C_12	LPWPRMLPVIPI	0,04	76	Polyp, NS4	Inesp.
28	>29C_12	YPWPISYFMTPA	0,04	9.7	Core, Polyp	Esp.
29	>30C_12	YFPFSAFHTGVK	0,04	32	E2, Polyp	Esp.
30	>31C_12	YSWPSFHTEAAS	0,04	184	Core, Polyp	Esp.
31	>32C_12	IPWPTPDQPPPL	0,04	23	Polyp	Inesp.
32	>33C_12	YFPPLSPTLARE	0,04	32	E1, Polyp	Inesp.
33	>34C_12	YPWPNMQPPPWP	0,04	18	Polyp, Core	Esp.
34	>35C_12	YPWPTTVKNLVT	0,04	42	Core, Polyp	Esp.
35	>36C_12	MPWPETSTHTTR	0,04	32	Polyp	Esp.
36	>37C_12	MLPQQLMSSHLH	0,04	42	Polyp	Esp.
37	>38C_C7C	APLPHCC	0,04	444	E2, Polyp	Inesp.
38	>39C_C7C	AFPWPSS	0,04	42	Core	Esp.
39	>40C_C7C	AYPWPIT	0,38	9.7	Core	Esp.

40	>42C_C7C	AYPWPVPWC	0,04	13	Core, Polyp	Esp.
41	>47C_C7C	TPHWPLF	0,04	102	Polyp	Esp.
42	>48C_C7C	PTRSSAT	0,04	444	Pol, Polyp, NS5a	Esp.
43	>51C_C7C	PFPWWVP	0,04	444	Polyp	Inesp.
44	>52C_C7C	HPSTTAS	0,04	444	Polyp, NS5a	Inesp.
45	>53C_C7C	WSPHQRT	0,04	247	Polyp, NS5a	Inesp.
46	>54C_C7C	AYPWPTT	0,04	18	Core	Esp.
47	>55C_C7C	PFPWWAP	0,08	444	E2, Polyp, NS5a	Inesp.
48	>58C_C7C	AYPW PSS	0,04	18	Core	Esp.
49	>59C_C7C	SVSPLPF	0,04	444	Pol, Polyp, NS5a	Inesp.

Onde: Nomenclatura clones: nº clone+C+_Biblioteca;

Core: proteína do capsídeo do HCV;

E1: proteína do envelope de HCV 1;

E2: proteína do envelope de HCV 2;

NS3: proteína não-estrutural 3 do HCV;

NS4: proteína não-estrutural 4 do HCV;

NS5a: proteína não-estrutural 5a do HCV;

Polyp: poliproteína do HCV;

Pol: proteína polimerase do HCV.

Os peptídeos selecionados para hepatite B apresentaram valores de E (medida de confiabilidade do valor de alinhamento, *score*) entre 11 e 2239 de indicando que o alinhamento pode não ser específico o suficiente. Aqueles selecionados para hepatite C apresentaram valores entre 3 e 800. Contudo, para ambas as doenças os valores de E estão bastante elevados, fato que pode ser atribuído às seqüências peptídicas serem bastante curtas, o que dificulta a obtenção de um bom alinhamento (valores mais baixos de E) frente a um banco de dados amplo.

Deste modo, a utilização dos valores de E como parâmetro para seleção de peptídeos, baseando-se nos alinhamentos às proteínas dos bancos de dados, mostrou ser um parâmetro não-confiável para a seleção de moléculas de potencial aplicabilidade, fato ainda mais evidenciado por diversos peptídeos terem alinhado inespecificamente com duas ou mais proteínas diferentes.

Para ambas as doenças foram identificadas inespecificamente outras proteínas dos vírus que não as reconhecidas pelos MAb's utilizados no *bio-panning*. Isto ocorreu possivelmente devido às curtas seqüências dos peptídeos alinhados frente a um grande banco de dados, o que era esperado frente a qualquer banco de dados conforme previamente mencionado.

Portanto, dadas as limitações de confiabilidade dos dados obtidos por BLASTP (altos valores de E e alinhamento a proteínas não utilizadas no *bio-panning*), para a seleção final dos clones de maior aplicabilidade, foram realizados ensaios imunoenzimáticos dos clones de maior representatividade para verificar se a presença majoritária de suas seqüências estava diretamente relacionada à maior afinidade às moléculas-alvo.

5.4.2 Avaliação dos clones selecionados frente aos pools de anticorpos monoclonais utilizados no *bio-panning*

Inicialmente foram selecionados de três a seis clones cujos peptídeos possuíam maior maior quantidade de motivos conservados (Tabelas 14 e 15), de um a dois clones de baixa representatividade, o *output* do terceiro ciclo de *bio-panning* de cada biblioteca como controle positivo (por possuir o *pool* de representantes de maior afinidade), dois clones obtidos pela técnica de *Phage Display* para seleção de alvos contra sífilis e HTLV-I e um clone de hepatite C para teste dos peptídeos de HBV ou um clone de hepatite B para teste dos peptídeos de HCV, como controle negativo (no total três controles negativos) do ensaio imunoenzimático (Tabela 17).

Este primeiro ensaio imunoenzimático teve como objetivo verificar se a presença de uma seqüência de alta representatividade de certos resíduos em diversos clones estava diretamente relacionada à afinidade ao alvo. Nesta avaliação foram utilizadas placas sensibilizadas com os *pools* de anticorpos monoclonais empregados no processo de *bio-panning*.

Tabela 17 – Clones selecionados para realização de ELISA frente ao *pool* de MAbS de HBV utilizados no *bio-panning*.

Biblioteca	Clones Testados	Represent.	Controle Positivo	Controles Negativos
Ph.D. 12	25B_12	0,04	<i>Output</i> 3º Ciclo de <i>Bio-panning</i>	Clone Sífilis Clone HTLV-I Clone 47C_C7C (Hepatite C)
	27B_12	0,08		
	31B_12	0,04		
	33B_12	0,08		
Ph.D. 7	5B_7	0,04		
	10B_7	0,08		
	21B_7	0,04		
Ph.D. C7C	46B_C7C	0,04		
	47B_C7C	0,25		
	49B_C7C	0,04		
	57B_C7C	0,04		

Todos os clones foram testados nas diluições 1×10^{10} (1EXP10) e 1×10^9 (1EXP09). Os resultados da análise dos clones de hepatite B estão representados na Figura 38.

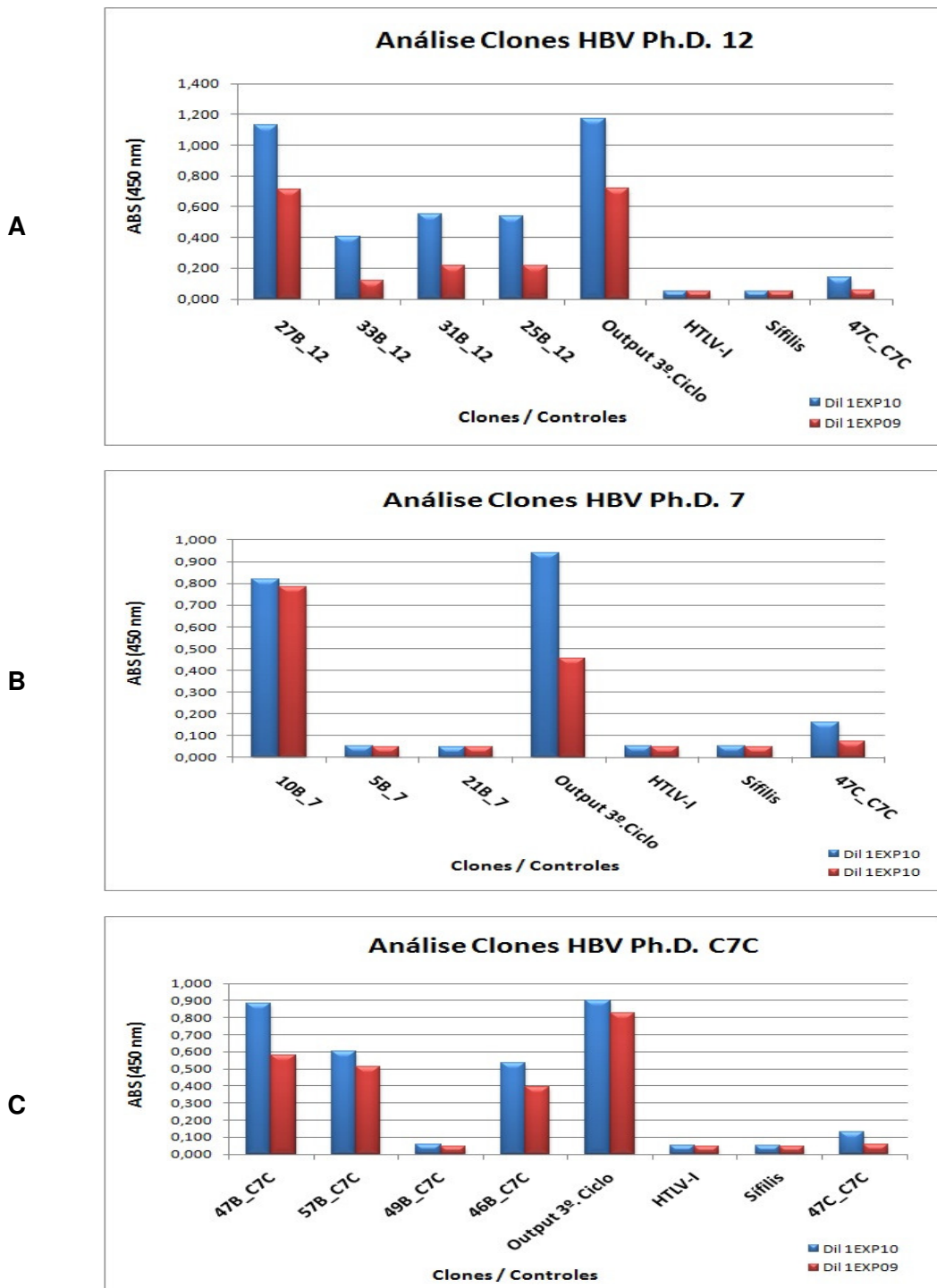


Figura 38 – Ensaio imunoenzimático dos clones selecionados de diferentes representatividades para HBV a partir das bibliotecas Ph.D. 12 (A), Ph.D. 7 (B) e Ph.D. C7C (C) frente ao *pool* de MAbs utilizado no *bio-panning*.

Conforme analisado anteriormente, a seleção para hepatite B utilizando a biblioteca Ph.D 12 não apresentou a seleção de peptídeos contendo uma seqüência prioritária, de modo que o clone 27B_12 (cuja seqüência estava presente em dois clones selecionados) foi o único a apresentar uma leitura de absorbância compatível com afinidade ao alvo, ou seja, com leitura de absorbância a 450 nm superior a 0,8 e compatível com a leitura obtida pelo controle positivo.

Para a biblioteca Ph.D 7 apenas o clone 10B_7, de maior representatividade, apresentou afinidade ao alvo quando testado isoladamente frente ao *pool* de MAbs, obtendo leitura de absorbância próxima ao controle positivo.

Os clones obtidos para hepatite B na seleção da biblioteca Ph.D. C7C possuíam em sua maioria o mesmo peptídeo, caracterizando uma forte seqüência de grande representatividade. Através do ensaio imunoenzimático pode-se definir que apenas este peptídeo presente majoritariamente e representado pelo clone 47B_C7C possui potencial aplicabilidade, haja vista o baixo sinal de absorbância (entre 0,05 e 0,6) dos outros clones testados.

Portanto, foram selecionados 3 clones de potencial aplicabilidade para hepatite B, um de cada biblioteca de peptídeos randômicos, todos de maior representatividade dentre os peptídeos selecionados, fato que corrobora com a hipótese de que a representatividade dos peptídeos está diretamente relacionada com a afinidade dos mesmos às moléculas-alvo utilizadas no *bio-panning* (Tabela 18).

O fato de um peptídeo representado em apenas dois clones fornecer um sinal bastante satisfatório no ELISA (clone 27B_12 e 10B_7) demonstra que futuramente outros clones pré-selecionados poderão ser avaliados, pois possuem capacidade de fornecer um bom sinal quando avaliados individualmente.

Tabela 18 – Peptídeos de potencial aplicabilidade selecionados para o vírus da hepatite B.

Peptídeos de potencial aplicabilidade para Hepatite B		
Clone	Seqüência nucleotídica	Seqüência aminoacídica
10B_7	TATACTATTTATCCGACGCAT	YTIYPTH
47B_C7C	GCTTGTTGGCCGCTTTCTTTTCCTTCTTGC	WPLSFPS
27B_12	GTTTCATCCGTGGTTTGATTATGATGCTTAGGCTTGG	VHPWFDYDAQAW

Conforme mencionado anteriormente na avaliação dos dados de seqüenciamento, a seleção de peptídeos bastante diversos para hepatite B poderia ser um indício de seleção de clones com baixa afinidade ao alvo. Entretanto, os resultados dos ensaios imunoenzimáticos indicam que existe afinidade ao alvo, por mais diversos que sejam os peptídeos selecionados.

Paralelamente, o fato de um peptídeo representado em apenas dois clones fornecer um sinal bastante satisfatório no ELISA (clones 27B_12 e 10B_7) demonstra que futuramente outros clones pré-selecionados poderão ser avaliados, pois possuem capacidade de fornecer um bom sinal quando avaliados individualmente.

Na Tabela 19 constam os clones de hepatite C que foram pré-selecionados nas etapas anteriores para terem sua afinidade aos anticorpos monoclonais de HCV testadas em ELISA.

Tabela 19 – Clones selecionados para realização de ELISA frente ao pool de MAbs de HCV utilizados no *bio-panning*.

Biblioteca	Clones Testados	Represent.	Controle Positivo	Controles Negativos
Ph.D. 12	23C_12	0,04	<i>Output</i> 3º Ciclo de <i>Bio-panning</i>	Clone Sífilis Clone HTLV-I Clone 54B_C7C (Hepatite B)
	24C_12	0,08		
	28C_12	0,04		
	37C_12	0,04		
Ph.D. 7	1C_7	0,07		
	2C_7	0,07		
	4C_7	0,07		
	5C_7	0,07		
	8C_7	0,07		
	11C_7	0,07		
	12C_7	0,07		
Ph.D. C7C	40C_C7C	0,38		
	47C_C7C	0,04		
	48C_C7C	0,04		
	51C_C7C	0,04		
	55C_C7C	0,08		
	58C_C7C	0,04		

Todos os clones foram testados nas diluições 1×10^{10} (1EXP10) e 1×10^9 (1EXP09). Os resultados da análise dos clones de hepatite B estão representados na Figura 39.

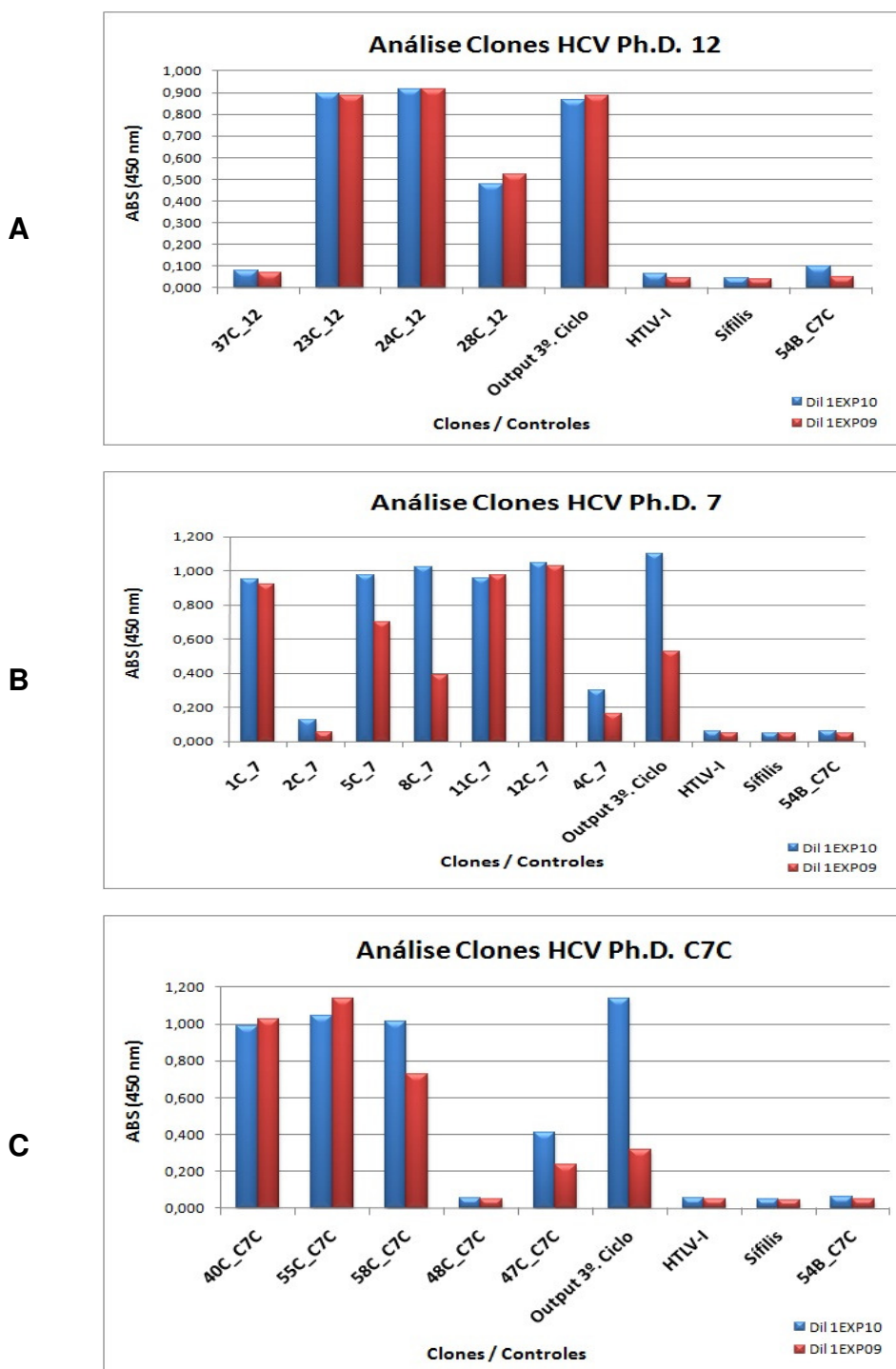


Figura 39 – Ensaio imunoenzimático dos clones selecionados de diferentes representatividades para HCV a partir das bibliotecas Ph.D. 12 (A), Ph.D. 7 (B) e Ph.D. C7C (C) frente ao *pool* de MABs utilizado no *bio-panning*.

Os resultados preliminares de seqüenciamento e alinhamento demonstravam que a seleção para HCV da biblioteca Ph.D. 12 possuía um motivo bastante conservado e representado em diversos clones selecionados. O ensaio imunoenzimático confirmou a afinidade destes clones ao alvo (absorbância acima de 0,8 e compatível com controle positivo), indicando os clones 23C_12 e 24C_12 como de potencial aplicabilidade. Ou seja, apesar de o clone 23C_12 não apresentar alta representatividade (não possuir muitas cópias), ele possui um motivo altamente conservado, o qual está igualmente presente no peptídeo 24C_12 (este porém presente em maior quantidade). Conforme esperado, o clone 37C_12, por não possuir qualquer seqüência majoritariamente selecionada, apresentou uma baixa afinidade ao alvo.

Para a biblioteca Ph.D. 7, conforme analisado anteriormente, foram observados diversos clones contendo uma mesma seqüência majoritária, com algumas modificações entre si. O teste da afinidade destes clones em ensaio imunoenzimático demonstrou que os clones 1C_7, 5C_7, 8C_7, 11C_7 e 12C_7 possuem potencial aplicabilidade e todos possuem a seqüência acima mencionada. Isto demonstra que a afinidade para hepatite C pode estar diretamente relacionada à presença destas regiões altamente representativas, pois os peptídeos apresentaram um resultado bastante satisfatório apesar de não serem idênticos.

De todas as seleções realizadas, a de hepatite C para a biblioteca Ph.D. C7C foi a que apresentou um peptídeo de maior representatividade e outros contendo uma seqüência em comum prevalente. Os dados do ELISA comprovam que estes clones obtidos possuem alta afinidade ao alvo e, portanto, os peptídeos 40C_C7C, 51C_C7C e 58C_C7C foram selecionados como de potencial aplicabilidade.

Analisando os resultados obtidos nos ensaios imunoenzimáticos juntamente com os resultados obtidos por BLASTP, foi possível confirmar que a presença destes motivos altamente conservados está diretamente relacionada com maior afinidade ao alvo no caso da hepatite C.

Ou seja, os clones com maior representatividade na seleção e/ou que possuem seqüências altamente conservadas dentre o *pool* selecionado, tiveram afinidade confirmada ao *pool* de anticorpos monoclonais utilizados para a seleção no *bio-panning*

A lista dos clones de potencial aplicabilidade selecionados para hepatite C está descrita na Tabela 20.

Tabela 20 – Peptídeos de potencial aplicabilidade selecionados para o vírus da hepatite C.

Peptídeos de potencial aplicabilidade para Hepatite C		
Clone	Seqüência nucleotídica	Seqüência aminoacídica
23C_12	TATCCGTGGCCGACGCTGAGTCGTAACGGCTCCG	YPWPTLSRTTAP
24C_12	TATCCTTGGCCTATTGCGCAGATTGCGTCGCTGCAT	YPWPPIAQLASLH
1C_7	TATCCGTGGCCGCTGGGTAGG	YPWPLGR
5C_7	TTTCCGTGGCCTGTGAAGCAG	FPWPVKQ
8C_7	TATCCTTGGCCTGCGCATACT	YPWPAHT
11C_7	TATCCTTGGCCGCTTCCTGAT	YPWPLPD
12C_7	TATCCTTTTCCTACTGTTGAT	YPFPTVD
40C_C7C	GCTTGTGCTTATCCTTGGCCTATTACTTAC	AYPWPIT
51C_C7C	GCTTGTCCCTTTTCCGTGGTGGGTTCCCTTGC	PFPPWWVP
58C_C7C	GCTTGTGCGTATCCGTGGCCTTCGTTCGTGC	AYPWPSS

Neste caso, diferentemente dos clones testados para hepatite B, aqueles peptídeos de HCV cujas seqüências ou parte delas não estavam presentes majoritariamente no *pool* podem ser considerados sem potencial aplicabilidade para futuras avaliações.

5.4.3 Avaliação da afinidade dos clones selecionados como de potencial aplicabilidade frente aos anticorpos monoclonais isoladamente em ensaio imunoenzimático

Os clones selecionados como de potencial aplicabilidade no primeiro ensaio imunoenzimático foram submetidos a um segundo ensaio imunoenzimático (ELISA de

abertura de *pool*s), no qual eles foram testados frente a cada anticorpo monoclonal separadamente, com o objetivo de detectar se a afinidade estava relacionada à presença de um MAb do *pool* em específico. As absorvâncias foram analisadas tendo como referência o sinal obtido utilizando o *pool* de anticorpos monoclonais correspondente.

Os resultados dos ensaios imunoenzimáticos da abertura do *pool* de anticorpos monoclonais utilizados para a seleção de peptídeos para hepatite B estão representados na Figura 40.

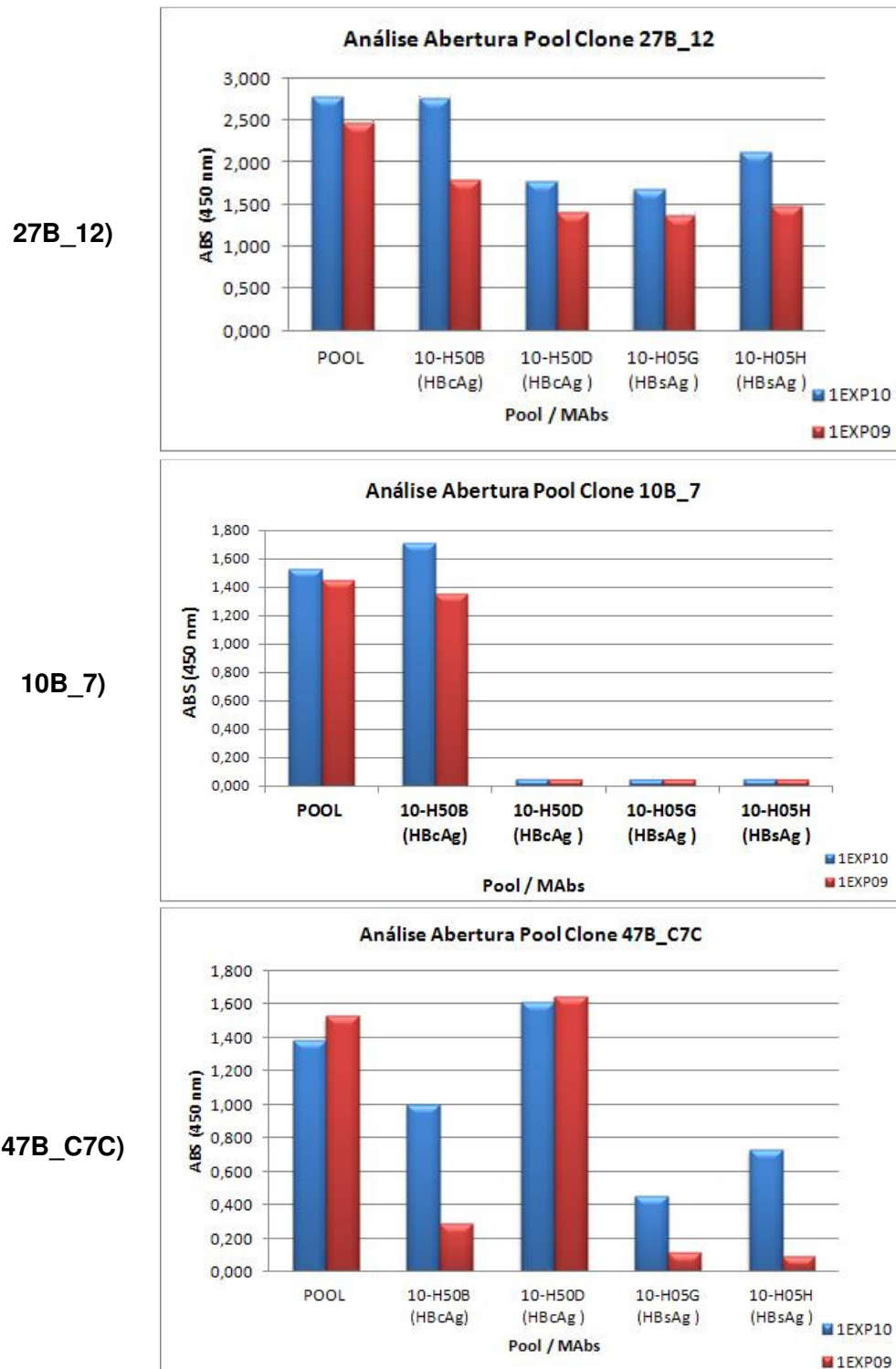


Figura 40 – Ensaio imunoenzimático para avaliação individual dos MABs de hepatite B utilizados para o *bio-panning* das bibliotecas Ph.D. 12, Ph.D. 7 e Ph.D. C7C.

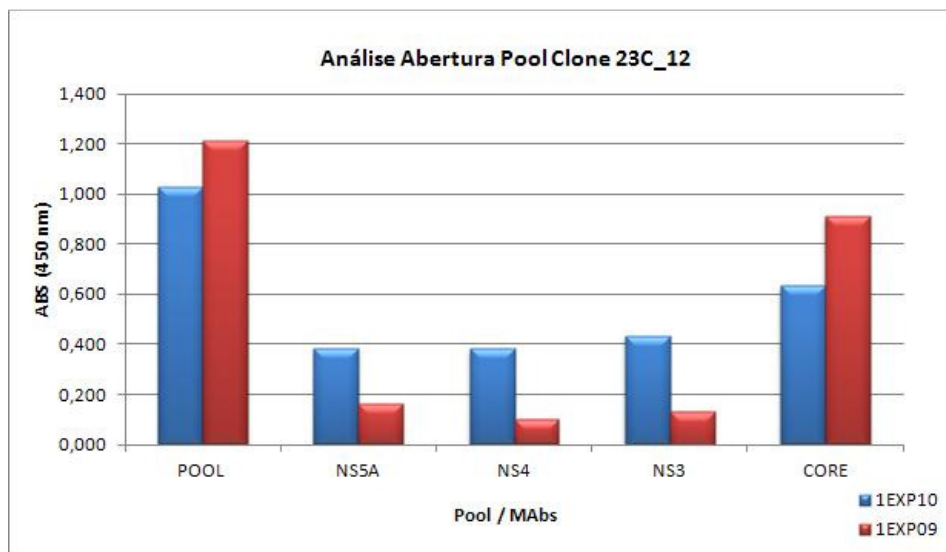
O clone 27B_12 apresentou afinidade relativamente alta para todos os anticorpos monoclonais utilizados para sua seleção, com maior seleção para o MAb de proteína do capsídeo (HBcAg, clone 10-H50B). O clone 10B_7 apresentou afinidade ao mesmo anticorpo monoclonal do capsídeo do vírus da hepatite B (clone 10-50B).

O clone 47B_C7C apresentou maior afinidade por ambos os MAbs do capsídeo (HBcAg) do vírus HBV, mas com relativa afinidade às proteínas de superfície (HBsAg) também.

Uma possível explicação para o reconhecimento simultâneo de diferentes MAbs, como ocorreu para os clones 27B_12 e 47C_C7C é a possibilidade de os quatro anticorpos monoclonais utilizados compartilharem curtas seqüências (até doze resíduos) de aminoácidos em seus epítomos (o fabricante não fornece as seqüências), longas o suficiente para que o mesmo peptídeo as reconheça ou que tenha ocorrido alguma interferência no ELISA, resultando em sinais inespecíficos para estes clones.

Os resultados dos ensaios imunoenzimáticos da abertura do *pool* de anticorpos monoclonais utilizados para a seleção de peptídeos para hepatite C estão representados nas Figuras 41, 42, 43 e 44.

23C_12)



24C_12)

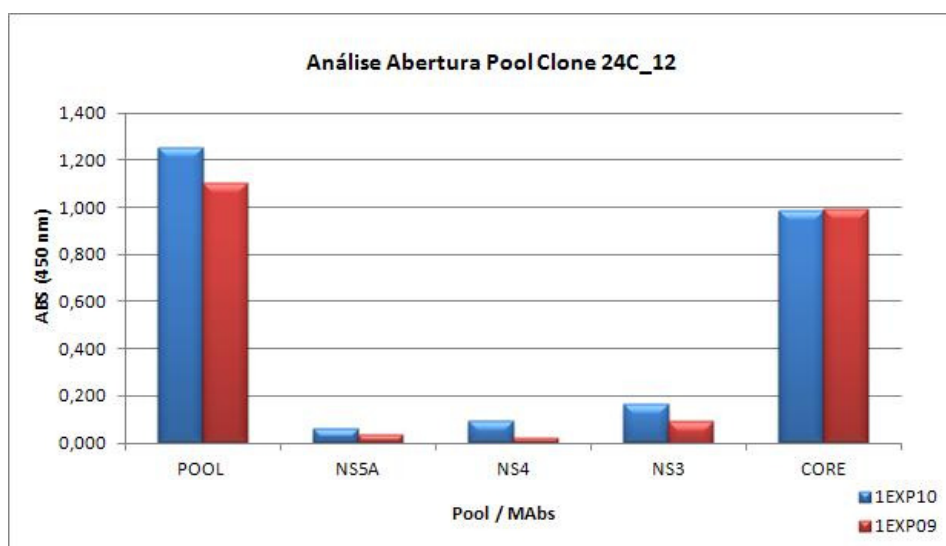


Figura 41 – ELISA para avaliação da afinidade dos peptídeos selecionados frente aos MAbs de hepatite C utilizados para o *bio-panning* da biblioteca Ph.D. 12.

A análise do clone 23C_12 permite avaliar que ele possui uma grande afinidade pela proteína de capsídeo (*Core*) do HCV, apresentando relativamente baixa afinidade aos demais alvos de seleção. O mesmo ocorre com o clone 24C_12, o qual apresentou afinidade apenas à proteína do capsídeo.

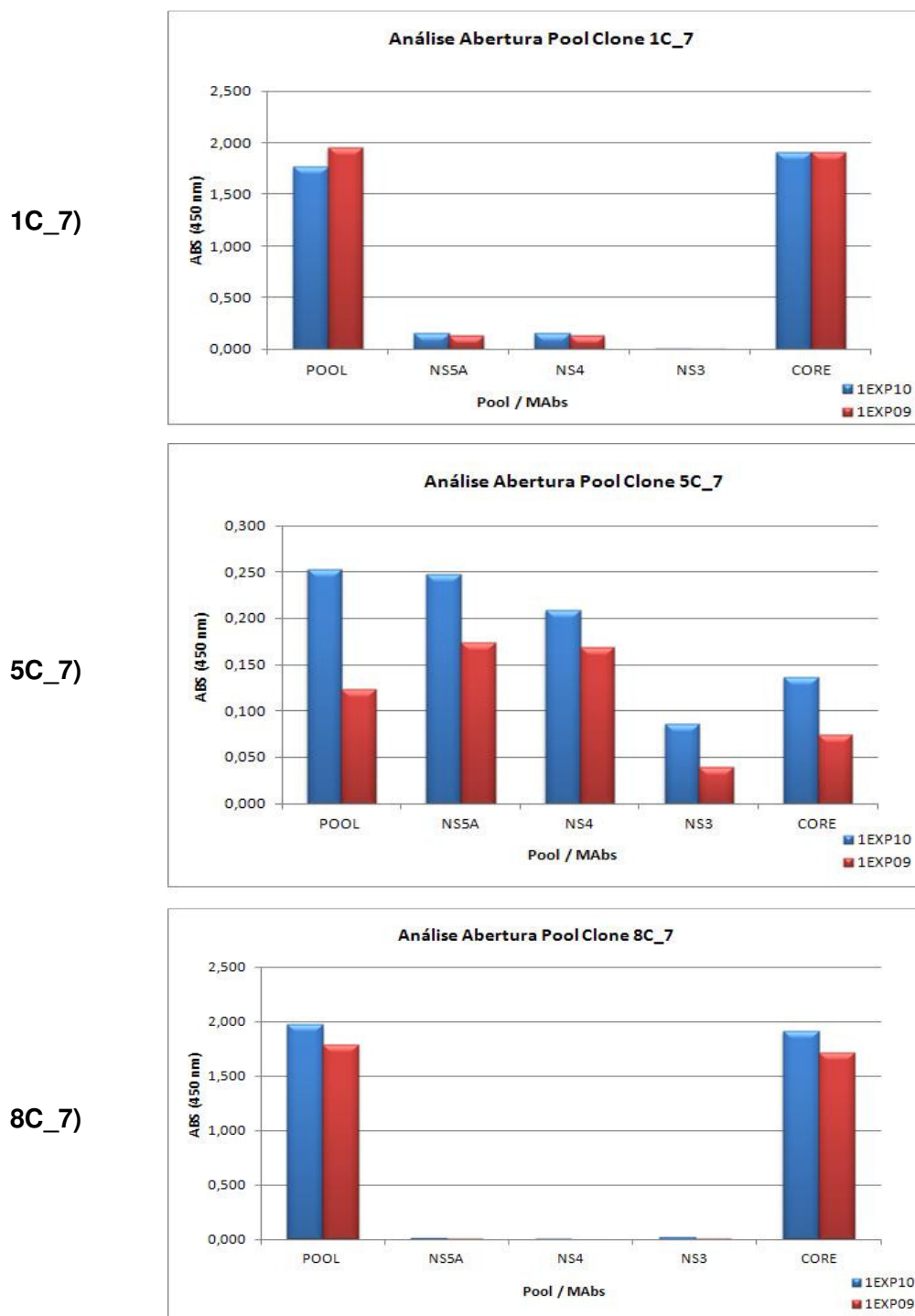
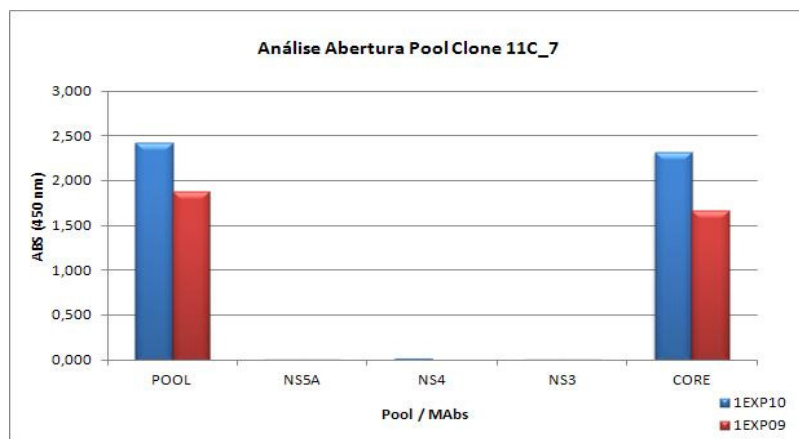


Figura 42 – ELISA para avaliação da afinidade dos peptídeos 1C_7, 5C_7 e 8C_7 selecionados frente aos MAbs de hepatite C utilizados para o *bio-panning* da biblioteca Ph.D. 7.

O clone 1C_7 demonstrou através do ensaio imunoenzimático afinidade exclusiva à proteína de capsídeo do HCV. O mesmo ocorreu para o clone 8C_7.

Por sua vez, o clone 5C_7 apresentou afinidade levemente superior à proteína NS5a do HCV, porém com baixa afinidade a todos os anticorpos monoclonais utilizados para seleção, uma vez que os sinais de absorvância podem ser considerados relativamente baixos.

11C_7)



12C_7)

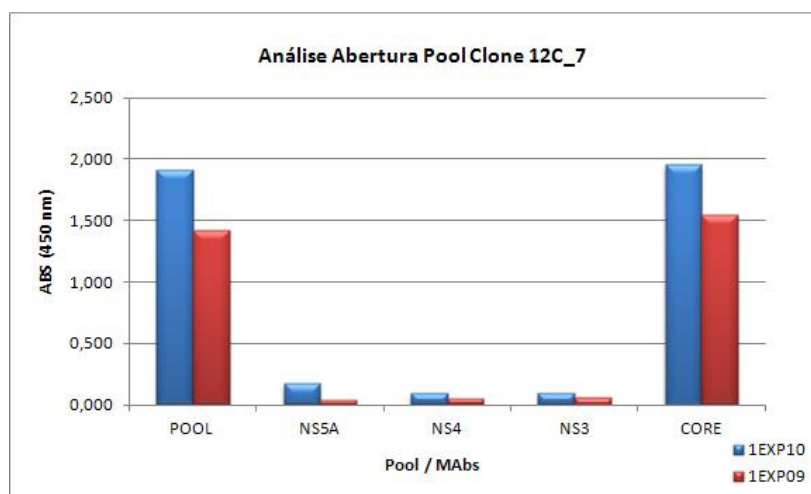
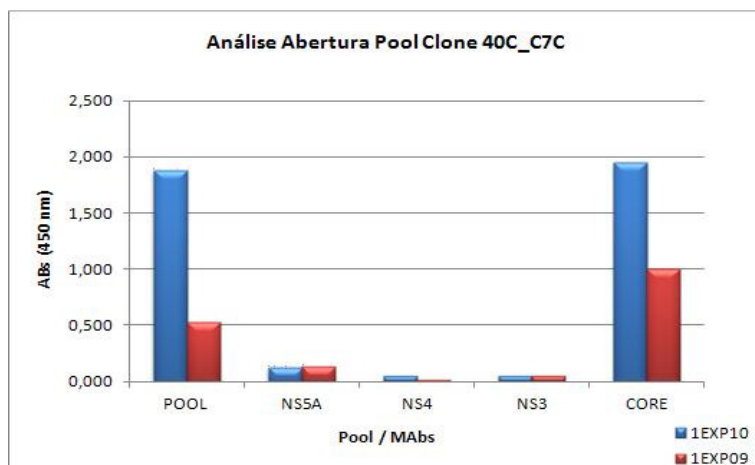


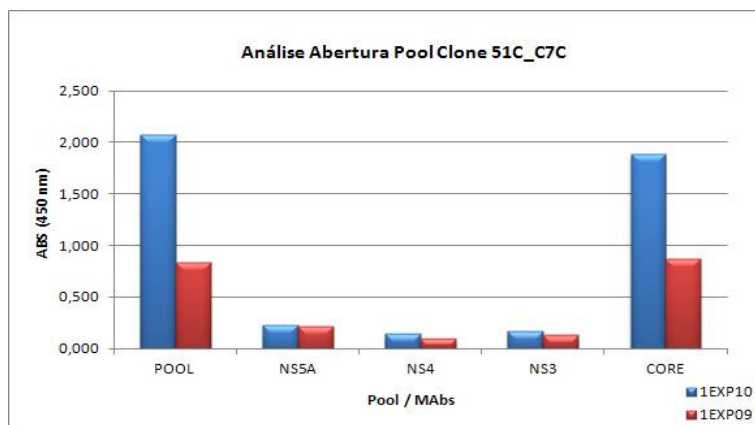
Figura 43 – ELISA para avaliação da afinidade dos peptídeos 11C_7 e 12C_7 selecionados frente aos MAbs de hepatite C utilizados para o *bio-panning* da biblioteca Ph.D. 7.

O mesmo comportamento de afinidade à proteína *core* foi observado para os clones 11C_7 e 12C_7. Uma possível explicação neste caso é a grande similaridade existente entre as seqüências dos peptídeos selecionados, pois quase a totalidade dos peptídeos selecionados para a hepatite C possuem a mesma seqüência majoritária de peptídeos.

40C_C7C)



51C_C7C)



58C_C7C)

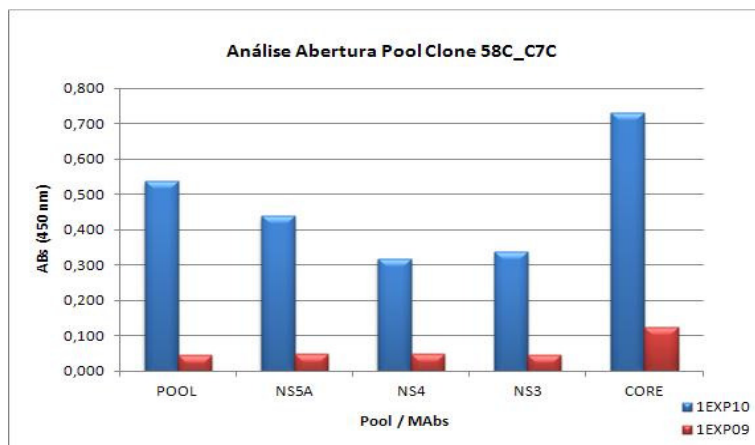


Figura 44 – ELISA para avaliação da afinidade dos peptídeos selecionados frente aos MAbs de hepatite C utilizados para o *bio-panning* da biblioteca Ph.D. C7C.

Os clones 40C_C7C e 51C_C7C tiveram grande afinidade pela proteína *core* do vírus da hepatite C, quando comparados ao sinal obtido de afinidade ao *pool* de MAb (utilizado como referência).

No entanto, o peptídeo 58C_C7C apresentou uma afinidade considerável por todos os alvos utilizados em sua seleção, com maior afinidade para a proteína *core* do HCV. Conforme explicado anteriormente, uma possível explicação para o reconhecimento simultâneo de diferentes MAb é a possibilidade de os quatro anticorpos monoclonais utilizados compartilharem curtas seqüências em seus epítomos, longas o suficiente para que o mesmo peptídeo as reconheça ou que tenha ocorrido alguma interferência no ELISA, resultando em sinais inespecíficos.

Inserindo a seqüência da proteína *core* do vírus da hepatite C obtida no NCBI (*National Center for Biotechnology Information* – Centro Nacional de Informações para Biotecnologia) com os a seqüência predominantemente representada nas três bibliotecas triadas para hepatite C, é possível identificar o local de alinhamento dos peptídeos na mesma (Figura 45).

```

HCV-Core          MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVRATR 50
Sequencia-Majoritaria-YPWP -----

HCV-Core          KTSERSQPRGRRQPIPKARQPEGRANAQPCYPWPLYGNEGGMGAGWLLSP 100
Sequencia-Majoritaria-YPWP -----
                                     YPWP----- 4
                                     ****

HCV-Core          RGSRPSWGPTDPRRRSRNLGKVIDTLTCGFADLMGYIPLVGAPLGGAARA 150
Sequencia-Majoritaria-YPWP -----

HCV-Core          LAHGVRVLEDGVNYATGNLPGCSFSIFLLALLSCLTIPASA 191
Sequencia-Majoritaria-YPWP -----

```

Figura 45 – Alinhamento da seqüência aminoacídica majoritária YPWP selecionada para o vírus da hepatite C frente à proteína do capsídeo viral (*core*).

Ao analisarmos os resultados do ELISA de abertura do *pool* de MAb com o alinhamento dos peptídeos aos bancos de dados de hepatite B e hepatite C por BLASTP, podemos constatar que os MAb de maior afinidade no ELISA não corresponderam, na maioria dos casos, às respectivas proteínas-alvo alinhadas nos bancos de dados.

Conforme análise realizada anteriormente do BLASTP, na qual foram especificadas

as limitações de interpretação e confiabilidade quando são alinhados grandes bancos de dados e curtas seqüências aminoacídicas, podemos afirmar que o ensaio imunoenzimático é a ferramenta mais adequada para determinar possíveis alvos de especificidade quando o objetivo é identificar uma proteína-alvo dentre o *pool* de MAb's utilizados para a seleção dos peptídeos.

5.5 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DOS PEPTÍDEOS SELECIONADOS COMO DE POTENCIAL APLICABILIDADE PARA O IMUNODIAGNÓSTICO EM ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO FRENTE A AMOSTRAS DE SOROS DE PACIENTES

A avaliação preliminar dos peptídeos obtidos frente a amostras de soro de pacientes foi realizada tendo como representante o clone 23C_12, o qual foi avaliado através de ensaio imunoenzimático frente à três *pools* de amostras positivas e três *pools* de amostras negativas de pacientes para hepatite C (Figura 46).

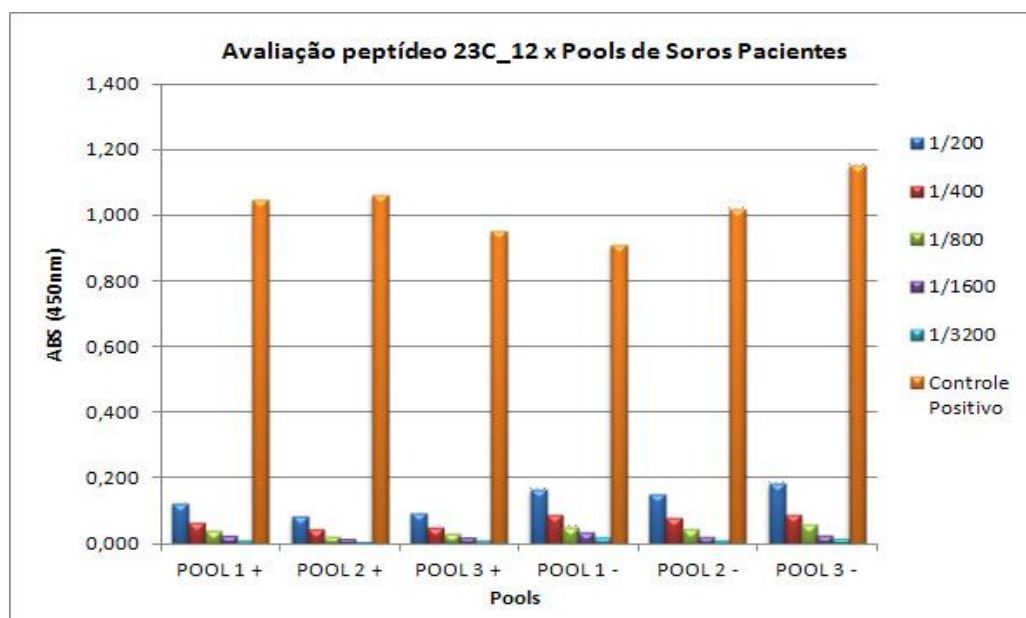


Figura 46 – ELISA preliminar frente a soros de pacientes utilizando como representante o peptídeo 23C_12.

Avaliando a figura acima é possível concluir que, apesar de o peptídeo reconhecer com bastante especificidade o controle positivo contra o qual foi selecionado (*pool* de MAbs para hepatite C), ele foi incapaz de fornecer um sinal satisfatório de detecção quando testado frente a uma amostra de paciente contendo baixa representatividade de anticorpos específicos.

Este resultado aponta a necessidade da obtenção destes peptídeos sem os artefatos associados à presença do fago para a realização de estudos mais específicos sobre quais interações estão ocorrendo. Para isto, os peptídeos de potencial aplicabilidade foram transferidos para o vetor pMAL-pIII (itens a seguir).

5.6 TRANSFERÊNCIA DOS PEPTÍDEOS DE POTENCIAL APLICABILIDADE PARA O VETOR PMAL-PIII

Para a futura realização de mais estudos sobre interações peptídeos/anticorpos das seqüências selecionadas, como uma alternativa à síntese química, os clones selecionados como de potencial aplicabilidade para o imunodiagnóstico de hepatite B e de hepatite C (Tabelas 18 e 19) foram transferidos para o vetor pMAL-pIII, para realizar a expressão destes peptídeos como fusões solúveis monovalentes à Proteína de Ligação à Maltose (MBP – *Maltose Binding Protein*) utilizando o vetor pMAL-pIII.

A transferência destas seqüências para um plasmídeo é igualmente uma maneira de viabilizar a produção dos peptídeos fusionados à MBP, de modo a poder ser testado sem todos os artefatos relacionados à presença do fago fusionado, além de uma opção para manutenção destes peptídeos viáveis e prontamente recuperáveis.

Inicialmente as seqüências dos peptídeos foram amplificadas por PCR. Os insertos amplificados foram detectados por gel de agarose 1% (Figura 47).

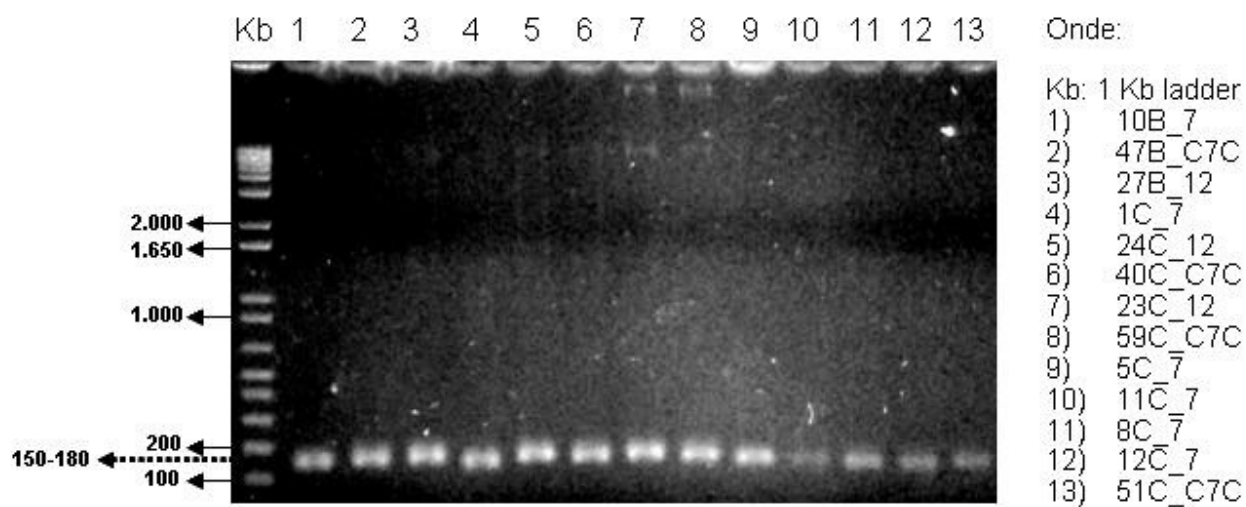


Figura 47 – Gel de agarose 1% dos insertos amplificados dos clones selecionados de potencial aplicabilidade.

Após a amplificação os produtos de PCR foram purificados e digeridos com as enzimas *Acc65I* e *EagI*. O vetor pMAL-pIII foi digerido sob as mesmas condições.

A digestão do vetor pMAL-pIII foi visualizada em gel de agarose 1%. Em seguida a banda de vetor digerido foi excisada e purificada (Figura 48).

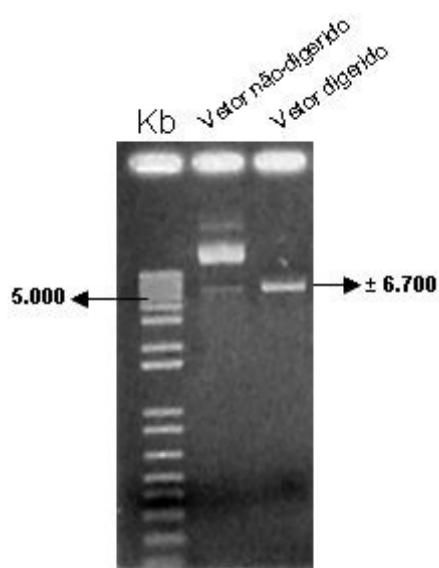


Figura 48 – Gel de agarose 1% do vetor pMAL-pIII digerido e não-digerido.

Os insertos amplificados e digeridos foram aplicados em gel 8% de poliacrilamida não-desnaturante. Em seguida as bandas foram excisadas e purificadas pelo método de *CRUSH and SOAK* (SAMBROOK & RUSSEL, 2006) (Figura 49).

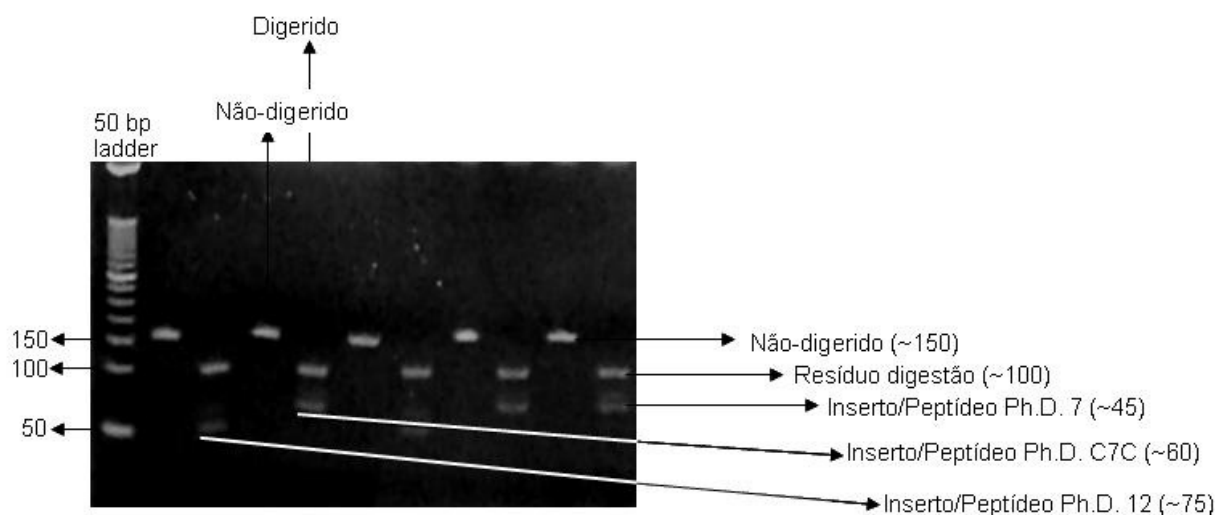


Figura 49 – Gel representativo de 8% de poliacrilamida utilizado para visualização e purificação das digestões dos insertos.

Uma vez obtidos os insertos e vetor, digeridos e purificados, foi realizada a ligação

dos mesmos utilizando a T4 DNA Ligase e a transformação dos insertos subclonados para o plasmídeo em *E. coli* K12 ER 2738 eletrocompetentes.

A partir de diluições das células transformadas foram preparadas, por *toothpick*, *master plates* para seleção de clones contendo os insertos desejados. Como controle foi utilizada uma transformação apenas do vetor sem inserto.

As colônias selecionadas foram amplificadas por PCR para detecção do inserto, utilizando *iniciadores* desenhados para amplificar cerca de 150 pb a montante do inserto e 150 pb a jusante, resultando em um amplicon com cerca de 400 pares de base (Figura 50).

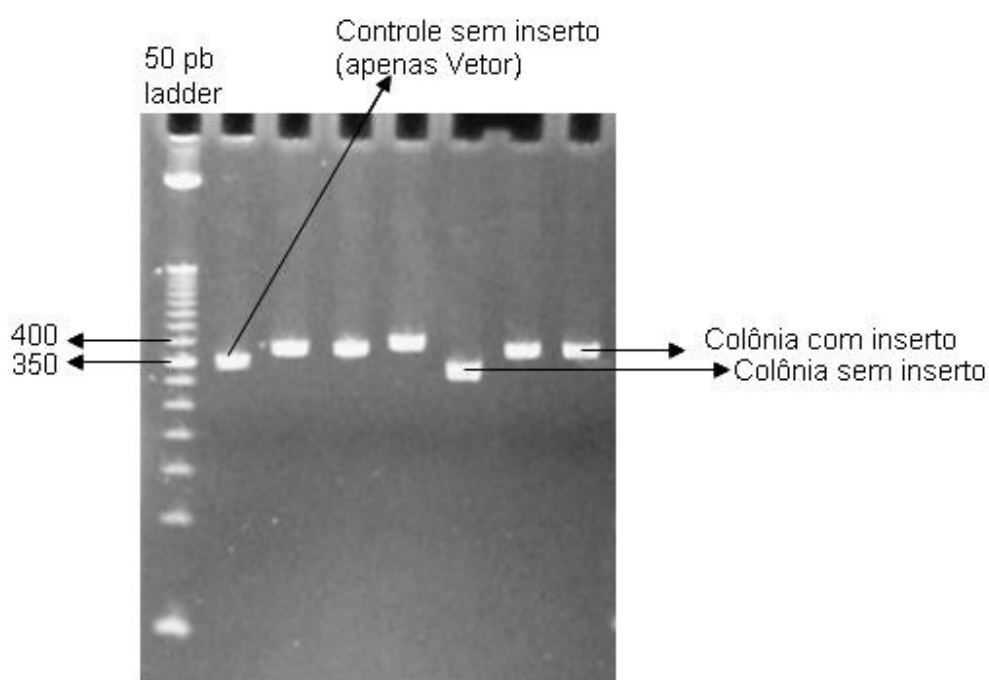


Figura 50 – Exemplo de gel de 8% de poliacrilamida não-desnaturante utilizado para triagem das colônias amplificadas contendo os insertos.

Foram preparadas culturas das colônias selecionadas para extração do material genético das mesmas com kit de MiniPrep. Este material genético foi então enviado para seqüenciamento para verificação da presença dos insertos, sendo que a mesma foi confirmada para todos os clones selecionados.

Deste modo, deverão ser realizados, em trabalhos futuros, testes de expressão destes peptídeos inseridos no vetor pMAL-pIII, bem como otimização de protocolos de

purificação dos mesmos para sua utilização em estudos de interação peptídeo/anticorpos para hepatite B e hepatite C, comparando também seu desempenho frente a peptídeos sintetizados quimicamente.

6 CONCLUSÃO

O trabalho desenvolvido possibilitou a seleção de três peptídeos com potencial aplicabilidade para imunodiagnóstico de hepatite B e de dez com potencial aplicabilidade para hepatite C, selecionados a partir do *bio-panning* de três bibliotecas comerciais de peptídeos randômicos obtidas por *Phage Display*.

A avaliação dos ciclos de seleção por ensaios imunoenzimáticos garantiu que a cada etapa fossem selecionadas as moléculas de maior potencial, considerando a afinidade dos peptídeos aos anticorpos monoclonais utilizados em *pool* para a triagem, os quais reconhecem as proteínas atualmente utilizadas nos testes comerciais aplicados para triagem sorológica nos bancos de sangue do Brasil.

A identificação de seqüências majoritariamente enriquecidas presentes nos peptídeos selecionados para as três bibliotecas utilizadas indicam possíveis epítomos para a detecção de anticorpos virais, os quais podem, portanto, vir a ser utilizados futuramente em tecnologias nacionais para diagnóstico.

Apesar da prospecção de biomoléculas através técnica de *Phage Display* ser bastante trabalhosa e requerer investimento de recursos, ela é uma ferramenta de grande potencial para o desenvolvimento de insumos nacionais que possibilitem a substituição dos reagentes de diagnóstico importados atualmente empregados em diversos programas de saúde nacionais.

Com a transferência dos peptídeos selecionados para o vetor de clonagem pMAL-pIII, estas seqüências estão prontamente disponíveis para a produção destas moléculas e realização de estudos futuros sobre a interação delas frente a amostras de pacientes, bem como para comparação entre o desempenho dos peptídeos clonados e daqueles obtidos por síntese química (peptídeos sintéticos).

A partir dos dados obtidos no presente trabalho é possível também o início de uma nova frente de pesquisa através do desenho de moléculas quiméricas contendo os melhores alvos selecionados, as quais poderão ser modificadas de modo a otimizar interações antígeno/proteína.

REFERÊNCIAS

Altschul, S., WOOTTON, J., GERTZ, M., AGARWALA, R., MORGULIS, A., SCHAFFER, A., YU, Y. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices, **FEBS J.** 272:5101-5109, 2005.

Altschul, S., MADDEN, T., SCHAFFER, A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, **Nucleic Acids Res.** 25:3389-3402, 1997.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Manual Técnico para Investigação da Transmissão de Doenças pelo Sangue. Série A: Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2004.

ANZOLA, M, BURGOS, J. Hepatitis C virus (HCV): model structure and genome organization. **Expert Reviews in Molecular Medicine.** Vol 5 (19), 2003.

ANZOLA, M., Hepatocellular Carcinoma: Role of Hepatitis B and Hepatitis C Viruses Proteins in Hepatocarcinogenesis. **J Viral Hepat.** 11(5), 2004.

AZZAZY, H., HIGHSMITH, E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. **Clinical Biochemistry.** 35: 425-445, 2002.

BARBAS, C. F.; BURTON, D. R.; SCOTT, J. K.; SILVERMAN, G. J. Phage display - A laboratory manual, 1st ed. Cold Spring Harbor: **Cold Spring Harbor Laboratory Press,** 2001.

BLUM, H., ZHANG Z., GALUN E. Hepatitis B virus X protein is not central to the viral life cycle in vitro. **J Virol.** 66: 1223-1227, 1992.

BRATS - Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde. Ano II, nº. 3 (2007). Disponível em: <http://200.214.130.94/rebrats/publicacoes/Brats03.pdf>. Acesso em 22 de Novembro de 2010.

CASEY, J., COLEY, A., PARISI, K., FOLEY, M. Peptide mimics selected from immune sera

using phage display technology can replace native antigens in the diagnosis of Epstein-Barr virus infection. **Protein Engineering, Design & Selection**. Vol.22, nº.2: 85-91, 2009.

CHEVALIEZ, S., PAWLOTSKY, JM. HCV Genome and Lifecycle. In: Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology. Tan SL, Norfolk (UK), **Horizon Bioscience**, 2006.

ELAZAR, M., LIU, P., RICE, C., GLENN, J. An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins and HCV RNA replication. **J Virol**. 78: 11393-11400, 2004.

EROGLU, Ç., PINARBASI, E. Hepatitis C virus: genome organization, viral proteins and implications in disease pathogenesis. **Turk J Biol**. 24:153-369, 2000.

FONSECA, J. História natural da hepatite crônica B. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 40(6): 672-677, 2007.

FRANCK, N., LE SEYEC, J., GUGUEN-GUILLOUZO, C., ERTMANN, L. Hepatitis C virus NS2 protein is phosphorylated by the protein kinase CK2 and target for degradation to the proteasome. **J Virol**. 29: 2700-2708, 2005.

GADELHA, C. Desenvolvimento, Complexo Industrial da Saúde e Política Industrial. **Rev. Saúde Pública**, 40(C Esp):11-23, 2006.

GONZALEZ, M., CARRASCO, L. Viroporins. **FEBS Lett**. 552: 28-34, 2003.

JUNQUEIRA, P.C., ROSENBLIT, J., HAMERSCHLAK, N. História da Hemoterapia no Brasil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**. 27 (3): 201-207, 2005

KANN, M., BISCHOF, A., GERLICH, W. In vitro model for the nuclear transport of the hepadnavirus genome. **Journal of Virology**. 71(2): 1310-1316, 1997.

KAO J.H., CHEN, P.J., LAI, M.Y., CHEN, D.S. Occult hepatitis B virus infection and clinical outcomes of patients with chronic hepatitis C. **J Clin Microbiol**.40(11):4068-71, 2002.

KAO, JH. Role of viral factor in the natural course and therapy of chronic hepatitis B. **Hepatol Int**. 1:415-430, 2007.

KONTHUR, Z., CRAMERI, R. High-throughput applications of phage display in proteomic analysis. **TARGETS**. Vol.2 n^o. 6: 261-270, 2003.

LAUER, G., WALKER, B. Hepatitis C virus infection. **Engl J Med**. 345: 1425, 2001.

LESBURG, C., CABLE, M., FERRARI, E., HONG, Z., MANNARINO, A., WEBER, P., Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. **Nat Struc Biol**. 6: 937-943, 1999.

LIAW, YF., CHU, MC. Hepatitis B virus infection. **The Lancet**. 373: 582-92, 2009.

LINDENBACH, B., RICE, C. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. **Nature**. Vol: 436: 933-938, 2005.

LOCARNINI, S., FELD, J. Antiviral therapy for hepatitis B virus infections: new targets and technical challenges. **Journal of Clinical Virology**. 25: 267-283, 2002.

LOWMAN, H. Bacteriophage display and discovery of peptide leads for drug development. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct**. 26:401-424, 1997.

OMS - Organização Mundial da Saúde. Fact Sheet: Hepatitis B. Disponível em: http://www.who.int/immunization_delivery/adc/gavi_hepb_factsheet.pdf. Acesso em 28 de Dezembro de 2010.

OMS - Organização Mundial da Saúde. **Weekly Epidemiological Record**. 77: 41-48, 2002.

PAWLOTSKY, JM. Molecular Diagnosis of Viral Hepatitis. **Gastroenterology**. 122: 1554-1568, 2002.

PAWLOTSKY, JM. Therapy of hepatitis C: from empiricism to cure. **Hepatology**. 43: S207-S220, 2006.

PENIN, F., BRASS, V., APPEL, N., RAMBOARINA, S., MONTSERRET, R., FICHEUX, D., BLUM, H., BARTENSCHLAGER, R., MORADPOUR, D. Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A **J Biol Chem**. 279:

40835-40843, 2004a.

PENIN, F., DUBUISSON, J., REY, F., MORADPOUR, D., PAWLITSKY, JM. Structural biology of hepatitis C virus. **Hepatology**. 39(1): 5-19, 2004b.

ROSINI, N.; MOUSSE, D.; SPADA, C.; TREITINGER, A. Seroprevalence of HbsAg, Anti-HBc and Anti-in Southern Brazil, 1999-2001. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. 7(4): 262-267, 2003.

RUSSEL, M., LOWMAN, H. B., CLACKSON, T. Introduction to phage biology and phage display. In: CLACKSON, T.; LOWMAN, H. B. (Org.) Phage display. Oxford: **Oxford Unity Press**, p.1-26, 2004.

SAMBROOK, J. RUSSEL, D. The condensed protocols. From molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2006.

SCOTT, J. Peptide Libraries. In: BARBAS, C., BURTON, D., SCOTT, J., SILVERMAN, G. Phage display - A laboratory manual, 1st ed. **Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 4.1-4.10, 2001a.

SCOTT, J., BARBAS, C. Phage-Display Vectors. In: BARBAS, C., BURTON, D., SCOTT, J., SILVERMAN, G. Phage display - A laboratory manual, 1st ed. Cold Spring Harbor: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2.1-2.17, 2001a.

SCOTT, J., IRVING, M., PAN, O. Random-peptide libraries and antigen-fragment libraries for epitope mapping and the development of vaccines and diagnosis. **Current Opinion in Chemical Biology**. 5: 314-324, 2001b.

SEEGER, C., MASON, W. Hepatitis B Virus Biology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. Vol.64 n^o.1: 51-68, 2000.

SERGEEVA, A., KOLONIN, M., MOLLDREM, J., PASQUALINI, R, ARAP, W. Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents. **Adv Drug Deliv Rev**. 58(15): 1622-1654, 2006.

SIDHU, S. Phage display in pharmaceutical biotechnology. **Current Opinion in**

Biotechnology. 11: 610-616, 2000.

SMITH, G., PETRENKO, V. Phage Display. **Chem Rev.** 97: 391-410, 1997.

SUMMERS, J., MASON, WS. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. **Cell.** 29:403-15, 1992.

TAVIS, J., PERRI S., GANEM, D. Hepadnavirus reverse transcription initiates within the stem-loop of the RNA packaging signal and employs a novel strand transfer. **Journal of Virology.** 68: 3536-3543, 1994.

TAYLOR, L., GHOLAM, P., DELONG, A., RAMPALO, A., KLEIN, R., SCHUMAN, P., GARDNER, L., CARPENTER, C. Occult hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) viremia in women with and at-risk for HIV/AIDS. **XVII International AIDS Conference (AIDS 2008).** Mexico City, 2008.

THOMSON, B. Hepatitis C virus: the growing challenge. **British Medical Bulletin.** 89: 153-167, 2009.

WEBSTER, R. Filamentous Phage Biology. In: BARBAS, C., BURTON, D., SCOTT, J., SILVERMAN, G. Phage display - A laboratory manual, 1st ed. Cold Spring Harbor: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1.1-1.29, 2001.

WILLATS, W. Phage display: practicalities and prospects. **Plant Molecular Biology.** 50: 837-854, 2002.

YAGER, P., DOMINGO, G., GERDES, John. Point-of-care diagnostics for global health. **Annu. Rev. Biomed. Eng.** 10:107-44, 2008.

ZEKRI, AR., HAFEZ, M., MOHAMED, N., HASSAN, Z., EL-SAYED, M., KHALED, M., MANSOUR, T. Hepatitis B virus (HBV) genotypes in Egyptian pediatric cancer patients with acute and chronic active HBV infection. **Virology Journal.** 4:74, 2007.

ZOU, S., TEPPER, M., GIULIVI, A. Current status of hepatitis C in Canada. **Can J Public Health.** 91 Suppl 1:S10-5, S10-6, 2000.

ZUCKERMAN, A. Medical Microbiology. 4th ed. **Baron S editor**. The University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.

ZWICK, M., BONNYCASTLE, L., NOREN, K., VENTURINI, K., LEONG E., BARBAS, C., NOREN, J., SCOTT, J. The maltose-binding protein as a scaffold for monovalent display of peptides derived from phage libraries. **Analytical Biochemistry**. 264: 87-97, 1998.

ZWICK, M., SHEN, J., SCOTT, J. Phage-displayed peptide libraries. **Current Opinion in Biotechnology**. 9: 427-436, 1998.

ANEXOS

ANEXO A – BLASTP 2.2.22 DOS CLONES SELECIONADOS PARA HEPATITE B
EM TODAS AS BIBLIOTECAS

BLASTP 2.2.22 CLONES HBV

Biblioteca	nº.	HBV	nº.	HCV	nº.	HBV
PhD - 7	1	HPVTFPS	-	-	-	-
PhD - 7	2	VRTHTYA	-	-	-	-
PhD - 7	3	YSIEAPS	-	-	-	-
PhD - 7	4	ARLPALP	-	-	-	-
PhD - 7	5	KNWVPTT	-	-	-	-
PhD - 7				-	-	-
PhD - 7				-	-	-
PhD - 7	6	HTLNANP	-	-	-	-
PhD - 7	7	VFGATFD	-	-	-	-
PhD - 7	8, 30	LIRATVA	-	-	-	-
PhD - 7	9	DPLISQE	-	-	-	-
PhD - 7	10, 19	YTIYPH	-	-	19	Query: 1 YTIYPH 7
PhD - 7				-		YTIYPH
PhD - 7				-		Sbjct: 1 YTIYPH 7
PhD - 7	11	NPLEGYS	-	-	-	-
PhD - 7				-		-
PhD - 7				-		-
PhD - 7	12	THAWLAS	-	-	-	-
PhD - 7	13	SPTFFDT	-	-	-	-
PhD - 7	14, 15	QSVPRTG	-	-	30	Query: 1 QSVPR 5
PhD - 7				-		+ PR
PhD - 7				-		Sbjct: 7 NATPR 11
PhD - 7				-	18	Query: 4 PRT 6
PhD - 7				-		PR+
PhD - 7				-		Sbjct: 7 PRS 9
PhD - 7	15, 14	QSVPRTG	-	-	-	-
PhD - 7	16	GYHSNHL	-	-	-	-
PhD - 7	17	SNPNKEP	-	-	-	-
PhD - 7	18	HIWYTPW	-	-	-	-
PhD - 7	19, 10	YTIYPH	-	-	-	-
PhD - 7	20	NPPP.SL	34	Query: 3 PP 4	-	-
PhD - 7				PP		-
PhD - 7				Sbjct: 8 PP 9		-
PhD - 7			26	Query: 5 SL 6		-
PhD - 7				SL		-
PhD - 7				Sbjct: 10 SL 11		-

PhD - 7				Query: 5 SL 6		-
PhD - 7			24	SL		-
PhD - 7				Sbjct: 10 SL 11		-
PhD - 7	21	TRVPQSF	-	-	-	-
PhD - 7				-		-
PhD - 7	22	STWHATL	-	-	-	-
PhD - 7				-		-
PhD - 7	23	TTLRLQL	-	-	-	-
PhD - 7				-		-
PhD - 7				-		-
PhD - 7	24	ELSRLSG	-	-	-	-
PhD - 7				-		-
PhD - 7				-		-
PhD - 7				-		-
PhD - 7				-		-
PhD - 12	25	STSSISHGSGR	-	-	-	-
PhD - 12				-		Query: 9 LGTS 12
PhD - 12	26	TQAMKPDRLGTS	-	-	42	LGTS
PhD - 12				-		Sbjct: 3 LGTS 6
PhD - 12				Query: 2 HPWFDY 7		-
PhD - 12			27	+PW DY		-
PhD - 12				Sbjct: 1 YPWPDY 6		-
PhD - 12	27, 43	VHPWFDYDA.AW		Query: 3 PWFYDA 9	-	-
PhD - 12			25	PW YD		-
PhD - 12				Sbjct: 2 PWPTYDT 8		-
PhD - 12				-		-
PhD - 12	28	NNMMTTTTPFENW	-	-	-	-
PhD - 12				-		-
PhD - 12				-		-
PhD - 12				-		-
PhD - 12	29	SSPDRTLHISL	-	-	31	Query: 1 SSP 3
PhD - 12				-		+SP
PhD - 12				-		Sbjct: 6 TSP 8
PhD - 12				Query: 2 FYHPTNATP 10		Query: 4 HPTNATP 10
PhD - 12	30	TFYHPTNATPRL	25	F PT TP	39	PT TP
PhD - 12				Sbjct: 1 FPWPTYDTP 9		Sbjct: 6 QPTYLTP 12
PhD - 12				-		-
PhD - 12	31	LENVATSPPYPR	-	-	-	-
PhD - 12				-		-
PhD - 12				-		-
PhD - 12	32	ANMNALGSTNQN	-	-	-	-
PhD - 12	33, 38	AEFTQTKSFYNS	-	-	-	-
PhD - 12	34	EGKFQQMSLNSV	-	-	-	-
PhD - 12	35	SPRANSFNTDAH	-	-	-	-
PhD - 12				-		Query: 1 QWMHHPQI 8
PhD - 12	36	QWMHHPQIDPEL	-	-	61	WM HP
PhD - 12				-		Sbjct: 1 SWMRHPSC 8
PhD - 12				-		-
PhD - 12	37	NSQQQTLHHRGE	-	-	-	-
PhD - 12				-		-

PhD - 12	38, 33	AEFTQTKSFYNS	-	-	-	-	
PhD - 12	39	QMVLTQPTYLTP	25	Query: 7 PTYLTP 12	30	Query: 6 QPTYLTP 12	
PhD - 12				PTY TP		PT TP	
PhD - 12				Sbjct: 4 PTYDTP 9		Sbjct: 4 HPTNATP 10	
PhD - 12	40	EEHICFTSHCPR	-	-	-	-	
PhD - 12	41	SIQSAILAARLY	-	-	-	-	
PhD - 12	42	FDLGTSARINPR	-	-	26	Query: 3 LGTS 6	
PhD - 12				-		LGTS	
PhD - 12				-		Sbjct: 9 LGTS 12	
PhD - 12	43, 27	VHPWFDYDA.AW	25	Query: 3 PWFYDA 9	-	-	
PhD - 12				PW YD		-	
PhD - 12				Sbjct: 2 PWPTYDT 8		-	
PhD - 12			27	Query: 2 HPWFDY 7		-	
PhD - 12				+PW DY		-	
PhD - 12				Sbjct: 1 YPWPDY 6		-	
PhD - 12	44	EDVLRWHPEWPG	-	-	-	-	
PhD - 12				-		-	
PhD - 12				-		-	
PhD - 12				-		-	
PhD - 12				-		-	
PhD - 12				-		-	
PhD - 12	45	VANASLQVEGTS	-	-	-	-	
PhD-C7C	46	PFPSLT	2	Query: 4 PSLT 7	-	-	
PhD-C7C				PSLT		-	
PhD-C7C				Sbjct: 4 PSLT 7		-	
PhD-C7C	47, 52, 53, 56, 58, 59	WPLSFPS	-	-	-	-	
PhD-C7C				-		-	
PhD-C7C				-		-	
PhD-C7C	48	LSSTYPP	-	-	51	Query: 1 LSSTYPP 7	
PhD-C7C				-		LS +YP	
PhD-C7C				-		Sbjct: 1 LSLSYPA 7	
PhD-C7C	49	LNAPPTA	34	Query: 1 LNAPP 5	-	-	
PhD-C7C				+ PP		-	
PhD-C7C				Sbjct: 6 MQPPP 10		-	
PhD-C7C	50	LSSASTR	-	-	-	-	
PhD-C7C				-		-	
PhD-C7C				-		-	
PhD-C7C	51	LSLSYPA	-	-	48	Query: 1 LSLSYPAC 8	
PhD-C7C				-		LS +YP C	
PhD-C7C				-		Sbjct: 1 LSSTYPPC 8	
PhD-C7C				29	Query: 1 LSL 3	-	-
PhD-C7C					+SL		-
PhD-C7C					Sbjct: 9 ISL 11		-
PhD-C7C	52, 58, 56, 53,	WPLSFPS	-	-	-	-	
PhD-C7C				-		-	

PhD-C7C	47, 59			-		-
PhD-C7C	53, 52,	WPLSFPS	-	-	-	-
PhD-C7C	58, 56,			-		-
PhD-C7C	47, 60			-		-
PhD-C7C	54	ALDPLHL	-	-	-	-
PhD-C7C	55	PPWLLPS	11	Query: 2 PWLLPS 7	-	-
PhD-C7C				PW LP		-
PhD-C7C				Sbjct: 2 PWPLPD 7		-
PhD-C7C	56, 52,	WPLSFPS	-	-	-	-
PhD-C7C	58, 53,			-		-
PhD-C7C	47, 59			-		-
PhD-C7C	57	ACSMPPQ	-	-	-	-
PhD-C7C	58,	WPLSFPS	-	-	-	-
PhD-C7C	47, 52,			-		-
PhD-C7C	53, 56,			-		-
PhD-C7C	59					
PhD-C7C	59, 58,	WPLSFPS	-	-	-	-
PhD-C7C	47, 52,			-		-
PhD-C7C	53, 56			-		-
PhD-C7C	60	NTPALSA	16	Query: 2 TPALSA 7	-	-
PhD-C7C				TP+LS+		-
PhD-C7C				Sbjct: 6 TPSLSS 11		-
PhD-C7C	61	SWMRHPS	-	-	36	Query: 1 SWMRHPSC 8
PhD-C7C				-		WM HP
PhD-C7C				-		Sbjct: 1 QWMHHPQI 8

ANEXO B - BLASTP 2.2.22 DOS CLONES SELECCIONADOS PARA HEPATITE C EM TODAS AS BIBLIOTECAS

BLASTP 2.2.22 HCV

Biblioteca	nº.	HCV	nº.	HBV	nº.	HCV
PhD - 7	1	YPWPLGR			24, 26	Query: 1 YPWPLGR 7
PhD - 7						YPWP+ +
PhD - 7						Sbjct: 1 YPWPIAQ 7
PhD - 7					11	Query: 1 YPWPL 5
PhD - 7						YPWPL
PhD - 7						Sbjct: 1 YPWPL 5
PhD - 7					29	Query: 1 YPWPLG 6
PhD - 7						YPWP+
PhD - 7						Sbjct: 1 YPWPI 6
PhD - 7					40,41,43,44,45,46, 49,50,56	Query: 1 YPWPL 5
PhD - 7						YPWP+
PhD - 7						Sbjct: 2 YPWPI 6
PhD - 7					35	Query: 1 YPWPL 4

PhD - 7						YPWP
PhD - 7						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD - 7						Query: 1 YPWP 4
PhD - 7						YPWP
PhD - 7				22		Sbjct: 1 YPWP 4
PhD - 7						Query: 1 YPWP 4
PhD - 7						YPWP
PhD - 7				27		Sbjct: 1 YPWP 4
PhD - 7						Query: 1 YPWP 4
PhD - 7						YPWP
PhD - 7				23		Sbjct: 1 YPWP 4
PhD - 7						Query: 1 YPWP 4
PhD - 7						YPWP
PhD - 7				58		Sbjct: 2 YPWP 5
PhD - 7						Query: 1 YPWP 4
PhD - 7						YPWP
PhD - 7				54		Sbjct: 2 YPWP 5
PhD - 7						Query: 1 YPWP 4
PhD - 7						YPWP
PhD - 7				19		Sbjct: 1 YPWP 4
PhD - 7						Query: 1 YPWP 4
PhD - 7						YPWP
PhD - 7				8		Sbjct: 1 YPWP 4
PhD - 7						Query: 1 YPWPL 5
PhD - 7						YPWP+
PhD - 7				42		Sbjct: 2 YPWPV 6
PhD - 7						Query: 1 YPWP 4
PhD - 7						YPWP
PhD - 7				21		Sbjct: 1 YPWP 4
PhD - 7						Query: 1 YPWPLG 6
PhD - 7						YP+PL
PhD - 7				33		Sbjct: 1 YPFPLS 6
PhD - 7						Query: 2 PWPL 5
PhD - 7						PWPL
PhD - 7				16		Sbjct: 2 PWPL 5
PhD - 7						Query: 1 YPWP 4
PhD - 7						YPWP
PhD - 7				34		Sbjct: 1 YPWP 4
PhD - 7						
PhD - 7						Query: 1 YGWPSLT 7
PhD - 7						Y WPS T
PhD - 7				9		Sbjct: 1 YNWPSST 7
PhD - 7						Query: 1 YGWPS 5
PhD - 7				17		YGWP
PhD - 7						Sbjct: 1 YGWPE 5
PhD - 7	2	YGWPSLT				Query: 1 YGWPSL 6
PhD - 7				31		Y WPS
PhD - 7						Sbjct: 1 YSWPSF 6
PhD - 7				15		Query: 2 GWPS 5
PhD - 7						WPS

PhD - 7						Sbjct: 4 NWPS 7
PhD - 7						Query: 4 PSLT 7
PhD - 7					46	PSLT
PhD - 7						Sbjct: 4 PSLT 7
PhD - 7	3	YYWPHNL			34	Query: 3 WP 4
PhD - 7						WP
PhD - 7						Sbjct: 11 WP 12
PhD - 7	4	YYFPTLP				
PhD - 7						Query: 1 FPWPV 5
PhD - 7					25	FPWP
PhD - 7						Sbjct: 1 FPWP 5
PhD - 7						Query: 1 FPWP 4
PhD - 7					39	FPWP
PhD - 7	5	FPWPVKQ				Sbjct: 2 FPWP 5
PhD - 7						Query: 1 FPWPV 5
PhD - 7					42	+PWPV
PhD - 7						Sbjct: 2 YPWPV 6
PhD - 7						Query: 1 FPWP 4
PhD - 7					13	FPWP
PhD - 7						Sbjct: 1 FPWP 4
PhD - 7	6	YPSWTT				Query: 1 YPSW 5
PhD - 7					7	YPSW
PhD - 7						Sbjct: 1 YPSW 5
PhD - 7						Query: 1 YPSW 5
PhD - 7						YPSW
PhD - 7					6	Sbjct: 1 YPSW 5
PhD - 7	7	YPSWPF				Query: 3 SPWPF 7
PhD - 7						SP PF
PhD - 7					59	Sbjct: 3 SPLPF 7
PhD - 7						Query: 2 PSPWP 6
PhD - 7						P PWP
PhD - 7					34	Sbjct: 8 PPPWP 12
PhD - 7						Query: 1 YPWPA 5
PhD - 7						YPWP+
PhD - 7					19	Sbjct: 1 YPWPS 5
PhD - 7						Query: 1 YPWPA 5
PhD - 7						YPWP
PhD - 7					35	Sbjct: 1 YPWPT 5
PhD - 7						Query: 1 YPWPA 5
PhD - 7						YPWP+
PhD - 7	8	YPWPAHT			58	Sbjct: 2 YPWPS 6
PhD - 7						Query: 1 YPWPAH 6
PhD - 7						YPWP +
PhD - 7					27	Sbjct: 1 YPWPDY 6
PhD - 7						Query: 1 YPWP 4
PhD - 7						YPWP
PhD - 7					22	Sbjct: 1 YPWP 4
PhD - 7						Query: 1 YPWP 4
PhD - 7						YPWP
PhD - 7					26	Sbjct: 1 YPWP 4

PhD - 7					Query: 1 YPWP 4
PhD - 7					YPWP
PhD - 7				24	Sbjct: 1 YPWP 4
PhD - 7					Query: 1 YPWP 4
PhD - 7					YPWP
PhD - 7				23	Sbjct: 1 YPWP 4
PhD - 7					Query: 1 YPWP 4
PhD - 7					YPWP
PhD - 7				56	Sbjct: 2 YPWP 5
PhD - 7					Query: 1 YPWP 4
PhD - 7					YPWP
PhD - 7				54	Sbjct: 2 YPWP 5
PhD - 7					Query: 1 YPWP 4
PhD - 7					YPWP
PhD - 7				50	Sbjct: 2 YPWP 5
PhD - 7					Query: 1 YPWP 4
PhD - 7					YPWP
PhD - 7				49	Sbjct: 2 YPWP 5
PhD - 7					Query: 1 YPWP 4
PhD - 7					YPWP
PhD - 7				46	Sbjct: 2 YPWP 5
PhD - 7					Query: 1 YPWP 4
PhD - 7					YPWP
PhD - 7				45	Sbjct: 2 YPWP 5
PhD - 7					Query: 1 YPWP 4
PhD - 7					YPWP
PhD - 7				44	Sbjct: 2 YPWP 5
PhD - 7					Query: 1 YPWP 4
PhD - 7					YPWP
PhD - 7				43	Sbjct: 2 YPWP 5
PhD - 7					Query: 1 YPWP 4
PhD - 7					YPWP
PhD - 7				41	Sbjct: 2 YPWP 5
PhD - 7					Query: 1 YPWP 4
PhD - 7					YPWP
PhD - 7				40	Sbjct: 2 YPWP 5
PhD - 7					Query: 1 YPWP 4
PhD - 7					YPWP
PhD - 7				1	Sbjct: 1 YPWP 4
PhD - 7					Query: 1 YPWP 4
PhD - 7					YPWP
PhD - 7				21	Sbjct: 1 YPWP 4
PhD - 7					Query: 1 YPWP 4
PhD - 7					YPWP
PhD - 7				29	Sbjct: 1 YPWP 4
PhD - 7					Query: 1 YPWP 4
PhD - 7					YPWP
PhD - 7				11	Sbjct: 1 YPWP 4
PhD - 7					Query: 1 YPWPA 5
PhD - 7				42	YPWP

PhD - 7						Sbjct: 2 YPWPV 6	
PhD - 7						Query: 1 YPWP 4	
PhD - 7						YPWP	
PhD - 7						34	Sbjct: 1 YPWP 4
PhD - 7						35	Query: 1 YPWPAH 6
PhD - 7							+ AH
PhD - 7						20	Sbjct: 7 FNTDAH 12
PhD - 7							Query: 4 PA 5
PhD - 7							PA
PhD - 7						Sbjct: 10 PA 11	
PhD - 7	9	YNWPSST				Query: 1 YNWPSST 7	
PhD - 7						2	Y WPS T
PhD - 7						31	Sbjct: 1 YGWPSLT 7
PhD - 7							Query: 1 YNWPS 5
PhD - 7						Y+WPS	
PhD - 7						58	Sbjct: 1 YSWPS 5
PhD - 7							Query: 1 YNWPS 6
PhD - 7							Y WPSS
PhD - 7						39	Sbjct: 2 YPWPS 7
PhD - 7							Query: 1 YNWPS 6
PhD - 7	+ WPSS						
PhD - 7	Sbjct: 2 FPWPSS 7						
PhD - 7	10	YPFSPF				Query: 1 YPFPS 5	
PhD - 7						30	YPFPS
PhD - 7						12	Sbjct: 1 YPFPS 5
PhD - 7							Query: 1 YPFPS 5
PhD - 7						YPFP+	
PhD - 7						58	Sbjct: 1 YPFPT 5
PhD - 7							Query: 1 YPFPS 5
PhD - 7							YP+PS
PhD - 7						33	Sbjct: 2 YPWPS 6
PhD - 7							Query: 1 YPFSPF 7
PhD - 7	YPFP P						
PhD - 7	19	Sbjct: 1 YPFPLSP 7					
PhD - 7		Query: 1 YPFPS 5					
PhD - 7	YP+PS						
PhD - 7	14	Sbjct: 1 YPWPS 5					
PhD - 7		Query: 1 YPFP 4					
PhD - 7		YPFP					
PhD - 7	Sbjct: 1 YPFP 4						
PhD - 7	11	YPWPLPD	55			Query: 2	
PhD - 7						PWPLPD 7	
PhD - 7						42	Query: 1 YPWPLP 6
PhD - 7						PW LP	YPWP+P
PhD - 7						Sbjct: 2 PWLLPS	Sbjct: 2 YPWPVP 7
PhD - 7						7	Query: 1 YPWPL 5
PhD - 7						1	YPWPL
PhD - 7	19	Sbjct: 1 YPWPL 5					
PhD - 7		Query: 1 YPWPLP 6					
PhD - 7	YPWP P						

PhD - 7						Sbjct: 1 YPWSP 6
PhD - 7						Query: 1 YPWPLPD 7
PhD - 7					26	YPWP+
PhD - 7						Sbjct: 1 YPWPIAQ 7
PhD - 7						Query: 1 YPWPLPD 7
PhD - 7					24	YPWP+
PhD - 7						Sbjct: 1 YPWPIAQ 7
PhD - 7						Query: 1 YPWPL 5
PhD - 7					56	YPWP+
PhD - 7						Sbjct: 2 YPWPI 6
PhD - 7						Query: 1 YPWPL 5
PhD - 7					50	YPWP+
PhD - 7						Sbjct: 2 YPWPI 6
PhD - 7						Query: 1 YPWPL 5
PhD - 7					49	YPWP+
PhD - 7						Sbjct: 2 YPWPI 6
PhD - 7						Query: 1 YPWPL 5
PhD - 7					46	YPWP+
PhD - 7						Sbjct: 2 YPWPI 6
PhD - 7						Query: 1 YPWPL 5
PhD - 7					45	YPWP+
PhD - 7						Sbjct: 2 YPWPI 6
PhD - 7						Query: 1 YPWPL 5
PhD - 7					44	YPWP+
PhD - 7						Sbjct: 2 YPWPI 6
PhD - 7						Query: 1 YPWPL 5
PhD - 7					43	YPWP+
PhD - 7						Sbjct: 2 YPWPI 6
PhD - 7						Query: 1 YPWPL 5
PhD - 7					41	YPWP+
PhD - 7						Sbjct: 2 YPWPI 6
PhD - 7						Query: 1 YPWPL 5
PhD - 7					40	YPWP+
PhD - 7						Sbjct: 2 YPWPI 6
PhD - 7						Query: 1 YPWPL 5
PhD - 7					29	YPWP+
PhD - 7						Sbjct: 1 YPWPI 5
PhD - 7						Query: 1 YPWP 4
PhD - 7					35	YPWP
PhD - 7						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD - 7						Query: 1 YPWP 4
PhD - 7					22	YPWP
PhD - 7						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD - 7						Query: 1 YPWP 4
PhD - 7					23	YPWP
PhD - 7						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD - 7						Query: 1 YPWP 4
PhD - 7					27	YPWP
PhD - 7						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD - 7					58	Query: 1 YPWP 4

PhD - 7	14	YPPFAL			25	Query: 1 FPWP 4		
PhD - 7						FPWP		
PhD - 7						Sbjct: 1 FPWP 4		
PhD - 7						34	Query: 2 PWP 4	
PhD - 7					PWP			
PhD - 7					Sbjct: 10 PWP 12			
PhD - 7						33	Query: 1 YPPFA 6	
PhD - 7					YPPFA +			
PhD - 7					Sbjct: 1 YPPPLS 6			
PhD - 7						30	Query: 1 YPPFA 6	
PhD - 7					YPPFA			
PhD - 7					Sbjct: 1 YPPSA 6			
PhD - 7						12	Query: 1 YPP 4	
PhD - 7					YPP			
PhD - 7					Sbjct: 1 YPP 4			
PhD - 7						10	Query: 1 YPP 4	
PhD - 7					YPP			
PhD - 7					Sbjct: 1 YPP 4			
PhD 12	15	YVWPETRMMNVH			36	Query: 3 WPET 6		
PhD 12						WPET		
PhD 12						Sbjct: 3 WPET 6		
PhD 12						34	Query: 3 WP 4	
PhD 12					WP			
PhD 12					Sbjct: 11 WP 12			
PhD 12	16	LPWPLTPSLSS		60	1	Query: 6 TPSLSS 11		
PhD 12						TP+LS+		
PhD 12							28	Query: 2 PWPL 5
PhD 12				Sbjct: 2 PWPL 5				
PhD 12							11	Query: 1 LPWP 4
PhD 12				LPWP				
PhD 12								Sbjct: 1 LPWP 4
PhD 12				Query: 2 PWPL 5				
PhD 12					PWPL			
PhD 12	Sbjct: 2 PWPL 5							
PhD 12	17	YGWPEAHQSKPA			29	Query: 1 YGWPEAHQSKPA 12		
PhD 12						YWP ++ PA		
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPISYFMTPA 12		
PhD 12						2	Query: 1 YGWPE 5	
PhD 12					YGWP			
PhD 12					Sbjct: 1 YGWPS 5			
PhD 12	18	DTGPNEPRSSTT						
PhD 12								
PhD 12								
PhD 12	19	YPWPSPLSETS			27	Query: 1 YPWPSPLSETS 11		
PhD 12						YPWP L++ +		
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPDYLTQRN 11		
PhD 12						58	Query: 1 YPWPS 5	
PhD 12					YPWPS			
PhD 12					Sbjct: 2 YPWPS 6			

PhD 12						Query: 1 YPWPSPLSE 9
PhD 12					35	YPWP+ +
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPTTVKN 9
PhD 12						Query: 1 YPWPSPLSETS 11
PhD 12					23	YPWP+ LS T+
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPT-LSRTT 10
PhD 12						Query: 1 YPWSP 6
PhD 12					42	YPWP P
PhD 12						Sbjct: 2 YPWVP 7
PhD 12						Query: 1 YPWSP 6
PhD 12					11	YPWP P
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPLP 6
PhD 12						Query: 1 YPWSP 8
PhD 12					22	YPWP+ S
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPN EHS 8
PhD 12						Query: 1 YPWPS 5
PhD 12					54	YPWP+
PhD 12						Sbjct: 2 YPWPT 6
PhD 12						Query: 1 YPWPS 5
PhD 12					8	YPWP+
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPA 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					26	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					24	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWPS 5
PhD 12					39	+PWPS
PhD 12						Sbjct: 2 FPWPS 6
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					56	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					50	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					49	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					46	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					45	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					44	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					43	YPWP

PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					41	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					40	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					1	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					21	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					29	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWPSPL 7
PhD 12					30	YP+PS
PhD 12						Sbjct: 1 YPFPSAF 7
PhD 12						Query: 1 YPWPS 5
PhD 12					34	YPWP+
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPN 5
PhD 12						Query: 1 YPWPS 5
PhD 12					10	YP+PS
PhD 12						Sbjct: 1 YPFPS 5
PhD 12						Query: 1 YEWPTAAVRPAS 12
PhD 12						Y WP+ AS
PhD 12	20	YEWPTAAVRPAS			31	Sbjct: 1 YSWPSFHTEAAS 12
PhD 12						Query: 1 YPWPPMDSMLM 11
PhD 12					22	YPWP S +
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPNEHSSIQ 11
PhD 12						Query: 1 YPWPPMDSMLM 11
PhD 12					35	YPWP L+
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPTTVKNLV 11
PhD 12						Query: 1 YPWPPMD 7
PhD 12					23	YPWP +
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPTLS 7
PhD 12	21	YPWPPMDSMLMY				Query: 1 YPWP 4
PhD 12					26	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					24	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					27	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					54	YPWP

PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					19	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					58	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					56	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					50	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					49	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					46	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					45	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					44	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					43	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					41	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					40	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					8	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					1	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					29	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					11	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					42	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12					34	Query: 1 YPWPPMD 7

PhD 12					YPWP M
PhD 12					Sbjct: 1 YPWPNMQ 7
PhD 12					Query: 1 YPWPNEHSSIQ 11
PhD 12				21	YPWP S +
PhD 12					Sbjct: 1 YPWPMDSMLM 11
PhD 12					Query: 1 YPWP 5
PhD 12				27	YPWP+
PhD 12					Sbjct: 1 YPWPD 5
PhD 12					Query: 1 YPWP 5
PhD 12				34	YPWP
PhD 12					Sbjct: 1 YPWP 5
PhD 12					Query: 1 YPWP 5
PhD 12				35	YPWP
PhD 12					Sbjct: 1 YPWPT 5
PhD 12					Query: 1 YPWPNEHS 8
PhD 12				19	YPWP+ S
PhD 12					Sbjct: 1 YPWPSPLS 8
PhD 12					Query: 1 YPWP 5
PhD 12				23	YPWP
PhD 12					Sbjct: 1 YPWPT 5
PhD 12					Query: 1 YPWP 5
PhD 12				58	YPWP+
PhD 12					Sbjct: 2 YPWPS 6
PhD 12					Query: 1 YPWP 5
PhD 12				54	YPWP
PhD 12	22	YPWPNEHSSIQN			Sbjct: 2 YPWPT 6
PhD 12					Query: 1 YPWP 4
PhD 12				26	YPWP
PhD 12					Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12					Query: 1 YPWP 4
PhD 12				24	YPWP
PhD 12					Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12					Query: 1 YPWP 4
PhD 12				56	YPWP
PhD 12					Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12					Query: 1 YPWP 4
PhD 12				50	YPWP
PhD 12					Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12					Query: 1 YPWP 4
PhD 12				49	YPWP
PhD 12					Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12					Query: 1 YPWP 4
PhD 12				46	YPWP
PhD 12					Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12					Query: 1 YPWP 4
PhD 12				45	YPWP
PhD 12					Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12					Query: 1 YPWP 4
PhD 12				44	YPWP
PhD 12					Sbjct: 2 YPWP 5

PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					43	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					41	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					40	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWPNEH 7
PhD 12					29	YPWP +
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPISY 7
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					8	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					1	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					11	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					42	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWPT 5
PhD 12					35	YPWPT
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPT 5
PhD 12						Query: 1 YPWPT 5
PhD 12					54	YPWPT
PhD 12						Sbjct: 2 YPWPT 6
PhD 12						Query: 1 YPWPT-LSRTT 10
PhD 12					19	YPWP+ LS T+
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPSPLSETS 11
PhD 12						Query: 1 YPWPT 5
PhD 12					22	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPN 5
PhD 12						Query: 1 YPWPT 5
PhD 12					58	YPWP+
PhD 12						Sbjct: 2 YPWPS 6
PhD 12						Query: 1 YPWPTLS 7
PhD 12					34	YPWP +
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPNMQ 7
PhD 12						Query: 1 YPWPT 5
PhD 12					26	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPI 5
PhD 12						Query: 1 YPWPT 5
PhD 12					24	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPI 5
PhD 12						Query: 1 YPWPTLS 7
PhD 12					21	YPWP +

PhD 12						Sbjct: 1 YPWPPMD 7
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					27	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWPTLS 7
PhD 12					12	YP+PT+
PhD 12						Sbjct: 1 YPFPTVD 7
PhD 12						Query: 1 YPWPT 5
PhD 12					25	+PWPT
PhD 12						Sbjct: 1 FPWPT 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					56	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					50	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					49	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					46	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					45	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					44	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					43	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					41	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					40	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					8	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					1	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					29	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					11	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12					42	Query: 1 YPWPT 5

PhD 12					YPWP	
PhD 12					Sbjct: 2 YPWPV 6	
PhD 12	24, 26	YPWPIAQIASLH			Query: 1 YPWPIAQIASLH 12	
PhD 12					26	YPWPIAQIASLH
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPIAQIASLH 12
PhD 12						Query: 1 YPWPIAQIAS 10
PhD 12						YPWPI+ +
PhD 12					29	Sbjct: 1 YPWPISYFMT 10
PhD 12						Query: 1 YPWPIAQ 7
PhD 12						YPWP+ +
PhD 12					1	Sbjct: 1 YPWPLGR 7
PhD 12						Query: 1 YPWPIA 6
PhD 12					56	YPWPI
PhD 12						Sbjct: 2 YPWPIT 7
PhD 12						Query: 1 YPWPIA 6
PhD 12					50	YPWPI
PhD 12						Sbjct: 2 YPWPIT 7
PhD 12						Query: 1 YPWPIA 6
PhD 12					49	YPWPI
PhD 12						Sbjct: 2 YPWPIT 7
PhD 12						Query: 1 YPWPIA 6
PhD 12					46	YPWPI
PhD 12						Sbjct: 2 YPWPIT 7
PhD 12						Query: 1 YPWPIA 6
PhD 12					45	YPWPI
PhD 12						Sbjct: 2 YPWPIT 7
PhD 12						Query: 1 YPWPIA 6
PhD 12					44	YPWPI
PhD 12						Sbjct: 2 YPWPIT 7
PhD 12						Query: 1 YPWPIA 6
PhD 12					43	YPWPI
PhD 12						Sbjct: 2 YPWPIT 7
PhD 12						Query: 1 YPWPIA 6
PhD 12					41	YPWPI
PhD 12						Sbjct: 2 YPWPIT 7
PhD 12						Query: 1 YPWPIA 6
PhD 12					40	YPWPI
PhD 12						Sbjct: 2 YPWPIT 7
PhD 12						Query: 1 YPWPIA 6
PhD 12					35	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPTT 6
PhD 12						Query: 1 YPWPI 5
PhD 12					42	YPWP+
PhD 12						Sbjct: 2 YPWPV 6
PhD 12		Query: 1 YPWPIAQ 7				
PhD 12	11	YPWP+				
PhD 12		Sbjct: 1 YPWPLPD 7				
PhD 12		Query: 1 YPWP 4				
PhD 12	22	YPWP				
PhD 12		Sbjct: 1 YPWP 4				

PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					27	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWPI 5
PhD 12					23	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPT 5
PhD 12						Query: 1 YPWPIA 6
PhD 12					54	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWPTT 7
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					58	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					19	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					8	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					21	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWPIAQ 7
PhD 12					34	YPWP Q
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPNMQ 7
PhD 12						Query: 4 PTYDTP 9
PhD 12			39		39	PTY TP
PhD 12						Sbjct: 7 PTYLTP 12
PhD 12						Sbjct: 2 FPWPS 6
PhD 12						Query: 2 PWPTYDT 8
PhD 12			43		35	PW YD
PhD 12						Sbjct: 3 PWFDYDA 9
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPT 5
PhD 12						Query: 2 PWPTYDT 8
PhD 12			27		5	PW YD
PhD 12	25	FPWPTYDTPASY				Sbjct: 3 PWFDYDA 9
PhD 12						Sbjct: 1 FPWPV 5
PhD 12						Query: 1 FPWPT 5
PhD 12			30		54	F PT TP
PhD 12						Sbjct: 2 FYHPTNATP 10
PhD 12						Query: 1 FPWPT 5
PhD 12					23	+PWPT
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPT 5
PhD 12						Query: 1 FPWP 4
PhD 12					13	FPWP
PhD 12						Sbjct: 1 FPWP 4
PhD 12	26, 24	YPWPIAQIASLH			24	Query: 1 YPWPIAQIASLH 12
PhD 12						YPWPIAQIASLH

PhD 12						Sbjct: 1 YPWPIAQLSLH 12
PhD 12						Query: 1 YPWPIAQIAS 10
PhD 12					29	YPWPI+ +
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPISYFMT 10
PhD 12						Query: 1 YPWPIAQ 7
PhD 12					1	YPWP+ +
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPLGR 7
PhD 12						Query: 1 YPWPIA 6
PhD 12					56	YPWPI
PhD 12						Sbjct: 2 YWPIT 7
PhD 12						Query: 1 YPWPIA 6
PhD 12					50	YPWPI
PhD 12						Sbjct: 2 YWPIT 7
PhD 12						Query: 1 YPWPIA 6
PhD 12					49	YPWPI
PhD 12						Sbjct: 2 YWPIT 7
PhD 12						Query: 1 YPWPIA 6
PhD 12					46	YPWPI
PhD 12						Sbjct: 2 YWPIT 7
PhD 12						Query: 1 YPWPIA 6
PhD 12					45	YPWPI
PhD 12						Sbjct: 2 YWPIT 7
PhD 12						Query: 1 YPWPIA 6
PhD 12					44	YPWPI
PhD 12						Sbjct: 2 YWPIT 7
PhD 12						Query: 1 YPWPIA 6
PhD 12					43	YPWPI
PhD 12						Sbjct: 2 YWPIT 7
PhD 12						Query: 1 YPWPIA 6
PhD 12					41	YPWPI
PhD 12						Sbjct: 2 YWPIT 7
PhD 12						Query: 1 YPWPIA 6
PhD 12					40	YPWPI
PhD 12						Sbjct: 2 YWPIT 7
PhD 12						Query: 1 YPWPIA 6
PhD 12					35	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YWPPT 6
PhD 12						Query: 1 YPWPI 5
PhD 12					42	YPWP+
PhD 12						Sbjct: 2 YWPV 6
PhD 12						Query: 1 YPWPIAQ 7
PhD 12					11	YPWP+
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPLPD 7
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					22	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					27	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12					23	Query: 1 YPWPI 5

PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					56	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					50	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					49	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					46	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					45	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					44	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					43	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					41	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					40	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					1	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					21	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					29	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					11	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWP 5
PhD 12					34	YPWP+
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					42	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 6
PhD 12					43	+PW DY
PhD 12						Sbjct: 2 HPWFDY 7
PhD 12						Query: 1 YPWP 6
PhD 12					27	+PW DY

PhD 12						Sbjct: 2 HPWFDY 7
PhD 12	28	LPWPRMLPVIPD			16	Query: 1 LPWP 4
PhD 12						LPWP
PhD 12						Sbjct: 1 LPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWPIFYMT 10
PhD 12	29	YPWPISYFMTPA			26, 24	YPWPI+ +
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPIAQIAS 10
PhD 12					24, 26	Query: 1 YPWPIFYMT 10
PhD 12						YPWPI+ +
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPIAQIAS 10
PhD 12						Query: 1 YPWPI 6
PhD 12						YPWPI+
PhD 12						Sbjct: 2 YWPIT 7
PhD 12						Query: 1 YWPIS 6
PhD 12						YPWP+
PhD 12		Sbjct: 1 YWPPLG 6				
PhD 12		Query: 1 YWPIS 6				
PhD 12		YPWP S				
PhD 12		Sbjct: 2 YWPSS 7				
PhD 12		Query: 1 YWPIS 6				
PhD 12		YPWP +				
PhD 12		Sbjct: 1 YWPPT 6				
PhD 12		Query: 1 YPWPIFYMTPA 12				
PhD 12		Y WP ++ PA				
PhD 12		Sbjct: 1 YGWPEAHQSKPA 12				
PhD 12		Query: 1 YPWPISY 7				
PhD 12		YPWP+ +				
PhD 12		Sbjct: 2 YWPVPW 8				
PhD 12		Query: 1 YPWPISY 7				
PhD 12		YPWP +				
PhD 12		Sbjct: 1 YWPNEH 7				
PhD 12		Query: 1 YWPIS 6				
PhD 12		YPWP +				
PhD 12		Sbjct: 2 YWPPT 7				
PhD 12		Query: 1 YWPIS 5				
PhD 12		YPWP+				
PhD 12		Sbjct: 1 YWPPL 5				
PhD 12		Query: 1 YWP 4				
PhD 12		YPWP				
PhD 12		Sbjct: 1 YWP 4				
PhD 12		Query: 1 YWP 4				
PhD 12		YPWP				
PhD 12		Sbjct: 1 YWP 4				
PhD 12		Query: 1 YWP 4				

PhD 12						YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12				8		YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12				21		YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12				34		YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPFPS 5
PhD 12				10		YPFPS
PhD 12						Sbjct: 1 YPFPS 5
PhD 12						Query: 1 YPFPSA 6
PhD 12				12		YPFP+
PhD 12						Sbjct: 1 YPFPTV 6
PhD 12						Query: 1 YPFPSA 6
PhD 12				58		YP+PS+
PhD 12						Sbjct: 2 YPWSS 7
PhD 12	30	YPFPSAFHTGVK				Query: 1 YPFPSA 6
PhD 12				14		YPFP A
PhD 12						Sbjct: 1 YPFPA 6
PhD 12						Query: 1 YPFPSAF 7
PhD 12				19		YP+PS
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPSPL 7
PhD 12						Query: 1 YPFP 4
PhD 12				33		YPFP
PhD 12						Sbjct: 1 YPFP 4
PhD 12						Query: 1 YSWPSF 6
PhD 12				2		Y WPS
PhD 12						Sbjct: 1 YGWPSL 6
PhD 12						Query: 1 YSWPSFHTEAAS
PhD 12	31	YSWPSFHTEAAS				12
PhD 12				20		Y WP+ AS
PhD 12						Sbjct: 1 YEWPTAAVRPAS 12
PhD 12						Query: 1 YSWPS 5
PhD 12				9		Y+WPS
PhD 12						Sbjct: 1 YNWPS 5
PhD 12						Query: 1 IPWPTDQP 9
PhD 12				25		PWPT D P
PhD 12						Sbjct: 1 FPWPTYDTP 9
PhD 12						Query: 2 PWPTD 7
PhD 12				11		PWP PD
PhD 12						Sbjct: 2 PWPLPD 7
PhD 12	32	IPWPTDQPPPL				Query: 2 PWPT 5
PhD 12				35		PWPT
PhD 12						Sbjct: 2 PWPT 5
PhD 12						Query: 2 PWPT 5
PhD 12				23		PWPT

PhD 12						Sbjct: 2 PWPT 5
PhD 12						Query: 2 PWPT 5
PhD 12					54	PWPT
PhD 12						Sbjct: 3 PWPT 6
PhD 12						Query: 1 IPWPTPDQPP 10
PhD 12					34	PWP PP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPNMQPPP 10
PhD 12						Query: 1 YPFPLS 6
PhD 12					14	YPFP +
PhD 12						Sbjct: 1 YPFPA 6
PhD 12						Query: 1 YPFPLS 6
PhD 12					1	YP+PL
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPLG 6
PhD 12						Query: 1 YPFP 4
PhD 12					30	YPFP
PhD 12						Sbjct: 1 YPFP 4
PhD 12	33	YPFPLSPTLARE				Query: 1 YPFP 4
PhD 12					12	YPFP
PhD 12						Sbjct: 1 YPFP 4
PhD 12						Query: 1 YPFPL 5
PhD 12					11	YP+PL
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPL 5
PhD 12						Query: 1 YPFPLSP 7
PhD 12					10	YPFP P
PhD 12						Sbjct: 1 YPFPSFP 7
PhD 12						Query: 1 YPWPN 5
PhD 12					22	YPWPN
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPN 5
PhD 12						Query: 1 YPWPNMQ 7
PhD 12					23	YPWP +
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPTLS 7
PhD 12						Query: 1 YPWPNMQ 7
PhD 12					26, 24	YPWP Q
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPIAQ 7
PhD 12						Query: 1 YPWPN 5
PhD 12					27	YPWP+
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPD 5
PhD 12	34	YPWPNMQPPPWP				Query: 1 YPWPN 5
PhD 12					19	YPWP+
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPS 5
PhD 12						Query: 1 YPWPN 5
PhD 12					58	YPWP+
PhD 12						Sbjct: 2 YPWPS 6
PhD 12						Query: 1 YPWPN 5
PhD 12					35	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPT 5
PhD 12						Query: 1 YPWPN 5
PhD 12					54	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWPT 6
PhD 12					21	Query: 1 YPWPNMQ 7

PhD 12					YPWP M
PhD 12					Sbjct: 1 YPWPPMD 7
PhD 12					Query: 1 YPWP 4
PhD 12				56, 50, 49, 46, 45, 44, 43, 41, 40	YPWP
PhD 12					Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12					Query: 1 YPWP 4
PhD 12				8	YPWP
PhD 12					Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12					Query: 1 YPWP 4
PhD 12				1	YPWP
PhD 12					Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12					Query: 1 YPWP 4
PhD 12				29	YPWP
PhD 12					Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12					Query: 1 YPWP 4
PhD 12				11	YPWP
PhD 12					Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12					Query: 1 YPWP 4
PhD 12				42	YPWP
PhD 12					Sbjct: 2 YPWP 5
PhD 12					Query: 1 YPWPTT 6
PhD 12				54	YPWPTT
PhD 12					Sbjct: 2 YPWPTT 7
PhD 12					Query: 1 YPWPT 5
PhD 12				23	YPWPT
PhD 12					Sbjct: 1 YPWPT 5
PhD 12					Query: 1 YPWPTT 6
PhD 12				58	YPWP++
PhD 12					Sbjct: 2 YPWPS 7
PhD 12					Query: 1 YPWPTT 6
PhD 12				56, 50, 49, 46, 45, 44, 43, 41, 40	YPWP T
PhD 12					Sbjct: 2 YPWPT 7
PhD 12					Query: 1 YPWPTTVKN 9
PhD 12				19	YPWP+ +
PhD 12					Sbjct: 1 YPWPSPLSE 9
PhD 12					Query: 1 YPWPT 5
PhD 12				22	YPWP
PhD 12					Sbjct: 1 YPWPN 5
PhD 12					Query: 1 YPWPTT 6
PhD 12				26, 24	YPWP
PhD 12					Sbjct: 1 YPWPIA 6
PhD 12					Query: 1 YPWPTT 6
PhD 12				29	YPWP +
PhD 12					Sbjct: 1 YPWPI 6
PhD 12					Query: 1 YPWP 4
PhD 12				27	YPWP
PhD 12					Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12					Query: 1 YPWPT 5
PhD 12				8	YPWP
PhD 12					Sbjct: 1 YPWPA 5

PhD 12						Query: 1 YPWPTTVKNLV 11
PhD 12					21	YPWP L+
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPPMDSMLM 11
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					1	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWPT 5
PhD 12					25	+PWPT
PhD 12						Sbjct: 1 FPWPT 5
PhD 12						Query: 1 YPWP 4
PhD 12					11	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD 12						Query: 1 YPWPT 5
PhD 12					42	YPWP
PhD 12						Sbjct: 2 YPWPV 6
PhD 12						Query: 1 YPWPT 5
PhD 12					12	YP+PT
PhD 12						Sbjct: 1 YPFPT 5
PhD 12						Query: 2 PWPTT 6
PhD 12					36	PWP T
PhD 12						Sbjct: 2 PWPET 6
PhD 12						Query: 1 YPWPT 5
PhD 12					34	YPWP
PhD 12						Sbjct: 1 YPWPN 5
PhD 12	36	MPWPETSTHTTR			15	Query: 3 WPET 6
PhD 12						WPET
PhD 12						Sbjct: 3 WPET 6
PhD 12	37	MLPQQLMSSHLH				
PhD C7C	38	APLPHCC				
PhD C7C						Query: 1 AFPWPSS 7
PhD C7C					58	A+PWSS
PhD C7C						Sbjct: 1 AYPWPSS 7
PhD C7C						Query: 2 FPWPS 6
PhD C7C					25	FPWP+
PhD C7C						Sbjct: 1 FPWPT 5
PhD C7C						Query: 2 FPWPS 6
PhD C7C					19	+PWPS
PhD C7C	39	AFPWPSS				Sbjct: 1 YPWPS 5
PhD C7C						Query: 2 FPWP 5
PhD C7C					5	FPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 FPWP 4
PhD C7C						Query: 2 FPWP 5
PhD C7C					13	FPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 FPWP 4
PhD C7C						Query: 2 FPWPSS 7
PhD C7C					9	+WPSS
PhD C7C						Sbjct: 1 YNWPSS 6
PhD C7C	40, 41,					Query: 1 AYPWPIT 7
PhD C7C	43, 44,	AYPWPIT			54	AYPWP T
PhD C7C	45, 46,					Sbjct: 1 AYPWPTT 7

PhD C7C	49, 50, 56					Query: 2 YPWPIT 7	
PhD C7C						29	YPWPI+
PhD C7C							Sbjct: 1 YPWPI 6
PhD C7C							Query: 1 AYPWPI 6
PhD C7C						42	AYPWP+
PhD C7C							Sbjct: 1 AYPWPV 6
PhD C7C							Query: 2 YPWPIT 7
PhD C7C						26, 24	YPWPI
PhD C7C							Sbjct: 1 YPWPIA 6
PhD C7C							Query: 2 YPWPIT 7
PhD C7C						35	YPWP T
PhD C7C							Sbjct: 1 YPWPTT 6
PhD C7C							Query: 1 AYPWPIT 7
PhD C7C						58	AYPWP +
PhD C7C							Sbjct: 1 AYPWPSS 7
PhD C7C							Query: 2 YPWP 6
PhD C7C						1	YPWP+
PhD C7C							Sbjct: 1 YPWPL 5
PhD C7C							Query: 2 YPWP 6
PhD C7C						11	YPWP+
PhD C7C							Sbjct: 1 YPWPL 5
PhD C7C							Query: 2 YPWP 5
PhD C7C						22	YPWP
PhD C7C							Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C							Query: 2 YPWP 5
PhD C7C						27	YPWP
PhD C7C							Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C							Query: 2 YPWP 5
PhD C7C						23	YPWP
PhD C7C							Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C							Query: 2 YPWP 5
PhD C7C						19	YPWP
PhD C7C							Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C							Query: 2 YPWP 5
PhD C7C						8	YPWP
PhD C7C							Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C		Query: 2 YPWP 5					
PhD C7C	21	YPWP					
PhD C7C		Sbjct: 1 YPWP 4					
PhD C7C		Query: 2 YPWP 5					
PhD C7C	34	YPWP					
PhD C7C		Sbjct: 1 YPWP 4					
PhD C7C		Query: 1 AYPWPIT 7					
PhD C7C	41, 40, 43, 44, 45, 46, 49, 50, 56	AYPWPIT				54	
PhD C7C							AYPWP T
PhD C7C							Sbjct: 1 AYPWPPTT 7
PhD C7C							Query: 2 YPWPIT 7
PhD C7C						29	YPWPI+
PhD C7C							Sbjct: 1 YPWPI 6
PhD C7C		Query: 1 AYPWPI 6					
PhD C7C						AYPWP+	

PhD C7C						Sbjct: 1 AYPWPV 6
PhD C7C						Query: 2 YPWPIT 7
PhD C7C					26, 24	YPWPI
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPIA 6
PhD C7C						Query: 2 YPWPIT 7
PhD C7C					35	YPWP T
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPTT 6
PhD C7C						Query: 1 AYPWPIT 7
PhD C7C					58	AYPWP +
PhD C7C						Sbjct: 1 AYPWPSS 7
PhD C7C						Query: 2 YPWPI 6
PhD C7C					1	YPWP+
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPL 5
PhD C7C						Query: 2 YPWPI 6
PhD C7C					11	YPWP+
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPL 5
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					22	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					27	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					23	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					19	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					8	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					21	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					34	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 1 AYPWPV 6
PhD C7C					41, 40, 43, 44, 45, 46, 49, 50, 56	AYPWP+
PhD C7C						Sbjct: 1 AYPWPI 6
PhD C7C	42	AYPWPV PWC			11	Query: 2 YPWPVP 7
PhD C7C						YPWP+P
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPLP 6
PhD C7C					54	Query: 1 AYPWPV 6
PhD C7C						AYPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 AYPWPT 6
PhD C7C					19	Query: 2 YPWPVP 7
PhD C7C						YPWP P

PhD C7C						Sbjct: 1 YPWSP 6
PhD C7C						Query: 1 AYPWP 5
PhD C7C					58	AYPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 AYPWP 5
PhD C7C						Query: 2 YPWPV 6
PhD C7C					26	YPWP+
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPI 5
PhD C7C						Query: 2 YPWPV 6
PhD C7C					24	YPWP+
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPI 5
PhD C7C						Query: 2 YPWPVPW 8
PhD C7C					29	YPWP+ +
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPI SY 7
PhD C7C						Query: 2 YPWPV 6
PhD C7C					5	+PWPV
PhD C7C						Sbjct: 1 FPWPV 5
PhD C7C						Query: 2 YPWPV 6
PhD C7C					1	YPWP+
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPL 5
PhD C7C						Query: 2 YPWPV 6
PhD C7C					35	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPT 5
PhD C7C						Query: 2 YPWPV 6
PhD C7C					23	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPT 5
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					22	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					27	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWPV 6
PhD C7C					8	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPA 5
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					21	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					34	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWPVP 7
PhD C7C					51	+PW VP
PhD C7C						Sbjct: 2 FPWWVP 7
PhD C7C						Query: 1 AYPWPIT 7
PhD C7C	43, 41,				54	AYPWP T
PhD C7C	40,					Sbjct: 1 AYPWPPTT 7
PhD C7C	44, 45,	AYPWPIT				Query: 2 YPWPIT 7
PhD C7C	46, 49,				29	YPWPI+
PhD C7C	50, 56					Sbjct: 1 YPWPI S 6
PhD C7C					42	Query: 1 AYPWPI 6

PhD C7C					AYPWP+
PhD C7C					Sbjct: 1 AYPWPV 6
PhD C7C					Query: 2 YPWPIT 7
PhD C7C				26, 24	YPWPI
PhD C7C					Sbjct: 1 YPWPIA 6
PhD C7C					Query: 2 YPWPIT 7
PhD C7C				35	YPWP T
PhD C7C					Sbjct: 1 YPWPTT 6
PhD C7C					Query: 1 AYPWPIT 7
PhD C7C				58	AYPWP +
PhD C7C					Sbjct: 1 AYPWPSS 7
PhD C7C					Query: 2 YPWPI 6
PhD C7C				1	YPWP+
PhD C7C					Sbjct: 1 YPWPL 5
PhD C7C					Query: 2 YPWPI 6
PhD C7C				11	YPWP+
PhD C7C					Sbjct: 1 YPWPL 5
PhD C7C					Query: 2 YPWP 5
PhD C7C				22	YPWP
PhD C7C					Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C					Query: 2 YPWP 5
PhD C7C				27	YPWP
PhD C7C					Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C					Query: 2 YPWP 5
PhD C7C				23	YPWP
PhD C7C					Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C					Query: 2 YPWP 5
PhD C7C				19	YPWP
PhD C7C					Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C					Query: 2 YPWP 5
PhD C7C				8	YPWP
PhD C7C					Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C					Query: 2 YPWP 5
PhD C7C				21	YPWP
PhD C7C					Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C					Query: 2 YPWP 5
PhD C7C				34	YPWP
PhD C7C					Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C					Query: 1 AYPWPIT 7
PhD C7C				54	AYPWP T
PhD C7C					Sbjct: 1 AYPWPTT 7
PhD C7C					Query: 2 YPWPIT 7
PhD C7C	44, 41,			29	YPWPI+
PhD C7C	40, 43,				Sbjct: 1 YPWPIA 6
PhD C7C	45, 46,	AYPWPIT			Query: 1 AYPWPI 6
PhD C7C	49, 50,			42	AYPWP+
PhD C7C	56				Sbjct: 1 AYPWPV 6
PhD C7C					Query: 2 YPWPIT 7
PhD C7C				26, 24	YPWPI
PhD C7C					Sbjct: 1 YPWPIA 6

PhD C7C						Query: 2 YPWPIT 7
PhD C7C					35	YPWP T
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPTT 6
PhD C7C						Query: 1 AYPWPIT 7
PhD C7C					58	AYPWP +
PhD C7C						Sbjct: 1 AYPWPSS 7
PhD C7C						Query: 2 YPWPI 6
PhD C7C					1	YPWP+
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPL 5
PhD C7C						Query: 2 YPWPI 6
PhD C7C					11	YPWP+
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPL 5
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					22	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					27	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					23	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					19	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					8	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					21	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					34	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 1 AYPWPIT 7
PhD C7C					54	AYPWP T
PhD C7C						Sbjct: 1 AYPWPTT 7
PhD C7C						Query: 2 YPWPIT 7
PhD C7C					29	YPWPI+
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPIS 6
PhD C7C	45, 44,					Query: 1 AYPWPI 6
PhD C7C	41, 40,				42	AYPWP+
PhD C7C	43,	AYPWPIT				Sbjct: 1 AYPWPV 6
PhD C7C	46, 49,					Query: 2 YPWPIT 7
PhD C7C	50, 56				26, 24	YPWPI
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPIA 6
PhD C7C						Query: 2 YPWPIT 7
PhD C7C					35	YPWP T
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPTT 6
PhD C7C						Query: 1 AYPWPIT 7
PhD C7C					58	AYPWP +

PhD C7C						Sbjct: 1 AYPWPSS 7
PhD C7C						Query: 2 YPWPI 6
PhD C7C					1	YPWP+
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPL 5
PhD C7C						Query: 2 YPWPI 6
PhD C7C					11	YPWP+
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPL 5
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					22	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					27	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					23	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					19	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					8	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					21	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					34	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 1 AYPWPIT 7
PhD C7C					54	AYPWP T
PhD C7C						Sbjct: 1 AYPWPTT 7
PhD C7C						Query: 2 YPWPI 7
PhD C7C					29	YPWPI+
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPI 6
PhD C7C						Query: 1 AYPWPI 6
PhD C7C					42	AYPWP+
PhD C7C						Sbjct: 1 AYPWPV 6
PhD C7C						Query: 2 YPWPI 7
PhD C7C	46,				26, 24	YPWPI
PhD C7C	44, 41,					Sbjct: 1 YPWPIA 6
PhD C7C	40, 43,	AYPWPIT				Query: 2 YPWPI 7
PhD C7C	45, 49,				35	YPWP T
PhD C7C	50, 56					Sbjct: 1 YPWPTT 6
PhD C7C						Query: 1 AYPWPIT 7
PhD C7C					58	AYPWP +
PhD C7C						Sbjct: 1 AYPWPSS 7
PhD C7C						Query: 2 YPWPI 6
PhD C7C					1	YPWP+
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPL 5
PhD C7C					11	Query: 2 YPWPI 6

PhD C7C						YPWP+
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPL 5
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C				22		YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C				27		YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C				23		YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C				19		YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C				8		YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C				21		YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C				34		YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C	47	TPHWPLF			25	Query: 1 TP 2
PhD C7C						TP
PhD C7C						Sbjct: 8 TP 9
PhD C7C	48	PTRSSAT				
PhD C7C						
PhD C7C						
PhD C7C					54	Query: 1 AYPWPIT 7
PhD C7C						AYPWP T
PhD C7C						Sbjct: 1 AYPWPTT 7
PhD C7C						Query: 2 YPWPIT 7
PhD C7C				29		YPWPI+
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPIS 6
PhD C7C						Query: 1 AYPWPI 6
PhD C7C				42		AYPWP+
PhD C7C	49,					Sbjct: 1 AYPWPV 6
PhD C7C	46, 44,					Query: 2 YPWPIT 7
PhD C7C	41, 40,	AYPWPIT			26, 24	YPWPI
PhD C7C	43,					Sbjct: 1 YPWPIA 6
PhD C7C	45,					Query: 2 YPWPIT 7
PhD C7C	50, 56				35	YPWP T
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPTT 6
PhD C7C						Query: 1 AYPWPIT 7
PhD C7C					58	AYPWP +
PhD C7C						Sbjct: 1 AYPWPSS 7
PhD C7C						Query: 2 YPWPI 6
PhD C7C					1	YPWP+
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPL 5

PhD C7C						Query: 2 YPWPI 6
PhD C7C					11	YPWP+
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPL 5
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					22	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					27	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					23	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					19	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					8	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					21	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					34	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 1 AYPWPIT 7
PhD C7C					54	AYPWP T
PhD C7C						Sbjct: 1 AYPWPTT 7
PhD C7C						Query: 2 YPWPI 7
PhD C7C					29	YPWPI+
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPI 6
PhD C7C						Query: 1 AYPWPI 6
PhD C7C					42	AYPWP+
PhD C7C						Sbjct: 1 AYPWPV 6
PhD C7C						Query: 2 YPWPI 7
PhD C7C					26, 24	YPWPI
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPIA 6
PhD C7C						Query: 2 YPWPI 7
PhD C7C					35	YPWP T
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPTT 6
PhD C7C						Query: 1 AYPWPIT 7
PhD C7C					58	AYPWP +
PhD C7C						Sbjct: 1 AYPWPSS 7
PhD C7C						Query: 2 YPWPI 6
PhD C7C					1	YPWP+
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPL 5
PhD C7C						Query: 2 YPWPI 6
PhD C7C					11	YPWP+
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPL 5
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					22	YPWP

PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					27	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					23	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					19	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					8	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					21	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					34	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 1 PFPWWVP 7
PhD C7C					57, 55	PFPWW P
PhD C7C	51	PFPWWVP				Sbjct: 1 PFPWWAP 7
PhD C7C						Query: 2 FPWWVP 7
PhD C7C					42	+PW VP
PhD C7C						Sbjct: 2 YPWPVP 7
PhD C7C	52	HPSTTAS				
PhD C7C						
PhD C7C	53	WSPHQRT				
PhD C7C						Query: 2 YPWPTT 7
PhD C7C					35	YPWPTT
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPTT 6
PhD C7C						Query: 1 AYPWPTT 7
PhD C7C					40,41,43,44,45,46, 49,50,56	AYPWP T
PhD C7C						Sbjct: 1 AYPWPIT 7
PhD C7C						Query: 1 AYPWPTT 7
PhD C7C					58	AYPWP++
PhD C7C						Sbjct: 1 AYPWPSS 7
PhD C7C						Query: 2 YPWPT 6
PhD C7C	54	AYPWPTT			23	YPWPT
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPT 5
PhD C7C						Query: 1 AYPWPT 6
PhD C7C					42	AYPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 AYPWPV 6
PhD C7C						Query: 2 YPWPT 6
PhD C7C					22	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPN 5
PhD C7C						Query: 2 YPWPT 6
PhD C7C					19	YPWP+
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPS 5

PhD C7C						Query: 2 YPWPTT 7
PhD C7C					26, 24	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPIA 6
PhD C7C						Query: 2 YPWPTT 7
PhD C7C					29	YPWP +
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPIA 6
PhD C7C						Query: 2 YPWPT 5
PhD C7C					27	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPT 4
PhD C7C						Query: 2 YPWPT 6
PhD C7C					25	+PWPT
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPT 5
PhD C7C						Query: 2 YPWPT 5
PhD C7C					1	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPT 4
PhD C7C						Query: 2 YPWPT 5
PhD C7C					8	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPT 4
PhD C7C						Query: 2 YPWPT 5
PhD C7C					21	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPT 4
PhD C7C						Query: 2 YPWPT 5
PhD C7C					11	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPT 4
PhD C7C						Query: 2 YPWPTT 7
PhD C7C					12	YP+PT
PhD C7C						Sbjct: 1 YPFPTV 6
PhD C7C						Query: 2 YPWPT 6
PhD C7C					34	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPT 5
PhD C7C						Query: 1 PFPWW 5
PhD C7C	55, 57	PFPWWAP	28			Query: 1 PFPWWAP 7
PhD C7C					51	PFPWW P
PhD C7C						Sbjct: 8 PFENW 12
PhD C7C						Sbjct: 1 PFPWWVP 7
PhD C7C					54	Query: 1 AYPWPIT 7
PhD C7C						AYPWP T
PhD C7C						Sbjct: 1 AYPWPTT 7
PhD C7C						Query: 2 YPWPT 7
PhD C7C					29	YPWPI+
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPIA 6
PhD C7C	56,					Query: 1 AYPWPI 6
PhD C7C	50, 46,	AYPWPIT			42	AYPWP+
PhD C7C	44, 41,					Sbjct: 1 AYPWPT 6
PhD C7C	40, 43,					Query: 2 YPWPT 7
PhD C7C	45, 49,				26, 24	YPWPI
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPIA 6
PhD C7C						Query: 2 YPWPT 7
PhD C7C					35	YPWP T
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPTT 6

PhD C7C						Query: 1 AYPWPIT 7
PhD C7C					58	AYPWP +
PhD C7C						Sbjct: 1 AYPWPSS 7
PhD C7C						Query: 2 YPWPI 6
PhD C7C					1	YPWP+
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPL 5
PhD C7C						Query: 2 YPWPI 6
PhD C7C					11	YPWP+
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPL 5
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					22	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					27	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					23	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					19	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					8	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					21	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					34	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 1 PFPWW 5
PhD C7C	57, 55	PFPWWAP	28			Query: 1 PFPWWAP 7
PhD C7C					51	PFPWW P
PhD C7C						Sbjct: 8 PFENW 12
PhD C7C						Sbjct: 1 PFPWWVP 7
PhD C7C						Query: 1 AYPWPSS 7
PhD C7C					39	A+PWSS
PhD C7C						Sbjct: 1 AYPWPSS 7
PhD C7C						Query: 1 AYPWPSS 7
PhD C7C					54	AYPWP++
PhD C7C						Sbjct: 1 AYPWPPTT 7
PhD C7C						Query: 2 YPWSS 7
PhD C7C	58	AYPWSS			35	YPWP++
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPTT 6
PhD C7C						Query: 1 AYPWPSS 7
PhD C7C					40,41,43,44,45,46,49,50,56	AYPWP +
PhD C7C						Sbjct: 1 AYPWPIT 7
PhD C7C						Query: 2 YPWPS 6
PhD C7C					19	YPWPS
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPS 5

PhD C7C						Query: 1 AYPWP 5
PhD C7C					42	AYPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 AYPWP 5
PhD C7C						Query: 2 YPWPS 6
PhD C7C					22	YPWP+
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPN 5
PhD C7C						Query: 2 YPWPS 6
PhD C7C					23	YPWP+
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPT 5
PhD C7C						Query: 2 YPWPS 7
PhD C7C					29	YPWP S
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPI 6
PhD C7C						Query: 2 YPWPS 6
PhD C7C					8	YPWP+
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPA 5
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					26, 24	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWPS 6
PhD C7C					27	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPD 5
PhD C7C						Query: 2 YPWPS 7
PhD C7C					9	Y WPSS
PhD C7C						Sbjct: 1 YNWPS 6
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					1	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					21	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWPS 7
PhD C7C					30	YP+PS+
PhD C7C						Sbjct: 1 YPFPS 6
PhD C7C						Query: 2 YPWP 5
PhD C7C					11	YPWP
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWP 4
PhD C7C						Query: 2 YPWPS 6
PhD C7C					34	YPWP+
PhD C7C						Sbjct: 1 YPWPN 5
PhD C7C						Query: 2 YPWPS 6
PhD C7C					10	YP+PS
PhD C7C						Sbjct: 1 YPFPS 5
PhD C7C						Query: 3 SPLPF 7
PhD C7C					7	SP PF
PhD C7C						Sbjct: 3 SPWPF 7
PhD C7C	59	SVSPLPF				Query: 1 SVSPL 5
PhD C7C					46	++SP+
PhD C7C						Sbjct: 8 AMSPM 12