



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Análise do genoma completo de um isolado de *Sapovirus* no Distrito Federal e expressão do capsídeo do vírus para a produção de "Virus-like particles" pelo sistema de baculovírus recombinantes

Karoline dos Anjos

Brasília, 2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Análise do genoma completo de um isolado de *Sapovirus* no Distrito Federal e expressão do capsídeo do vírus para a produção de "Virus-like particles" pelo sistema de baculovírus recombinantes

Karoline dos Anjos

Orientador: Dr. Tatsuya Nagata

Co-orientador: Dr. Bergmann Morais Ribeiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, do Departamento de Biologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Brasília, 2013

Dissertação de autoria de Karoline dos Anjos, intitulada “Análise do genoma completo de um isolado de *Sapovirus* no Distrito Federal e expressão do capsídeo do vírus para a produção de "Virus-like particles" pelo sistema de baculovírus recombinantes”, apresentado como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, em 15 de fevereiro de 2013, aprovada pela banca examinadora abaixo assinada:

Prof. Dr. Tatsuya Nagata
Biologia Celular – UnB (Orientador)

Prof. Dr. Fernando Lucas de Melo
Biologia Celular - UnB

Prof. Dra. Marize Pereira Miagostovich
Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz

Brasília
2013

Para meus pais, Sandra e Manoel, pelo apoio e amor incondicional.

*Em especial, dedico esse trabalho ao meu irmão Pedro, pelas
palavras de incentivo ditas há sete anos.*

Agradecimentos

Não há como não começar esse texto agradecendo aqueles que representam tudo para mim. Sendo assim agradeço à minha família, pelo amor, apoio e incentivo incondicional. Sem eles nenhum sonho seria possível. Incluo nessa família aqueles que pude escolher e tenho uma imensa alegria de chamar de amigos: Tamiris Maia Moura, André Ortega, Nanda Neves, Camilla Sonza e Grazi Peres, vocês fazem parte do que sou há muitos anos e por isso merecem o meu carinho e agradecimento mais especial.

Não haveria agradecimentos se não houvesse Dissertação e esta, certamente, não seria escrita sem o Dr. Tatsuya Nagata. A ele devo o descobrimento de um novo sonho, a curiosidade incessante e a paciência. Agradeço pelos seis anos de trabalho, pela confiança, pelo incentivo e até pelos puxões de orelha. Obrigada por acreditar na minha capacidade.

Como ciência não é feita de um indivíduo, mas sim de grupos de loucos curiosos, não posso deixar de agradecer a todos os amigos e colegas de laboratório pela ajuda, risadas, lágrimas, géis, minipreps e companheirismo. Aqui fica o meu agradecimento especial à Natália Lucinda, Franciele Maldaner, Ana Cláudia e Thaís Lamounier. Obrigada pela paciência, carinho, apoio e exemplo. Incluo nesses agradecimentos todos os colegas da Virologia e, principalmente, Daniel Mendes pela ajuda desde o momento da seleção de mestrado até a execução do projeto.

Aos professores Dr. Bergmann R. Moraes, Msc. Lidia Maria e Dra. Paula Andreia os meus sinceros agradecimentos pela contribuição neste projeto.

Em conclusão agradeço aquele que representou nesses dois anos de mestrado um pouco de todos aqui mencionados, o melhor amigo, companheiro de trabalho, orientador anônimo e namorado nas horas vagas: André Bertran. Obrigada pela paciência, carinho e motivação.

RESUMO

A família *Caliciviridae* é formada por vírus pertencentes a cinco gêneros: *Sapovirus*, *Norovirus*, *Lagovirus*, *Vesivirus* e *Nebovirus*. Alguns sapovírus e norovírus são conhecidos como agentes causadores de gastroenterites em humanos, sendo sapovírus o segundo agente viral mais importante depois dos norovírus. O genoma do sapovírus é linear, de senso positivo, ssRNA, com tamanho de cerca de 7,5 kb, poliadenilado na região terminal 3'. Os sapovirus, atualmente, são divididos em sete genogrupos (GI-GVII) que infectam humanos, suínos e visons. Essa classificação é baseada, principalmente na sequência da proteína do capsídeo. Nesse estudo, o genoma completo de um sapovírus isolado (Sapovirus Hu/GI.2/BR-DF01/BRA/2009) em Brasília, Brasil, foi analisado com todas as sequências de sapovírus disponíveis para determinar sua relação filogenética e possíveis eventos de recombinação intra- e inter-genogrupos. Foi determinada uma proximidade filogenética com uma sequência obtida em 2005 em Bangladesh. Uma possível recombinação inter-genogrupo entre GI (humano) e GIII (suíno) assim como recombinações intra-genogrupo foram encontradas nas análises. Outro achado relevante é a região RdRp-CP como sítio de recombinação. Devido à ausência de ferramenta eficaz de diagnóstico imunológico do vírus baseada em procedimento de ELISA, surgiu à demanda de se expressar o capsídeo viral utilizando sistema de expressão de proteína heteróloga para obter anticorpo específico. Dessa forma o segundo objetivo desse trabalho foi produzir VLP de sapovírus utilizando o sistema de baculovírus recombinante. Para a confirmação da montagem dessa particular além de análise em microscopia eletrônica foi produzido um anticorpo policlonal contra a porção variável da proteína do capsídeo (P2). A análise ao microscópio eletrônico de transmissão demonstrou partículas esféricas com tamanhos de 20-40 nm, no entanto a ligação entre o anticorpo anti-P2 e possível VLP expressa não foi demonstrada. Esses resultados indicam que maiores estudos quanto a expressão e purificação de VLP de sapovírus devem ser realizados.

Palavras-chave: calicivírus, sapovírus, recombinação, produção de anticorpos policlonais, *virus-like particles*

ABSTRACT

The family *Caliciviridae* consists of viruses belonging to five genera: *Sapovirus*, *Norovirus*, *Lagovirus*, *Vesivirus* and *Nebovirus*. Certain sapovirus and norovirus strains are well-known causative agents of serious human gastroenteritis. Sapovirus is the second most important causative agent of human diseases next to norovirus. The sapovirus genome is linear, positive-sense, single-stranded RNA, of approximately 7,5kb that is polyadenylated at the 3' terminus. Sapovirus is divided into, at moment, seven genogroups (GI-GVII). This classification is based mainly on capsid protein sequence divergence. In this study, the entire genome of one sapovirus isolated in Brasília, Brazil (Sapovirus Hu/GI.2/BR-DF01/BRA/2009) was evaluated with all available sequences of sapovirus to determine its phylogenetic relationship and possible intra- and inter-genogroups recombination events using RDP3 program. It was determined the identity between the Brazilian sequence and one sequence collected in 2005 in Bangladesh and its possible recombination such as a possibility of an inter-genogroup recombination event between GI (human) and GIII (porcine). Another relevant found is the region of RdRp-CP as a hot spot of recombination. Due to the lack of the efficient diagnostic tools based on ELISA procedure, the preparation of capsid protein of the virus using heterologous protein expression system was requested. Thus the second objective of this work was to produce VLP sapovirus using recombinant baculovirus system. To confirm this particle assembly besides electronic microscopy analysis a polyclonal antibody was produced against the variable region (P2) of the capsid protein. The analysis by transmission electron microscope showed spherical particles with sizes of 20-40 nm, however the response between the anti-P2 and the possible VLP could not be demonstrated. These results indicate that further studies regarding the expression and purification of VLP sapovirus should be performed.

Key-words: calicivirus, sapovirus, recombination, production of polyclonal antibodies, *virus-like particles*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1. Representação da proteína do capsídeo de calicivírus. | 14 |
| Figura 2. Microscopia eletrônica de transmissão de partículas de sapovírus de extrato fecal. | 15 |
| Figura 3. Representação dos genomas virais dos gêneros que compõe a família <i>Caliciviridae</i> . | 17 |
| Figura 4. Representação do genoma completo. | 25 |
| Figura 5. Eletroforese de gel de agarose 1% referente as PCRs das regiões 5' e 3' do genoma completo do sapovírus. | 27 |
| Figura 6. Árvore filogenética baseado na sequência do genoma completo de sapovírus. | 29 |
| Figura 7. Árvores filogenéticas baseadas no algoritmo maximum-likelihood utilizando as sequências de CP (a) e 5' UTR mais ORF1 (b). | 30 |
| Figura 8. Análise de recombinação baseada no genoma completo utilizando o método RDP. | 32 |
| Figura 9. Diagrama de distância de GQ261222 contra os três sapovírus mais relacionados. | 33 |
| Figura 10. Análise de recombinação baseada na região 3' do genoma de sapovírus utilizando o método RDP. | 34 |
| Figura 11. Ilustração do baculovírus AcMNPV. | 39 |
| Figura 12. VLP de sapovírus. | 40 |
| Figura 13. Representação do vetor de entrada pENTR-2b. | 43 |
| Figura 14. Representação do vetor de expressão pDEST-17. | 44 |
| Figura 15. Representação do vetor pGEM-T easy. | 48 |
| Figura 16. Representação do vetor de expressão em células de inseto pFastBac1. | 49 |
| Figura 17. Esquema representativo do sistema Bac-to-bac. | 51 |
| Figura 18. Gel de agarose 1% referente a amplificação de P2. | 53 |
| Figura 19. Gel de agarose 1% referente aos clones selecionados para transformação em <i>E. coli</i> para expressão do gene de P2. | 53 |
| Figura 20. SDS-PAGE referente aos clones de BL21 AI contendo o gene de P2. | 54 |
| Figura 21. Western-blotting referente a expressão de P2. | 55 |

| | |
|--|----|
| Figura 22. Western-blotting referente a purificação de P2 utilizando coluna Ni-NTA. | 55 |
| Figura 23. Western-blottig utilizando soro de coelho como anticorpo primário anti-P2. | 56 |
| Figura 24. Gel de agarose 1% referente a PCR para amplificação do gene completo da CP. | 57 |
| Figura 25. Imagem de gel de agarose 1% de DNA plasmidial após clonagem da sequência referente a CP + ORF2 + UTR (VLP de sapovírus). | 58 |
| Figura 26. Imagem de gel de agarose 1% mostrando a PCR de confirmação dos bacmídeos. | 59 |
| Figura 27. SDS-PAGE de sobrenadante celular sedimentado e CsCl. | 60 |
| Figura 28. SDS-PAGE referente a expressão de CP em célula de inseto. | 60 |
| Figura 29. SDS-PAGE comparando célula e sobrenadante sem purificação por CsCl. | 61 |
| Figura 30. Imagem de MET. Possível VLP observada após sedimentação em CsCl. (Aumento 85 k). | 62 |
| Figura 31. Imagem em MET. (Aumento 250 k) | 62 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|----------|---|
| 6xhis | Cauda de hexa-histidina |
| g | Velocidade de sedimentação gravitacional |
| AcMNPV | Baculovírus <i>Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus</i> |
| Amp (R) | Gene de resistência a ampicilina |
| att | Sítios de ligação |
| BCIP | 5-bromo-4-cloro-3- indol fosfato |
| BV | Vírus brotado |
| cDNA | DNA sintetizado a partir de um RNA |
| CP | Proteína do capsídeo |
| CsCl | Cloreto de céσιο |
| dNTP | Desoxinucleotídeos trifosfato |
| FCV | <i>Feline calicivirus</i> |
| For | “primer forward” |
| g | Gramas |
| G | Genogrupo |
| h | Horas |
| h.p.i. | Horas pós-infecção |
| ICTV | Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus |
| IPTG | Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo |
| kDa | Kilo Dalton |
| Km (R) | Gene de resistência a canamicina |
| Kpb | Kilo pares de base |
| LB | Meio de cultura Luria-Bertani |
| μ g | Microgramas |
| Min | Minutos |
| M | Molar |
| MET | Microscopia eletrônica de transmissão |
| Miniprep | Mini preparação (extração de DNA plasmidial) |
| μ l | Microlitro |
| ml | Militros |
| m. o. i. | Multiplicidade de infecção |
| NBT | “nitro-blue tetrazolium chloride” |
| Ng | Nanogramas |
| NoV | <i>Norovirus</i> |
| OB | Corpos de oclusão |
| ODV | Vírus ocluso |
| ORF | Leitura de fase aberta |
| P2 | Porção variável da proteína do capsídeo |
| PAGE | Gel de eletroforese de poliacrilamida |
| PBS | Tampão de fosfato salino |
| PB | Pares de base |
| Ph | Concentração de íon hidrogênio livre |
| Ver | “primer reverse” |
| RdRp | RNA polimerase RNA dependente |
| RHDV | <i>Rabbit haemorrhagic disease virus</i> |
| RT-PCR | Transcrição reversa – Reação em cadeia da polimerase |
| S | Segundo |

| | |
|-------|---|
| SaV | Sapovírus |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| SMSV | <i>San Miguel sea lion virus</i> |
| SOC | Caldo de Hanahan com adição de 20% de glicose |
| Tris | 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol |
| UTR | Região não traduzida |
| VESV | <i>Vesicular exanthema virus</i> |
| VLP | Virus-like particles |
| X-Gal | 5-bromo-4-cloro-indol- β -D-galctopiranosídeo |

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| RESUMO | iv |
| ABSTRACT | v |
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES | vi |
| LISTA DE ABREVIATURAS | viii |
| I. INTRODUÇÃO | 13 |
| I.I Calicivírus | 14 |
| I.I.I Sapovírus | 17 |
| II. JUSTIFICATIVA | 19 |
| III. OBJETIVOS | 21 |
| III.I Objetivo Geral | 21 |
| CAPÍTULO I – POSSÍVEL EVOLUÇÃO MOLECULAR DE SAPOVÍRUS POR RECOMBINAÇÃO INTRA- E INTER-GENOGRUPOS | 22 |
| 1. RECOMBINAÇÃO DE CALICIVÍRUS | 22 |
| 2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 23 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 24 |
| 3.1 Isolado de sapovírus utilizado para o estudo | 24 |
| 3.2 RT-PCR, clonagem e sequenciamento | 24 |
| 3.3 Análise da sequência | 25 |
| 4. RESULTADOS | 27 |
| 4.1 PCR | 27 |
| 4.2 Perfil da sequência do genoma | 27 |
| 4.3 Análise de identidade nucleotídica | 28 |
| 4.4 Análise de possíveis eventos de recombinação | 31 |
| 5. DISCUSSÃO | 35 |

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO II – EXPRESSÃO DE SAPOVIRUS-LIKE PARTICLES | 38 |
| 1. EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS USANDO BACULOVÍRUS RECOMBINANTE | 38 |
| 2. VIRUS-LIKE PARTICLES | 39 |
| 3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 42 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 43 |
| 4.1 Sapovírus utilizado para o estudo | 43 |
| 4.2 Expressão da porção variável da proteína do capsídeo em <i>E. coli</i> | 43 |
| 4.2.1 Purificação de proteína | 45 |
| 4.2.2 Produção de anticorpos | 46 |
| 4.2.3 Purificação de anticorpos | 46 |
| 4.3 Produção de <i>virus-like particles</i> | 47 |
| 4.3.1 RT-PCR, clonagem e sequenciamento | 47 |
| 4.3.2 Sistema <i>Bac-to-bac</i> | 48 |
| 4.3.3 Confirmação da expressão de <i>virus-like particles</i> | 51 |
| 4.4 Microscopia eletrônica de transmissão | 52 |
| 5. RESULTADOS | 52 |
| 5.1 Amplificação e clonagem do gene de P2 | 52 |
| 5.2 Expressão em <i>E. coli</i> | 54 |
| 5.2.1 Purificação de proteína utilizando coluna de níquel | 55 |
| 5.3 Produção de anticorpo | 56 |
| 5.3.1 Ensaio de especificidade do anticorpo | 56 |
| 5.4 Amplificação e clonagem do gene da proteína do capsídeo | 57 |
| 5.5 Produção de baculovírus recombinante | 58 |
| 5.5.1 Expressão de VLP | 59 |
| 5.6 Microscopia eletrônica de transmissão | 61 |

| | |
|---|----|
| 6. DISCUSSÃO | 63 |
| IV. CONCLUSÃO GERAL | 66 |
| V. PERSPECTIVAS | 67 |
| VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 68 |
| VII. ANEXOS | 76 |
| VII.I Artigo | 77 |
| VII.II Termos de concessão de uso das imagens | 82 |

I. INTRODUÇÃO

A diarreia é um dos sintomas mais comuns de doenças que acometem crianças nos primeiros anos de vida, sendo causa significativa de morbidade e mortalidade infantil em todo o mundo (Vernachio et al., 2006; Xavier et al., 2009). A diarreia em crianças com menos de cinco anos é considerada grave devido à possibilidade de perda de fluídos e eletrólitos levá-las mais rapidamente a um estado de desidratação (Martella et al., 2008).

Mundialmente estima-se que doenças diarreicas causem aproximadamente 1,87 milhões de mortes por ano entre crianças menores de cinco anos de idade (Instituto Adolf Lutz, 2004). A maioria dessas mortes ocorre em países emergentes da África e sudeste da Ásia (Ramani & Kang, 2009). No Brasil de acordo com o Ministério da Saúde 3,9% de crianças menores de cinco anos foram a óbito devido a doenças diarreicas no ano de 2008 e 3% no ano de 2010 (Ministério da Saúde, 2008; 2010).

A etiologia das diarreias pode envolver vários agentes como vírus, bactérias e parasitas (Instituto Adolf Lutz, 2004).

Recentemente, com a melhoria das condições higiênicas, sanitárias e de suprimento de água em países emergentes, tem havido uma redução significativa no número de casos atribuídos a bactérias, e um aumento proporcional de diarreia em pacientes hospitalizados, que são atribuídas a agentes virais (Ramani & Kang, 2009; Schlenker & Surawicz, 2009).

Os cinco gêneros virais entéricos mais comuns são: *Rotavirus* (Família *Reoviridae*), *Norovirus* e *Sapovirus* (Família *Caliciviridae*), *Mastadenovirus* (*Adenoviridae*) e *Mamastrovirus* (*Astroviridae*), sendo os rotavírus mundialmente reconhecidos como os principais agentes virais causadores de gastroenterites (Santos et al., 2008). Não obstante, com o aprimoramento das técnicas de diagnóstico molecular, os calicivírus humanos e outros patógenos não descritos anteriormente vêm ganhando importância enquanto agentes associados a gastroenterites (Vernachio et al., 2006).

Sabe-se que a primeira descrição dos calicivírus humanos foi feita em 1972, quando amostras provenientes de um surto de diarreia, numa escola primária nos Estados Unidos da América foram analisadas por imunoeletromicroscopia. O primeiro calicivírus humano isolado foi o *Norwalk virus* (gênero *Norovirus*). Em

1977 ocorreu um surto de gastroenterite na cidade de Sapporo, no Japão, onde foi demonstrada, também por microscopia eletrônica, a presença de um vírus morfológicamente semelhante ao *Norwalk virus*, denominado *Sapporo virus* (gênero *Sapovirus*) (revisado por Schlenker et al., 2009).

I.I Calicivírus

Os calicivírus são vírus esféricos com um diâmetro de 27 a 40 nm. Seu capsídeo é composto por um único tipo de proteína, exibindo simetria icosaédrica. São 180 unidades organizadas em 90 dímeros que formam dois domínios: o domínio S e o domínio P (Oka et al., 2005). O domínio S forma a parte interna do capsídeo e envolve o RNA genômico; o domínio P, subdividido nos (sub)domínios P1 e P2 (Figura 1a), assume uma organização característica: é visto em forma de cálice na microscopia eletrônica (ME). Essa morfologia é mais aparente nos *Sapovirus*, conferindo-lhes a aparência de estrela de Davi (Figura 2) (Borges et al., 2005).

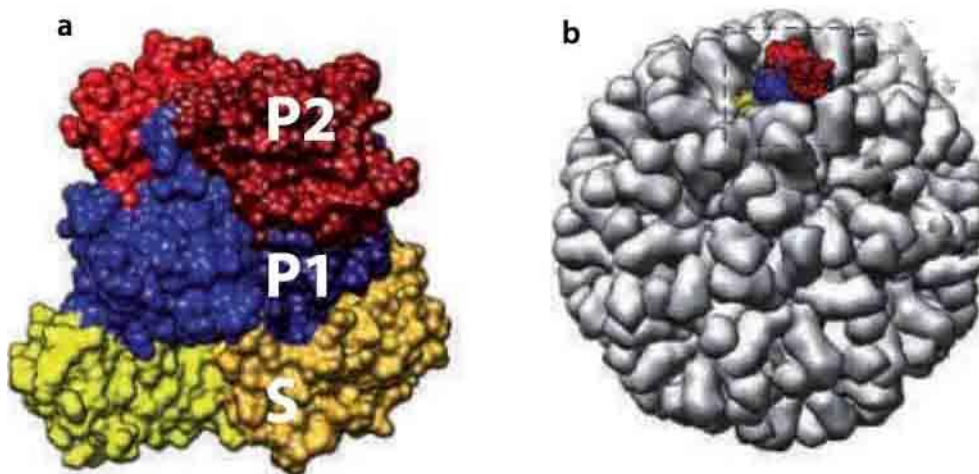


Figura 1. Representação da proteína do capsídeo de calicivírus. a) Representação da organização estrutural do domínio S (em amarelo) e dos subdomínios P1 e P2 (azul e vermelho). b) Partícula viral completa na qual foi destacado o monômero da proteína do capsídeo. A partícula possui simetria icosaédrica e a proteína do capsídeo se apresenta na forma de dímeros (proteína do capsídeo) (adaptado de Donaldson et al., 2010).

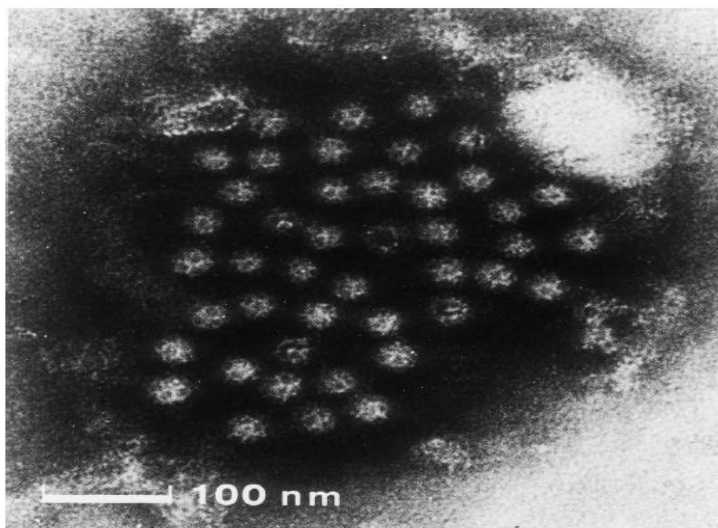


Figura 2: Microscopia eletrônica de transmissão de partículas de sapovírus de extrato fecal. Nessa imagem é possível observar a conformation em estrela de Davi, característica dos vírus pertencentes à família *Caliciviridae* (adaptado de Chiba et al., 2000).

Os primeiros calicivírus a serem descritos foram o *Vesicular exanthema virus* (VESV), *San Miguel sea lion virus* (SMSV) e *Feline calicivirus* (FCV) (Thiel et al., 1999). Em 1932 na cidade de Orange County, Califórnia (EUA), houve um surto de VESV, que inicialmente foi associado com febre aftosa devido à semelhança de sintomas. Posteriormente, descobriu-se que os suínos infectados haviam sido alimentados com carne de animais marinhos contaminada com calicivírus (Smith et al., 1998; Thiel et al., 1999). VESV foi erradicado nos Estados Unidos da América no ano de 1959, ao contrário de SMSV que ainda é circulante. Embora este último tenha dado origem aos vírus que contaminaram suínos e sua nomenclatura seja em função de um grupo estudado em leões marinhos, sabe-se que existem genogrupos de SMSV capazes de infectar mais de 11 espécies marinhas (Thiel et al., 1999).

Os calicivírus felinos (FCV) são classificados, atualmente, como pertencentes ao gênero *Vesivirus*, e estão associados a diferentes patologias animais como doença respiratória, estomatite aguda e crônica, artrite aguda e febre semelhante à hemorrágica, também conhecida como doença sistêmica virulenta associada à FCV (Pedersen et al., 2000).

Inicialmente, os calicivírus foram classificados como pertencentes à família *Picornaviridae*, mas após análises estruturais, morfológicas e principalmente filogenéticas, em 1979, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) aprovou a criação da família *Caliciviridae*, na época composta por um único gênero, *Calicivirus*.

Os calicivírus são classificados, atualmente, em cinco principais gêneros: *Sapovirus*, *Norovirus*, *Lagovirus*, *Vesivirus* e *Nebovirus*, baseados na estrutura e diversidade do genoma viral (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, 2012). *Sapovirus* e *Norovirus* são os únicos gêneros dessa família capazes de infectar humanos, podendo ainda infectar alguns animais como suínos e bovinos, entre outros. São agentes causadores de gastroenterites, acometem adultos e principalmente crianças. Ambos os patógenos causam sintomas de diarreia, náuseas e vômitos, nos meses de inverno, principalmente. Quanto a epidemiologia, os norovírus são, atualmente, os principais causadores de gastroenterite viral no mundo (Donaldson et al., 2010), sabe-se que os sapovírus também são epidêmicos. No entanto, em países como o Brasil sua incidência ainda é desconhecida.

Lagovirus é o gênero representado, principalmente, pelos vírus causadores da febre hemorrágica de coelhos (RHDV). Esses vírus são endêmicos na Europa e Ásia (Mitro et al., 1993) e, causam necrose e hemorragia de fígado, baço, rins e pulmões. Os animais chegam a óbito aproximadamente três dias após a infecção (Alonso et al., 1998). Em alguns países, como por exemplo, a Austrália esses vírus já foram utilizados como controle do crescimento das populações de coelhos (Cooke, 2002).

A família *Caliciviridae* é formada por vírus não envelopados com genoma de RNA fita simples, senso-positivo, poliadenilado e de tamanho genômico entre 7,3 e 8,3 kpb. O genoma apresenta duas ou três fases de leitura abertas (ORF – *open reading frame*) dependendo do gênero ou do genótipo (Okada et al., 2006). Uma importante característica do RNA genômico desses vírus é a codificação da cisteíno-protease, “3C-like protease”, na ORF1. A protease é inicialmente sintetizada como parte da ORF1 e cliva a poliproteína codificada pela ORF em múltiplas proteínas não estruturais (Okada et al., 2006). A proteólise da poliproteína dá origem a uma proteína associada ao genoma (VPg), uma helicase e a uma RNA polimerase RNA dependente (RdRp) (Schlenker et al., 2009). A proteína estrutural que forma o capsídeo é traduzida a partir de um RNA mensageiro subgenômico codificado pela ORF2 (Figura 3).

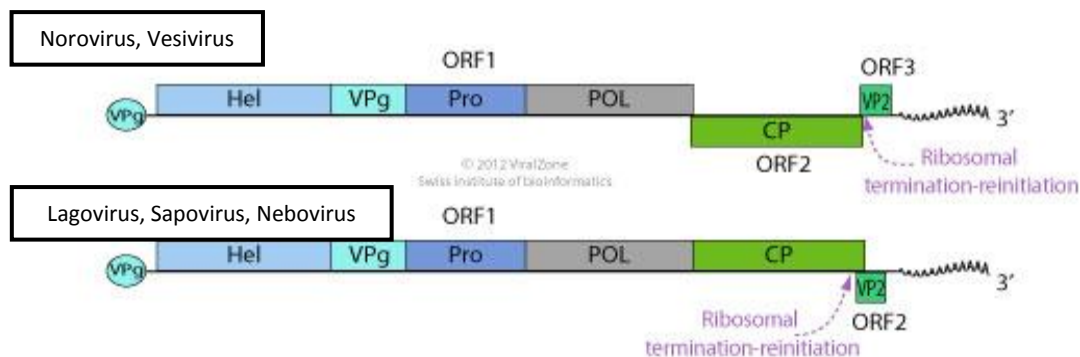


Figura 3: Representação dos genomas virais dos gêneros que compõe a família *Caliciviridae*. (Hel = helicase; VPg= proteína associada ao genoma; Pro= protease; POL = RNA polimerase RNA dependente; CP = proteína do capsídeo) (adaptado de ViralZone, 2012).

I.I.I Sapovírus

Os calicivírus apresentam dois importantes agentes causadores de gastroenterites humanas, os sapovírus e os norovírus (Hansman et al., 2007). Ambos possuem distribuição global, incluindo a América do Sul. Esses dois agentes virais diferem-se quanto à epidemiologia e também pela sintomatologia. Por exemplo, em crianças de dois anos de idade os norovírus causam diarreia moderada a grave, com vômito como sintoma predominante, enquanto os sapovírus causam diarreias agudas (Jonhsen et al., 2009).

Os sapovírus humanos foram identificados pela primeira vez em 1977, em Sapporo, Japão. Um surto diarreico acometeu crianças menores de cinco anos matriculadas em uma creche local. As amostras fecais foram colhidas e analisadas por imunoelctromicroscopia e a sua morfologia foi descrita como característica a morfologia dos calicivírus (Chiba et al., 1979).

Sapporo virus é a única espécie membro do gênero *Sapovirus*. Sua transmissão é por via oral-fecal e é frequentemente associada à ingestão de água e alimentos contaminados. Muitos relatos de estudos epidemiológicos de sapovírus provenientes da Ásia, Europa e Américas estão disponíveis, e atualmente, este vírus é reconhecido como um importante agente de gastroenterites agudas (Hansman et al., 2005; Schlenker et al., 2009; Svraka et al., 2010). A caracterização dos sapovírus tem sido dificultada, especialmente para as linhagens que infectam humanos, dada a ausência de um sistema eficiente de cultivo *in vitro* (Oka et al., 2006; Fullerton et al., 2007; Hansman et al.,

2007). Apenas um isolado da cepa suína (Po/SV/Cowden/1980/US) é capaz de se propagar em cultura celular (Chang et al., 2005; Oka et al., 2006; Fullerton et al., 2007).

Os sapovírus causam gastroenterites em humanos, suínos e vison (*mink*) (Guo et al., 2001; Hansman et al., 2004; Katayama et al., 2004; Johnsen et al., 2009), e são, atualmente, divididos em cinco genogrupos pelo ICTV (2012) (GI-GV), dois novos genogrupos foram sugeridos após análises filogenéticas que os distinguiram dos demais (Phan et al., 2007), GVI e GVII. Os vírus dos genogrupos I, II, IV e V infectam humanos, enquanto GIII e GVI infectam suínos e GVII infecta *mink* (Tabela 1) (Phan et al., 2007; Cunha et al., 2010). A classificação em genogrupos e genótipos é baseada na diversidade nucleotídica do gene da proteína do capsídeo (Schuffenecker et al., 2001; Farkas et al., 2004).

Em 2010 o Comitê Científico Internacional de Calicivírus determinou que a classificação (genotipagem) dos sapovírus fosse dada a partir da análise da sequência completa do gene da proteína do capsídeo (aproximadamente 1700 nucleotídeos). Em 2012, 107 sequências de capsídeo de sapovírus humanos, incluindo uma sequência de sapovírus suíno, foram utilizadas para classificação em genogrupo e genótipo. As distâncias genéticas foram obtidas a partir do método bi-paramétrico de Kimura. As análises resultaram em 4 genogrupos e 16 genótipos para os vírus humanos (GI [1-7], GII [1-7], GIV [1] e GV [1]) (Tabela 1) (Oka et al., 2012).

Tabela 1. Classificação (genotipagem) de sapovírus em genogrupos e hospedeiros, baseada na sequência do gene da proteína do capsídeo (Oka et al., 2012)

| Genogrupo | Número de Genótipos | Hospedeiro |
|------------------|----------------------------|-------------------|
| GI | 7 | Humano |
| GII | 7 | Humano |
| GIII | 1 | Suíno |
| GIV | 1 | Humano |
| GV | 1 | Humano |
| GVI (?) | - | Suíno |
| GVII (?) | - | Vison |

(?) Genogrupos não determinados pelo ICTV (Phan et al., 2007)

As partículas virais de sapovírus tem morfologia típica da família *Caliciviridae*, a aparência de estrela de Davi (Chiba et al., 1979; Farkas et al., 2004). O genoma de RNA é linear, senso positivo, possui aproximadamente 7,5 kpb e é poliadenilado no

terminal 3'. Os genomas dos membros de GI, GIV, e GV contem três ORFs, enquanto GII e GIII apresentam apenas duas (Hansman et al., 2004). A ORF1 codifica uma poliproteína que contém motivos de aminoácidos para 2C-like NTPase, VPg, 3C-like protease, RdRp e proteína do capsídeo (CP) (Oka et al., 2005). É possível que a ORF2 codifique uma proteína estrutural menor, que auxilie a montagem de CP (Glass et al., 2000). No entanto, a função da proteína codificada pela ORF3 ainda não foi elucidada (Oka et al., 2006).

II. JUSTIFICATIVA

Sabe-se que os sapovírus são importantes agentes virais causadores de gastroenterites em humanos (Hansman et al., 2007). Após uma pesquisa feita no banco de dados ISI Web of Knowledge foi possível constatar a prevalência dos sapovírus por todo o mundo. Somente no ano de 2012, 10 publicações referentes à epidemiologia desse vírus foram encontradas. Estudos de prevalência dependente de sazonalidade e casos de reinfecção foram descritos no Japão (Dey et al., 2012; Harada et al., 2012). Outros estudos epidemiológicos na Ásia, também, foram descritos (Grant et al., 2012; Park et al., 2012; Trang et al., 2012; Xu & Ren, 2012) assim como, na Europa (Medici et al., 2012) e na América do Norte (Gomez-Santiago et al., 2012; Lee et al., 2012). No entanto, nenhum trabalho relacionado à incidência de sapovírus no Brasil ou América Latina foi encontrado.

Levando-se em conta a ausência desses estudos o primeiro objetivo proposto nesta Dissertação deu início a estudos posteriores a cerca da detecção e análise dos sapovírus circulantes no Brasil envolvendo o interesse de Institutos como a Fiocruz (Rio de Janeiro) e o Instituto Evandro Chagas (comunicação pessoal - Dra. Marize Pereira Miagstovich e Dra Yvone Gabay Mendes, 2012). A proposta de se avaliar possíveis eventos de recombinação é baseada na literatura (Katayama et al., 2004; Hansman et al., 2005) onde análises a partir de sequências virais descrevem a evolução molecular dos sapovírus humanos. Além disso, esse tipo de análise acresce o número de informações a respeito desse gênero viral.

O interesse em se produzir uma ferramenta biotecnológica que auxilie na identificação desses vírus surgiu a partir da ausência do mesmo no Brasil e do amplo conhecimento a respeito do desenvolvimento de *virus-like particles* (VLP) utilizando baculovírus recombinantes (Kitamoto et al., 2012).

Em conclusão são necessários estudos a respeito da prevalência desses vírus no Brasil e na América Latina e o sequenciamento de um vírus obtido no Distrito Federal e bem como o seu uso para o desenvolvimento de VLP são importantes para a aquisição de novos dados e início de novos estudos.

III. OBJETIVOS

III.I OBJETIVOS GERAIS

O principal objetivo do capítulo I foi investigar a posição filogenética do sapovírus isolado em Brasília (BR-DF01) e possíveis eventos de recombinação genômica ocorridos entre o isolado BR-DF01 de sapovírus e outros sapovírus identificados. No capítulo II o principal objetivo foi produzir “virus-like particles” (VLPs) do sapovírus em células de inseto por meio de baculovírus recombinante.

CAPÍTULO I – POSSÍVEL EVOLUÇÃO MOLECULAR DE SAPOVÍRUS POR RECOMBINAÇÃO INTRA- E INTER-GENOGRUPOS

1. *INTRODUÇÃO

No estudo dos calicivírus a análise filogenética a partir de genomas levou à classificação atual da família em cinco gêneros (*Norovirus*, *Sapovirus*, *Nebovirus*, *Lagovirus* e *Vesivirus*). Inicialmente a classificação era baseada principalmente no hospedeiro e na sintomatologia e, no caso dos calicivírus humanos a nomenclatura era baseada no local de detecção.

Estima-se que os primeiros calicivírus tenham tido origem em ambiente marinho (Green et al., 2000), dada a distribuição entre espécies mais primitivas e recentes na filogenia desta família. Um dos caminhos para a atual distribuição da família entre diferentes espécies animais hospedeiras é a recombinação gênica.

O processo de recombinação em vírus de RNA, diferentemente do processo de mutação pontual, corresponde à geração de um novo genoma viral a partir da troca de regiões genômicas entre dois ou mais genomas parentais presentes em uma única célula hospedeira. Esse evento pode ser explicado pela ação da RdRp, responsável pela replicação viral, que por homologia sequencial e semelhança estrutural pode “saltar” de uma fita de RNA parental a outra, gerando progênie que contém informações genéticas referentes aos dois vírus parentais, sendo, portanto, um híbrido (Aazis & Tepfer, 1999).

Estudos sobre recombinação em sapovírus humanos demonstraram a ocorrência de eventos intra- e inter-genogrupos (Katayama et al., 2004; Hansman et al., 2006). Um exemplo de recombinação intra-genogrupo foi observado a partir da análise filogenética usando as sequências dos genes de CP e RdRp, separadamente. Os pesquisadores notaram inicialmente que dois isolados avaliados pela sequência de CP eram classificados como pertencentes ao mesmo genogrupo, porém genótipos diferentes, no entanto, tornavam-se membros do mesmo *cluster* quando analisados a partir da sequência da RdRp (Katayama et al., 2004). Análises posteriores demonstraram um evento de recombinação entre o término da sequência da RdRp e início da sequência de CP. Em um estudo semelhante Hansman e colaboradores (2006) demonstraram uma

*Os resultados apresentados neste capítulo foram publicados em julho de 2011. DOI 10.1007/s00705-01101079-8. “The possible molecular evolution of sapoviruses by inter- and intra-genogroup recombination”. Archives of Virology. v. 156, p. 1953-1959.

recombinação inter-genogrupo. Os isolados estudados mudavam de GII para GIV quando analisados filogeneticamente pela RdRp. O sítio de recombinação era a junção RdRp-Cp.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Sequenciamento do genoma completo do isolado de sapovírus identificado no Distrito Federal.
2. Análise filogenética para classificação do isolado.
3. Análise de possíveis eventos de recombinação entre o isolado brasileiro e outros isolados de sapovírus, cujas sequências estão disponíveis.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolado de sapovírus utilizado para o estudo

Um sapovírus (Sapo_BR-DF01) presente em uma amostra fecal de uma criança de dois anos com diarreia aguda no Distrito Federal, obtido em 2009, foi utilizado nesse estudo. A infecção por sapovírus foi confirmada por RT-PCR multiplex para o gene parcial (P2) do capsídeo (Yan et al., 2003). Após o sequenciamento, o isolado foi classificado como sapovírus GI/2 (Dos Anjos et al, 2011).

3.2 RT-PCR, clonagem e sequenciamento

O RNA total foi extraído de uma amostra fecal, positiva para sapovírus, por meio do Reagente “TRIzol” (Invitrogen) de acordo com as instruções dos fabricante.

Dois fragmentos de cDNA referentes ao genoma completo, com sobreposição de 70 nucleotídeos, foram amplificados por RT-PCR (Figura 4). O cDNA referente a região 3' foi sintetizado utilizando o iniciador oligodT₅₀PacIM4 (5'- TCA GCA CTG ACC CTT TTG AAT TAA T₅₀ - 3') e a enzima transcriptase reversa Superscript III (Invitrogen). O iniciador Sapo 3' For (5' -3416- CAG TGG TGA CTA TCA CGG AAG -3436- 3', os números indicam a posição nucleotídica no genoma) foi utilizado para PCR em combinação com o iniciador ancora reverso M4 (5' – TCA GCA CTG ACC CTT TTG – 3'). O cDNA referente a região 5' do genoma foi sintetizado utilizando o iniciador Sapo 5' Rev (5' -3509- TTC TTR GTT GGG TAA CCA TT - 3490- 3') e amplificado utilizando o par de iniciadores Sapo 5' Rev e Sapo 5' For (5' - 01- GTG ATT GGT TAG ATG GYT TC -20- 3'). Fragmentos de cDNA de 3,9 kb (região 3') e 3,5 kb (região 5') foram obtidos por PCR utilizando a enzima LongAmp *Taq* DNA polimerase (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA) e, após purificação de fragmentos de cDNA amplificados por eletroforese de gel de agarose a 1% (p/v) utilizando o kit “Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification” (GE Healthcare), o produto da PCR foi ligado ao vetor pCR4 TOPO (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

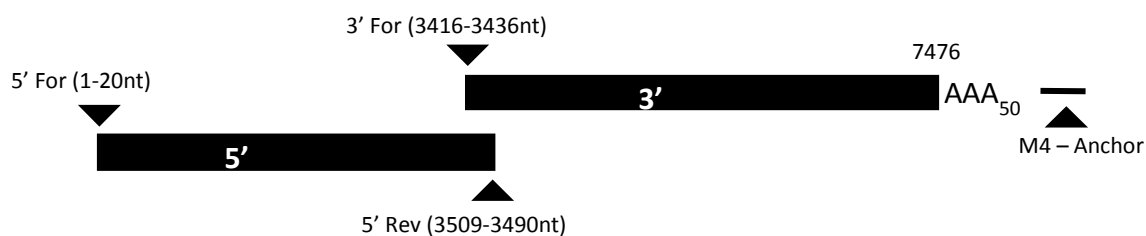


Figura 4. Representação do genoma completo. As setas indicam as regiões de anelamento dos primers. Os dois retângulos representam as regiões amplificadas separadamente (Dos Anjos et al., 2011).

Dois clones foram selecionados para cada região, e os insertos foram sequenciados por *primer walking*. Uma sequência consenso foi gerada utilizando o software Staden 4.0 (Staden, 1996), e a sequência final do genoma completo foi depositada no banco de dados DDBJ/EMBL/GenBank sob o número de acesso AB614356 (Sapovirus Hu/GI.2/BR-DF01/BRA/2009).

3.3 Análise da sequência

Para caracterizar o isolado Sapo_BR-DF01 filogeneticamente, foi realizado o alinhamento de sua sequência com 21 sequências de genomas completos e 29 sequências de CP de sapovírus disponíveis no GenBank (Tabela 1), e em seguida árvores filogenéticas foram construídas.

O programa CLUSTAL W incluso no software MEGA5 (Tamura et al., 2011) foi utilizado para alinhamento múltiplo, e as relações filogenéticas entre as sequências foram obtidas pelo método de Máxima-Verossimilhança (modelo *best-fit* TN93 + G + 1 e *bootstrap* de 1000 réplicas).

Os possíveis eventos de recombinação foram analisados pelo software RDP3 (Martin, 2009) usando alinhamento múltiplo de sequências do genoma completo e de sequências correspondentes a um fragmento do genoma completo cobrindo a extensão da RdRp, CP e Região Não Traduzida (UTR) da porção 3' (3100 nt), onde se encontra um possível sítio de recombinação. Os valores de confiança foram avaliados por seis métodos inclusos no RDP3, RDP (Martin & Rybicki, 2000), GENECONV (Padidam et al., 1999), Maxchi (Smith, 1992), Chimera (Martin et al., 2005), 3Seq (Boni et al., 2007) e Siscan (Gibbs et al., 2000). Os valores de p inferiores a 1×10^{-5} foram considerados significantes.

Tabela 2. Sequências utilizadas para análise filogenética do isolado Sapo_BR-DF01.

| Isolado viral ID | Número de Acesso | Cluster | Origem geográfica |
|-------------------------|-------------------------|----------------|--------------------------|
| MT-2010/1982 | HM002617 | GI/1 | Japão |
| Sapporo | U65427 | | Japão |
| Houston/86 | U95643 | | EUA |
| Mc114 | AY237422 | | Japão |
| Manchester | X86560 | | Reino Unido |
| Lyon 30388/98 | AJ251991 | | França |
| Dresden pJG-Sap01 | AY694184 | | Alemanha |
| Plymoth isolate | X86559 | | Reino Unido |
| BR-DF01 BRA/2009 | AB614356 | GI/2 | Brasil |
| Kecskemet HUN3739/2008 | FJ844411 | | Hungria |
| HuCV/Potsdam/2000 | AF294739 | | Alemanha |
| BD/697/2005 | GQ261222 | | Bangladesh |
| Houston/27/90 | U95644 | | EUA |
| Parkville | U73124 | | Reino Unido |
| Ehime643/2000 | DQ366345 | GI/5 | Japão |
| NongKhai-24 | AY646856 | GV | Tailândia |
| Ehime475/2004 | DQ366344 | | Japão |
| Angelholm/SW314/2004 | DQ125334 | GIV | Suécia |
| Angelholm/SW278/2004 | DQ125333 | | Suécia |
| Chiba/000671/1999 | AJ786349 | | Japão |
| Ehime1107/2002 | DQ058829 | | Japão |
| Ehime1596/1999 | DQ366346 | | Japão |
| C12 | AY603425 | | GII/3 |
| SaKaeo-15/2004 | AY646855 | Tailândia | |
| Mc10 | NC_010624 | GII/2 | Tailândia |
| Mc2/2002 | AY237419 | GII/1 | Tailândia |
| Bristol/98 | AJ249939 | | Reino Unido |
| Pig/sav1/2008 | FJ387164 | GIII | China |
| LL14 | AY425671 | | EUA |
| Po/SV/Cowden/1980 | AF182760 | | EUA |
| | | | EUA |

4. RESULTADOS

4.1 PCR

Os cDNAs referentes ao genoma completo do sapovírus foram obtidos a partir de extração de RNA viral de fezes, seguido de reação de transcriptase reversa. A PCR foi realizada anteriormente a clonagem. Foram obtidos dois amplificadores distintos de acordo com os iniciadores utilizados. O produto de PCR referente à região 5' apresentou aproximadamente 3500 pb enquanto o produto de PCR referente a região 3' apresentou cerca de 3930 pb (Figura 5).

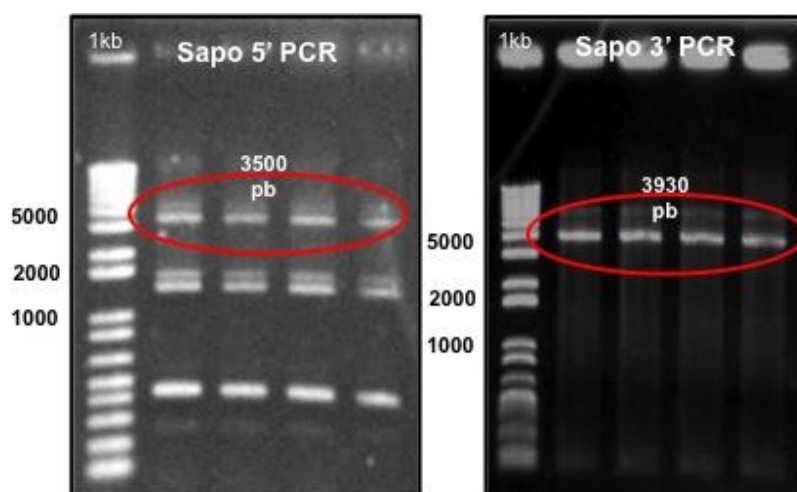


Figura 5. Eletroforese de gel de agarose 1% referente as PCRs das regiões 5' e 3' do genoma completo do sapovírus. Essa etapa foi fundamental para clonagem do genoma em vetor pCR4 TOPO.

4.2 Perfil da sequência do genoma

A primeira sequência do genoma completo de um sapovírus (Sapo_Br-DF01) na América Latina foi determinada. O genoma possui 7476 nucleotídeos sem a cauda de poli-A, e, assim como os demais sapovírus classificados como GI, apresenta três ORFs (ORF1, 13-6882 nt com 2290 aa; ORF2, 5180 a 5668 nt com 163 aa; e ORF3, 6882 a 7370 nt como 163 aa).

4.3 Análise de identidade nucleotídica

A sequência do Sapo_BR-DF01 apresenta 77% de identidade nucleotídica com um vírus de Bangladesh, coletado em 2005 (GQ261222, GI/2). Em uma árvore filogenética gerada pelo método de Máxima-Verossimilhança (Figura 6) o isolado brasileiro apresenta-se no grupo GI, que contém o isolado de Bangladesh e outros isolados asiáticos e europeus, porém, ele está num ramo fora dos *clusters* principais de GI/1 e GI/2 (Figura 6). O mesmo perfil filogenético foi obtido quando, ao invés da sequência do genoma completo, foi usada somente a região 5' UTR + ORF1 (excluindo o gene da CP, ORF2 e 3'UTR) do para análise (Figura 7b).

Em uma análise filogenética preliminar utilizando a sequência de P2 (CP parcial) do mesmo vírus obteve-se a classificação deste como GI/2, que foi confirmada quando a análise foi repetida utilizando a sequência completa da CP (Figura 7a).

Quando somente o gene da CP foi utilizado para a análise filogenética, a identidade nucleotídica entre Sapo_BR-DF01 e o vírus de Bangladesh (GQ261222) aumentou para 92%. No entanto, o parentesco mais próximo nesse caso foi em relação a outro vírus GI/2, obtido em 2008 na Hungria (FJ844411) com 98% de identidade nucleotídica (Figura 7a). Devido à ausência da sequência do genoma completo desse vírus húngaro, não foi possível a análise entre os dois genomas inteiros.

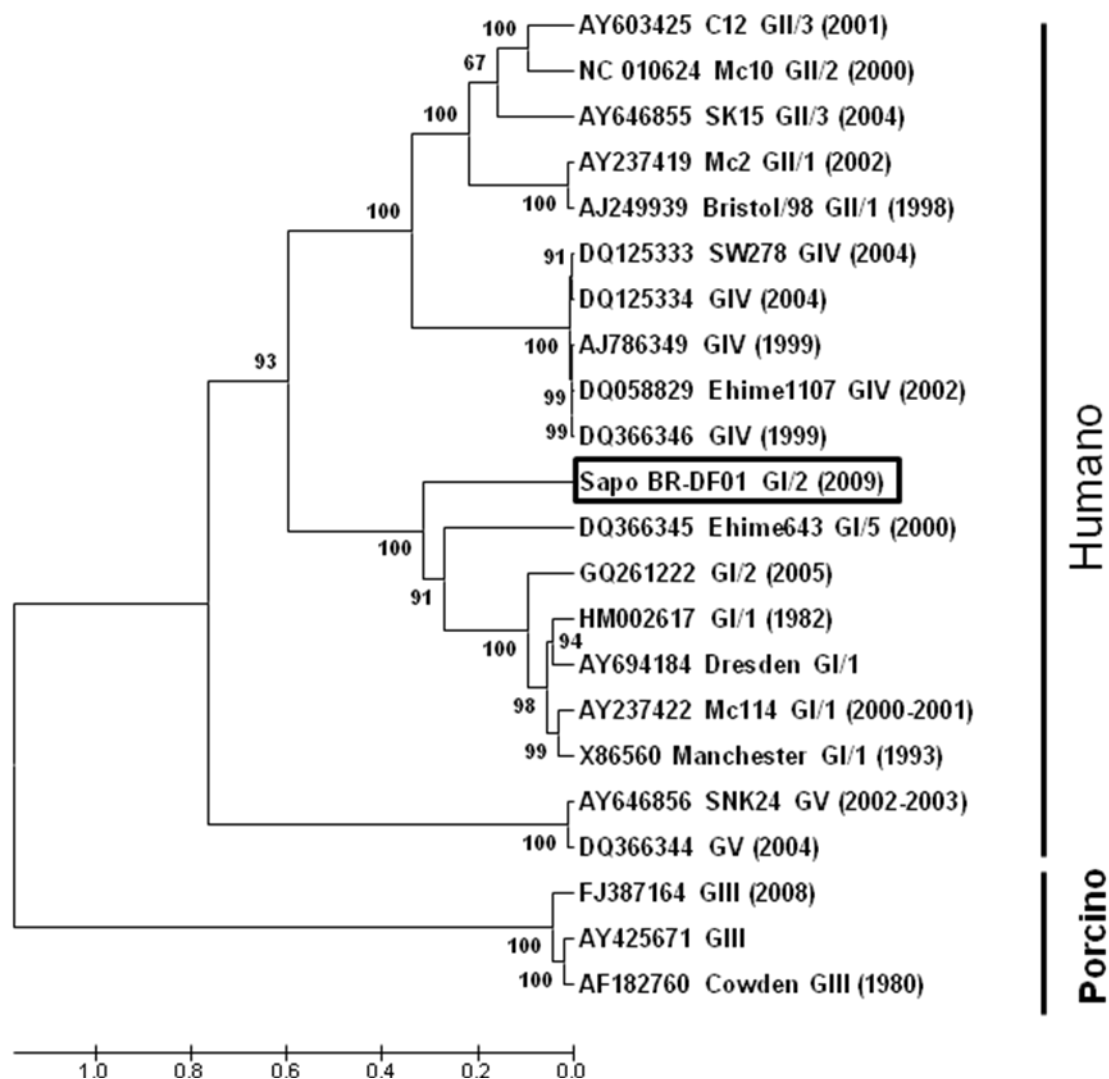


Figura 6. Árvore filogenética baseado na sequência do genoma completo de sapovírus, utilizando o algoritmo Máxima-Verossimilhança. Os sapovírus que infectam humanos e suínos são agrupados separadamente. O vírus Sapo_BR-DF01 está destacado por um retângulo. Os vírus estão identificados pelo número de acesso/nome/genogrupo-genótipo e ano de detecção, quando disponível. Informações referentes aos vírus encontram-se na Tabela 1. Os números localizados próximos aos nós da árvore indicam o valor de *bootstrap*, e aqueles menores que 50 não são mostrados. A escala representa o número de substituições nucleotídica por sítio.

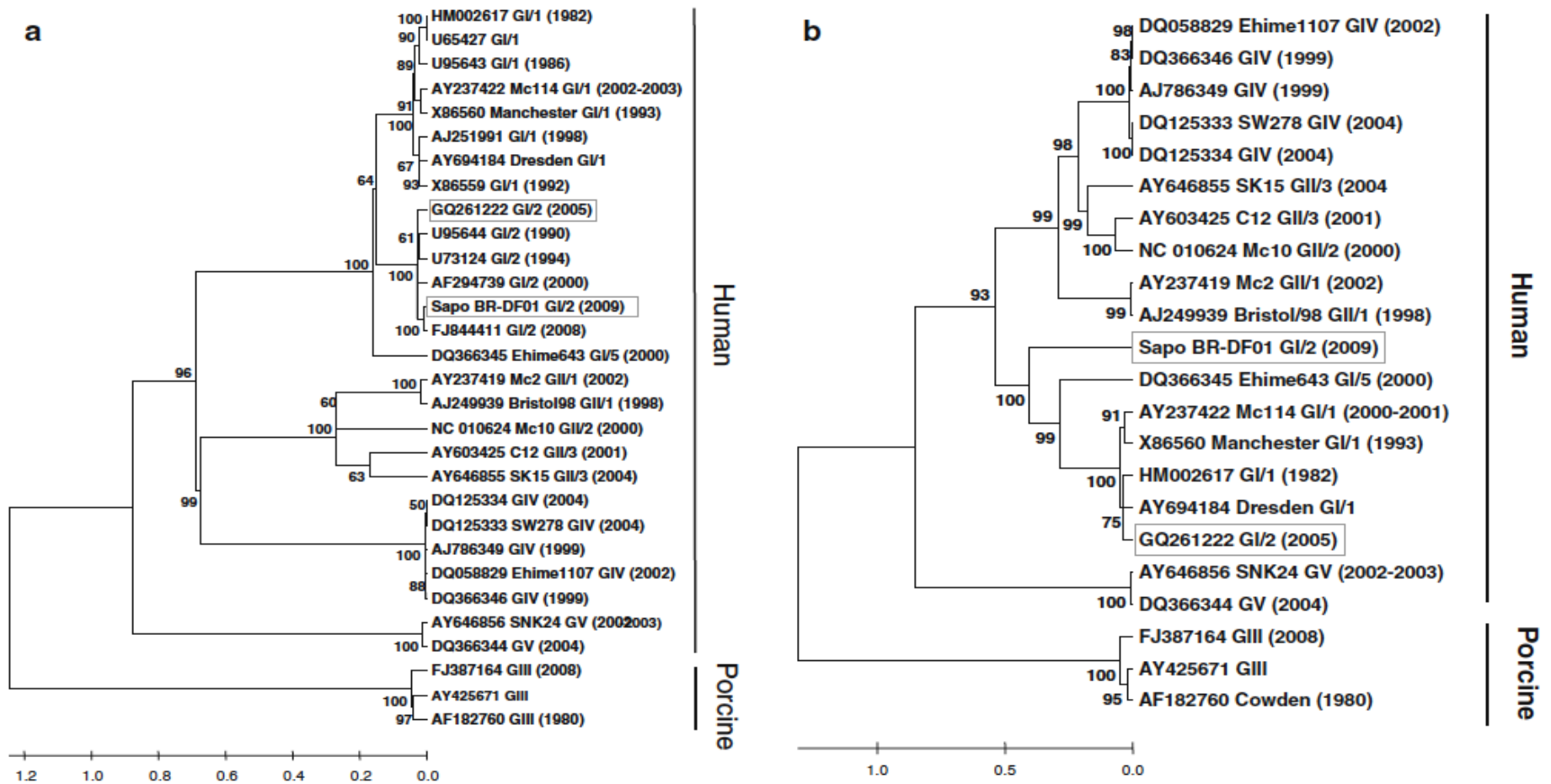


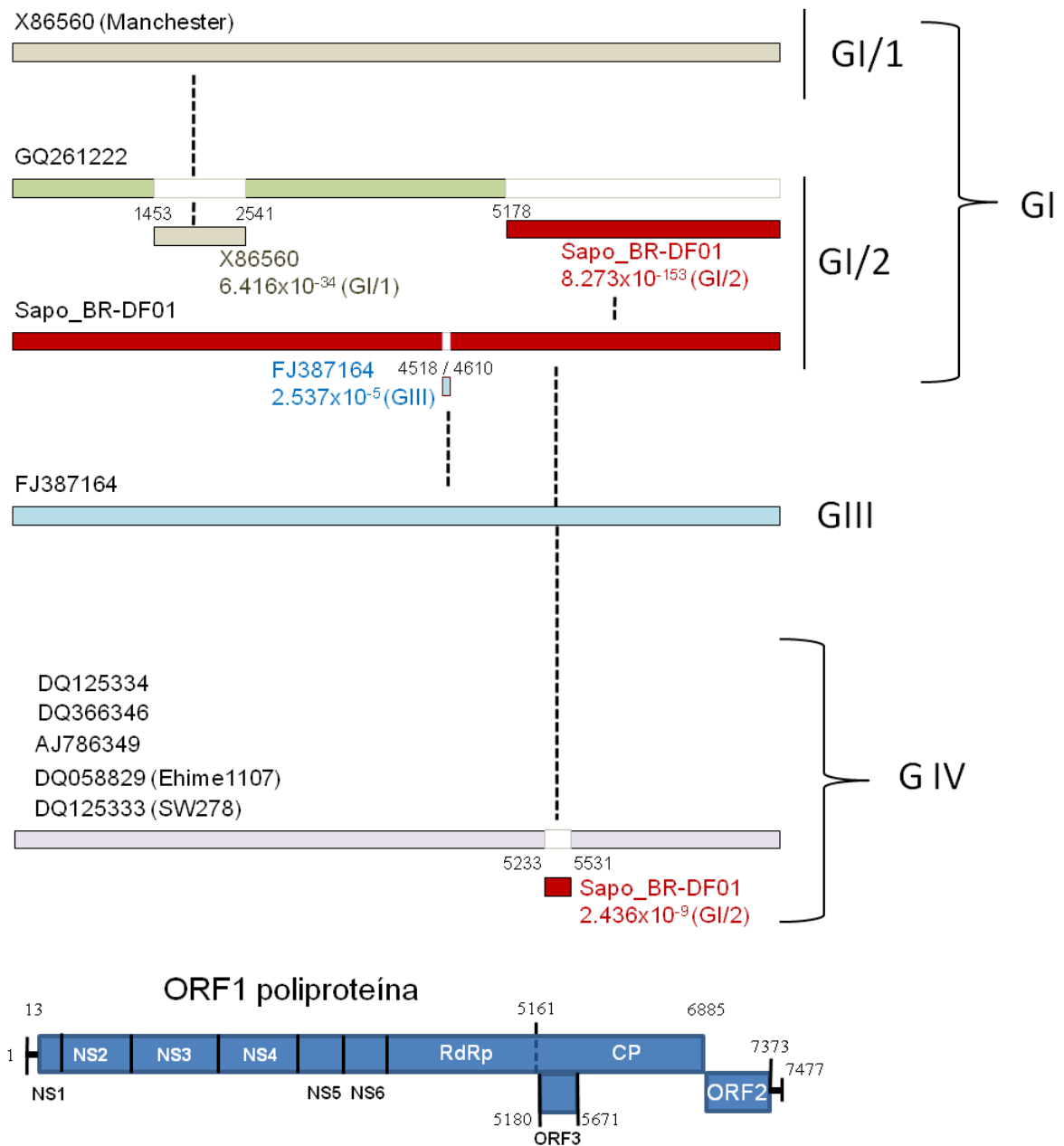
Figura 7. Árvores filogenéticas baseadas no algoritmo máxima-verossimilhança utilizando as sequências de CP (a) e 5' UTR mais ORF1 (b). Para a análise filogenética de CP (a) foram utilizadas as sequências correspondentes aos nucleotídeos de 5161 a 6885 (correspondentes ao genoma do Sapo_BR-DF01), enquanto que para o terminal 5' (b) foram utilizados os nucleotídeos de 1 a 5161. Os vírus Sapo_BR-DF01 e GQ261222 estão destacados em retângulos.

4.4 Análise de possíveis eventos de recombinação

Em uma análise de genoma completo, quatro sinais de recombinação (não relatados em outros estudos) foram detectados pelo RDP3 (Figura 8). Primeiramente, possíveis eventos de recombinação foram encontrados entre os vírus X86560 (Manchester), GQ261222, Sapo_BR-DF01 e FJ387164 (Figura 8). É possível que GQ261222 seja resultado de uma recombinação intra-genogrupo, sendo receptor de parte da ORF1 do vírus X86560 Manchester ($p = 6,4 \times 10^{-34}$ pelo RDP) e região referente ao gene da CP do vírus Sapo_BR-DF01 ($p = 8,2 \times 10^{-153}$ pelo RDP). Ainda em relação ao vírus GQ261222, foi possível observar que sua região 5' (1-5161nt) agrupa-se perfeitamente no GI/1 (Figura 7b), essa informação também foi observada em um diagrama de distância gerado pelo RDP3 (Figura 9). Portanto, é provável que GQ261222 seja uma quimera entre GI/1 e GI/2.

Além disso, o isolado Sapo_BR-DF01 pode ser receptor de uma pequena região nucleotídica da RdRp (4518-4610 nt) de um sapovírus suíno, FJ387164 (PEC) (GIII – $p = 2,5 \times 10^{-5}$ pelo RDP) (Figura 8). Esse possível evento de recombinação foi encontrado quando utilizadas sequências nucleotídicas referentes ao início da RdRp a região 3'UTR de 30 sapovírus. Nesta análise, não somente Sapo_BR-DF01, mas também quatro vírus pertencentes ao GI/2 (FJ844411, AF294739, U95644 e U73124) apresentaram o mesmo sinal de recombinação (Figura 10).

Um sítio de recombinação inter-genogrupo foi encontrado entre isolados do grupo GIV e Sapo_BR-DF01 (GI/2) (Figura 8). Esse sinal de recombinação foi localizado na junção entre RdRp e CP (5233-5531 nt) ($p = 2,436 \times 10^{-9}$ pelo RDP).



Genoma completo

Figura 8. Análise de recombinação baseada no genoma completo utilizando o método RDP. O genoma completo de cada vírus é representado pelos retângulos maiores, enquanto os menores representam as regiões recombinadas. A relação entre possíveis sequências parentais e filhas estão indicadas por linhas pontilhadas na vertical. A classificação genogrupo-genótipo se encontra ao lado direito da figura. Os valores de p para cada evento de recombinação, obtidos pelo RDP, estão indicados abaixo da identificação dos vírus. A organização do genoma de sapovírus e suas ORF3 está representada pelo esquema em azul, com as posições nucleotídicas correspondentes. NS = proteína não estrutural; RdRp = RNA polimerase RNA dependente; CP = Proteína do Capsídeo.

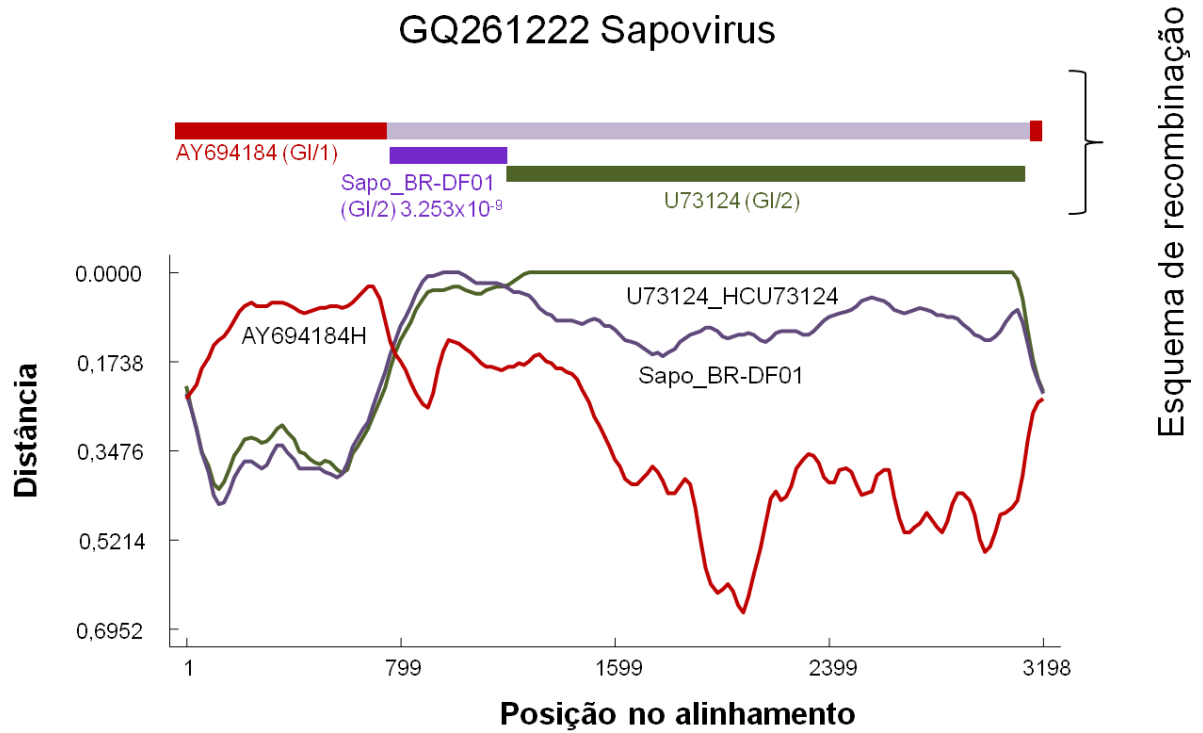


Figura 9. Diagrama de distância de GQ261222 contra os três sapovírus mais relacionados. A sequência de GQ261222 foi utilizada como referência (eixo y = 0) e a distância entre os outros três sapovírus (AY694184 (GI/1), Sapo_BR-DF01 (GI/2) e U73124 (GI/2)) foi calculada e demonstrada no diagrama.

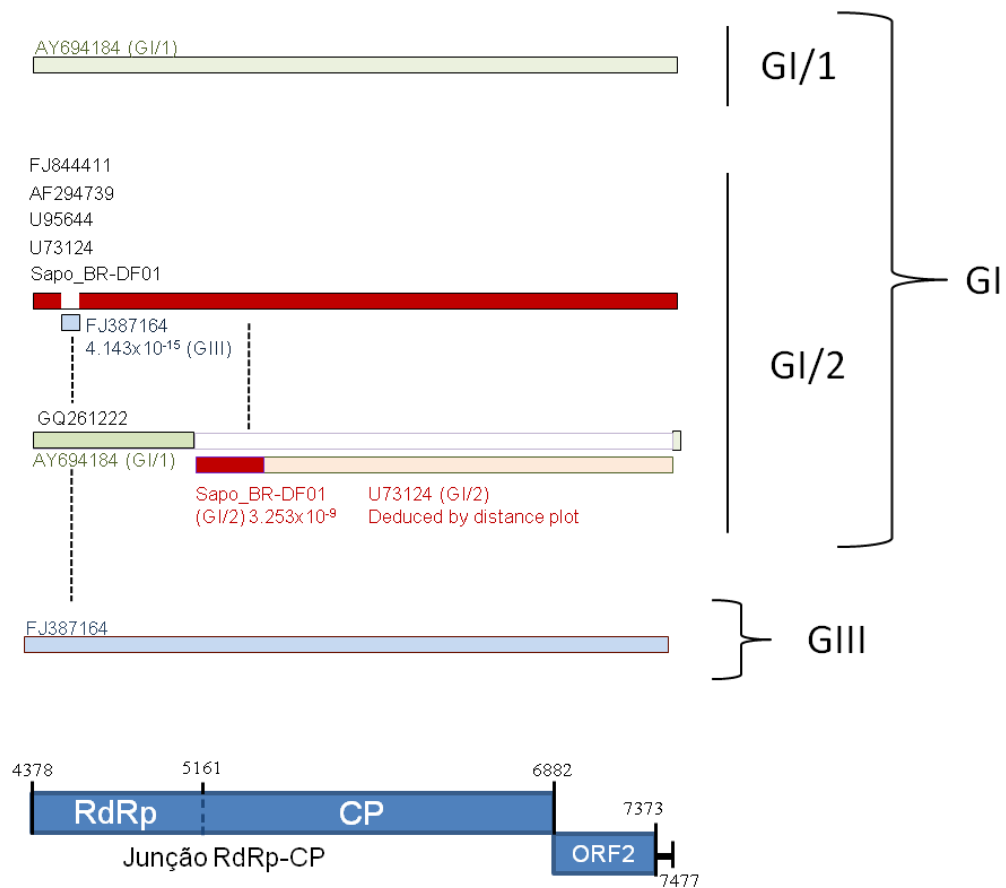


Figure 10. Análise de recombinação baseada na região 3' do genoma de sapovírus utilizando o método RDP. Uma representação esquemática da região genômica utilizada nessa análise é ilustrada na parte inferior da figura, em escala, com os nucleotídeos correspondentes. O genoma parcial de cada vírus é representado pelos retângulos maiores, enquanto os menores representam as regiões recombinadas. A relação entre possíveis sequências parentais e filhas estão indicadas por linhas pontilhadas na vertical. A classificação genogrupo-genótipo se encontra ao lado direito da figura. Os valores de p para cada evento de recombinação, obtidos pelo RDP, estão indicados abaixo da identificação dos vírus.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi determinada a sequência do genoma completo de um sapovírus isolado em Brasília, Brasil e, foi comparada a outras 21 sequências de genomas completos e 29 de região 3' terminal disponíveis no banco de dados DDBJ/EMBL/GenBank. O principal objetivo deste trabalho era analisar possíveis eventos de recombinação entre sapovírus como um dos fatores responsáveis pela evolução desse grupo de vírus.

Recombinação acontece somente em células que estão infectadas simultaneamente por pelo menos dois vírus distintos. Assim como em outros vírus de RNA senso positivo (RNA+), eventos de recombinação também são descritos para a família *Caliciviridae*. Motomura e colaboradores (2010) avaliaram a evolução molecular dos norovírus GII/4 devido a sua prevalência mundial. As epidemias de 2006 a 2009, no Japão, foram analisadas usando 199 genomas quase-completos de norovírus, e o resultado sugeriu uma recombinação frequente na região entre as ORF1 e ORF2 (junção RdRp-CP), o que promove um mecanismo de modificações na proteína do capsídeo e na sua RNA polimerase (Motomura et al., 2010).

Katayama e colaboradores (2004) descreveram a primeira evidência de recombinação intra-genogrupo de sapovírus entre os vírus Mc10 e C12, ambos pertencentes ao GII. Uma pequena região abrangendo o fim da região da RdRp e o começo da região de CP foi considerada o local de recombinação (Katayama et al., 2004). Hansman e colaboradores (2005) reportaram o primeiro evento de recombinação inter-genogrupo entre sapovírus GII (Mc10) e GIV (vírus SW278 e Ehime1107). O vírus analisado apresentava em sua sequência a região não estrutural altamente idêntica ao GII e a região estrutural mais próxima as sequências presentes no GIV (Hansman et al., 2005). Tal evidência sugeriu que os sapovírus podem escapar do sistema imunológico de seus hospedeiros modificando suas regiões estruturais. Esta hipótese também é discutida por Phan e colaboradores (2007), que identificaram evento de recombinação intra-genogrupo entre sapovírus GI/1 em amostras coletadas no Japão de julho de 2005 a junho de 2006 (Phan et al., 2007).

A sequência do isolado Sapo_BR-DF01 mostrou algumas evidências de eventos de recombinação (Figura 8) com GQ261222 (GI/2), e com outros cinco isolados de GIV, todos presentes na junção RdRp-CP, sendo Sapo_BR-DF01, possivelmente, um parental de GQ261222. Este isolado também apresentou evidência de recombinação com o vírus X86560 (Manchester), porém não na junção RdRp-CP, e sim entre NS3 e NS4 presentes na ORF1.

Os eventos de recombinação encontrados em calicivírus foram detectados na junção RdRP-CP, e é possível que isto ocorra como forma de evasão viral frente ao sistema imune do hospedeiro. No entanto, esta não é a única razão pela qual os vírus animais recombinam (Lai, 1992), e outros mecanismos podem, provavelmente, explicar a ocorrência e seleção de recombinantes com diferentes sítios de recombinação, como observado na região entre NS3 e NS4 de GQ261222.

Outro achado referente ao Sapo_BR-DF01 é a sua relação com os vírus pertencentes a GIV. Neste caso, o sítio de recombinação identificado também foi a junção RdRp-CP, o que corrobora com a hipótese de que essa região talvez seja um *hot spot* para recombinação, semelhante aos resultados encontrados para norovírus (Motomura et al., 2010). A recombinação inter-genogrupo foi encontrada para todos os vírus de GIV utilizados nesse trabalho. Desta forma é possível que esse evento tenha acontecido nos primeiros estágios evolutivos desse genogrupo.

Outro sinal interessante de recombinação foi encontrado entre os isolados GI e o representante PEC de GIII, o que pode implicar uma possível coinfeção de sapovírus suíno e humano em um mesmo hospedeiro, gerando a recombinação.

Até o momento, somente Martella e colaboradores (2008) sugeriram uma relação entre sapovírus suínos (GIII) e humanos (GI) baseando-se na análise da região 3' dos genomas, ainda que análises de recombinação não tenham sido claramente demonstradas. A recombinação inter-genogrupo, identificada nesse trabalho, referente à GIII e GI/2 incluindo o vírus brasileiro apresentou um baixo valor de *p*. Outras predições são necessárias para sua confirmação.

O uso da sequência do gene da CP como única forma de genotipagem de sapovírus pode levar a uma classificação imprecisa, devido a frequente detecção de recombinação entre esses vírus. Essa afirmação pode ser ilustrada pelo exemplo do vírus GQ261222. Quando 65% de seu genoma é utilizado para genotipagem (região 5') este pode ser classificado como GI/1, no entanto quando somente a sequência de CP é utilizada a classificação é alterada para GI/2 (Figura 7). O critério de identificação taxonômica e genotípica deve ser discutido levando-se em conta os eventos de recombinação, principalmente para estudos evolutivos.

Conclui-se que assim como os norovírus, os sapovírus também apresentam a junção RdRp-CP como sítio de recombinação, porém a compreensão quanto a diversidade genética dos sapovírus ainda é limitada, principalmente na América Latina, onde não é realizada a detecção desses vírus. Para um maior entendimento quanto à frequência e impacto desses

eventos de recombinação entre sapovírus é necessário um maior número de sequências genômicas.

CAPÍTULO II – EXPRESSÃO DE SAPOVIRUS-LIKE PARTICLES

1. EXPRESSÃO DE PROTEÍNA HETERÓLOGA USANDO BACULOVÍRUS RECOMBINANTE

Os baculovírus pertencem à família *Baculoviridae*, são vírus de DNA fita dupla, circular e o genoma possui de 80 a 200 kbp. Estes vírus são cada vez mais utilizados como ferramenta biotecnológica, devido à eficiência e qualidade das proteínas recombinantes obtidas (Rohrmann, 2011).

A expressão de proteínas por meio de engenharia de baculovírus ocorre pela inserção, através de recombinação homóloga, do gene de interesse no genoma do vírus, em geral, sob o comando do promotor forte do gene da poliedrina, que não é essencial para a infecção celular, mas representa mais de 70% da quantidade de proteína total da célula hospedeira na fase tardia da infecção (Smith et al., 1983). Esse genoma modificado é utilizado para transfecção em culturas de células de inseto, uma vez que a transfecção do genoma viral desprovido de partícula gera infecção e a expressão heteróloga ocorre na fase de ativação do promotor, a partir de 12 horas pós-inoculação (hpi), com pico de acumulação de proteína entre 72 e 120 hpi. (Smith et al., 1983).

Nos sistemas comerciais disponíveis para expressão heteróloga o baculovírus utilizado é o *Alphabaculovirus, Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) (Figura 11), que é a espécie-tipo da família *Baculoviridae* (Fauquet et al., 2005). As principais culturas celulares utilizadas são derivadas de *Spodoptera frugiperda* e de *Trichoplusia ni* (Willians & Faulkner, 1997).

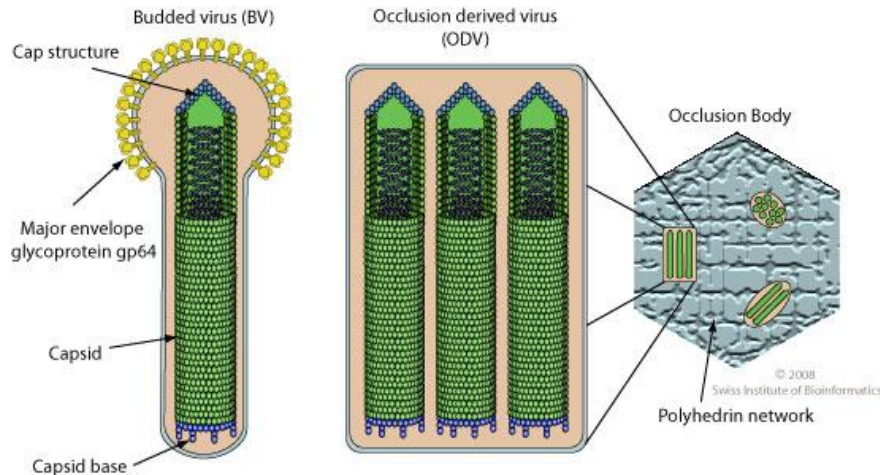


Figura 11. Ilustração do baculovírus AcMNPV. Os baculovírus apresentam duas formas de infecção, os vírus brotados (*budded virus* - BV) e os vírus oclusos (*occlusion derived virus* – ODV). No processo de expressão de proteínas os ODVs podem ser observados diretamente ao microscópio de luz, caso haja também a expressão de poliedrina (ViralZone, 2013).

Esse sistema de expressão de proteínas heterólogas apresenta vantagens, tais como capacidade de acomodar grandes inserções de DNA (O'Reilly et al., 1994), simplicidade de manipulação comparada a células de mamíferos e principalmente o ambiente de expressão eucariótica (Castro et al., 1999), ou seja, são capazes de realizar modificações pós-traducionais como, glicosilação, ponte de dissulfeto e fosforilação (Mille, 1981). Há ainda o alto nível de expressão e baixo custo comparado com sistemas de cultura celular de mamífero (Kost et al., 2005). Estas características permitem a utilização de baculovírus para a produção de antígenos virais com potencial para uso em vacinas humanas e testes diagnósticos como, por exemplo, a vacina “CERVARIX®” produzida contra HPV-16, um dos vírus do papiloma humano responsáveis pelo câncer de colo de útero (Zheng et al., 2004), outra vacina humana produzida utilizando esse sistema é a vacina contra câncer de próstata “PROVENGE®”, baseada na expressão de PSA (Small et al., 2000).

2. VIRUS-LIKE PARTICLE

Virus-like particles (VLPs) são arranjos tridimensionais formados basicamente pela(s) proteína(s) do capsídeo de um vírus (se não for envelopado) apresentando morfologia semelhante à morfologia dos vírus nativos, no entanto, sem a presença das proteínas não estruturais e do genoma viral em seu interior (Figura 12). O amplo uso de VLP compreende desde a tentativa de se avaliar as funções das proteínas estruturais, bem como o uso em kits diagnósticos e, mais comumente, a produção de vacinas.

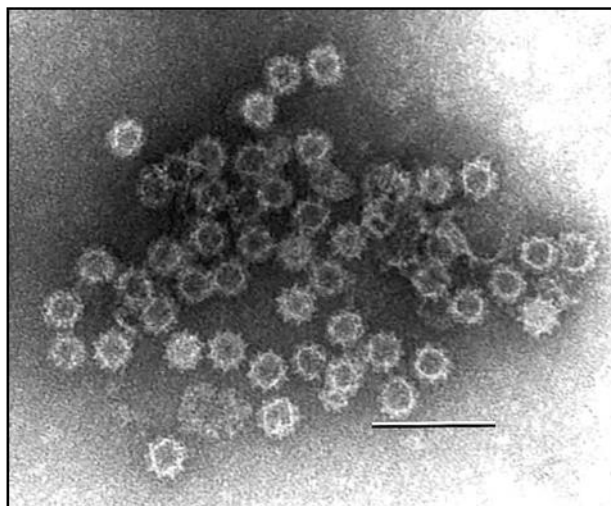


Figura 12. *Virus-like particles* de sapovírus. Partículas observadas em microscopia eletrônica de transmissão após contrastação negativa com molibdato de amônio 1%. Barra equivalente a 100 nm (adaptado de Jiang et al., 1999).

No que se refere aos calicivírus, o uso de VLPs tem sido de extrema importância quando considerada a falta de uma linhagem celular específica para a compreensão do ciclo infeccioso dos gêneros que infectam humanos.

A partir dos anos 90, estudos relacionados à VLPs utilizando principalmente o sistema de baculovírus recombinantes para expressão heteróloga demonstraram uma série de informações sobre esses vírus. A proteína do capsídeo de diversos calicivírus humanos incluindo *Norwalk virus*, *Mexico virus* e o *Snow mountain virus*, foi expressa em células de inseto infectadas com baculovírus recombinante (Green et al., 1997; Hardy et al., 1997; Jiang et al., 1992, 1995).

Em 1992, Jiang e colaboradores produziram a primeira VLP de *Norwalk virus*. A proteína do capsídeo (ORF2) foi expressa em células de inseto dando origem a partículas de morfologia semelhante à do vírus nativo. A antigenicidade destas foi comprovada por meio de ELISA e imunoprecipitação (Jiang et al., 1992). A VLP também foi utilizada para obtenção de anticorpos produzidos em animais, como coelhos, por exemplo. No ano seguinte, Green e colaboradores (1993) realizaram um teste para avaliar o tipo de ligação entre os anticorpos anti-norovírus e VLPs e, anti-norovírus e vírus nativo, esse estudo ressaltou a possibilidade do uso da proteína do capsídeo expressa em célula de inseto como instrumento para detecção de norovírus (Green et al., 1993).

Além de permitir o diagnóstico de gastroenterites causadas por calicivírus, as VLPs permitiram também o estudo da estrutura da partícula viral, como no trabalho realizado por Prasad e colaboradores (1994), onde foram descritas as unidades S e P (P1 e P2) formadoras

do capsídeo, por meio de criomicroscopia eletrônica. As VLPs de norovírus foram ainda utilizadas para a compreensão da internalização viral em diferentes linhagens de células, embora em estudos como esse tenha sido observada internalização tanto em células humanas como animais (Prasad et al., 1994). White e colaboradores (1996) observaram que a linhagem de células D-CaCo-2 apresentavam uma maior afinidade de ligação com VLPs. Essas partículas eram capazes de invadirem essas células em cultura com maior afinidade quando comparadas a outras células de mamíferos (White et al., 1996).

Em 1994 surgiu a primeira evidência de que as VLPs poderiam ser viáveis como vacinas contra calicivírus. O primeiro exemplo surgiu de um grupo de pesquisadores franceses (Laurent et al., 1994) que utilizaram o capsídeo de RHDV (VP60) (*Rabbit hemorrhagic disease virus*) purificado após expressão em células de inseto, como vacina em coelhos. Os animais receberam injeções intramusculares 15 e cinco dias antes do desafio com o vírus selvagem. O resultado foi o desenvolvimento de anticorpos capazes de impedir o desenvolvimento da patologia. Em 2006 surgiu a primeira candidata a vacina de felinos domésticos contra FCV (*Feline calicivirus*), também derivada de VLP (Di Martino et al., 2006). Já para suínos, as VLPs foram utilizadas no desenvolvimento de testes ELISA para detecção de anticorpos anti-PEC (*Porcine enteric calicivirus*) em soro de suínos que apresentavam sintomas de diarreia (Guo et al., 2001b).

A primeira vez que uma VLP de sapovírus humano foi expressa por meio de células de inseto o intuito era avaliar a morfologia da proteína e quais as sequências fundamentais para sua formação (Numata et al., 1997). Jiang e colaboradores (1999) utilizaram dois isolados de sapovírus (Hou/86 e Hou/90) com oito construções cada, e somente a construção que apresentava 73 nucleotídeos à jusante da sequência completa da proteína do capsídeo formou VLP. Esses experimentos iniciais foram cruciais para determinar que a inserção de hexa-histidina (6xhis) não interfere na expressão da proteína do capsídeo, no entanto, impede a formação da VLP (Jiang et al., 1999).

Na última década, o principal desafio em relação aos calicivírus humanos tem sido a busca por células cultiváveis capazes de manter a infecção viral, para que dessa forma se possa entender melhor o ciclo infeccioso desses vírus. Foi a partir de VLPs produzidas por baculovírus recombinantes que se descobriu que a ORF3 dos norovírus expressa uma proteína estrutural menor, com função ainda desconhecida (Glass et al., 2000). Ainda para norovírus, o uso de VLP como possível vacina demonstrou, em estudos de fase I de segurança e efetividade, a capacidade de estimular IgG e IgA em humanos voluntários ao desafio de

infecção (Ball et al., 1999; Noad and Roy, 2003). Estudos utilizando inoculação oral e intranasal demonstraram uma relação direta de estimulação do sistema imune também em tecidos mucosos distais, o que faz das VLPs candidatas a vacinas carreadoras de peptídeos fusionados. No entanto, o obstáculo atual é o mesmo que ocorre com o vírus influenza devido às mutações virais que ocorrem a cada surto, ou seja, a vacina deverá ser renovada a cada modificação detectável (Herbs-Kralovetz et al., 2010).

Embora os norovírus sejam, atualmente, os principais agentes virais causadores de gastroenterites em humanos, o desenvolvimento de novas tecnologias para detecção demonstrou que os sapovírus são, também, importantes patógenos relacionados a essa patologia, porém de forma aguda. Dentre os principais trabalhos descritos a respeito desse gênero, há aqueles relacionados a detecção, como o realizado por Hansman e colaboradores (2006), que desenvolveram um teste ELISA utilizando VLP produzida em células de inseto para produção de anticorpos policlonais (Hansman et al., 2006). Oka e colaboradores (2006) produziram VLP em células de mamíferos com o intuito de avaliar a antigenicidade dessas partículas quando inoculadas em animais para produção de anticorpos (Oka et al., 2006).

Um dos trabalhos mais importantes sobre a caracterização desses vírus utilizou partículas formadas a partir de baculovírus recombinante para elucidação da via proteolítica e sua influência na expressão da proteína do capsídeo independente da expressão da cisteíno-protease viral. Para esse estudo Hansman e colaboradores (2008) utilizaram o genoma completo de sapovírus e, avaliaram a expressão de cada uma das proteínas, na presença e ausência da “3C-like protease”. Os pesquisadores concluíram que a proteólise da poliproteína é realizada pela protease celular e, há formação de VLP, também, quando a poliproteína viral é inserida no genoma do baculovírus (Hansman et al., 2008).

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Produzir anticorpos policlonais anti-P2 (proteína parcial do capsídeo de sapovírus).
2. Construir baculovírus recombinante contendo o gene da proteína do capsídeo de sapovírus.
3. Expressar proteína do capsídeo de sapovírus em células de inseto.
4. Visualizar VLP por microscopia eletrônica de transmissão.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolado de sapovírus utilizado para o estudo

O isolado de sapovírus utilizado para este estudo foi descrito no item 3.1 do Capítulo I deste trabalho.

4.2 Expressão de região P2 do CP em *E. coli*

Para expressão de CP parcial foram amplificado 520 nt referentes à região variável do gene da proteína do capsídeo (P2) utilizando os iniciadores SapoP2 BamHI For (5'- AGA GAG GAT CCA ATG GGC GGA TGG TCT ACT GCA CCA GT -3') e SapoP2 XhoI Rev (5'- AGA GAC TCG AGT TAA GTG CCA TCC ATA GGT GTC A -3'). Após a purificação em gel de agarose 1% utilizando kit “Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification” (GE Healthcare) o cDNA foi ligado ao vetor doador pENTR-2B (Invitrogen) (Figura 13) de acordo com as instruções do fabricante. A escolha desse vetor deve-se a facilidade de clonagem oferecida pelo sistema *Gateway* (Invitrogen), que é um método baseado nas propriedades sítio-específicas de recombinação do bacteriófago lambda (Landy, 1989).

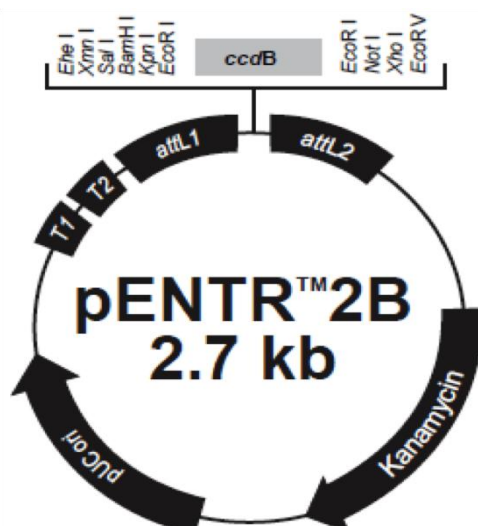


Figura 13. Representação do vetor de entrada pENTR-2B (Invitrogen). Esse vetor apresenta gene *ccdB*. Sítios de restrição das enzimas BamHI e XhoI (New England Biolabs) utilizados para clonagem de P2. Presença de gene de resistência a canamicina.

O pENTR-2B atua como um vetor de entrada, onde o gene de P2 foi clonado, eliminando a ORF do gene tóxico *ccdB*. A ligação foi feita após digestão dupla com as enzimas BamHI e XhoI (New England Biolabs) utilizando T4 DNA ligase (New England Biolabs) de acordo com as instruções do fabricante. A transformação foi feita em célula

DH5 α , eletrocompetentes. Foram plaqueados 200 μ l de transformante em uma placa de petri contendo meio LB Agar adicionado de canamicina (40 ng/ml). Após 24h de incubação na estufa a 37°C, dez colônias foram inoculadas em três ml de meio LB líquido contendo canamicina (40 ng/ml) e as culturas mantidas por 16h em agitação de 240 rpm a 37°C. Após extração de DNA plasmidial em pequena escala (miniprep) foi realizada uma digestão dupla com as enzimas XhoI e BamHI (New England Biolabs) utilizando NEB buffer quatro e BSA (New England Biolabs), de acordo com as instruções do fabricante.

Os três clones que apresentaram perfil esperado na digestão, ou seja, apresentaram dois fragmentos na eletroforese de gel de agarose 1%, um com o tamanho esperado do vetor (2700bp) e outro com o tamanho esperado do inserto (520bp) foram sequenciados para confirmação. Desses, apenas um apresentou a sequência na fase correta. Utilizando esse clone foi realizada a recombinação para o vetor de expressão pDEST-17 (Figura 13), que contém a sequência promotora da polimerase de RNA do fago T7, resistência a ampicilina, tamanho de 6354bp e, após o seu códon de início de tradução (ATG), seis histidinas, o que possibilita o uso de anticorpo anti- hexa histidina (SIGMA-ALDRICH) para detecção da proteína expressa. A clonagem foi realizada de acordo com as instruções do manual “*E. coli* Expression System with Gateway Technology” (Invitrogen).

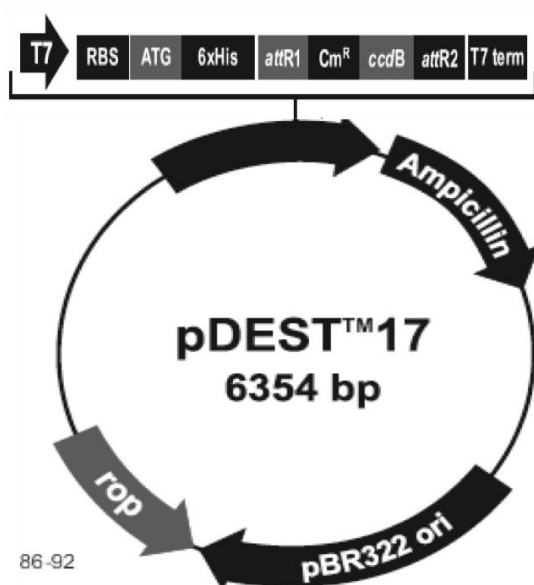


Figura 14. Representação do vetor de expressão pDEST-17 (Invitrogen). Esse vetor apresenta sítios *attR* para reação por meio da LR-clonase (Invitrogen), gene de resistência a ampicilina e, *6xhis*.

Para a obtenção desses clones foi realizado o mesmo procedimento de transformação em células DH5 α , eletrocompetentes, realizada para a obtenção de clones em pENTR-2B. Após a extração de DNA plasmidial (P2+pDEST-17) quatro clones que apresentaram perfil

de restrição correto foram enviados para o sequenciamento. Após a confirmação da sequência e da fase, apenas um clone foi transformado em BL21-AI, termocompetente, cepa de *E. coli* utilizada para expressão de genes sob o controle da T7 RNA polimerase (Grodberg and Dunn, 1988; Studier and Moffatt, 1986), pois, ela apresenta o gene da T7 RNA polimerase sob o controle do promotor *araBAD*, ou seja, a L- arabinose é um indutor de expressão nesse sistema (Lee, 1980; Lee *et al.*, 1987).

Para transformação em célula BL21-AI termocompetente, o DNA plasmidial foi diluído (1:50, aproximadamente 2ng/μl) e um μl foi adicionado a bactéria, em seguida a mistura foi incubada no gelo por 30 minutos e após esse período o tubo foi colocado por 30 segundos em água aquecida a 42°C (choque térmico). A etapa seguinte foi realizada no gelo, onde 250μl de meio SOC (Sambrook et al., 1989) foram adicionados para o posterior crescimento em agitação de 240 rpm a 37°C. Foram plaqueados 50μL do transformante em placa de petri contendo 20 ml de meio LB mais ampicilina (50 ng/ml). Após 24h na estufa a 37°C as colônias brancas foram inoculadas em três ml de meio LB líquido contendo canamicina (40 ng/ml) por 16h em agitação de 240 rpm a 37°C. A partir desses inóculos a expressão foi feita seguindo o manual “*E. coli* Expression System with Gateway Technology” (Invitrogen).

Para confirmação da expressão da proteína foi feito um SDS-PAGE e *Western-blotting* utilizando anticorpo monoclonal anti-hexa histidina.

4.2.1 Purificação de proteína

Para purificação de proteína foi utilizada coluna de Ni-NTA, (Invitrogen). O procedimento foi realizado de acordo com o manual “Ni-NTA Purification System” (Invitrogen) para proteínas insolúveis.

Para determinar em qual a fração estava a proteína (solúvel ou insolúvel), as células foram lisadas utilizando-se um tampão de guanidina, de acordo com as instruções dos fabricantes. O produto lisado foi centrifugado a 3000 g por 15 minutos, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Ambos, sobrenadante e sedimento, foram utilizados para a eletroforese SDS-PAGE.

4.2.2 Produção de anticorpos

A produção de anticorpos contra CP de sapovírus foi realizada utilizando dois coelhos fêmeas, de 2,5 kg e 16 semanas de vida. Foram feitas três aplicações de 200 µg/ml de proteína, cada, num intervalo de três semanas entre cada aplicação.

Na primeira aplicação foi utilizado (co-inoculado) um ml de adjuvante de Freund completo e um ml (200 ng) de proteína purificada. A aplicação é realizada em cinco locais distintos no dorso do coelho após assepsia do local com etanol 70%. Após três semanas foi realizada a segunda aplicação, porém com adjuvante de Freund incompleto e proteína purificada. Na terceira e última aplicação, seis semanas após a primeira aplicação, foi injetado no coelho, também, adjuvante incompleto e proteína purificada.

Após uma semana da terceira inoculação foi realizada a coleta de sangue do coelho, a partir da veia central auricular. Foram coletados 20 ml de sangue. Foram realizadas três coletas num intervalo de sete dias cada.

Após cada coleta o sangue foi deixado em temperatura ambiente por 1 hora e em seguida centrifugado a 3800 g por 20 minutos. O antissoro foi coletado e armazenado em freezer -20°C.

4.2.3 Purificação de anticorpos

Para purificação de imunoglobulina G (IgG) dos soros obtidos a partir da coleta de sangue total dos coelhos foi utilizada a coluna de DEAE-Sephacel (GE Healthcare). O soro escolhido para purificação foi o soro correspondente a coleta três do coelho dois. O soro foi diluído 1:10 em água destilada e, em seguida foram adicionados 10 ml de solução saturada de sulfato de amônio. Após incubar a amostra a 4°C por 4h, esta foi centrifugada a 2450 g por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em PBS 0,5X pH 6,5. A amostra foi dialisada e então adicionada a coluna DEAE-Sephacel (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. As frações colhidas foram armazenadas no freezer -20°C.

4.3 Amplificação da CP completa

O RNA total foi extraído da amostra infectada usando TRIzol Reagent (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. O produto de PCR referente à CP do vírus foi amplificado usando o iniciador oligodT50PacIM4 (5'-TCA GCA CTG ACC CTT TTG AAT TAA T50-3') por meio de transcrição reversa usando a enzima Superscript III (Invitrogen). O iniciador SapoVLP For (5'- TTT GGA ATT CCA CCA TGG AGG GCA ATG GCT CCC A - 3') foi usado para a PCR em combinação com PacI-M4-SacI Rev (5'- TTT GAG CTC TTT TCC CAG TCA CGA CTT AAT TAA -3'). O fragmento obtido por PCR, usando LongAmp *Taq* DNA polimerase (New England Biolabs) foi de 2.2 kpb.

4.3.1 Clonagem e Sequenciamento

Após a purificação em gel de agarose 1% utilizando kit “Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification” (GE Healthcare), o produto de PCR foi ligado ao vetor pGEM-T Easy (Promega) (Figura 15) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida transformado em *E. coli* eletrocompetente (DH5 α). Um volume de 200 μ l do transformante foi plaqueado em placa de petri contendo 20 ml de meio LB Agar mais ampicilina (50ng/ml), IPTG (100 ng/ml) e X-gal (20 ng/ml). Após 24h na estufa a 37°C as colônias brancas foram inoculadas em três ml de meio LB líquido contendo ampicilina (50 ng/ml) por 16h em agitação de 240 rpm a 37°C. Foi então feito miniprep desses inóculos a fim de extrair o DNA plasmidial. Para confirmar quais os possíveis clones foi realizada uma digestão dupla com as enzimas EcoRI e SacI (New England Biolabs), NEB buffer quatro, BSA (New England Biolabs), de acordo com as instruções do fabricante.

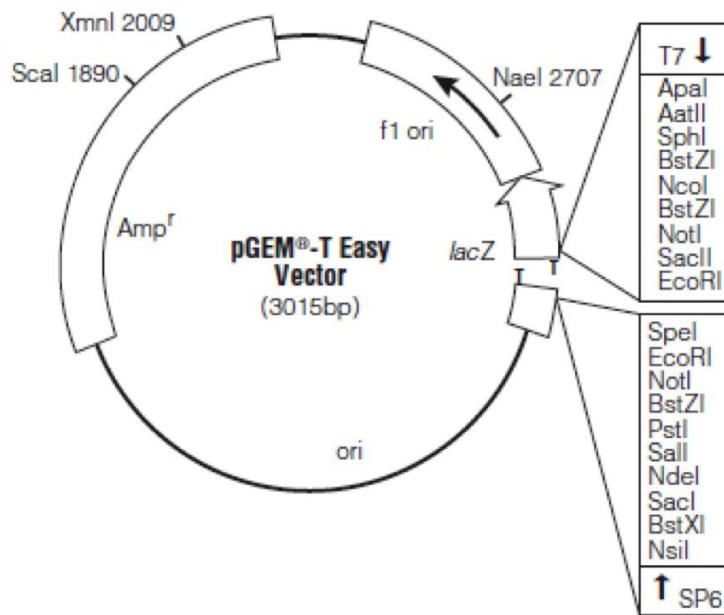


Figura 15. Representação do vetor pGEM-T *easy* (Invitrogen). O vetor pGEM-T *easy* apresenta gene de resistência a ampicilina, promotor lacZ e sítios de restrição EcoRI e SacI, utilizados para liberação do inserto referente ao gene da proteína do capsídeo.

Dois clones foram selecionados para sequenciamento e em seguida uma sequência consenso foi gerada usando o software Staden 4.0 (Staden, 1996). Esses clones foram analisados para a confirmação da sequência que posteriormente foi subclonada no vetor pFastBac1 (Invitrogen), para a construção do bacmídeo.

4.3.2 Sistema *Bac-to-bac*

O gene da CP foi inserido no vetor pFastBac1 (Invitrogen) sob o controle do promotor da poliedrina, considerado forte. Geralmente, os genes inseridos nessa região são expressos na fase tardia da infecção pelo baculovírus recombinante. Assim como, o gene da CP foi duplamente digerido com as enzimas EcoRI e SacI (New England Biolabs) o vetor pFastBac1 (Invitrogen) (Figura 16) foi digerido e defosforilado com CIP (New England Biolabs) por uma hora a 37°C, de acordo com as instruções do fabricante. A ligação do gene da CP no vetor foi realizada utilizando a enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs) de acordo com as instruções do fabricante.

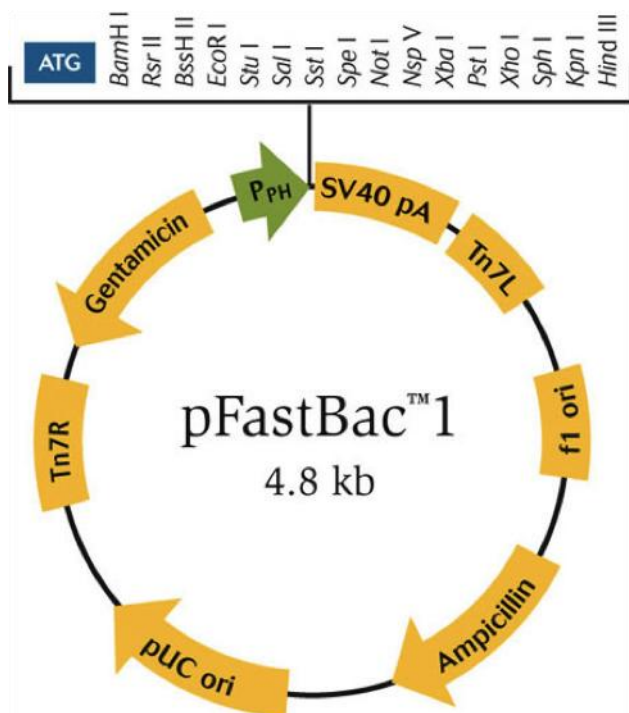


Figura 16. Representação do vetor de expressão em células de inseto pFastBac1 (Invitrogen). O vetor pFastBac1 apresenta gene de resistência a gentamicina, promotor da poliedrina e sítios de restrição EcoRI e SacI, utilizados para inserção do inserto referente ao gene da proteína do capsídeo.

Foi realizada a transformação dessa nova clonagem em célula eletrocompetente DH5 α (*E. coli*). Um volume de 200 μ l do transformante foi plaqueado em placa de petri contendo 20 ml de meio LB Agar mais canamicina (40ng/ml). Após 24h de incubação na estufa a 37°C as colônias brancas foram inoculadas em 3 ml de meio LB líquido contendo canamicina (40 ng/ml) por 16h em agitação de 240 rpm a 37°C. Foi então feito miniprep desses inóculos a fim de extrair o DNA plasmidial, para posterior sequenciamento e confirmação da correta ligação do gene de interesse no vetor (pFastBac1).

O sistema de expressão de baculovírus *Bac-to-bac* (Invitrogen) (Figura 17) contém uma linhagem de *E. coli* DH10Bac que fornece as duas moléculas necessárias para que ocorra a transposição, o bacmídeo bMON14272 (136 kb) e o plasmídeo *helper* pMON14272 (13,2 kb), que fornece a função de transposição Tn7 *in trans* (Barry, 1988) ao produzir uma transposase de forma constitutiva. Dessa forma, após a confirmação por sequenciamento de dois clones ligados corretamente em pFastBac1 (Invitrogen) foi realizada a transformação dos plasmídeos purificados em DH10bac, célula termocompetente, de acordo com as instruções do fabricante. Foi plaqueado 200 μ l do transformante em uma placa de petri contendo 20 ml de meio LB Agar mais tetraciclina (50ng/ml), canamicina (40ng/ml), gentamicina (sete ng/ml), IPTG (100 ng/ml) e X-gal (20 ng/ml). Após 48h na estufa a 37°C as colônias brancas

foram inoculadas em três ml de meio LB líquido contendo tetraciclina (50 ng/ml), canamicina (40 ng/ml) e gentamicina (sete ng/ml) por 16h em agitação de 240 rpm a 37°C. Foi então feito um miniprep desses inóculos a fim de extrair o DNA plasmidial.

Os bacmídeos recombinantes foram analisados por PCR para confirmar a transposição utilizando-se iniciador específico para CP (Sapo_VLPFor) e também para sequência M13 que flanqueia o sítio de transposição (M13 Rev). Essa amplificação foi realizada como controle da transposição do gene de interesse para genoma do baculovírus. A reação foi feita com LongAmp Taq polimerase, 2,5 nM dNTP, buffer LongAmp um µl de DNA plasmidial, num tempo de extensão de três minutos.

Os plasmídeos recombinantes (nomeados clone um, clone dois e clone três) foram purificados e um µg de DNA vindo de cada bacmídeo foi diluído em 200 µl de meio de cultura TC-100 (GIBCO), para cada amostra, cinco µl de lipofectina (Cellfectin, Invitrogen) foi adicionados em 200 µl de meio de cultura TC-100 (GIBCO). As duas misturas foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente para que o DNA se incorporasse aos lipossomos. Após a incubação, o meio de cultura de três placas de 33 mm contendo monocamada de células de inseto da linhagem BTI-Tn5B1-4 (Granados et al., 1994) foi removido e um ml de mistura contendo DNA/lipofectina foi adicionada à placa, de modo a recobrir toda a camada celular. Este sistema foi incubado a temperatura ambiente por três horas e depois foram adicionados 1,5 ml de meio de cultura com 10% de soro fetal bovino (GIBCO). As células foram incubadas por sete dias a temperatura ambiente e observadas via microscopia de luz invertida após esse período (Axiovert 100, Zeiss).

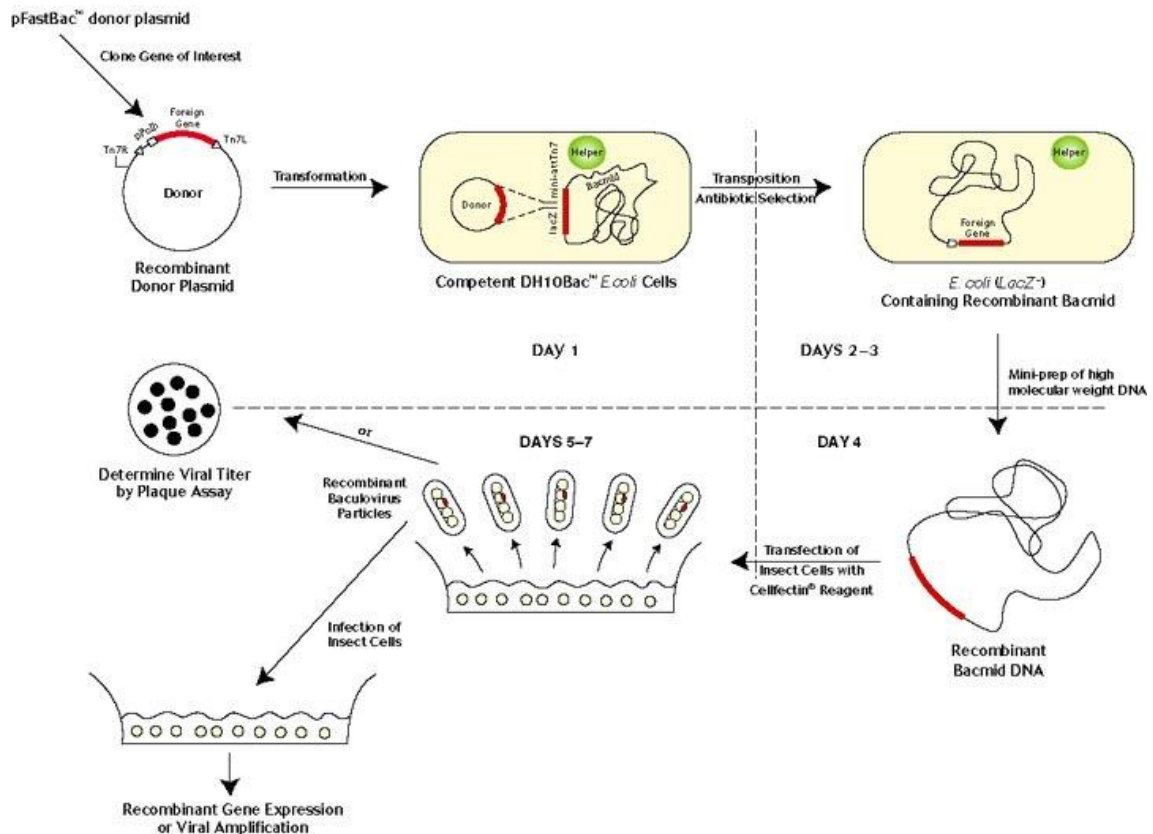


Figura 17: Esquema representativo do sistema Bac-to-bac (Invitrogen). Dia 1: recombinação do gene de interesse no plasmídeo doador (pFastBac1), transformação em célula competente DH10Bac para transposição e geração do bacmídeo (baculovírus recombinante) (Dias 2-3); Dia 4: bacmídeo recombinante confirmado por meio de PCR usando primers M13pUC e os primers do gene de interesse; Dias 5-7: infecção celular usando bacmídeo recombinante, titulação viral para determinar a infecção viral em novas células para obter proteína de interesse expressa (adaptado de Bac-to-bac Baculovirus Expression System Manual – Invitrogen).

4.3.3 Confirmação da expressão

Para confirmar se houve expressão da proteína do capsídeo foi realizada a purificação utilizando cloreto de cério de acordo com (Ausar et al., 2006). As células foram centrifugadas a 500 g por cinco minutos a temperatura ambiente. A concentração da VLP presente na fração do sobrenadante foi realizada por meio de colchão de sacarose a 20% e ultracentrifugação por duas horas (rotor SW70 Beckman) a 112400 g a 4°C. O sedimento foi então ressuspensionado em PBS 0,5X, pH 5,5 e sedimentado através do CsCl (0,39 g/ml) (rotor SW28 Ti Beckman) a 104000 g por 18h a 4°C. Todas as fases foram coletadas e dialisadas em solução PBS 0,5, pH 5,5, por três horas. As amostras foram então coletadas e estocadas a 4°C até o uso. As células sedimentadas após a primeira centrifugação a 500 g por cinco minutos foram lisadas com tampão PBS 0,5X Triton 1%, seguida de uma centrifugação de 3800 g por 15 min. O

sobrenadante desse procedimento foi então processado como o sobrenadante inicialmente separado das células.

Após a purificação uma eletroforese SDS-PAGE foi realizada para confirmar a expressão de CP, cuja banda esperada era de 60 kDa. Para a análise por meio de *Western-blotting* da expressão da CP em célula de inseto foi utilizado como anticorpo primário o anticorpo policlonal contra P2, cuja proteína foi expressa em *E. coli*.

4.4 Análises da VLP em MET

Após a purificação da proteína por cloreto de céσιο como descrito no item 4.3.3, as frações, que apresentaram no SDS-PAGE bandas acima de 50 kDa foram, separadamente, colocadas em telhas de níquel de 2,5 mm, preparadas previamente com Formvar e carbono. Para a análise direta da partícula foi realizada a contrastação negativa usando acetato de uranila 1%, onde os íons se depositam ao redor das partículas contrastando-as.

5. RESULTADOS

5.1 Amplificação e clonagem de P2

O gene da proteína do capsídeo parcial (P2) foi amplificado utilizando os iniciadores específicos, o tamanho esperado era de 519 nucleotídeos (Figura 18). O fragmento de PCR foi purificado do gel e clonado em vetor pENTR-2B (Invitrogen) por meio dos sítios de restrição. Após a confirmação por meio de sequenciamento, apenas um clone foi utilizado para a reação de LR clonase (Invitrogen) e transferência do gene de P2 para o vetor pDEST-17. Como há recombinação entre as regiões *att* dos vetores, a clonagem não necessita de sítios de restrição, porem a presença destes no gene pode ser usada para confirmar a recombinação (Figura 19).

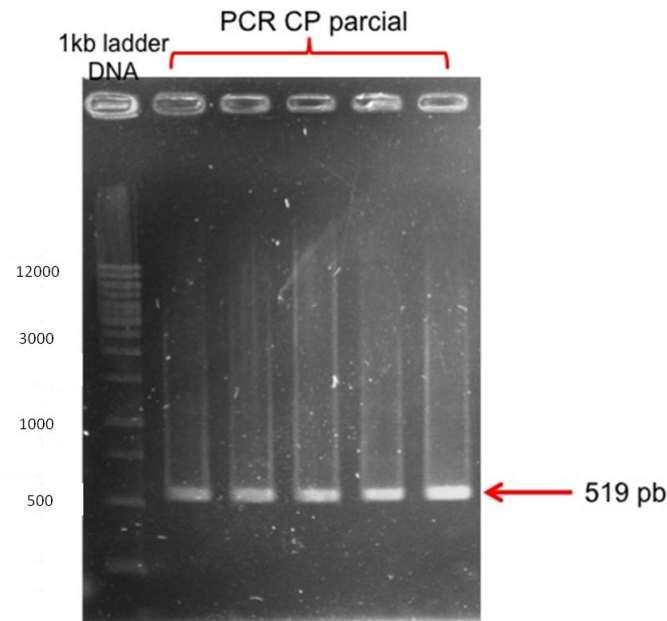


Figura 18. Eletroforese de agarose 1% referente a amplificação de P2. Essa imagem confirma o tamanho esperado após a PCR do gene de P2. Esse gene foi amplificado com iniciadores específicos para a inserção de sítios de restrição (XhoI e BamHI) para posterior clonagem no vetor de entrada pENTR 2B.

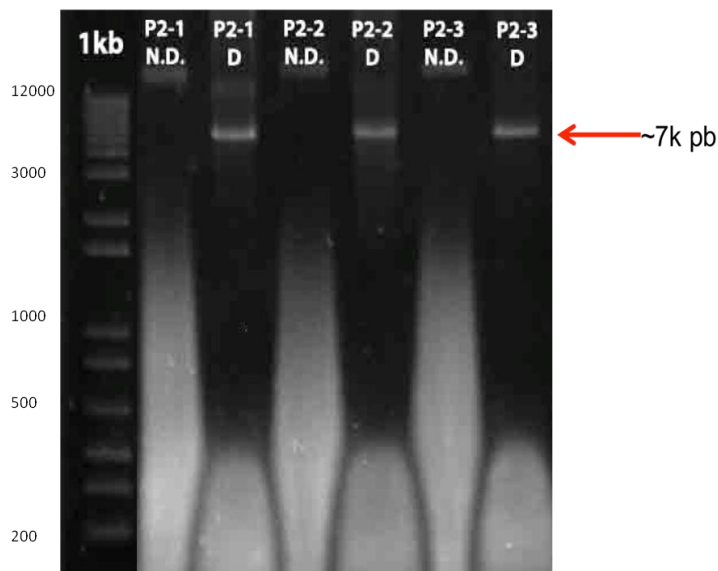


Figura 19. Eletroforese de agarose 1% referente aos clones selecionados para transformação em *E. coli* para expressão do gene de P2. N.D = DNA plasmidial extraído por miniprep. D = Digestão com enzima de restrição XhoI (NEB). O vetor pDEST-17 apresenta 6,3 kpb somados e o gene de P2 519 pb. Tamanho condizente com o observado na imagem. O DNA plasmidial não digerido foi obtido após a reação de clonagem e transformação em células DH5 α . Nesse gel, ainda é possível observar a digestão do clone do gene de CP em pGEM-T Easy e do vetor de expressão em células de inseto pFastBacI.

5.2 Expressão em *E. coli*

Após a recombinação a confirmação dos clones contendo P2 em pDEST-17 ocorreu por meio de sequenciamento. Apenas o clone P2-3 apresentou a sequência correta. O plasmídeo purificado foi transformado em célula *E. coli* (BL21 AI). Quatro clones foram escolhidos para avaliar o perfil de expressão. A indução foi realizada com 0,9% de L-arabinose, por duas horas a 37°C. A Figura 20 mostra que os quatro clones apresentaram bandas de aproximadamente 24 kDa correspondentes a proteína P2, de acordo com a estimativa *in silico* para o peso molecular gerada pela ferramenta *Compute pI/Mw* (disponível em: http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool). Os clones P2.1 e P2.2 apresentaram, além da banda esperada, uma banda inferior (que também reagiu no *Western blotting*). A expressão foi confirmada por meio de um *Western-blotting* utilizando como anticorpo primário anti-hexa histidina, presente no vetor de expressão pDEST17 (Invitrogen) (Figura 21).

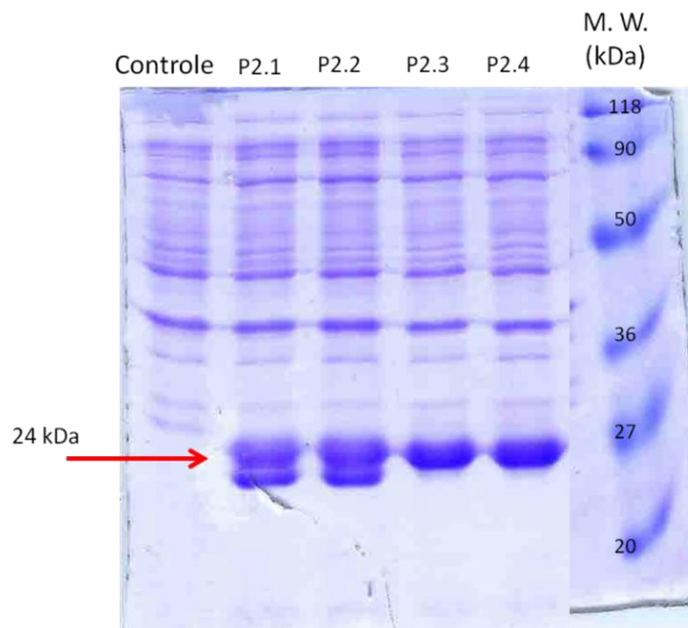


Figura 20. SDS-PAGE referente aos clones de BL21 AI contendo o gene de P2. Condições de indução: 2h; 37°C; 200 rpm. É possível observar uma diferença entre os clones 1 e 4, por exemplo. A presença de uma banda menor nos primeiros clones pode indicar uma possível degradação da proteína.

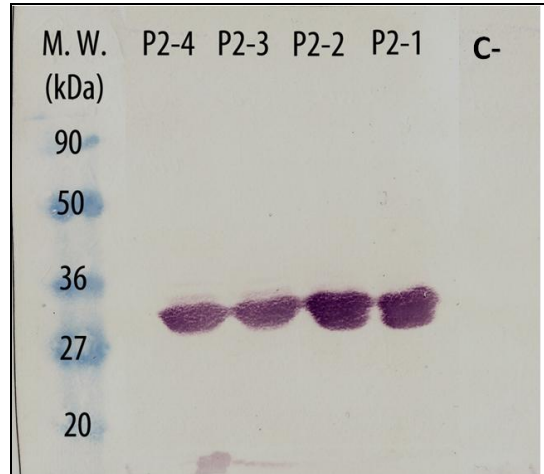


Figura 21. *Western-blotting* referente a expressão de P2. O anticorpo primário utilizado nessa reação foi o anticorpo monoclonal anti-hexa histidina, pois, o vetor de expressão pDEST-17 contém 6xhis tag em sua sequência o que proporciona uma forma eficiente para detecção e purificação da proteína.

5.2.1 Purificação de proteína utilizando coluna de níquel

A purificação foi realizada por meio de cromatografia em coluna de Ni-NTA (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Na última etapa foram colhidas cinco frações de aproximadamente um ml cada. A presença de P2 nessas frações foi avaliada por meio de *Western-blotting* utilizando anticorpo anti-hexa histidinas para sua detecção (Figura 22).

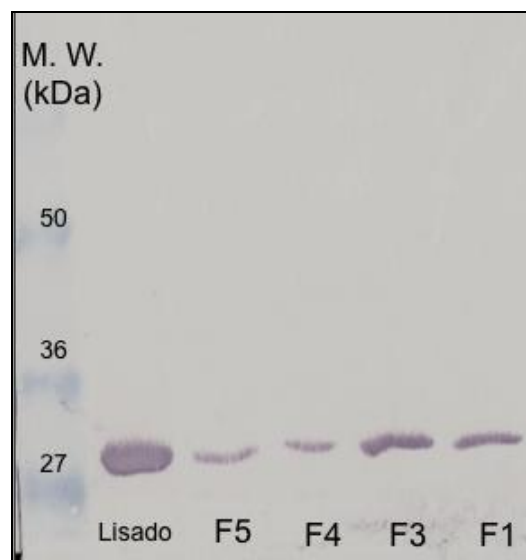


Figura 22. *Western-blotting* referente a purificação de P2 utilizando coluna Ni-NTA (Invitrogen). No primeiro poço subsequente ao marcados está a proteína lisada. F = indica as frações na ordem de coleta após a ligação e lavagem pela coluna. A fração 2 foi mantida refrigerada para outros fins, não sendo utilizada para esse procedimento.

5.3 Produção de anticorpo

Para a produção de anticorpos anti-P2, 600 ng de proteínas foram utilizados para cada coelho, sendo 200 ng para cada injeção. Durante o processo nenhum animal apresentou reação adversa. Foram realizadas três coletas de sangue total, num intervalo semanal. Em cada coleta obteve-se sete ml de antissoro. Esse material foi estocado em freezer - 20°C. Cada coleta foi analisada por meio de *Western-blotting*. O soro foi utilizado como anticorpo primário diretamente, sem purificação.

5.3.1 Ensaio de especificidade do anticorpo

Para avaliar qual a melhor coleta e qual o melhor soro (coelho um ou dois) o *Western-blotting* realizado tinha como amostra positiva a própria P2 utilizada para imunizar os animais. Como o coelho um não apresentou reação positiva em nenhuma coleta apenas o soro do coelho dois foi utilizado para purificação de imunoglobulinas. Na figura 23 é possível observar que a terceira e última coleta apresentou uma reação mais específica.

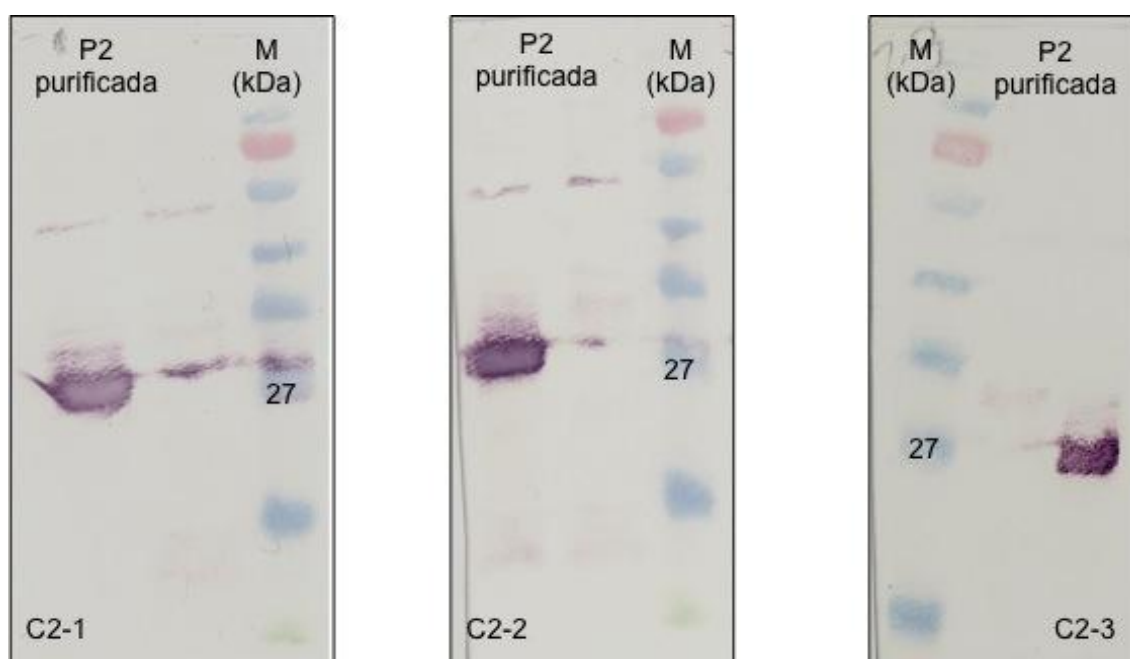


Figura 23. *Western-blotting* utilizando soro de coelho como anticorpo primário anti-P2. C2 indica que o coelho nomeado como 2 foi o único que produziu anticorpos contra P2. Os números a frente de C2 indicam a ordem de coleta. A terceira coleta apresentou uma reação mais específica quando comparada com as primeiras.

5.4 Amplificação e clonagem do gene da proteína do capsídeo

O objetivo principal deste trabalho é expressar a proteína estrutural (capsídeo) do sapovírus em baculovírus. Sendo assim, o gene referente a essa proteína foi amplificado utilizando um par de iniciadores que recuperavam a sequência completa do capsídeo, a ORF2 e a região 3' UTR, correspondentes a um fragmento de 2,2 kb contendo também dois sítios específicos inseridos pela PCR (Figura 24), o sítio de EcoRI (no iniciador For) e o de SacI (no iniciador Rev). Além dos sítios de restrição, três nucleotídeos (ACC), sequência de Kozak, foram inseridos antes do ATG da sequência do capsídeo.

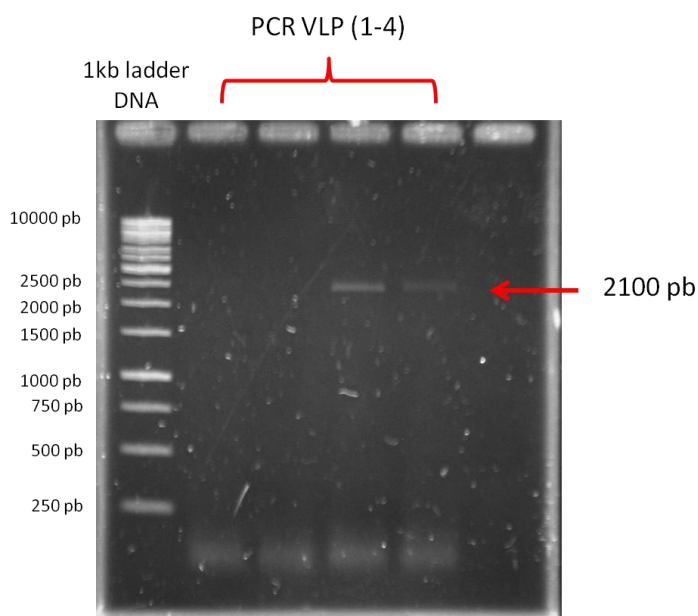


Figura 22. Eletroforese de agarose 1% referente a PCR para amplificação do gene completo da CP.

A primeira clonagem realizada utilizou o pGEM-T Easy para confirmação do inserto por meio de sequenciamento. Após essa etapa foi realizada a subclonagem em vetor pFASTBacI (vetor doador). Após extração plasmidial a seleção de clones para construção do baculovírus recombinante foi realizada por enzimas de restrição (XhoI e EcoRI –NEB) (Figura 25). Os três clones selecionados por digestão foram sequenciados. A análise do gene da CP, ORF2 e região não traduzida foi realizada para evitar que possíveis mutações inseridas por PCR impedissem a expressão e montagem da VLP de sapovírus. Os clones 35 e 36 foram confirmados por sequenciamento e ambos utilizados para construção do bacmídeo.

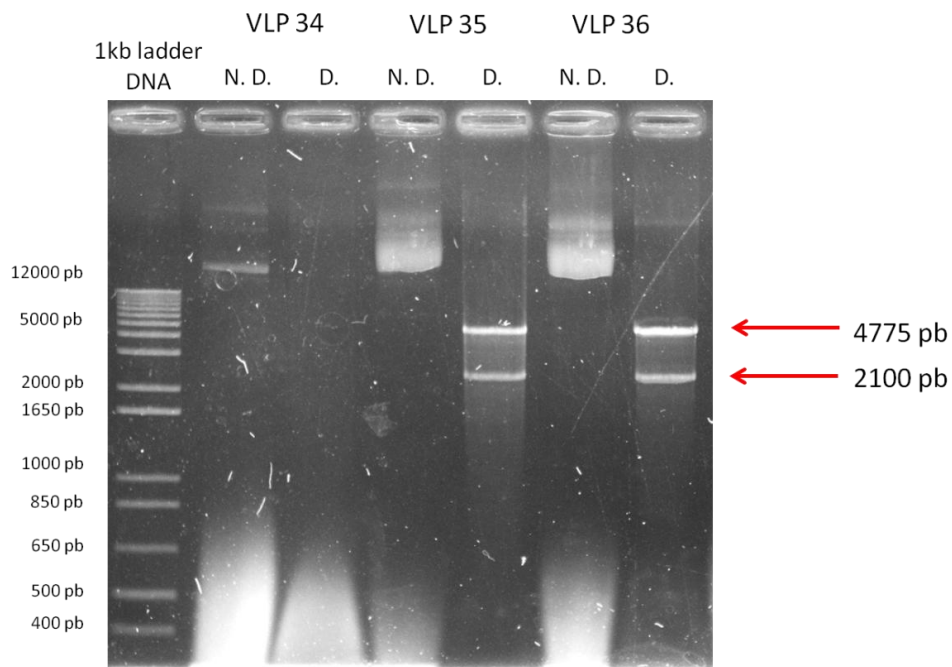


Figura 23. Eletroforese de gel de agarose 1% de DNA plasmidial após clonagem da sequência referente a CP + ORF2 + UTR (VLP de sapovírus) utilizando vetor pFastBac 1 após a digestão teste de três clones (N.D = não digerido/miniprep D. = digerido).

5.5 Produção de baculovírus recombinante

Para a expressão da proteína do capsídeo em baculovírus foi utilizado o sistema *Bac-to-bac* (Invitrogen), no qual o plasmídeo doador contendo o inserto de interesse é recombinado com o genoma do baculovírus inserido na célula DH10Bac com ajuda do plasmídeo *helper*. Como o genoma do baculovírus tem aproximadamente 180 kb a confirmação da recombinação por meio de digestão ou sequenciamento não é recomendada. Sendo assim foi feita uma PCR usando os iniciadores específicos para amplificação do gene de interesse e também o uso de M13 (pUC) *Forward*, de acordo com as instruções do fabricante. O resultado obtido foi a amplificação do gene e também da região do gene somada aos nucleotídeos da região de recombinação do genoma do baculovírus, local onde o iniciador M13 parecia (Figura 26).

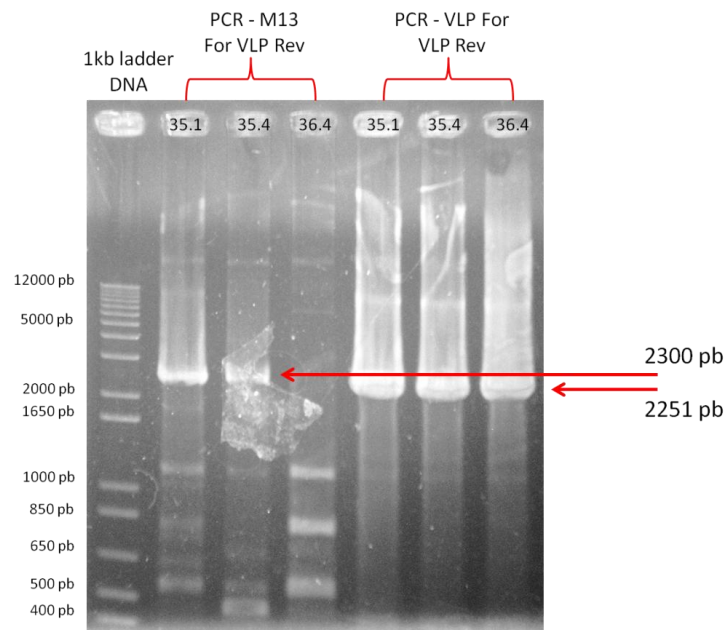


Figura 26. Eletroforese de gel de agarose 1% mostrando a PCR de confirmação dos bacmídeos, utilizando os iniciadores específicos para a amplificação da sequência de interesse e a combinação usando o M13 forward, para confirmar a recombinação.

5.5.1 Expressão de VLP

Sabe-se que o DNA de baculovírus é infeccioso, sendo assim as células são transfectadas com o genoma do vírus recombinante com o gene de interesse, nesse caso, o gene de CP, ORF2 e a sequência da região 3'UTR. O resultado da transfecção é a produção de baculovírus recombinantes (BVs), que foram utilizados para infectar novas células e avaliar a expressão de VLP.

Para infecção foram utilizados vírus com m.o.i. $3,04 \times 10^6$. O sobrenadante e as células foram colhidos a 6 d.p.i. O resultado da primeira tentativa de purificação por CsCl pode ser observado na Figura 27. Os controles foram processados e corridos separadamente. Foi observada uma banda de 70kDa em cada fração visível após a ultracentrifugação (B1-1, B1-2 e B2-1). Essa banda também foi obtida quando a limpeza por colchão de sacarose foi substituída por uma ultracentrifugação de duas horas (Beckman 70TI) e o sedimento ressuspendido, sedimentado em solução de CsCl (0,39g/ml) (Figura 28).

O peso molecular calculado para CP é de 60kDa, esse tamanho foi observado apenas após ultracentrifugação de 2h (Beckman 70TI) (Figura 29), antes de sedimentar a amostra em CsCl.

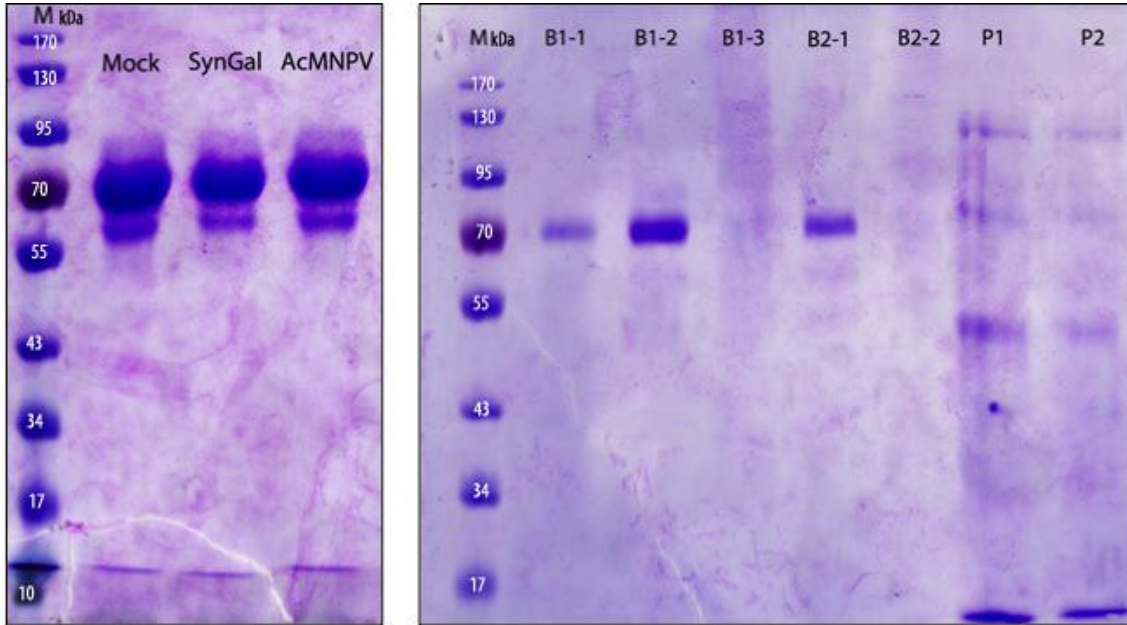


Figura 27. SDS-PAGE de sobrenadante celular sedimentado e CsCl. A esquerda eletroforese dos controles. O sobrenadante foi colhido, ultracentrifugado por duas horas e o sedimento ressuspendido em 100 μ l de PBS 0,5x. Mock = células não infectadas; SynGal = baculovírus recombinante que não produz poliedro; AcMNPV = baculovírus nativo que produz poliedro. A direita eletroforese referente as frações colhidas de duas amostras distintas, B1 e B2. A numeração indica a ordem de coleta das frações pós-purificação. P1 e P2 referem-se a uma alíquota do pellet formado após a primeira ultracentrifugação (colchão de sacarose 20%).

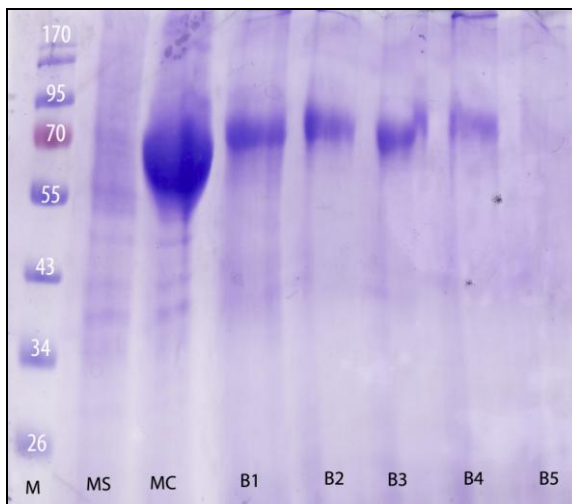


Figura 28. SDS-PAGE referente à expressão de CP em célula de inseto. Os primeiros poços representam controle sem qualquer tipo de tratamento. Observa-se no segundo poço uma grande concentração de proteína cujo peso é de aproximadamente 60kDa, essa proteína é o BSA contido no meio de cultura. MS = Mock da célula; MC = Mock sobrenadante; B1-B5 frações coletadas após sedimentação por CsCl, sem passagem por colchão de sacarose a 20%.

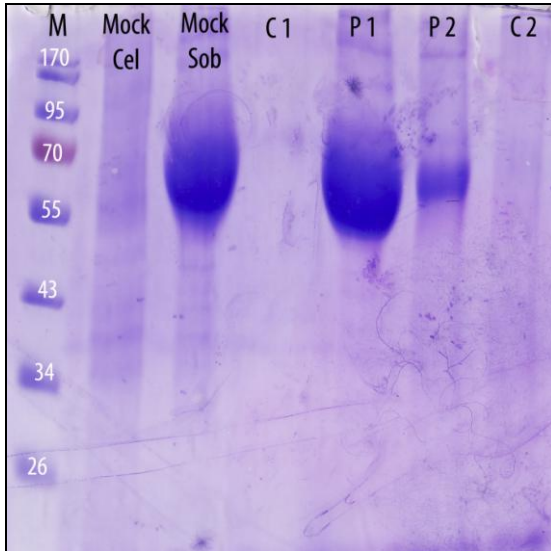


Figura 29. SDS-PAGE comparando célula e sobrenadante sem purificação por CsCl. C1 e P1 são célula e sobrenadante colhidos sem processamento. P2 e C2 são sedimento e célula após ultracentrifugação de 2h (Beckman 70TI).

5.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

O sobrenadante referente ao meio de cultura de células de inseto foi colhido, em seguida foi ultracentrifugado por duas horas e, sedimentado por CsCl e dialisado em PBS 0,5x pH5,5 por seis horas. Para análise por MET, 1 μ l desse material foi contrastado negativamente com uranila 1%. Foram observadas partículas esféricas de tamanhos entre 20 e 40 nm. Essas partículas podem ser VLP. Em menor aumento o campo apresenta partículas de diferentes tamanhos (Figura 30) e, em maior aumento é possível avaliar a superfície de uma partícula, que se assemelha a VLP de sapovírus (Figura 31).

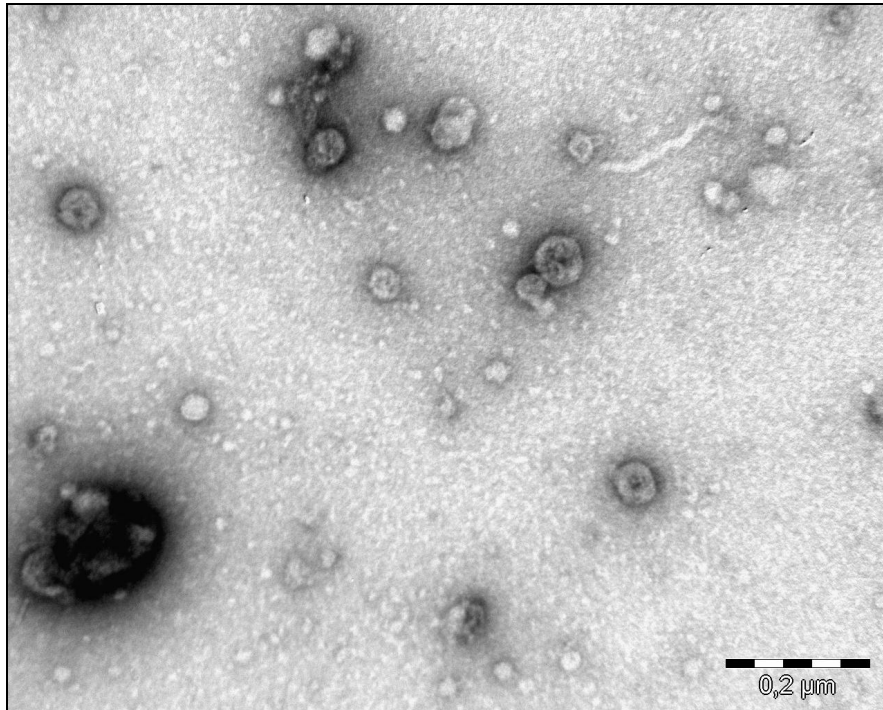


Figura 30. Micrografia de microscopia eletrônica de transmissão. Possível VLP observada após sedimentação em CsCl. A amostra foi contrastada negativamente com uranila 1% (Aumento de 85 K).

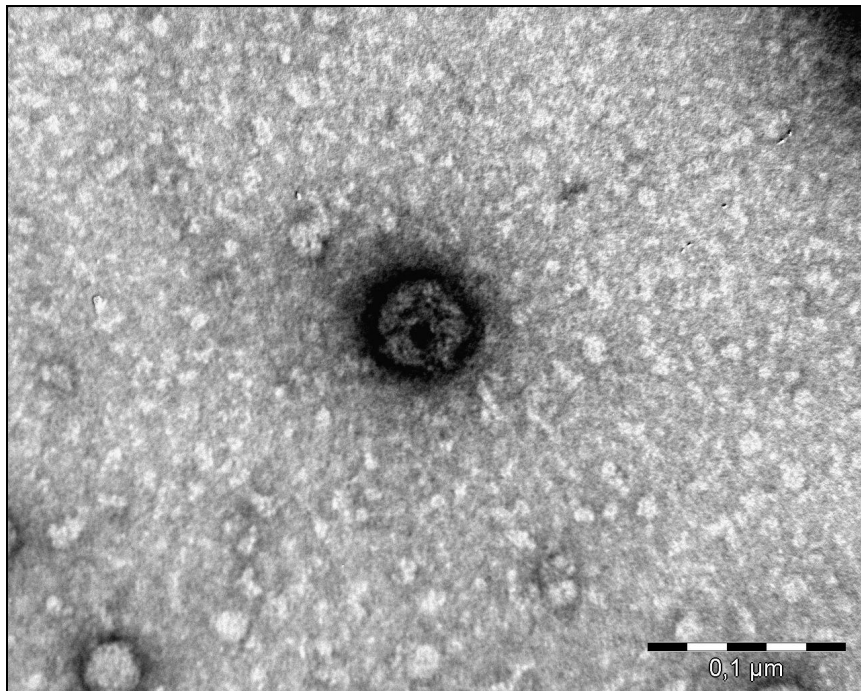


Figura 31. Micrografia em microscopia eletrônica de transmissão. Possível VLP observada em detalhe após sedimentação em CsCl. A amostra foi contrastada negativamente com uranila 1% (Aumento de 250K).

6. DISCUSSÃO

Sabe-se que os sapovírus são importantes causadores de gastroenterites em humanos e são prevalentes na Ásia e Europa, no entanto, sua incidência no Brasil ainda é desconhecida. Para detecção e identificação de patógenos é importante o desenvolvimento de ferramentas sensíveis, específicas e baratas.

O objetivo desse trabalho foi produzir uma VLP de sapovírus, a primeira no Brasil, a fim de gerar uma ferramenta que facilite o desenvolvimento de anticorpos de alta reatividade e conjuntos de detecção imunológica.

O anticorpo produzido contra a P2 de sapovírus GI/2 foi purificado e reagiu de maneira específica contra a proteína expressa em *E. coli*. No entanto, para a validação desse anticorpo serão necessárias amostras fecais positivas do vírus. Deve-se levar em conta que esse anticorpo foi produzido a partir da porção variável do capsídeo, ou seja, ele pode não detectar vírus do próprio genogrupo se seus genótipos forem distintos. O objetivo dessa etapa do trabalho desenvolvido durante o mestrado foi criar uma ferramenta para auxiliar a confirmação da expressão de VLP em baculovírus. No entanto, não conseguimos, até o momento, demonstrar reatividade entre esse anticorpo e o material produzido em células de inseto.

Existem duas hipóteses quanto a não reatividade do anti-P2 à VLP, a primeira delas seria: não houve expressão da proteína do capsídeo em células de inseto, portanto não haveria antígeno na amostra para reagir com o anticorpo; ou, como a P2 utilizada para imunizar os animais foi obtida em sua forma desnaturada, suas regiões mais antigênicas não são acessíveis nos ensaios de *immunoblotting*, o que levaria ao não reconhecimento do antígeno pelo anticorpo gerado.

A possível VLP observada por microscopia eletrônica apresenta morfologia esférica, tamanho de aproximadamente 40 nm e, em maior aumento (Figura 31) é possível observar uma deposição diferencial da uranila ao redor da partícula, criando a imagem relacionada ao domínio P do capsídeo viral. A amostra utilizada para a obtenção dessa imagem foi conservada em freezer - 80°C, o que poderia justificar uma degradação da estrutura, tendo em vista que as VLPs são mais estáveis a 4°C (Ausar et al., 2006).

Outra evidência de que houve expressão de VLP é a observação de uma banda de 60 kDa (Figura 29), presente no sobrenadante ultracentrifugado, mas não sedimentado em CsCl. Esse resultado é o mesmo apresentado por Jiang e colaboradores (1999) no primeiro trabalho de expressão de VLP de sapovírus (Jiang et al., 1999). No entanto, após a sedimentação da

amostra em CsCl todas as frações geradas apresentaram uma banda de 70 kDa. A princípio suspeitou-se de uma interação entre CP e ORF2. Acreditou-se que a possível ausência de stop códon no fim da sequência de CP poderia fazer com que a ORF2, uma proteína estrutural menor (Glass et al., 2000), se mantivesse ligada a CP gerando uma banda de 70 kDa. Essa hipótese foi descartada frente a análise do sequenciamento, que provou a presença do códon de parada. Além disso, as amostras são desnaturadas por aquecimento e adição de β -mercaptoetanol antes da eletroforese, esse procedimento promoveria a dissociação entre as duas proteínas.

Dessa forma, a banda de 70 kDa visualizada pode não ser referente a VLP, pois é ao visualizada nos controles (Figura 27). Portanto, quando as amostras foram sedimentadas em CsCl e as frações colhidas, é possível que proteínas celulares tenham sido purificadas. O que indicaria uma falha no processo de sedimentação em CsCl.

Esse resultado foi observado em uma repetição do ensaio (Figura 28), no entanto, a expressão de VLP não foi excluída pela evidência de uma banda de 60 kDa (Figura 29) e pela imagem obtida por MET. A dificuldade em se confirmar com exatidão a expressão de VLP deve-se ao fato de que algum mecanismo ainda não elucidado é necessário para que haja aumento da expressão. Alguns estudos demonstraram a importância de sequências próprias antes do ATG inicial da sequência da CP para formação de VLP (Jiang et al., 1999; Hansman et al., 2005; 2006), entretanto, a expressão ainda é considerada baixa.

Hansman e colaboradores (2005) observaram que uma troca de aminoácido na posição 1076 da sequência da CP de um sapovírus GI aumentava a expressão de VLP em células de inseto, quando comparada ao vírus não mutado. A concentração de proteína obtida a partir de 200 ml de meio de cultura foi de 80 μ g (Hansman et al., 2005), concentração suficiente para imunizar uma única vez um camundongo. Outro trabalho realizado por esses pesquisadores demonstrou que sapovírus GIV expressam baixas quantidades de VLP em células de inseto. Mesmo quando a expressão foi otimizada a concentração de proteína obtida foi de 10 μ g (Hansman et al., 2006).

Na tentativa de expressão de VLP de sapovírus em baculovírus é preciso otimizar o processo de purificação e concentração de partículas, no entanto, os resultados descritos nesse capítulo evidenciam a expressão e formação das mesmas.

Atualmente, o principal desafio aos pesquisadores que trabalham com calicivírus humanos é o desenvolvimento de um sistema de genética reversa, na ausência de um sistema de cultura celular. Dessa forma o uso de células de inseto e mamíferos para expressão de

proteínas virais recombinantes tem sido de suma importância para a compreensão desses patógenos. Assim a expressão de VLPs oferece uma importante ferramenta para análise estrutural e imunogênica.

IV. CONCLUSÃO GERAL

Atualmente os calicivírus humanos são os principais agentes virais causadores de gastroenterite no mundo, portanto são extensamente estudados a cerca de sua epidemiologia, morfologia e genética. Embora os norovírus humanos sejam os calicivírus mais estudados, sabe-se que os sapovírus são prevalentes em diversos países, o que deve levar a um maior interesse na sua detecção e identificação em países como o Brasil, por exemplo, onde doenças diarreicas são um problema de saúde pública.

Inicialmente foi identificada uma amostra fecal positiva para sapovírus no Distrito Federal. Esse vírus foi então clonado e sequenciado. A partir de sua sequência foi realizado um estudo de possíveis eventos de recombinação, que caracterizam uma forma de os vírus, em geral, evoluírem ao longo dos anos.

Nesta dissertação foram apresentados dados importantes a cerca do primeiro isolado de sapovírus brasileiro caracterizado, entre eles o possível evento de recombinação envolvendo sapovírus suínos e humanos. Outro resultado importante foi o evento de recombinação intra-genogrupo, exemplificado pelo isolado GQ261222, que incita a discussão sobre a classificação taxonômica baseada exclusivamente na sequência nucleotídica do capsídeo.

Frente as análises discutidas no capítulo I e a necessidade de se obter um maior número de sequências, o que implica num estudo de detecção e identificação, foi observada a necessidade de se desenvolver ferramentas que auxiliassem esses estudos. A partir disso o objetivo do capítulo II foi estabelecido como o desenvolvimento de uma VLP. Esse objetivo foi alcançado parcialmente, pois, as ferramentas necessárias para validação da expressão não mostraram-se eficazes, no entanto, é preciso ressaltar que de acordo com a literatura os sapovírus apresentam maior dificuldade de produção de VLP por meio de células de inseto comparando com VLP de norovírus.

O uso de VLPs para os calicivírus humanos tem sido de extrema importância na ausência de um cultivo celular estabelecido, pois, foi a partir de VLPs que a proteína estrutural de norovírus foi determinada, bem como os seus domínios, sendo assim o desenvolvimento dessas partículas vai além do uso de antígenos e produção de anticorpos para kit diagnóstico. A expressão de VLPs, pode elucidar vias de internalização de partículas em cultivo de células, além de poderem ser utilizadas como vacinas por apresentarem a mesma imunogenicidade que partículas completas.

Os dados apresentados nesta dissertação de mestrado demonstram a importância de se estudar novos agentes virais causadores de gastroenterites, pois, o primeiro passo para o controle de uma patologia é a identificação de seu agente causador e, como apresentado anteriormente, doenças diarreicas ainda apresentam um elevado índice de mortalidade infantil no Brasil. Além disso esse trabalho contribuiu com o estudo da virologia básica, para caracterização genética do vírus.

V. PERSPECTIVAS

As principais perspectivas a respeito desse trabalho são a validação do anticorpo anti-P2, demonstrando a sua ligação com a VLP expressa em células de inseto. Uma melhor expressão de VLPs bem como o uso de purificação de troca iônica. O resultado desse ensaio deve fornecer material puro e em quantidade suficiente para imunização de animais e produção de anticorpos anti-VLP. Estes poderão ser validados utilizando amostras fecais positivas por meio de *imunoblotting*.

Espera-se que a produção dessas ferramentas auxilie na aquisição de dados epidemiológicos a respeito da incidência desses vírus no Brasil, e a partir disso, novas análises filogenéticas e evolutivas sejam realizadas.

Como maior perspectiva encontra-se o desenvolvimento de um clone infeccioso utilizando a sequência do genoma completo do sapovírus obtido no Distrito Federal (Dos Anjos et al., 2011). O desenvolvimento desse clone permitirá analisar interações entre as proteínas virais e as proteínas das células de mamíferos. Assim como o desenvolvimento de um sistema de genética reversa para sapovírus humanos.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAZIZ, R. & TPFER, M. Recombination RNA virus and virus resistant transgenic plants. **Journal of General Virology**, v.80, p. 1339-1346, 1999.
- AUSAR, S. F.; FOUBERT, T. R.; HUDSON, M. H.; VEDVICK, T. S.; MIDDAUGH C. R. Conformational Stability and Disassembly of Norwalk Virus-like Particles. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 281 (28), p. 19478–19488, 2006.
- BALL, J.M., GRAHAM, D.Y., OPEKUN, A.R., GILGER, M.A., GUERRERO, R.A., ESTES, M.K. Recombinant Norwalk virus-like particles given orally to volunteers: phase I study. **Gastroenterology**, v. 117, p. 40–48, 1999.
- BARRY, G. F. A Broad Host-Range Shuttle System for Gene Insertion into the Chromosomes of Gram-negative Bacteria. **Gene**, v. 71, p. 75-84, 1988.
- BORGES, A. M. T.; CARDOSO, D. P. Calicivírus Humano. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 10, 2005.
- CASTRO, M. E. B.; SOUZA, M. L.; SIHLER, W.; RODRIGUES, J. C. M.; RIBEIRO, B. M. Molecular biology of baculovirus and its use in biological control in Brazil. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 34, n. 10, 1999.
- CHANG, K. O.; SOSNOVTSEV, S. S.; BELLLOT, G.; WANG, Q.; SAIF L. J.; GREEN, K. Y. Reverse genetics system for porcine enteric calicivirus, a prototype sapovirus in the Caliciviridae. **Journal of Virology**, v. 79, p.1409–1416, 2005.
- CHIBA, S.; SAKUMA, Y.; KOGASAKA, R.; AKIHARA, M.; HORINO, K.; NAKAO, T.; FUKUI, S. Outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an infant home. **Journal of Medical Virology**, v. 4, p. 249–25, 1979.
- CHIBA, S.; NAKATA, S.; NUMATA-KINOSHITA, K.; HONMA, S. Sapporo virus: history and recent findings. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. 303-308, 2000.
- COOKE, B. D. Rabbit haemorrhagic disease: field epidemiology and the management of wild rabbit population. **Revue Scientifique et Technique**, v. 21, p. 347-358, 2002.
- CUNHA, J. B.; DE MENDONCA, M. C. L.; MIAGOSTOVICH, M. P.; LEITE, J. P. G. Genetic diversity of porcine enteric caliciviruses in pigs raised in Rio de Janeiro State, Brazil. **Archives of Virology**, v.155, p. 1301–1305, 2010.
- DEY, S. K.; PHATHAMAVONG, O.; NGUYEN, T. D.; THONGPRACHUM, A.; CHAN-IT, W.; OKITSU, S.; MIZUGUCHI, M.; USHIJIMA, H. Seasonal pattern and genotype distribution of sapovirus infection in Japan, 2003-2009. **Epidemiology and Infection**, v. 140, p. 74-77, 2012.
- DI MARTINO, B.; MARSILI, F.; ROY, P. Assembly of feline calicivirus-like particles and its immunogenicity. **Veterinary Microbiology**, v.120, p.173-178, 2007.
- DONALDSON, E. F.; LINDESMITH, L. C.; LOBUE, A. D.; BARIC, R. S. Viral shape-

shifting: norovirus evasion of the human immune system. **Nature Reviews**, v. 8, p. 231-241, 2010.

DOS ANJOS, K.; LIMA, L. M. P.; SILVA, P. A.; INOUE-NAGATA, A. K.; NAGATA, T. The possible molecular evolution of sapoviruses by inter- and intra-genogroup recombination. **Archives of Virology**, v. 156, p. 1953-1959, 2011.

FARKAS, S. T.; ZHONG, W. M.; JING, Y.; HUANG, P. W.; ESPINOSA, S. M.; MARTINEZ, N.; MORROW, A. L.; RUIZ-PALACIOS, G. M.; PICKERING, L. K.; FULLERTON, S.W.B.; BLASCHKE, M.; COUTARD, B.; GEBHARDT, J.; GORBALENYA, A.; CANARD, B.; TUCKER, P. A.; ROHAYEM, J. Structural and functional characterization of sapovirus RNA-dependent RNA polymerase. **Journal of Virology**, v. 81, p. 1858-1871, 2007.

GLASS, P. J.; WHITE, L. J.; BALL J. M.; LEPARC-GOFFART, I.; HARDY, M. E.; ESTES, M. K. Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. **Journal of Virology**, v. 74, n. 14, p. 6581-6591, 2000.

GOMEZ-SANTIAGO, F.; MARIA RIBAS-APARICIO, R.; GARCIA-LOZANO, H. Molecular characterization of human calicivirus associated with acute diarrheal disease in mexican children. **Virology Journal**, v. 9, p. 154-160, 2012.

GRANADOS, R. R.; GUOXUN, L.; DERKSEN, A. C. G.; MCKENNA, K. A. A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclearpolyhedrosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 64, p. 260- 266, 1994.

GRANT, L.; VINJÉ, J.; PARASHAR, U.; WATT, J.; REID, R.; WEATHERHOLTZ, R.; SANTOSHAM, M.; GENTSCH, J.; O'BRIEN, K. Epidemiologic and Clinical Features of Other Enteric Viruses Associated with Acute Gastroenteritis in American Indian Infants. **The Journal of Pediatrics**, v. 161, p. 110-115, 2012.

GREEN, K. Y.; LEW, J. F.; JIANG, X.; KAPIKIAN, A. Z.; ESTES, M. K. Comparison of the Reactivities of Baculovirus-Expressed Recombinant Norwalk Virus Capsid Antigen with Those of the Native Norwalk Virus Antigen in Serologic Assays and Some Epidemiologic Observations. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 8, p. 2185-2191, 1993.

GREEN, K.Y., KAPIKIAN, A.Z., VALDESUSO, J., SOSNOVTSEV, S., TREANOR, J.J., LEW, J.F. Expression and self-assembly of recombinant capsid protein from the antigenically distinct Hawaii human calicivirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 1909–1914, 1997.

GUO, M.; EVERMANN, J. F.; SAIF, L. J. Detection and molecular characterization of cultivable caliciviruses from clinically normal mink and enteric caliciviruses associated with diarrhea in mink. **Archives of Virology**, v. 146, p. 479–493, 2001. (a)

GUO, M.; QIAN, Y.; CHANG, K-O; SAIF, L. J. Expression and self-assembly in baculovirus of Porcine Enteric Calicivirus capsids into virus-like particles and their use in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for antibody detection in swine. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1487-1493, 2001. (b)

HALE, A. D.; CRAWFORD, S. E.; CIARLET, M.; GREEN, J.; GALLIMORE, C. BROWN, D. W. G.; JIANG, X.; ESTES, M. K. Expression and self-assembly of Grimsby virus: Antigenic distinction from Norwalk and Mexico viruses. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, n. 1, p. 142-145, 1999.

HANSMAN, G. S.; NATORI, K.; OKA, T.; OGAWA, S.; TANAKA, K.; NAGATA, N.; USHIJIMA, H.; TAKEDA, N.; KATAYAMA, K. Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. **Archives of Virology**, v. 150, p. 21–36, 2004.

HANSMAN, G. S.; TAKEDA, N.; OKA, T.; OSETO, M.; HEDLUND, K. O.; KATAYAMA, K. Intergenogroup recombination in sapoviruses. **Emerging Infectious Disease**, v. 11, p. 1916–1920, 2005.

HANSMAN, G. S.; GUTAPONG, R.; PONGSUWANNA, Y.; NATORI, K.; KATAYAMA, K.; TAKEDA, N. Development of an antigen ELISA to detect sapovirus in clinical stool specimen. **Archives of Virology**, v. 151, p. 551-561, 2006.

HANSMAN, G. S.; OKA, T.; SAKON, N.; TAKEDA, N. Antigenic diversity of human sapoviruses. **Emerging Infectious Disease**, v. 13, p. 1519–1525, 2007.

HANSMAN, G. S.; OKA, T.; TAKEDA, N. Sapovirus-like particles derived from polyprotein. **Virus Research**, v. 137, p. 261-265, 2008.

HARADA, S.; OKA, T.; TOKUOKA, E.; KIYOTA, N.; NISHIMURA, K.; SHIMADA, Y.; UENO, T.; IKEZAWA, S.; WAKITA, T.; WANG, Q.; SAIF, L. J.; KATAYAMA, K. A confirmation of sapovirus re-infection gastroenteritis cases with different genogroups and genetic shifts in the evolving sapovirus genotypes, 2002-2011. **Archives of Virology**, v. 10, p. 1999-2003, 2012.

HARDY, M.E., KRAMER, S.F., TREANOR, J.J., ESTES, M.K.. Human calicivirus genogroup II capsid sequence diversity revealed by analyses of the prototype Snow Mountain agent. **Archives of Virology**, v.142, p. 1469–1479, 1997.

HERBS-KRALOVETZ, M.; MASON, H. S.; CHEN, Q. Norwalk virus-like particles as vaccines. **Expert Review of Vaccine**, v. 9, n. 3, p. 299-307, 2010.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMYVIRUSES. *Caliciviridae*. **Virus Taxonomy: Ninth Report of the ICTV**, 2012.

INSTITUTO ADOLF LUTZ. Diarréia e rotavírus. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 2, 2004.

JIANG, X., WANG, M., GRAHAM, D.Y., ESTES, M.K. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. **Journal of Virology**, v. 66, p. 6527–6532, 1992.

JIANG, X., MATSON, D.O., RUIZ-PALACIOS, G.M., HU, J., TREANOR, J., PICKERING, L.K. Expression, self-assembly, and antigenicity of a snow mountain agent-like calicivirus capsid protein. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1452–1455, 1995.

JIANG, X.; ZHONG, W.; KAPLAN, M.; PICKERING, L. K.; MATSON, D. O. Expression and characterization of Sapporo-like human calicivirus capsid proteins in baculovirus. **Journal of Virological Methods**, v. 78, p. 81-91, 1999.

JIANG, X. Genetic diversity among sapoviruses. **Archives of Virology**, v. 149, p. 1309–1323, 2004.

JOHNSEN, C. K.; MIDGLEY, S.; BÖTTIGER, B. Genetic diversity of sapovirus infections in Danish children 2005-2007. **Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 46, p. 265-269, 2009.

KATAYAMA, K.; SHIRATO-HORIKOSHI, H.; KOJIMA, S.; KAGEYAMA, T.; OKA, T.; HOSHINO, F.; FUKUSHI, S.; SHINOHARA, M.; UCHIDA, K.; SUZUKI, Y.; GOJOBORI, T.; TAKEDA, N. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. **Virology**, v. 299, p. 225-239, 2002.

KATAYAMA, K.; MIYOSHI, T.; UCHINO, K.; OKA, T.; TANAKA, T.; TAKEDA, N.; HANSMAN, G. S. Novel recombinant sapovirus. **Emerging Infectious Disease**, v.10, p. 1874-1876, 2004.

KITAMOTO, N.; OKA, T.; KATAYAMA, K.; LI, T-C.; TAKEDA, N.; KATO, Y.; MYOSHI, T.; TANAKA, T. Novel monoclonal antibodies broadly reactive to human recombinant sapovirus-like particles. **Microbiology Immunology**, v. 56, p. 760-770, 2012.

KOST, T. A.; CONDREAY, J. P.; JARVIS, D. L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v. 23, p. 567-75, 2005.

LAI M. M. C. RNA Recombination in Animal and Plant Viruses. **Microbiological Reviews**, v. 79, p. 56-61, 1992.

LANDY, A. Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of Lambda Site-specific Recombination. **Annual Review of Biochemistry**, v.58, p. 913-949, 1989.

LAURENT, S.; VAUTHEROT, J. F.; MADELAINE, M. F.; LE GALL, G.; RASSCHAERT, D. Recombinant Rabbit Hemorrhagic Disease Virus Capsid Protein Expressed in Baculovirus Self-Assembles into Virus-like Particles and Induces Protection. **Journal of Virology**, v. 68, p. 6794-6798, 1994.

LEE, L. E.; CEBELINSKI, E. A.; FULLER, C.; KEENE, W. E.; SMITH, K.; VINJÉ, J.; BESSER, J. M. Sapovirus Outbreaks in Long-Term Care Facilities, Oregon and Minnesota, USA, 2002-2009. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, p. 873-876, 2012.

LEE, N. Molecular Aspects of *ara* Regulation. In **The Operon**, J. H. Miller and W. S. Reznikoff, eds. (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory), p. 389-410, 1980.

LEE, N., FRANCKLYN, C., AND HAMILTON, E. P. Arabinose-Induced Binding of AraC Protein to *araI2* Activates the *araBAD* Operon Promoter. **Proceeding of the National Academy of Sciences.**, v. 84, p. 8814-8818, 1987.

MARTELLA, V.; LORUSSO, E.; BANYAI, K.; DECARO, N.; CORRENTE, M.; ELIA, G.; CAVALLI, A.; RADOONA, A.; COSTANTINI, V.; SAIF, L. J.; LAVAZZA, A.; DI TRANI, L.; BUONAVOGLIA, C. Identification of a porcine calicivirus related genetically to human sapoviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 1907-1913, 2008.

MEDICI, M. C.; TUMMOLO, F.; ALBONETTI, V.; ABELLI, L. A.; CHEZZI, C.; CALDERARO, A. Molecular detection and epidemiology of astrovirus, bocavirus, and sapovirus in Italian children admitted to hospital with acute gastroenteritis, 2008-2009. **Journal Of Medical Virology**, v. 84, p. 643-650, 2012.

MILLER, L. K. A virus vector for genetic engineering in invertebrates. In: Panopaulus NJ, editor. **Genetic engineering in the plant sciences**. New York: Praeger. p. 203-22, 1981.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Indicadores e Dados Básicos. DATASUS - Brasil, 2008 e 2010.

MITRO, S. & KRAUSS, H. Rabbit hemorrhagic disease: a review with special reference to its epizootiology. **European Journal of Epidemiology**, v. 9, p. 70-78, 1993.

MOTOMURA K, YOKOYAMA M, ODE H, NAKAMURA H, MORI H, KANDA T, OKA T, KATAYAMA K, NODA M, TANAKA T, TAKEDA N, SATO H. Divergent evolution of norovirus GII/4 by genome recombination from May 2006 to February 2009 in Japan. **Journal of Virology**, v. 84, p. 8085-8097, 2010.

NOAD, R., ROY, P. Virus-like particles as immunogens. **Trends Microbiology**, v.11, p. 438-444, 2003.

NUMATA, K.; HARDY, M. E.; NAKTA, S.; CHIBA, S.; ESTES, M. K. Molecular characterization of morphologically typical human calicivirus Sapporo. **Archives of Virology**, v. 142, p.1537-1552, 1997.

OKA, T.; HANSMAN, G. S.; KATAYAMA, K.; OGAWA, S.; NAKATA, N.; MIYAMURA, T.; TAKEDA, N. Expression of sapovirus virus-like particles in mammalian cells. **Archives of Virology**, v. 151, p. 399-404, 2006.

OKA, T.; MORI, K.; IRITANI, N.; HARADA, S.; UEKI, Y.; IIZUKA, S.; MISE, K.; MURAKAMI, K.; WAKITA, T.; KATAYAMA, K. Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences. **Archives of Virology**, v. 157, p. 349-352, 2012.

OKADA, M.; YAMASHITA, Y.; OSETO, M.; OGAWA, T.; KAIHO, I.; SHINOZAKI, K. Genetic variability in the sapovirus capsid protein. **Virus Genes**, v. 33, p. 157-161, 2006.

O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K. Improvement of a baculovirus pesticide by deletion of the EGT gene. **Nature Biotechnology**, v. 9, p. 1086-1089, 1991.

PARK, S.; OH, S.; CHO, S.; LEE, J.; RYU, S.; SONG, M.; JUNG, H.; PARK, S.; PARK, G.; CHOI, S.; CHAE, Y.; KIM, H. Genetic Characterization of Sapovirus Detected in Hospitalized Children with Acute Gastroenteritis in Korea. **Clinical Laboratory**, v. 58, p. 1219-1224, 2012.

PEDERSEN, N.C.; ELLIOTT, J.B.; GLASGOW, A.; POLAND, A.; KEEL, K. An isolated epizootic of hemorrhagic-like fever in cats caused by a novel and highly virulent strain of feline calicivirus. **Veterinary Microbiology**, v. 73, p. 281–300, 2000.

PENG, K.; VAN OERS, M. M.; HU, Z.; VAN LENT, J. W.; VLAK, J. M. 2010. Baculovirus *per os* infectivity factors form a complex on the surface of occlusion-derived virus. **Journal of virology**, v. 84, p. 9497-950, 2010.

PHAN, T. G.; KHAMRIN, P.; QUANG, T. D.; DEY, S. K.; TAKANASHI, S.; OKITSU, S.; MANEEKARN, N.; USHIJIMA, H. Emergence of intragenotype recombinant sapovirus in Japan. **Infections, Genetics and Evolution**, v. 7, p. 542–546, 2007.

PRASAD, B. V.V.; ROTHNAGEL, R.; JIANG, X.; ESTES, M. K. Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. **Journal of Virology**, v. 68, p. 5117-5125, 1994.

RAMANI, S. & KANG, G. Viruses causing childhood diarrhoea in the developing world. **Current Opinion in Infectious Disease**, v. 22, p. 477-482, 2009.

ROHRMANN, G. F. **Baculovirus Molecular Biology**. Second Edition. Department of Microbiology, Oregon State University, Corvallis. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK49500/>

SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à virologia humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

SCHLENKER, C.; SURAWICZ, C. M. Emerging infections of the gastrointestinal tract. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 23, p. 89-99, 2009.

SCHUFFENECKER, I.; ANDO, T.; THOUVENOT, D.; LINA, B.; AYMARD, M. Genetic classification of “Sapporo-like viruses”. **Archives of Virology**, v. 146, p. 2115–2132, 2001.

SMALL, E. J.; FRATESI, P.; REESE, D. M.; STRANG, G.; LAUS, R.; PESHWA, M. V. Immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells. **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, p. 3894-3903, 2000.

SMITH, G. E.; SUMMER, M. D.; FRASER, M. J. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. **Molecular Cell Biology**, v. 3, p. 2156-2165, 1983.

STADEN, R. The staden analyses package. **Molecular Biotechnology**, v.5, p. 233-245, 1996.

SVRAKA, S.; VENNEMA, H.; VAN DER VEER, B.; HEDLUND, K.O.; THORHAGEN, M.; SIEBENGA, J.; DUIZER, E.; KOOPMANS, M. Epidemiology and genotype analysis of emerging sapovirus associated infections across Europe. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 2191–2198, 2010.

THIEL, H-J.; KOÈNIG, M. Caliciviruses: an overview. **Veterinary Microbiology**, v. 69, p. 55-62, 1999.

TRANG, N. V.; LUAN, L. E. T.; KIM-ANH, L. E. T.; HAU, V. T.; NHUNG, L.E. T. H.; PHASUK, P.; SETRABUTR, O.; SHIRLEY, H.; VINJÉ, J.; ANH, D. D.; MASON, C. J. Detection and molecular characterization of noroviruses and sapoviruses in children admitted to hospital with acute gastroenteritis in Vietnam. **Journal Of Medical Virology** , v. 84, p. 290-297, 2012.

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M.; MANILOFF, J.; MAYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. B. **Virus taxonomy**. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, 2000.

VIRALZONE. **Swiss Institute of Bioinformatic**. Sapovirus. Disponível em: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/196.html. Acesso em: 26 de julho de 2012.

VIRALZONE. **Swiss Institute of Bioinformatic**. Alphabaculovirus. Disponível em: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/537.html. Acesso em: 14 de janeiro de 2013.

VERNACCHIO, L.; VEZINA, R. M.; MITCHELL, A. A.; LESKO, S. M.; PLAUT, A.G.; ACHESON, D. W. K. Diarrhea in American Infants and Young Children in the Community Setting. **The Pediatric Infectious Disease Journal.**, v. 25, p.2-7, 2006.

XAVIER, M. P. T. P.; OLIVEIRA, S. A.; FERREIRA, M. S. R.; VICTORIA, M.; MIRANDA, V.; SILVA, M. F. M.; STRINA, A.; BARRETO, M. L.; MIAGOSTOVICHT, M. P.; LEITE, J. P. G. Detection of caliciviruses associated with acute infantile gastroenteritis in Salvador, an urban center in Northeast Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, p. 438–444, 2009.

XU, H & REN, Z. Etiological study of enteric viruses and genetic diversity of norovirus, sapovirus, adenovirus and astrovirus in children with diarrhea in chongqing, China. **Journal of Clinical Immunology**, v 32, p. 233-234, 2012.

WHITE, L. J.; BALL, J. M.; HARDY, M. E.; TANKA, T. N.; KITAMOTO, N.; ESTES, M. K. Attachment and Entry of Recombinant Norwalk Virus Capsids to Cultured Human and Animal Cell Lines. **Journal of Virology**, v. 70, p. 6589–6597, 1996.

WILLIAMS, G. V. & FAULKNER, P. Cytological and viral morphogenesis during baculovirus infection. In: Miller, L. K. **The baculoviruses**. Plenum Press, New York, p. 61-107, 1997.

ZHENG, J.; MA, J.; YANG, XIAO-FENG; LIU, HONG-LI; CHENG, HONG-WEI; SI, LU-SHENG; WANG, YI-LI. Highly efficient and economical baculovirus expression system for

preparig Human Papilomavirus type 16 virus-like particle. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 36, p. 548-552, 2004.

VII. ANEXOS

VII.I ARTIGO

The possible molecular evolution of sapoviruses by inter- and intra-genogroup recombination

Karoline dos Anjos · Lidia M. P. Lima ·
Paula Andreia Silva · Alice K. Inoue-Nagata ·
Tatsuya Nagata

Received: 19 May 2011 / Accepted: 15 July 2011 / Published online: 28 July 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Sapporo virus belongs to the genus *Sapovirus* (family *Caliciviridae*) and has a non-segmented single-stranded, positive-sense RNA genome. This virus causes acute gastroenteritis in human, porcine and mink hosts. In this study, the complete genome of a Brazilian sapovirus isolate from a child with acute gastroenteritis was determined. A phylogenetic tree was constructed to analyze the genotype of this sapovirus (Sapo_BR-DF01), and possible intra- and inter-genogroups recombination events were evaluated *in silico* using the RDP3 program. Two inter-genogroup and two intra-genogroup recombination events were newly recognized in this study.

Keywords Calicivirus · RdRp-CP junction site · Inter-genogroup recombination

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00705-011-1079-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

K. dos Anjos · T. Nagata (✉)
Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília,
70910-900 Brasília, DF, Brazil
e-mail: tatsuya@unb.br

L. M. P. Lima
LACEN-DF, Laboratório Central de Saúde Pública do DF,
70830-010 Brasília, DF, Brazil

P. A. Silva
Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia,
Universidade Católica de Brasília, 70790-160 Brasília, DF,
Brazil

A. K. Inoue-Nagata
EmbrapaVegetables, Caixa Postal 218, 70359-970 Brasília, DF,
Brazil

Introduction

The family *Caliciviridae* consists of viruses belonging to five genera: *Sapovirus*, *Norovirus*, *Lagovirus*, *Vesivirus* and *Nebovirus* (www.ictvdb.org/ICTVdB/index.htm). Certain sapovirus and norovirus strains are well-known causative agents of serious human gastroenteritis all around the world, including South America [9, 17, 27, 36]. The diseases caused by sapoviruses and noroviruses differ from each other both in their epidemiological features and clinical symptoms. For example, in infants under two years old, norovirus causes a moderate to severe disease, with vomiting as its predominant symptom, whereas sapovirus, in general, causes mild diarrhea [30].

Sapporo virus, which, to date, is the only member of the genus *Sapovirus*, was originally found in an outbreak of diarrhea occurring in an orphanage in Sapporo, Japan, in 1977 [4]. Its transmission is through the fecal-oral route and is often associated with ingestion of contaminated food and water. Many reports on epidemiological studies of sapovirus in Asia, Europe and the Americas are available, and today, it is recognized as an important agent of acute gastroenteritis [12, 29, 33]. The basic characterization of sapoviruses has been seriously hampered by the fact that human sapovirus strains are still non-cultivable [7, 13, 25], while one isolate (Po/SV/Cowden/1980/US), the porcine-infecting strain, is the only sapovirus that can be propagated in cultured cells [2, 7, 25].

Sapovirus causes gastroenteritis in humans, pigs and mink [10, 11, 14, 15], and it is currently divided into seven genogroups (GI–GVII). The viruses of genogroups I, II, IV and V are human-infecting sapovirus, whereas those of GIII and GVI infect pigs, and those of GVII infect mink [5, 28]. Their classification into genogroups and, more

finely, into genotypes is mainly based on diversity in the capsid protein gene [6, 30].

Sapovirus virions have typical caliciviral morphology, with a “Star of David” appearance [3, 6]. The genome is a linear, positive-sense single-stranded RNA of approximately 7.5 kb that is polyadenylated at the 3′ terminus. The genomes of members of the GI, GIV, and GV genogroups are predicted to contain three open reading frames (ORFs), whereas the GII and GIII genomes have only two [11]. ORF1 encodes a polyprotein that contains conserved amino acid motifs of 2C-like NTPase, VPg, 3C-like protease, RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and capsid protein (CP) [24]. The functions of the proteins encoded by ORF2 and ORF3 have not yet been elucidated [25]. The presence of a conserved translation initiation motif GCA-AUGG at the 5′ end of ORF3 may indicate that this ORF encodes a functional protein [6, 30].

In this study, the entire genome of one sapovirus isolated in Brasília, Brazil, was cloned and sequenced, and its phylogenetic relationship to other sapovirus isolates was studied. The possible intra- and inter-genogroup recombination events were analyzed *in silico*. A putative “hot-spot” region of sapovirus recombination present in the RdRp-CP gene junction site is also discussed.

Material and methods

Sapovirus isolate used for sequencing

A sapovirus isolate (Sapo_BR-DF01 isolate) from one stool sample from a two-year-old child with severe diarrhea in the Federal District, Brazil, sampled in 2009, was used in this study. Infection by a sapovirus was confirmed by multiplex RT-PCR targeting a partial CP gene [35], and after its sequencing, it was classified as a GI/2 sapovirus.

RT-PCR, cloning and sequencing

Total RNA was extracted from the infected sample using TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) as described in the manufacturer’s instructions. Two overlapping (ca. 70 nucleotides) cDNA fragments were amplified by RT-PCR, covering the entire virus genome (Supplementary Fig. 1). The first-strand cDNA was synthesized using primer oligodT₅₀PacIM4 (5′-TCA GCA CTG ACC CTT TTG AAT TAA T₅₀-3′) to recover the 3′ end genomic region using Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). The primer Sapo 3′ For (5′-3416-CAG TGG TGA CTA TCA CGG AAG-3436-3′; numbers indicate the nucleotide position in the genome; Supplementary Fig. 1) was used for PCR in combination with the M4 reverse anchor primer (5′-TCA GCA CTG ACC CTT

TTG-3′). The first-strand cDNA of the 5′ end of the genome was synthesized with Sapo 5′ Rev (5′-3509-TTC TTR GTT GGG TAA CCA TT-3490-3′) and amplified using the primer pair Sapo 5′ Rev and Sapo 5′ For (5′-01-GTG ATT GGT TAG ATG GYT TC-20-3′). cDNA fragments of 3.9 (3′ portion) and 3.5 kb (5′ portion) were obtained by PCR using LongAmp *Taq* DNA polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), and after gel purification, cloned into the pCR4-TOPO vector (Invitrogen). Two clones were selected for each portion, and the inserts were then sequenced by primer walking. A consensus sequence was assembled using the Staden 4.0 software package [32], and the final genome sequence was deposited in the DDBJ/EMBL/GenBank database under the accession number AB614356 (Sapovirus Hu/GI.2/BR-DF01/BRA/2009).

Sequence analysis

To characterize the Sapo_BR-DF01 isolate phylogenetically, it was aligned with the 22 available full genome and 30 complete CP gene sequences (Supplementary Table 1), and subsequently, phylogenetic trees were constructed. Briefly, the CLUSTAL W program included in the MEGA5 [34] software package was used for multiple alignment, and the phylogenetic relationships among these sequences were inferred by the maximum-likelihood method (using the best fit-model TN93 + G + I in MEGA5 with 1000 bootstrap replicates). Possible recombination events were analyzed by RDP3 [20] using multiple alignments based on both the complete genome sequences and a smaller genomic region comprising the 3′ end of the RdRp gene, the whole CP gene and the 3′ untranslated region (UTR) (ca. 3100 nt), which covered the possible hot spot site for recombination. Confidence values for the recombination events were also evaluated by the six methods included in the RDP3 software package, RDP [21], GENECONV [26], Maxchi [31], Chimera [22], 3Seq [1], and Siscan [8]. Events detected by RDP with a *p*-value under 1×10^{-5} were considered significant in this study.

Results

Genome sequence profile

The first complete genome sequence of a Latin American sapovirus isolate (Sapo_BR-DF01) was determined. The genome was 7476 nucleotides in length, without the poly-A tail, and, as other GI genotype sapovirus, three ORFs were found (ORF1, 13-6882 nt with 2290 aa; ORF2, 5180 to 5668 nt with 163 aa; and ORF3, 6882 to 7370 nt with 163 aa).

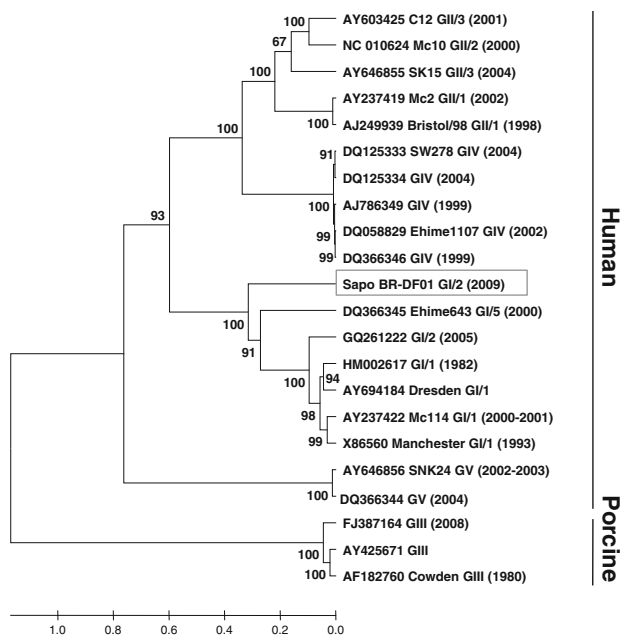


Fig. 1 Full-length-genome-based phylogenetic tree using the maximum-likelihood algorithm. Human- and porcine-infecting sapoviruses clustered separately. The Sapo_BR-DF01 isolate is boxed. Viruses are identified by accession number/name/genogroup-genotype and year isolated, if available. Detailed characteristics of each isolate are shown in Supplementary Table 1. Numbers at branch nodes indicate bootstrap values, and those lower than 50 are not shown. The scale represents nucleotide substitutions per site

Nucleotide sequence identity to other sapoviruses

This sapovirus sequence shared 77% genome-wide nucleotide identity with an isolate from Bangladesh, collected in 2005 (GQ261222, GI/2 genotype), the best-matched sequence. In a maximum-likelihood (ML) tree (Fig. 1), Sapo_BR-DF01 clustered within the GI group, which contained this Bangladeshi isolate and others from Asia and Europe, but was outside of the main GI/1 and GI/2 cluster (Fig. 1). This grouping was identical when only the 5' UTR and ORF 1 (excluding the CP gene, ORF2 and 3' UTR) of the genome were analyzed (Fig. 2b). In a preliminary phylogenetic analysis using a partial CP sequence of the same isolate, it was classified as genotype GI/2 (data not shown), which was confirmed by using the whole CP gene sequence (Fig. 2a). When comparing the CP regions, the pairwise identity between Sapo_BR-DF01 and this Bangladeshi isolate (GQ261222) increased to 92%, but the best hit partner of Sapo_BR-DF01 was another GI/2 isolate collected in 2008 in Hungary (FJ844411) with 98% nucleotide identity (Fig. 2a). Due to the lack of a complete genome sequence of this Hungarian isolate, it could not be used in the genome-wide analysis. All together, a recombinant nature among these isolates was implied by the

phylogenetic analysis. Therefore, possible recombination events were evaluated using the complete genome sequences and the 3' portion of the genome, which covered the end of the RdRp, the whole CP gene and the 3' UTR (ca. 3100 nt).

Recombination analysis

In a full-length genome analysis, four recombination signals (ones not previously reported) were detected by RDP3 (Fig. 3). At first, possible recombination events were found among X86560 (Manchester), GQ261222, Sapo_BR-DF01 and FJ387164 (Fig. 3). It is most likely that GQ261222 was an intra-genogroup recombinant, a receptor of part of ORF1 from the X86560 Manchester strain (p -value = 6.4×10^{-34} by RDP) and of its structural region from the Sapo_BR-DF01 strain (p -value = 8.2×10^{-153} by RDP) at the RdRp-CP junction. Interestingly, the 5' genomic region (nt 1-5161) of GQ261222 fit perfectly in the GI/1 cluster by phylogenetic analysis (Fig. 2b) and by the distance plot of RDP3 (data not shown). The GQ261222 isolate is most likely a chimera between GI/1 and GI/2.

Furthermore, Sapo_BR-DF01 may be a receptor of a small portion of RdRp (nt 4518 to 4610) from the porcine strain FJ387164 (GIII - p -value = 2.5×10^{-5} by RDP) (Fig. 3). This possible recombination event was again found using the 3' end genomic region of 30 sapovirus (Supplementary Fig. 2). In this analysis, not only Sapo_BR-DF01 but also other four GI/2 isolates (FJ844411, AF294739, U95644 and U73124) showed the same recombination signal.

One inter-genogroup recombination site was also recognized between GIV and Sapo_BR-DF01 isolates (GI/2) (Fig. 3). This recombination signal was located at the RdRp-CP junction (nt 5233-5531), and the p -value was significantly low (2.436×10^{-9} by RDP).

Previously reported recombination events between C12 and Mc2 isolates of GII [15], between Mc10 and C12 [12, 13], and between GII and GIV [12] were also found in our analysis (data not shown).

Discussion

In the present study, a full-genome sequence of a sapovirus from Brasília, Brazil, was determined and compared with other 21 complete sapovirus genome sequences and 29 3'-end sequences available in the DDBJ/EMBL/GenBank databases. The main goal of this study was to analyze possible recombination events between sapoviruses as a possible factor for the genetic evolution of this group of viruses.

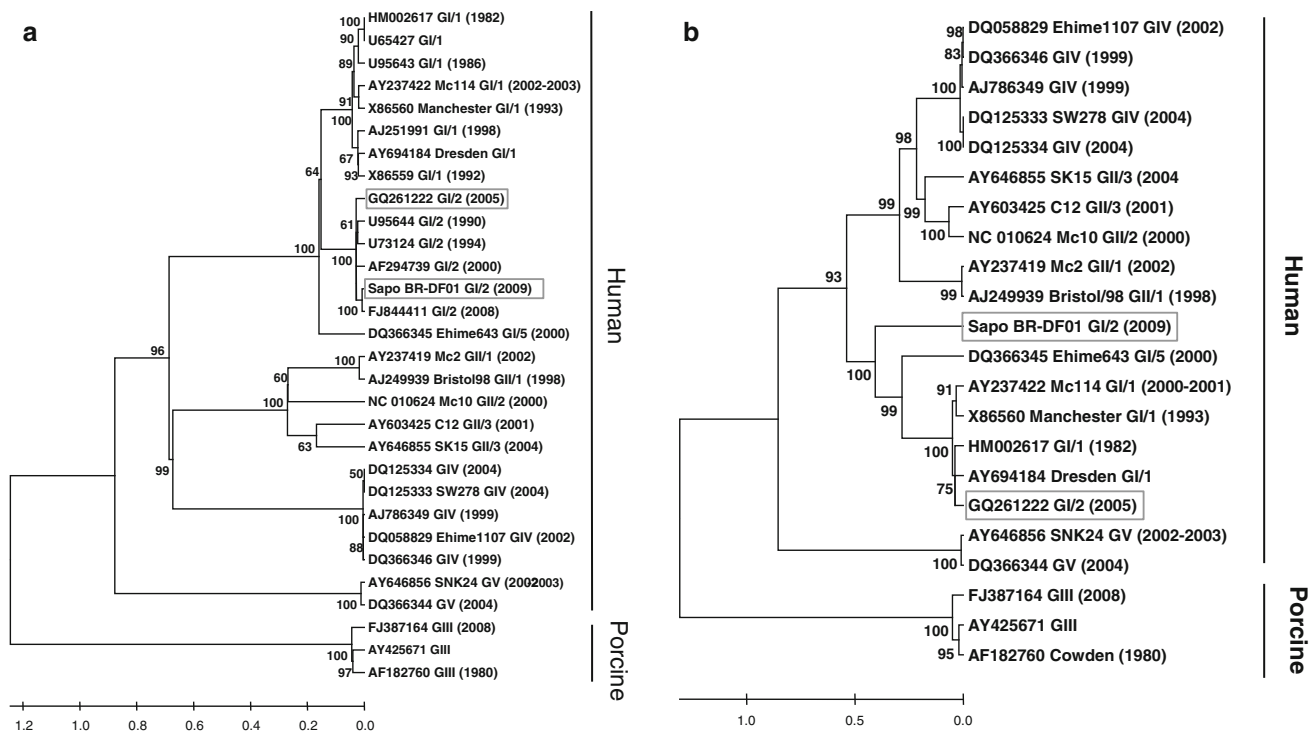


Fig. 2 Maximum-likelihood-based phylogenetic trees using CP (a) and 5' UTR and ORF1 (b) nucleotide sequences. For the CP phylogenetic analysis (a), nucleotides 5161 to 6885 (corresponding to Sapovirus BR-DF01 genome sequence) were used, while for the 5' termini region (b), nucleotides 1 to 5161 were used. Sapovirus BR-DF01 and GQ261222 isolates are boxed. Viruses are identified by accession

number/name/genogroup-genotype and year isolated, if available. Detailed characteristics of each isolate are shown in Supplementary Table 1. Numbers at branch nodes indicate bootstrap values, and those lower than 50 are not shown. The scale represents nucleotide substitutions per site

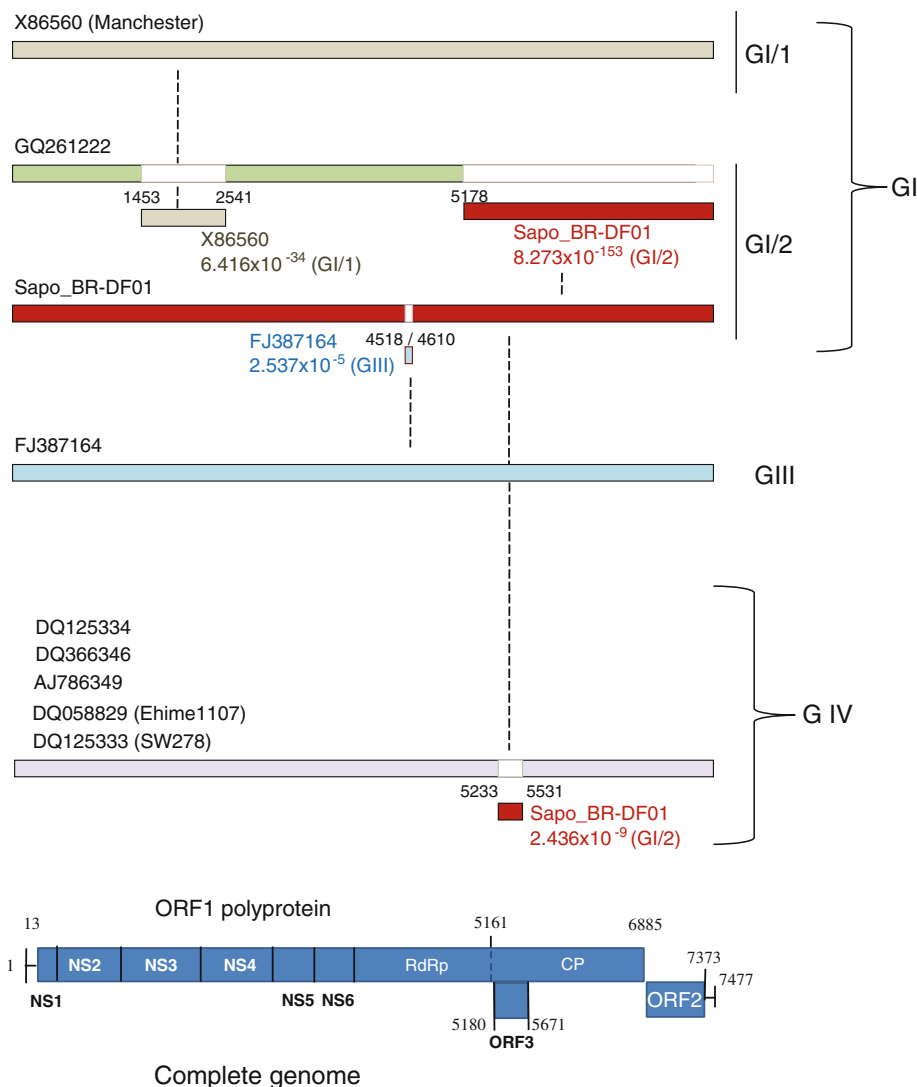
Recombination can only occur in a cell that is infected simultaneously by at least two distinct viruses. As with many other positive-sense single-stranded RNA viruses, recombination is known to occur in members of the family *Caliciviridae*. Motomura et al. [23] evaluated the molecular evolution of norovirus GII/4 because of its worldwide prevalence. The epidemics from 2006 to 2009 were finely analyzed using 199 nearly complete norovirus genome sequences, and the results suggested frequent genome recombination at the ORF1/2 boundary region (RdRp-CP junction), which provided a common mechanism of concurrent changes on the virion surface and in the viral polymerase [23].

Katayama et al. [15] reported evidence for the first intra-genogroup sapovirus recombination event between the isolates Mc10 and C12, both of which belong to GII. A small region spanning the end of the RdRp region and the beginning of the CP region was considered to be the site of the recombination event. Hansman et al. [13] reported the first inter-genogroup recombination event between GII (Mc10) and GIV (isolates SW278 and Ehime1107) sapoviruses. The daughter strains that were analyzed had a nonstructural region that was highly identical to GII, whereas the structural region most closely resembled that

of the GIV type. Such evidence suggested that sapoviruses could evade host immunity by the exchange of structural regions. This hypothesis was also discussed by Phan et al. [28], who detected an intra-genotype recombination event among sapoviruses of GI/1 detected in samples collected in Japan from July 2005 to June 2006.

The sequence of the Sapovirus BR-DF01 isolate showed some evidence of interesting recombination events (Fig. 3) with GQ261222 (GI/2), and with five GIV isolates, both at the junction of the RdRp and CP genes. Regarding the former recombination partner, the Sapovirus BR-DF01 isolate may be one of the parental strains, resulting in the daughter sequence GQ261222 (Fig. 3). This isolate also showed evidence of recombination with the X86560 (Manchester) isolate, although not at the RdRp-CP junction, but instead in the NS3-NS4 region of ORF1. Recombination is thought to occur when the RdRp switches templates due to formation of a strong secondary structure, mainly during negative strand synthesis [16, 18]. Generally, the recombination events found in calicivirus were detected at the RdRp-CP junction, and this phenomenon is considered to be the result of the attempt by the virus to escape from pressure by the the host immune system by changing the epitope sites. However, this is not the only reason why

Fig. 3 Recombination analysis based on the complete genome sequences using the RDP method. The complete genome is represented by a *box*, and the predicted recombined region is indicated by *smaller boxes* below the complete genome box. The possible parental or daughter sequences are indicated by *dotted lines*. The genogroup-genotype classification is indicated on the *right side*. *p*-values for each recombination event, determined using RDP, are indicated below the virus identifier. The sapovirus genome organization and ORFs are schematically represented below with the corresponding nucleotide positions. NS = nonstructural protein; RdRp = RNA dependent RNA polymerase; CP = capsid protein



animal viruses recombine [18], and other mechanisms can probably explain the occurrence and selection of recombinants with different recombination sites, as observed in the NS3-NS4 region in GQ261222. Therefore, it was clear that GQ261222 showed a double chimeric character relative to isolates of GI/1 and GI/2 (Fig. 3).

It was found that the isolate Sapo_BR-DF01 could be a parental strain for the GIV isolates (Fig. 3). In this case, a recombination signal was also identified at the RdRp-CP junction, suggesting that this region is a hot spot for recombination, similar to that found in noroviruses. The inter-genogroup recombination that we recognized was found in all GIV sapovirus isolates used in this study. Thus, recombination may have occurred at an earlier stage of GIV evolution.

Another interesting recombination signal was found between the GI and GIII genogroups, which may imply a possible co-infection with human and porcine sapoviruses, leading to recombination (Fig. 3 and Supplementary

Fig. 2). To date, only Martella et al. [19] have suggested a relationship between a porcine calicivirus (sapovirus GIII) and a human sapovirus (GI) based upon the analyses of the 3'-end genomic region, though no clear recombination analysis was shown. In this study, a recombination site in a small portion of the catalytic domain of the RdRp gene from GIII in GI/2 isolates including the Brazilian Sapo_BR-DF01 (Fig. 3) was detected, as another example of inter-genogroup recombination. However, the *p*-value was low and, additionally, this recombination signal was found in a highly conserved catalytic domain of the sapovirus RdRp region, which may lead to a misinterpretation by recombinant prediction programs. Further confirmation is needed when more sapovirus sequences become available.

It was clear that there is a risk in using only the CP gene sequence for sapovirus genotyping analysis, due to frequent detection of recombination in these viruses. For instance, GQ261222 belongs to GI/1, when the upstream

portion of the genome (almost 65% of the genome) is used as the genotype parameter (Fig. 2b), whereas the same isolate is considered to belong to GI/2 by CP gene sequence analysis (Fig. 2a). The taxonomic and genotyping identification criteria should be discussed further with regard to recombination events, which may occur frequently in this virus group.

Interestingly, the RdRp-CP junction was also identified as an important spot for recombination in sapovirus. Fewer studies on genetic diversity of sapoviruses have been reported than of noroviruses, a similar virus in the same family. For a more comprehensive understanding of the frequency and impact of the occurrence of recombination between sapoviruses, additional genome sequences must become available.

Acknowledgments The first author is supported financially by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). The fourth and fifth authors are research fellows of CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). We thank Dr. Tomoichiro Oka (National Institute of Infectious Diseases, Japan) for the technical discussion.

References

- Boni MF, Posada D, Feldman MW (2007) An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets. *Genetics* 176:1035–1047
- Chang KO, Sosnovtsev SS, Belliot G, Wang Q, Saif LJ, Green KY (2005) Reverse genetics system for porcine enteric calicivirus, a prototype sapovirus in the Caliciviridae. *J Virol* 79:1409–1416
- Chiba S, Sakuma Y, Kogasaka R, Akihara M, Horino K, Nakao T, Fukui S (1979) Outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an infant home. *J Med Virol* 4:249–254
- Chiba S, Nakata S, Numata-Kinoshita K, Honma S (2000) Sapovirus: history and recent findings. *J Infect Dis* 181(Suppl 2):S303–S308
- Cunha JB, de Mendonca MCL, Miagostovich MP, Leite JPG (2010) Genetic diversity of porcine enteric caliciviruses in pigs raised in Rio de Janeiro State, Brazil. *Arch Virol* 155:1301–1305
- Farkas T, Zhong WM, Jing Y, Huang PW, Espinosa SM, Martinez N, Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Pickering LK, Jiang X (2004) Genetic diversity among sapoviruses. *Arch Virol* 149:1309–1323
- Fullerton SWB, Blaschke M, Coutard B, Gebhardt J, Gorbalenya A, Canard B, Tucker PA, Rohayem J (2007) Structural and functional characterization of sapovirus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* 81:1858–1871
- Gibbs MJ, Armstrong JS, Gibbs AJ (2000) Sister-Scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics* 16:573–582
- Gutierrez-Escolano AL, Velazquez FR, Escobar-Herrera J, Saucedo CL, Torres J, Estrada-Garcia T (2010) Human caliciviruses detected in Mexican children admitted to hospital during 1998–2000, with severe acute gastroenteritis not due to other enteropathogens. *J Med Virol* :632–637
- Guo M, Evermann JF, Saif LJ (2001) Detection and molecular characterization of cultivable caliciviruses from clinically normal mink and enteric caliciviruses associated with diarrhea in mink. *Arch Virol* 146:479–493
- Hansman GS, Natori K, Oka T, Ogawa S, Tanaka K, Nagata N, Ushijima H, Takeda N, Katayama K (2004) Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. *Arch Virol* 150:21–36
- Hansman GS, Takeda N, Oka T, Oseto M, Hedlund KO, Katayama K (2005) Intergenogroup recombination in sapoviruses. *Emerg Infect Dis* 11:1916–1920
- Hansman GS, Oka T, Sakon N, Takeda N (2007) Antigenic diversity of human sapoviruses. *Emerg Infect Dis* 13:1519–1525
- Johnsen CK, Midgley S, Böttiger B (2009) Genetic diversity of sapovirus infections in Danish children 2005–2007. *J Clin Virol* 46:265–269
- Katayama K, Miyoshi T, Uchino K, Oka T, Tanaka T, Takeda N, Hansman GS (2004) Novel recombinant sapovirus. *Emerg Infect Dis* 10:1874–1876
- Kirkegaard K, Baltimore D (1986) The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell* 47:433–443
- Kroneman A, Harris J, Vennema H, Duizer E, van Duynhoven Y, Gray J, Iturriza M, Bottiger B, Falkenhorst G, Johnsen C, von Bonsdorff CH, Maunula L, Kuusi M, Pothier P, Gallay A, Schreier E, Koch J, Szuets G, Reuter G, Krisztalovics K, Lynch M, McKeown P, Foley B, Coughlan S, Ruggeri MF, Di Bartolo I, Vainio K, Isakbaeva E, Poljsak-Prijatelj M, Grom AH, Bosch A, Buesa J, Fauquier AS, Hernandez-Pezzi G, Hedlund KO, Koopmans M (2008) Data quality of 5 years of central norovirus outbreak reporting in the European Network for food-borne viruses. *J Public Health* 30:82–90
- Lai MMC (1992) RNA Recombination in Animal and Plant Viruses. *Microbiol Rev* 56:61–79
- Martella V, Lorusso E, Banyai K, Decaro N, Corrente M, Elia G, Cavalli A, Radogna A, Costantini V, Saif LJ, Lavazza A, Di Trani L, Buonavoglia C (2008) Identification of a porcine calicivirus related genetically to human sapoviruses. *J Clin Microbiol* 46:1907–1913
- Martin DP (2009) Recombination detection and analysis using RDP3. *Methods Mol Biol* 537:185–205
- Martin D, Rybicki E (2000) RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics* 16:562–563
- Martin D, Williamson C, Posada D (2005) RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics* 21:260–262
- Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Takeda N, Sato H. Divergent evolution of norovirus GII/4 by genome recombination from May 2006 to February 2009 in Japan. *J Virol* 84:8085–8097
- Oka T, Katayama K, Ogawa S, Hansman GS, Kageyama T, Ushijima H, Miyamura T, Takeda N (2005) Proteolytic processing of sapovirus ORF1 polyprotein. *J Virol* 79:7283–7290
- Oka T, Yamamoto M, Katayama K, Hansman GS, Ogawa S, Miyamura T, Takeda N (2006) Identification of the cleavage sites of sapovirus open reading frame 1 polyprotein. *J Gen Virol* 87:3329–3338
- Padidam M, Sawyer S, Fauquet CM (1999) Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265(2): 218–225
- Pang XLL, Lee BE, Tyrrell GJ, Preiksaitis JK (2009) Epidemiology and genotype analysis of sapovirus associated with gastroenteritis outbreaks in Alberta, Canada: 2004–2007. *J Infect Dis* 199:547–551
- Phan TG, Khamrin P, Quang TD, Dey SK, Takanashi S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H (2007) Emergence of intragenotype recombinant sapovirus in Japan. *Infect Genet Evol* 7:542–546

29. Schlenker C, Surawicz CM (2009) Emerging infections of the gastrointestinal tract. *Best Practice & Research Clin Gastroenterol* 23:89–99
30. Schuffenecker I, Ando T, Thouvenot D, Lina B, Aymard M (2001) Genetic classification of “Sapporo-like viruses”. *Arch Virol* 146:2115–2132
31. Smith JM (1992) Analyzing the mosaic structure of genes. *J Mol Evol* 34:126–129
32. Staden R (1996) The Staden sequence analysis package. *Mol Biotechnol* 5:233–241
33. Svraka S, Vennema H, van der Veer B, Hedlund KO, Thorhagen M, Siebenga J, Duizer E, Koopmans M (2010) Epidemiology and genotype analysis of emerging sapovirus associated infections across Europe. *J Clin Microbiol* 48:2191–2198
34. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. doi:10.1093/molbev/msr121
35. Yan H, Yagyu F, Okitsu S, Nishio O, Ushijima H (2003) Detection of norovirus (GI, GII), Sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. *J Virol Methods* 114:37–44
36. Xavier MPTP, Oliveira SA, Ferreira MSR, Victoria M, Miranda V, Silva MFM, Strina A, Barreto ML, Miagostovicht MP, Leite JPG (2009) Detection of caliciviruses associated with acute infantile gastroenteritis in Salvador, an urban center in Northeast Brazil. *Braz J Med Bio Res* 42:438–444

VII.II TERMOS DE CONCESSÃO DE USO DAS IMAGENS

NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Feb 20, 2013

This is a License Agreement between Karoline dos Anjos ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

| | |
|--|---|
| License Number | 3091941243221 |
| License date | Feb 18, 2013 |
| Licensed content publisher | Nature Publishing Group |
| Licensed content publication | Nature Reviews Microbiology |
| Licensed content title | Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system |
| Licensed content author | Eric F. Donaldson, Lisa C. Lindesmith, Anna D. LoBue and Ralph S. Baric |
| Licensed content date | Mar 1, 2010 |
| Volume number | 8 |
| Issue number | 3 |
| Type of Use | reuse in a thesis/dissertation |
| Requestor type | academic/educational |
| Format | print and electronic |
| Portion | figures/tables/illustrations |
| Number of figures/tables/illustrations | 1 |
| High-res required | no |
| Figures | Figure 1 genome organization and capsid structure. |
| Author of this NPG article | no |
| Your reference number | |
| Title of your thesis / dissertation | Análise do genoma completo de um isolado de Sapovirus no Distrito Federal e expressão do capsídeo do vírus para a produção de "Virus-like particles" pelo sistema de baculovírus recombinante |
| Expected completion date | Mar 2013 |
| Estimated size (number of pages) | 80 |
| Total | 0.00 USD |
| Terms and Conditions | |

Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.
2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.
3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)
For AOP papers, the credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

Note: For republication from the *British Journal of Cancer*, the following credit lines apply.

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication) For AOP papers, the credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

6. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference

citation), copyright (year of publication)

Note: For adaptation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

7. Translations of 401 words up to a whole article require NPG approval. Please visit <http://www.macmillanmedicalcommunications.com> for more information. Translations of up to a 400 words do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication).

Note: For translation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.

Special Terms:

v1.1

If you would like to pay for this license now, please remit this license along with your payment made payable to "COPYRIGHT CLEARANCE CENTER" otherwise you will be invoiced within 48 hours of the license date. Payment should be in the form of a check or money order referencing your account number and this invoice number RLNK500959179. Once you receive your invoice for this order, you may pay your invoice by credit card. Please follow instructions provided at that time.

**Make Payment To:
Copyright Clearance Center
Dept 001
P.O. Box 843006
Boston, MA 02284-3006**

For suggestions or comments regarding this order, contact RightsLink Customer Support: customercare@copyright.com or +1-877-622-5543 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.

**OXFORD UNIVERSITY PRESS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Feb 20, 2013

This is a License Agreement between Karoline dos Anjos ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Oxford University Press, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

| | |
|------------------------------|---|
| License Number | 3092090269879 |
| License date | Feb 18, 2013 |
| Licensed content publisher | Oxford University Press |
| Licensed content publication | Journal of Infectious Diseases |
| Licensed content title | Sapporo Virus: History and Recent Findings: |
| Licensed content author | Shunzo Chiba, Shuji Nakata, Kazuko Numata-Kinoshita, Shinjiro Honma |
| Licensed content date | 05/01/2000 |
| Type of Use | Thesis/Dissertation |
| Institution name | |
| Title of your work | Análise do genoma completo de um isolado de Sapovirus no Distrito Federal e expressão do capsídeo do vírus para a produção de "Virus-like particles" pelo sistema de baculovírus recombinante |
| Publisher of your work | n/a |
| Expected publication date | Mar 2013 |
| Permissions cost | 0.00 USD |
| Value added tax | 0.00 USD |
| Total | 0.00 USD |
| Total | 0.00 USD |

Terms and Conditions

**STANDARD TERMS AND CONDITIONS FOR REPRODUCTION OF MATERIAL
FROM AN OXFORD UNIVERSITY PRESS JOURNAL**

1. Use of the material is restricted to the type of use specified in your order details.
2. This permission covers the use of the material in the English language in the following territory: world. If you have requested additional permission to translate this material, the terms and conditions of this reuse will be set out in clause 12.
3. This permission is limited to the particular use authorized in (1) above and does not allow you to

sanction its use elsewhere in any other format other than specified above, nor does it apply to quotations, images, artistic works etc that have been reproduced from other sources which may be part of the material to be used.

4. No alteration, omission or addition is made to the material without our written consent. Permission must be re-cleared with Oxford University Press if/when you decide to reprint.

5. The following credit line appears wherever the material is used: author, title, journal, year, volume, issue number, pagination, by permission of Oxford University Press or the sponsoring society if the journal is a society journal. Where a journal is being published on behalf of a learned society, the details of that society must be included in the credit line.

6. For the reproduction of a full article from an Oxford University Press journal for whatever purpose, the corresponding author of the material concerned should be informed of the proposed use. Contact details for the corresponding authors of all Oxford University Press journal contact can be found alongside either the abstract or full text of the article concerned, accessible from www.oxfordjournals.org Should there be a problem clearing these rights, please contact journals.permissions@oxfordjournals.org

7. If the credit line or acknowledgement in our publication indicates that any of the figures, images or photos was reproduced, drawn or modified from an earlier source it will be necessary for you to clear this permission with the original publisher as well. If this permission has not been obtained, please note that this material cannot be included in your publication/photocopies.

8. While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by Oxford University Press or by Copyright Clearance Center (CCC)) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and Oxford University Press reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned or transferred by you to any other person without Oxford University Press's written permission.

10. Oxford University Press reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

11. You hereby indemnify and agree to hold harmless Oxford University Press and CCC, and their respective officers, directors, employs and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

12. Other Terms and Conditions:

v1.4

If you would like to pay for this license now, please remit this license along with your payment made payable to "COPYRIGHT CLEARANCE CENTER" otherwise you will be invoiced within 48 hours of the license date. Payment should be in the form of a check or money order referencing your account number and this invoice number RLNK500959425. Once you receive your invoice for this order, you may pay your invoice by credit card. Please follow instructions provided at that time.

**Make Payment To:
Copyright Clearance Center
Dept 001
P.O. Box 843006
Boston, MA 02284-3006**

For suggestions or comments regarding this order, contact RightsLink Customer Support: customercare@copyright.com or +1-877-622-5543 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.



- General

ViralZone is a [SIB Swiss Institute of Bioinformatics](#) web-resource for all viral genus and families, providing general molecular and epidemiological information, along with virion and genome figures. Each virus or family page gives an easy access to [UniProtKB/Swiss-Prot](#) viral protein entries.

Who are we?

- Chantal Hulo, *Biocuration*
- Patrick Masson, PhD, *Biocuration*
- Edouard de Castro, PhD, *software development*
- Philippe Le Mercier, PhD, *ViralZone team leader, virion graphics*

ViralZone project is handled by the virus program of SwissProt group

Swiss Institute of Bioinformatics, C.M.U., 1 rue Michel-Servet, 1211 Geneve 4, Switzerland

Proteins popups were developed in collaboration with Prof. Christian von Mering and Andrea Franceschini, [Bioinformatics Group](#), Institute of Molecular Life Sciences, University of Zurich, Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zurich, Switzerland, funded in part by the SIB Swiss Institute of bioinformatics.

Virion pictures

All pictures in ViralZone are copyright of the [SIB Swiss Institute of Bioinformatics](#).

Permission is granted to use the pictures in academic thesis or non-commercial powerpoint presentations, provided the source is acknowledged (Source: ViralZone www.expasy.org/viralzone, Swiss Institute of Bioinformatics). For any other use, please contact us at viralzone@isb-sib.ch

Funding

This project is funded by the [SIB Swiss Institute of bioinformatics](#)

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Feb 20, 2013

This is a License Agreement between Karoline dos Anjos ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

| | |
|--|--|
| Supplier | Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK |
| Registered Company Number | 1982084 |
| Customer name | Karoline dos Anjos |
| Customer address | Quadra 104 lote 3 bloco b apt 601 Brasilia, Distrito Federal 71909180 |
| License number | 3092130341649 |
| License date | Feb 18, 2013 |
| Licensed content publisher | Elsevier |
| Licensed content publication | Journal of Virological Methods |
| Licensed content title | Expression and characterization of Sapporo-like human calicivirus capsid proteins in baculovirus |
| Licensed content author | Xi Jiang, Weiming Zhong, Michael Kaplan, Larry K Pickering, David O Matson |
| Licensed content date | March 1999 |
| Licensed content volume number | 78 |
| Licensed content issue number | 1-2 |
| Number of pages | 11 |
| Start Page | 81 |
| End Page | 91 |
| Type of Use | reuse in a thesis/dissertation |
| Portion | figures/tables/illustrations |
| Number of figures/tables/illustrations | 1 |
| Format | both print and electronic |
| Are you the author of this Elsevier article? | No |
| Will you be translating? | No |
| Order reference number | |

| | |
|-----------------------------------|---|
| Title of your thesis/dissertation | Análise do genoma completo de um isolado de Sapovirus no Distrito Federal e expressão do capsídeo do vírus para a produção de "Virus-like particles" pelo sistema de baculovírus recombinante |
| Expected completion date | Mar 2013 |
| Estimated size (number of pages) | 80 |
| Elsevier VAT number | GB 494 6272 12 |
| Permissions price | 0.00 USD |
| VAT/Local Sales Tax | 0.0 USD / 0.0 GBP |
| Total | 0.00 USD |
| Terms and Conditions | |

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

“Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER].” Also Lancet special credit - “Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier.”

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at permissions@elsevier.com)

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. **License Contingent Upon Payment:** While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. **Warranties:** Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. **Indemnity:** You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. **No Transfer of License:** This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. **No Amendment Except in Writing:** This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. **Objection to Contrary Terms:** Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. **Revocation:** Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article. If this

license is to re-use 1 or 2 figures then permission is granted for non-exclusive world rights in all languages.

16. **Website:** The following terms and conditions apply to electronic reserve and author websites:

Electronic reserve: If licensed material is to be posted to website, the web site is to be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course if:

This license was made in connection with a course,

This permission is granted for 1 year only. You may obtain a license for future website posting,

All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image,

A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>, and

Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

17. **Author website** for journals with the following additional clauses:

All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image, and the permission granted is limited to the personal version of your paper. You are not allowed to download and post the published electronic version of your article (whether PDF or HTML, proof or final version), nor may you scan the printed edition to create an electronic version.

A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx>. As part of our normal production process, you will receive an e-mail notice when your article appears on Elsevier's online service ScienceDirect (www.sciencedirect.com). That e-mail will include the article's Digital Object Identifier (DOI). This number provides the electronic link to the published article and should be included in the posting of your personal version. We ask that you wait until you receive this e-mail and have the DOI to do any posting.

Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

18. **Author website** for books with the following additional clauses:

Authors are permitted to place a brief summary of their work online only.

A hyper-text must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version.

Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

19. **Website** (regular and for author): A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or for books to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>

20. **Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published

commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission.

21. Other Conditions:

v1.6

If you would like to pay for this license now, please remit this license along with your payment made payable to "COPYRIGHT CLEARANCE CENTER" otherwise you will be invoiced within 48 hours of the license date. Payment should be in the form of a check or money order referencing your account number and this invoice number RLNK500959485. Once you receive your invoice for this order, you may pay your invoice by credit card. Please follow instructions provided at that time.

**Make Payment To:
Copyright Clearance Center
Dept 001
P.O. Box 843006
Boston, MA 02284-3006**

For suggestions or comments regarding this order, contact RightsLink Customer Support: customercare@copyright.com or +1-877-622-5543 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.
