

**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Pós-Graduação em Biologia Molecular**

**Proteína multiepitopo recombinante para o
desenvolvimento de kit de diagnóstico para hepatite C**

José Carlos Dos Santos

Brasília

2011

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós Graduação em Biologia Molecular

**Proteína multiepitopo recombinante para o
desenvolvimento de kit de diagnóstico para hepatite C**

Dissertação apresentado ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Biologia Molecular.

Orientado: José Carlos Dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres

Coorientadora: Prof. Dra. Maria Sueli Soares Felipe

Brasília

2011

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres – Orientador (UnB)

Prof. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca – Examinadora (UnB)

Prof. Dra. Beatriz Dolabela de Lima – Examinadora (UnB)

Prof. Dra. Lidia Maria Pepe de Moraes – Suplente (UnB)

Brasília

2011

“recomeçar

Não importa onde você parou...

em que momento da vida você cansou...

o que importa é que sempre é possível e necessário “Recomeçar”.

Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo...

é renovar as esperanças na vida e o mais importante...

acreditar em você de novo...

Sofreu muito nesse período? Foi aprendizado.

Chorou muito? Foi limpeza da alma.

Ficou com raiva das pessoas? Foi para perdoá-las um dia.

Tem tanta gente esperando apenas um sorriso seu para “chegar” perto de você.

Recomeçar...

hoje é um bom dia para começar novos desafios.

Onde você que chegar?

Ir alto... sonhe alto...

queira o melhor do melhor...

pensando assim trazemos pra nós aquilo que desejamos...

Se pensarmos pequeno coisas pequenas teremos

Já se desejarmos fortemente o melhor e principalmente lutarmos pelo melhor, o melhor vai se instalar em nossa vida.

“Porque sou do tamanho daquilo que vejo, e não do tamanho da minha altura.”

Carlos Drummond de Andrade

“Se procurar bem você acaba encontrando.
Não a explicação (duvidosa) da vida,
Mas a poesia (inexplicável) da vida”

Carlos Drummond de Andrade

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por estar sempre presente, me encorajando mesmo nas horas mais difíceis.

Aos meus orientadores, professor Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres e professora Dra. Maria Sueli Soares Felipe, pela oportunidade, pelos primeiros ensinamentos de Biologia Molecular, pelo constante apoio, incentivo e pela confiança depositada na realização desse projeto.

Aos meus pais João e Maria e aos meus irmãos Cláudio e Nilson, que sempre esteve comigo, mesmo a distância, por me apoiarem durante toda a minha vida.

A professora Dra. Sônia Freitas, do laboratório de biofísica, pelo ensinamento nos testes de difração circular.

A professora Dra. Yanna Karla, da Faculdade de Saúde, pelos ensinamentos com os testes imunoenzimáticos.

A todos os amigos e colegas de trabalho do laboratório de biologia molecular, especialmente aos nobres colegas do lab. 4 e lab. 2.

Aos funcionários da biomol , Fátima, Ivanilde, Fernanda, Thompson e Aldayde, pelo apoio técnico.

A empresa WAMA DIAGNÓSTICA pela parceria neste projeto.

Ao amigo e ex-chefe, Dr. Carlos Alberto Mestriner (Beto) funcionário da empresa WAMA DIAGNÓSTICA, por ter sido o grande incentivador dessa nova etapa profissional de minha vida.

A CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	i
Lista de Quadros	iii
Abreviaturas	iv
Resumo	vi
Abstract	vii
1. Introdução	1
1.1 Hepatites virais	2
1.1.1 Hepatite C	4
1.1.1.1 Agente Etiológico	5
1.1.1.2 Genótipos do HCV	8
1.1.1.3 Diagnóstico	9
1.1.1.4 Tratamento	11
1.2 Proteínas Recombinantes	12
2. Justificativa	14
3. Objetivos	16
3.1 Geral	17
3.2 Específicos	17
4. Materiais	18
4.1 Linhagens de <i>E. coli</i> para expressão heteróloga das proteínas recombinantes	19
4.2 Meios de cultura e soluções para o cultivo de <i>E. coli</i>	19
4.3 Reagentes	20
4.4 Soluções e tampões de corrida para gel de eletroforese	20
4.5 Soluções e tampões para gel de poliacrilamida desnaturante	20
4.6 Soluções para Western Blot	22
4.7 Tampões para purificação de proteínas	23
4.8 Marcadores para proteínas	24
4.9 Soluções e Tampões para o ELISA	24
5. Métodos	26
5.1 Metodologia Experimental	27
5.2 Estratégia para o desenho do gene sintético	27
5.3 Preparo de células termocompetentes <i>E. coli</i> DH5 α e BL21 (λ DE3) (CaCl ₂)	33
5.4 Transformação de <i>E. coli</i> DH5 α por choque térmico	33
5.5 Extração de DNA plasmidial em pequena escala para análise de restrição	34

5.6 Digestão com as enzimas de restrição <i>NdeI</i> e <i>XhoI</i>	34
5.7 Transformação de <i>E.coli</i> BL21 (λ DE3) por choque térmico	34
5.8 Indução da expressão do gene MEHCV em <i>E. coli</i>	34
5.9 Purificação do r-MEHCV	35
5.10 Western blot	35
5.11 Ensaio imunoenzimático (ELISA) anti-HCV	36
5.12 Dicroísmo Circular (CD)	37
6. Resultados e Discussão	38
6.1 Análise de restrição	39
6.2 Indução da expressão da proteína r-MEHCV em <i>E. coli</i> BL21 (λ DE3)	40
6.3 Purificação da proteína r-MEHCV	40
6.4 Análise prévia das amostras de soros humano anti-HCV a serem utilizadas no ensaio ELISA r-MEHCV.	42
6.5 ELISA r-MEHCV "caseiro"	43
6.6 ELISA r-MEHCV "caseiro" teste de reatividade cruzada	46
6.7 Dicroísmo Circular	48
7. Conclusões e Perspectivas	53
8. Referências Bibliográficas	56

Lista de Figuras

Figura 1. Modelo da estrutura e organização do genoma do vírus da hepatite C (HCV)	8
Figura 2. Representação dos epitopos selecionados a partir do genoma do HCV para construção da proteína multiepitopo r-MEHCV	27
Figura 3. Sequência primária da poliproteína HCV	28
Figura 4. Alinhamento das diversas regiões imunodominantes de isolados HCV sorotipos 1a/b e 3a	29
Figura 5. Sequência primária da proteína multiepitopo r-MEHCV	30
Figura 6. Sequência nucleotídica do gene r-MEHCV com sítios de restrições nas extremidades 5' (<i>NdeI</i>) e 3' (<i>XhoI</i>)	30
Figura 7. Mapa físico do vetor pET-21a	32
Figura 8. Mapa da região do <i>polylinker</i> do vetor pET-21a	32
Figura 9. Análise de restrição do plasmídeo pETMEHCV em gel de agarose 1%	39
Figura 10. Análise em gel SDS-PAGE 12% da cinética de indução da expressão da proteína r-MEHCV em <i>E.coli</i>	40
Figura 11. Purificação da proteína r-MEHCV por cromatografia de afinidade Ni-NTA, análise em gel SDS-PAGE 12%	41
Figura 12. Western blot: da purificação da proteína r-MEHCV por cromatografia de afinidade Ni-NTA	42
Figura 13. ELISA kit Hepanostika HCV Ultra: Análise das amostras de soros reagentes e não reagentes para HCV fornecidas pela empresa WAMA DIAGNÓSTICA	
Figura 14. ELISA r-MEHCV “caseiro” com amostras de soros humanos reagentes e não reagentes para HCV	44
Figura 15. ELISA r-MEHCV “caseiro” utilizando o revelador da peroxidase <i>Sigma FAST™ OPD Peroxidase Substrate Tablet Set</i>	45
Figura 16. ELISA r-MEHCV “caseiro” teste de reação cruzada com amostras de soros humanos reagentes para outras patologias	47
Figura 17. Espectros dicróicos para proteínas com predominância de estruturas secundárias	48

Figura 18. Espectros de dicroísmo circular da proteína r-MEHCV em pH 7 e 8	49
Figura 19. Espectros de dicroísmo circular da proteína r-MEHCV em pH 7 sob ação de diferentes temperaturas	50
Figura 20. Espectros de dicroísmo circular da proteína em pH 8 sob ação de diferentes temperaturas	50
Figura 21. Curva de desnaturação térmica da proteína r-MEHCV em tampão tris-HCl pH 7	51
Figura 22. Curva de desnaturação térmica da proteína r-MEHCV em tampão tris-HCl pH 8	51

Lista de Quadros

Quadro 1. Soros humanos reagentes para diversas patologias	46
Quadro 2. Predição da estrutura secundária da proteína r-MEHCV	49

Abreviaturas

- ALT:** Alanina Amino Transferase
- APB:** Tampão para fosfatase alcalina
- BCIP:** 5-Bromo-4-Cloroindolil Fosfato
- C-Terminal:** Região Carboxi-Terminal
- DNA:** Ácido Desoxirribonucleico
- EDTA:** Ácido Etilenodiaminotetracético
- ELISA:** *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- HAV:** *Hepatitis A virus* (vírus da hepatite A)
- HBV:** *Hepatitis B virus* (vírus da hepatite B)
- HCV:** *Hepatitis C virus* (vírus da hepatite C)
- HDV:** *Hepatitis D virus* (vírus da hepatite D)
- HEV:** *Hepatitis E virus* (vírus da hepatite E)
- HFV:** *Hepatitis F virus* (vírus da hepatite F)
- HGV:** *Hepatitis G virus* (vírus da hepatite G)
- His-Tag:** Segmento de 6 resíduos de histidina
- IB:** *Immunoblot*
- IFN:** Interferon
- IPTG:** Isopropil β -D-Tiogalactopiranosídeo
- IRES:** *Internal Ribosome Entry Site* (Sitio Interno de Entrada Ribossomal)
- kDa:** quilo Dalton
- Mini-Prep:** Mini Preparação de Plasmídeos por Lise Alcalina
- NBT:** Nitroazultetrazólio
- NC:** Região não - Codificadora
- OD:** Densidade Óptica
- ORF:** *Open Reading Frame*
- PAGE:** Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
- pb:** Par de Bases
- PBS:** Solução Salina Tamponada Fosfatada
- PBST:** Solução Salina Tamponada Fosfatada com Tween 20
- PCR:** *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

pH: Potencial Hidrogeniônico

Poli U: Sequência Longa de Uracilas

PNPP: Fosfato de Sódio 4-Nitrofenila Hexahidratado

r-MEHCV: Proteína Multiepitopo recombinante HCV

RNA: Ácido Ribonucleico

rpm: Rotação por Minuto

RT-PCR: *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (Transcrição Reversa associada à PCR)

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

SEN-V: *Hepatitis SEN virus* (vírus da hepatite SEN)

TBE: Tris Borato EDTA

TEMED: N'N'N'N'Tetrametilenodiamino

Tris-HCl: Tris (Hidroximetil) Aminometano Hidroclorido

TTV: *Transfusion Transmissible Virus* (vírus da hepatite TT)

RESUMO

O vírus da hepatite C (HCV) é um importante patógeno humano afetando 3% da população humana. A infecção crônica é frequente sendo uma das principais causas de cirrose hepática e carcinoma hepatocelular. Estudos de soroprevalência indicam que pelo menos 200 milhões de pessoas tenham sido infectadas no mundo sendo que somente no Brasil aproximadamente 2 milhões de casos foram relatados até 2003. Vários kits de diagnóstico baseados EIA (*Enzyme immunoassay*) estão disponíveis no mercado para a detecção de anticorpos anti-HCV no plasma. No entanto, devido à distribuição geográfica distinta de todos os genótipos do HCV no mundo, estes kits nem sempre apresentam um bom desempenho nas diferentes localidades do mundo. Atualmente, esses kits utilizam antígenos peptídicos (kits de terceira geração) ou antígenos recombinantes (kits de quarta geração) de ambas as regiões, estruturais e não estruturais, da proteína viral. A exigência de múltiplos peptídeos e/ou múltiplas proteínas recombinantes para o diagnóstico confiável de infecção pelo HCV aumenta o custo destes kits. A fim de reduzir o custo de fabricação e aumentar a especificidade dos kits de detecção de HCV desenvolvemos uma cadeia única de proteína multiepitopo recombinante composta de várias partes das regiões estruturais e não estruturais da proteína viral. Este gene sintético, com 948 pb, e que codifica para uma proteína multiepitopo HCV (denominado r-MEHCV) foi clonado no vetor pET21a. Células de *Escherichia coli* BL21 (λ DE3) foram transformadas com o plasmídeo resultante e a expressão induzida com 1 mM IPTG. Após 8 h de indução, uma proteína com massa molecular aparente de ~37 kDa foi observada. A proteína recombinante foi purificada até homogeneidade por meio de uma única etapa por cromatografia de afinidade com resina Ni-NTA. A expressão bem-sucedida, assim como os ensaios realizados com a construção de um ELISA “caseiro” baseado na r-MEHCV, no quais amostras de soros reagentes e não reagentes para HCV e reagentes para outras patologias foram analisadas, mostraram que esta proteína pode ser utilizada para o desenvolvimento de um autêntico kit brasileiro para fins de diagnóstico da hepatite C. Análises de dicroísmo circular em pH 7 e 8 mostraram que essa proteína apresenta um padrão de dobramento compatível com estruturas secundária e terciária.

ABSTRACT

Hepatitis C virus (HCV) is an important human pathogen affecting 3% of the human population. Chronic infection is frequent and is a major cause of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Seroprevalence studies suggest that at least 200 million individuals have been infected worldwide. In Brazil, approximately 2 million acute cases of hepatitis C have been reported till date. Several EIA (Enzyme immunoassay) based diagnostic kits are available in the market for the detection of anti-HCV antibodies in plasma. However, due to the distinct geographical distribution of all HCV genotypes worldwide, these kits do not always perform equally well in different parts of world. Currently, these kits use peptide antigens (third generation kits) or recombinant antigens (fourth generation kits) from both structural and non-structural regions of the viral protein. The requirement of multiple peptides and/or multiple recombinant proteins for reliable diagnosis of HCV infection adds to the cost of these EIA kits. In order to reduce manufacturing cost and extend the specificity of HCV detection kits we have designed a single-chain recombinant multi-epitope protein, consisting of several epitopes from structural and non-structural regions of the viral protein. This synthetic gene with c. 948-pb which encodes the HCV multi-epitope protein (rMEHCV) was cloned into pET21a vector. The resulting vector was named pETMEHCV. *Escherichia coli* BL21 (λ DE3) was transformed with the resulting plasmid. A bacterial clone was induced with 1 mM IPTG and the time course of induction after 8h showed a protein with an apparent molecular mass of ~37 kDa. The recombinant protein was purified to homogeneity from disrupted cells by a single step Ni-NTA chromatography. The successful expression, as well as the tests performed with the construction of an “in house” ELISA based on r-MEHCV, in which serum samples reactive and non reactive for HCV and serum reactive with other pathologies were analyzed, shows that this protein may be used for development of a genuine Brazilian hepatitis C kit for diagnostic purposes. Analyses of circular dichroism at pH 7 and 8 showed that this protein has a folding pattern consistent with secondary and tertiary structures.

1. Introdução

1.1 Hepatites virais

Hepatite é um termo genérico que significa inflamação do fígado e pode ser causada por medicamentos, doenças autoimunes, metabólicas e genéticas, álcool, substâncias tóxicas e vírus (Ministério da Saúde, 2009).

Uma ampla diversidade de vírus pode infectar esse órgão, sendo eles, os vírus hepatotrópicos, isto é, que têm um tropismo específico para o fígado. Atualmente, é aceito a existência de 9 vírus hepatotrópicos como agentes etiológicos das hepatites (A, B, C, D, E, F, G, TT e SEN). Esses vírus, apesar de apresentarem quadros clínicos bastante semelhantes, foram classificados em diversos gêneros, com características funcionais e estruturais extremamente distintas (Takahashi *et al.*, 2004).

Hepatite A é uma doença infecciosa viral, contagiosa, causada pelo vírus A (HAV) e também conhecida como hepatite infecciosa, hepatite epidêmica, ou hepatite de período de incubação curto. O agente etiológico é um pequeno vírus de RNA, membro da família *Picornaviridea*, sendo que o período de incubação, intervalo entre a exposição efetiva do indivíduo suscetível ao vírus e o início dos sinais e sintomas clínicos da infecção, varia de 15 a 50 dias (média de 30 dias). O HAV apresenta distribuição mundial tendo como principal via de contágio a fecal-oral, por contato inter-humano ou por água e alimentos contaminados. A disseminação está relacionada às condições de saneamento básico, nível socioeconômico da população, grau de educação sanitária e condições de higiene da população (Ministério da Saúde, 2009).

A hepatite B é uma doença infecciosa viral, contagiosa, causada pelo vírus da hepatite B (HBV), conhecida anteriormente como soro-homóloga. O agente etiológico é um vírus de DNA, hepatovírus da família *Hepadnaviridae*, podendo apresentar-se como infecção assintomática ou sintomática, sendo que, pessoas adultas infectadas com o HBV apresentam 90 a 95% de cura e 5 a 10% permanecem com o vírus por mais de seis meses, evoluindo para a forma crônica da doença. O período de incubação varia de 30 a 180 dias (média de 70 dias) e sua transmissão ocorre principalmente por relações sexuais desprotegidas, pois o vírus encontra-se no sêmen e secreções vaginais, por uso de drogas com compartilhamento de seringas, agulhas ou outros equipamentos contaminados, por transfusão de sangue e derivados contaminados, por transmissão vertical (mãe/filho) e por aleitamento materno (Ministério da Saúde, 2009).

A hepatite C é uma doença infecciosa viral, contagiosa, causada pelo vírus da hepatite C (HCV), conhecido anteriormente por “hepatite Não A Não B”, quando era responsável por 90% dos casos de hepatite transmitida por transfusão de sangue sem agente etiológico reconhecido, a fisiopatologia desta doença será melhor descrita a seguir (Ministério da Saúde, 2009).

A hepatite delta é uma doença infecciosa viral, contagiosa, causada pelo vírus da hepatite delta ou HDV (é um vírus RNA, que precisa do vírus B para que ocorra a infecção), podendo apresentar-se como uma infecção assintomática ou sintomática e, nestes casos, até mesmo com formas graves de hepatite. O período de incubação varia de 30 a 50 dias (média de 35 dias) e os modos de transmissão são os mesmos do HBV (Ministério da Saúde, 2009).

A hepatite E é uma doença infecciosa viral, contagiosa, causada pelo vírus E (HEV) do tipo RNA, classificado como pertencente à família *Caliciviridae*. O período de incubação varia de 15 a 60 dias (média de 40 dias) e a transmissão do HEV ocorre tanto sob a forma epidêmica, como de forma esporádica, em áreas endêmicas de países em desenvolvimento. A via de transmissão fecal-oral favorece a disseminação da infecção nesses países, onde a contaminação dos reservatórios de água mantém a cadeia de transmissão da doença e a transmissão interpessoal não é comum (Ministério da Saúde, 2009).

O vírus da hepatite F (HFV) tem sido descrito em apenas alguns casos na França, após a transmissão experimental realizadas em primatas. A virologia, epidemiologia, hepatotropicidade e importância clínica de VHF não estão estabelecidos (Deka *et al.*, 1994).

O vírus da hepatite G (HGV) é um RNA-vírus pertencente à família *Flaviviridae* e foi identificado pela primeira vez em 1995. Pelo menos 3 diferentes genomas foram identificados. Sua transmissão é através da via parenteral, apresentando baixa taxa de infectividade, já que menos de 50% dos receptores de sangue infectado pelo VHG apresentaram a infecção, sendo que, a transmissão sexual ou vertical também é possível, mas incomum (Roth *et al.*, 1997). O grupo de risco com maior prevalência para infecção pelo HGV é o de pacientes multi-transfundidos, de pacientes em hemodiálise e de usuários de drogas injetáveis. Em decorrência dessa similaridade na rota de transmissão, o HGV é frequentemente achado em associação com outras hepatites virais, particularmente com a hepatite C (Müller *et al.*, 1997).

O vírus TT (*transfusion transmissible virus*) é um DNA-vírus de fita simples e foi identificado pela primeira vez em 1997 no Japão. O vírus TT (TTV) não tem envelope e seu material genético circular apresenta cerca de 3800 nucleotídeos. Alguns pesquisadores

sugerem que o vírus TT está mais relacionado a família *Circoviridae*. Ainda assim, por apresentar algumas diferenças significativas em suas propriedades físico-químicas e diferenças em seu sequenciamento genético, outro grupo tenta classificá-lo em uma nova família viral, a *Circinoviridae*. Pode ser transmitido por produtos de sangue e pelas rotas parenterais usuais, mas não são descartadas outras vias (Bowden, 2001).

Um novo vírus hepatotrópico foi identificado em 2000 na Itália e foi nomeado, provisoriamente, de SEN (SEN-V), em decorrência do paciente fonte. Esse vírus não possui envelope e é um DNA-vírus de fita simples. Até o momento, já foram identificados 8 subtipos (SENV- A a H). Seu genoma linear compreende cerca de 3900 nucleotídeos e assemelha-se ao TTV, sendo provável um antecessor em comum (Bowden, 2001).

1.1.1 Hepatite C

O vírus da hepatite C (HCV) é um problema mundial de saúde causado pela falta de uma vacina eficaz, alto custo no tratamento, cronicidade associada a morbidade e mortalidade alta (Amini *et al.*, 2006). Estima-se que cerca de 200 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas com o HCV (Lauer & Walker, 2001; Alberti *et al.*, 2002).

O HCV foi identificado em 1989 por Choo *et al.* (1989), sendo responsável por 90% dos casos de hepatites pós-transfusionais não-A não-B, que até então não tinha etiologia definida (Alter *et al.*, 1989), sendo considerado uma das principais causas de hepatite crônica, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (Poynard *et al.*, 2003; Perz & Alter, 2006).

As infecções agudas e estágios menos avançados da doença crônica geralmente são clinicamente silenciosa e somente metade dos pacientes que apresentam viremia exibem elevada atividade de alanina aminotransferase (ALT). Deste modo, a hepatite C é muitas vezes diagnosticada pela primeira vez na fase tardia da doença, quando as opções terapêuticas já são limitadas (Lauer *et al.*, 2001; WHO, 2002).

Em muitos países, as taxas de transmissão diminuíram substancialmente com a introdução de exames de sangue em 1991 (WHO, 2001; Buti *et al.*, 2005). No entanto, devido à lenta progressão da doença, muitos pacientes infectados antes da década de 1990 através de produtos sanguíneos contaminados ainda estão em risco de evolução para doença hepática grave nos próximos anos. Portanto, apesar da diminuição de novas infecções adquiridas através de produtos derivados do sangue, os modelos matemáticos prevêm ainda um aumento contínuo da morbidade e mortalidade relacionado ao HCV (Buti *et al.*, 2005). Hoje,

após a erradicação da infecção associada à transfusão, o uso de drogas intravenosas é considerado como a principal causa de transmissão do HCV na maioria dos países europeus, com taxas de prevalência entre usuários de drogas injetáveis (UDI), variando de 15% a 90% (Esteban *et al.*, 2008).

Especialistas estimam que o HCV seja responsável por 20% dos casos de hepatite aguda, 70% dos casos de hepatite crônica, 40% dos casos de cirrose na fase final, 60% dos casos de carcinoma hepatocelular (HCC), e 30% dos casos de transplantes de fígado (LT) nos países industrializados (EASL, 1999). Relatórios da OMS e de uma conferência sobre o HCV realizada pelo Instituto Nacional de Saúde (UE) em 2002 consideraram o HCV como a principal responsável pelos transplantes hepático, visto que dois terços dos transplantes de fígado são devido à infecção causada pelo HCV (WHO, 1999; NIH, 2002).

1.1.1.1 Agente Etiológico

O HCV é pertencente à família *Flaviviridea* e ao gênero *Hepacivirus*. Nesta família também estão incluídos os vírus que causam a febre amarela e a dengue. Trata-se de um vírus de RNA fita simples de polaridade positiva, cujo genoma possui aproximadamente 9,5 kb de tamanho e duas extremidades não codificadoras: 5'NC e 3'NC (Chambers *et al.*, 1990; Alter *et al.*, 1999).

A extremidade 5'NC é a região mais conservada do genoma, contendo 341 nucleotídeos localizados na região *upstream* da longa e única fase aberta de leitura ORF que codifica para uma poliproteína de 3010-3033 resíduos de aminoácidos. Esta, por sua vez, é processada pós-traducionalmente para produzir 11 proteínas, sendo 3 estruturais (C ou *core*, E1 e E2), uma pequena proteína p7, 6 proteínas não-estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) e uma proteína F resultante de um *frameshift* da região codificadora do *core*. A região 5'NC contém quatro domínios altamente estruturados, numerados de I a IV, sendo que os domínios II, III e IV, juntamente com os primeiros 12 a 30 nucleotídeos da região codificadora do *core*, constituem a IRES, local onde ocorre a ligação direta da unidade ribossomal 40S gerando um mecanismo alternativo de tradução do RNA HCV. (Brown *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1995; Honda *et al.*, 1996).

A 3'NC possui aproximadamente 225 nucleotídeos e é dividida em três regiões: um segmento hipervariável de 30 a 40 nucleotídeos, uma cauda poli U variável em extensão, e uma região altamente conservada de 98 nucleotídeos, essencial para replicação *in vivo* (Rosenberg, 2001).

A proteína do *core* tem como principal função formar o capsídeo que irá abrigar e proteger o RNA viral enquanto o vírus passa de uma célula a outra ou de uma pessoa para outra. Além disso, a proteína do *core* parece estar associada a diversas funções, como modulação da transcrição gênica, proliferação, morte e sinalização celular, podendo interferir com o metabolismo lipídico e deprimir a resposta imune do hospedeiro por mecanismos ainda desconhecidos (McLauchlan, 2000; Giannini & Brechot, 2003).

As duas glicoproteínas do envelope viral, E1 e E2, são componentes essenciais e necessários para fusão do vírus em receptores de células alvo. Para cumprir essas funções, as glicoproteínas têm que adotar conformações drasticamente diferentes durante o ciclo de vida do vírus (Bartosch *et al.*, 2003; Drummer *et al.*, 2003). A proteína p7 é um pequeno polipeptídeo de 63 resíduos de aminoácidos que tem se mostrado uma proteína integral de membrana. A p7 é codificada pela região E2 e processada por um precursor E2/p7. Estudos apontam que possa mediar a permeabilidade de canal de íons cálcio e apresentar importante função na maturação e infectividade da partícula viral (Carrere-Kremer *et al.*, 2002; Gonzalez & Carrasco, 2003; Sakai *et al.*, 2003).

A proteína NS2 atua como um inibidor de apoptose, podendo também interferir na expressão gênica celular e ser necessária na fosforilação de NS5A. A proteína NS2 e o domínio amino-terminal da NS3 constituem a protease NS2-3 que catalisa a clivagem intramolecular do sítio NS2-NS3, esta autoprotease é essencial para alta taxa de replicação do vírus *in vivo* (Liu *et al.*, 1999; Bartenschlager *et al.*, 1995; Dumoulin *et al.*, 2003).

A NS3 é uma proteína multifuncional contendo um domínio serina-protease na região N-terminal e um domínio helicase/NTPase na região C-terminal. Juntamente com a proteína NS4A forma a NS3-NS4A protease, importante para o ciclo de vida do vírus. Essa protease processa a poliproteína do HCV clivando as junções NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A e NS5A/NS5B. A NS3-NS4A protease é um dos alvos virais mais importantes para a terapia anti-HCV (Kim *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 1998, Pawlotsky & McHutchison, 2004; Pawlotsky, 2006).

A região central da NS4A atua como um cofator da atividade serina-protease NS3, permitindo a sua estabilização e localização na membrana RE, bem como a ativação da clivagem na junção NS4B/NS5A (Bartenschlager *et al.*, 1995, Tanji *et al.*, 1995). Uma das funções do NS4B é servir como âncora para a membrana no complexo de replicação, além disso, pode inibir a síntese celular e modular a atividade da NS5B, sendo responsável também pela indução de interleucina 8 (Elazar *et al.*, 2004; Gretton *et al.*, 2005; Kadoya *et al.*, 2005).

A NS5A é uma fosfoproteína cujo número de fosforilações é influenciado por NS4A. Várias funções foram atribuídas a NS5A baseado em suas interações com proteínas celulares, ou seja, parece desempenhar um papel na resistência antiviral ao interferon (IFN) e, possivelmente, estar envolvida na regulação do crescimento celular e na ativação transcricional, assim como na via de sinalização celular (Gale *et al.*, 1998; Tellinghuisen *et al.*, 2002; Pellerin *et al.*, 2004). A proteína NS5B é uma RNA polimerase RNA-dependente, necessária para replicação viral, sendo um excelente alvo para terapia antiviral (Ma *et al.*, 2005; Pawlotsky *et al.*, 2006).

O papel da proteína F (*frameshift*) ou ARFP (*alternate reading frame protein*) no ciclo de vida HCV permanece desconhecido, mas foi proposto estar envolvido com a persistência viral (Baril & Brakier-Gingras, 2005) (A figura 1 representa o modelo estrutural e a organização do genoma HCV).

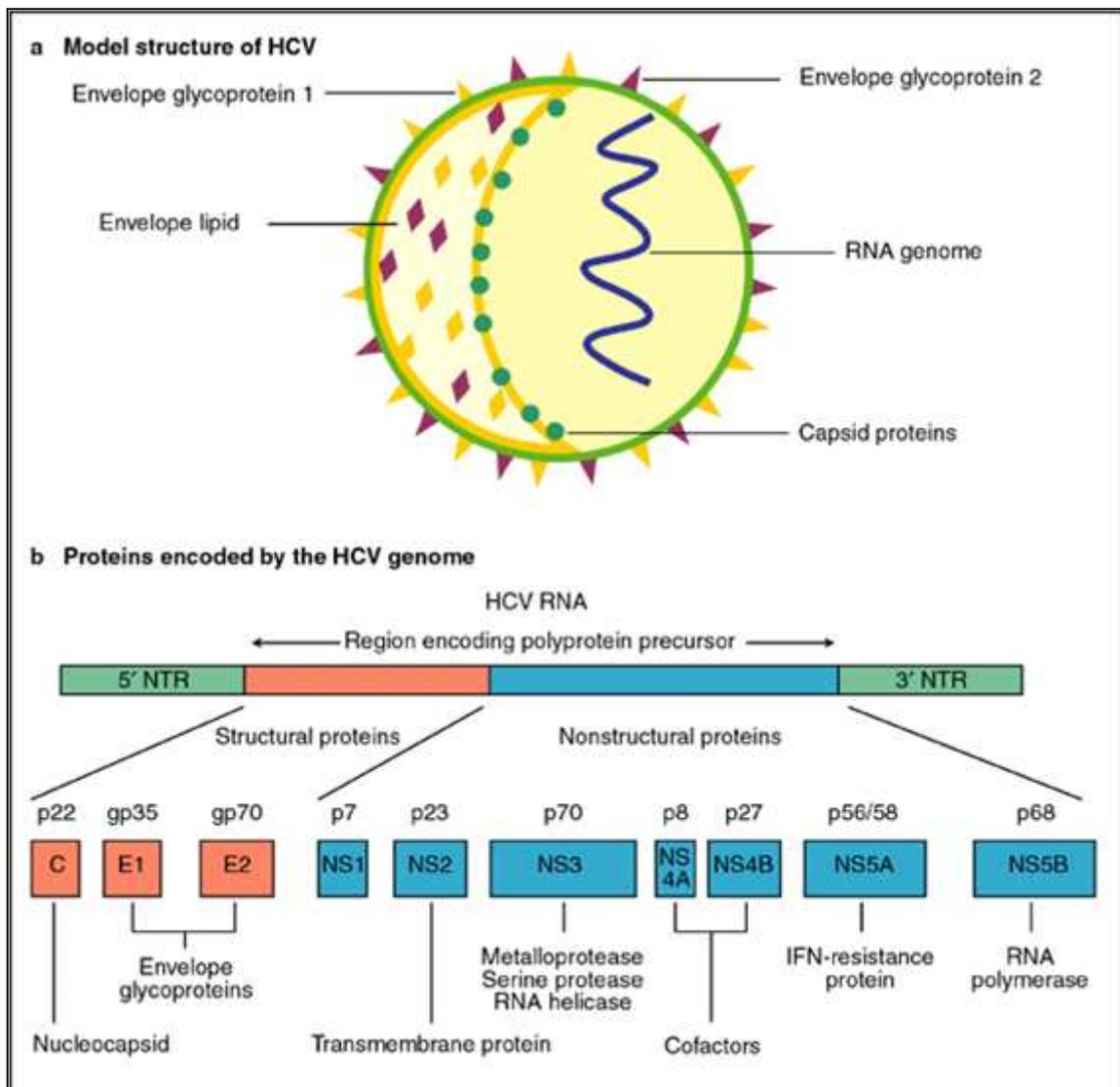


Figura 1 - Modelo da estrutura e organização do genoma do vírus da hepatite C (HCV). Extraído de “Expert Reviews in Molecular Medicine” (2003) Cambridge University Press.

1.1.1.2 Genótipos do HCV

Uma das características mais importante do HCV é o seu alto grau de variabilidade genética. Variações do genoma do HCV levaram à sua classificação em seis genótipos principais e um grande número de subtipos. Os genótipos diferem um dos outros em 31% a 33% ao nível de nucleotídeos, comparado com 20% a 25% entre os subtipos (Simmonds *et al.*, 2005).

Deste modo, com base na análise filogenética de sequência de nucleotídeos, vários genótipos e subtipos do HCV foram identificados, sendo que o genoma completo do HCV foi determinado por Choo *et al* (1991), após obter vários isolados sequenciados do HCV de diferentes partes do mundo (Choo *et al.*, 1989).

Na segunda Conferência Internacional de HCV e Vírus Relacionados, realizada em 1994, foi proposto um sistema de nomenclatura usual com o propósito de ser utilizada em estudos futuros dos genótipos, subtipos e quasispecies do HCV. Segundo este sistema o HCV é classificado com base na semelhança da sequência nucleotídica em grandes grupos genéticos designados genótipos. Deste modo, os genótipos HCV são numerados (numerais arábicos) de acordo com a ordem de sua descoberta. Já as cepas mais relacionadas dentro de alguns tipos de HCV são designadas subtipos, que são atribuídas letras minúsculas em ordem alfabética (Simmonds *et al.*, 1994; Mohsen, 2001).

Os genótipos e subtipos apresentam uma distribuição geográfica e epidemiológica distinta (Simmonds, 1995), sendo que os genótipos 1, 2 e 3 são encontrados em todos os continentes e constituem a maioria dos isolados do HCV em muitos países (Shi & Lai, 2001). O genótipo 4 é mais frequente no Norte e Centro-Oeste da África, enquanto os genótipos 5 e 6 são mais frequentes na África do Sul e Ásia, respectivamente (Martins *et al.*, 2006). O genótipo 1b tem sido associado com as mais severas doenças do fígado em indivíduos infectados com HCV (Farci & Purcell, 2000).

Analisando 1.688 amostras de sangue de pacientes infectados pelo HCV, mostraram que no Brasil os genótipos 1 e 3 do HCV são os mais frequentes. A frequência geral foi 64,9% (1.095) para o genótipo 1, 4,6% (78) para o genótipo 2, 30,2% (510) para o genótipo 3, 0,2% (3) para o genótipo 4 e 0,1% para o genótipo 5. Esses dados também revelaram que a distribuição dos genótipos no Brasil é muito parecida com as distribuições dos genótipos de HCV em alguns países europeus, indicando que, possivelmente, os genótipos de HCV circulantes no Brasil foram introduzidos depois da chegada dos imigrantes europeus, quando as práticas de transfusões sanguíneas tornaram-se comuns (Campiotto *et al.*, 2005).

Em outro trabalho, analisando 250 soros positivos anti-HCV na região Centro-Oeste do Brasil, concluíram também que os genótipos 1 e 3 foram os mais prevalentes com frequências de 67,9% e 29%, respectivamente. Assim, no Brasil, os genótipos 1 e 3 foram os mais frequentes, o que coincide com os genótipos mais frequentes em nível mundial (Martins *et al.*, 2006).

1.1.1.3 Diagnóstico

Antes do HCV ser caracterizado em 1989, a identificação da hepatite, até então classificada como não-A e não-B, era realizada através da análise dos níveis de aminotransferases no sangue. Particularmente, a estimativa de ALT no soro foi considerada

como marcador para a referida infecção, sendo que níveis de ALT acima de 1,5 vezes do valor normal era considerado como possível indicação da infecção (Gretch, 1997).

Após o vírus ser caracterizado, um ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA de primeira geração) foi desenvolvido para detecção de anticorpos anti-HCV no soro. Este ensaio tinha como alvo somente um antígeno, o peptídeo c100-3 da região NS4 do genoma do HCV. Este ELISA foi disponível comercialmente e amplamente usado em todo o mundo. Desde então, três gerações de ELISA têm sido desenvolvidos, cada nova geração, proporcionando melhora adicional na sensibilidade e especificidade para anticorpos anti-HCV (Gretch, 1997).

Define-se como sensibilidade de um teste diagnóstico a capacidade de detectar a doença em indivíduos realmente doentes e a especificidade pela capacidade de identificar corretamente a ausência de doença (ANVISA, 2004).

No ELISA de segunda geração, além da fração c100-3, foram adicionadas as frações c33c (NS3) e c22-3 (*core*). Os resultados falsos positivos, assim como a detecção tardia de anticorpos recentemente produzidos ou pré-existentes nos ELISA de primeira e segunda geração, levaram os pesquisadores a aperfeiçoar o sistema de ensaio. Deste modo, surgiu o ELISA de terceira geração que foi desenvolvido para detectar anticorpos contra quatro proteínas recombinantes do genoma viral (*core*, NS3, NS4, NS5). As frações antigênicas (c100-3 e c33c) obtidas por recombinação genética e utilizadas nos testes de segunda geração foram substituídas por peptídeos sintéticos correspondentes aos epitopos imunodominantes dessas frações nos testes de terceira geração, melhorando, assim, tanto a sensibilidade quanto a especificidade (Saez-Alquezar *et al.*, 2001).

Recentemente, foi desenvolvido o ELISA de quarta geração que possui adsorvido na microplaca uma combinação de anticorpos monoclonais anti-*core* HCV e antígenos recombinantes e peptídeos representando as regiões imunodominantes NS3 e do *core*. Este ensaio visa reduzir a janela imunológica em relação às demais gerações (Abbott., 2006).

No entanto, embora os testes anti-HCV sejam altamente sensíveis e específicos para detectar a infecção crônica, resultados falso-positivos podem ocorrer, especialmente em populações de baixo risco como os doadores de sangue (Alter *et al.*, 2003; Dal *et al.*, 2003).

Um diagnóstico exato do HCV é necessário e aconselhável antes do início do tratamento. Deste modo, testes sorológicos suplementares são importantes para a confirmação dos resultados positivos obtidos no ELISA. O teste imunoblot recombinante (RIBA), que identifica anticorpos contra antígenos individuais do HCV e tem maior especificidade do que o ELISA, é utilizado para confirmar o diagnóstico do HCV (Lok & Gunaratnum, 1997).

Embora o diagnóstico da hepatite C atualmente seja baseado na detecção de anticorpos por ELISA ou RIBA, estas técnicas são menos sensíveis nas fases iniciais da infecção e não podem diferenciar entre infecção ativa e resolução da doença. Além disso, pacientes imunodeprimidos, como aqueles que estão infectados com HIV ou submetidos a hemodiálise, produzem menos anticorpos podendo assim não ser detectados com o uso destas técnicas. A detecção molecular direta do RNA HCV pela transcrição reversa (RT) e PCR qualitativo é considerada o padrão ouro para o diagnóstico da infecção pelo HCV, além de avaliar a resposta antiviral na terapia com interferon (INF) e ou ribavirina (Jacob *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1998).

Avaliação quantitativa dos níveis de RNA HCV através da amplificação do sinal e PCR quantitativo (Q-PCR), são ferramentas importantes na conduta clínica dos pacientes antes, durante e após a terapia. Os ensaios de PCR são capazes de determinar quantidades diminutas de RNA HCV no soro ou plasma e ajuda a resolver o problema com resultados fracamente positivo ou falsos negativo encontrados no ELISA quando os sinais clínicos e/ou fatores de risco são compatíveis com a infecção pelo HCV (Davis *et al.*, 1998; McHutchinson *et al.*, 1998).

1.1.1.4 Tratamento

Como dito anteriormente, o HCV é uma das mais importantes causas de doença hepática crônica levando à cirrose e carcinoma hepatocelular (HCC) (Williams, 2006). Estudos têm demonstrado que aumento da produção de interferon- α (IFN- α) está fortemente associada com a resolução espontânea da infecção pelo HCV em comparação com a pouca produção encontrada em pacientes com infecção persistente (Neumann-Haefelin *et al.*, 2008).

Caso seja detectada a tempo, a progressão para doença hepática grave pode ser prevenido em 54-63% dos pacientes através de um tratamento antiviral com α INF “peguilado” e ribavirina (Manns *et al.*, 2001; Brady *et al.*, 2007). A resposta às terapias baseadas com IFN em pacientes infectados com genótipo 4 e 1 do HCV são muito menores do que para os genótipos 2 e 3 (Franco *et al.*, 2007). Sendo assim, clinicamente a genotipagem do HCV é importante para predizer a resposta ao tratamento e para determinar a duração da terapia antiviral. Além disso, a genotipagem é também importante para a saúde pública, pois ela pode ser útil para investigar surtos e compreender a epidemiologia da infecção (Lu *et al.*, 2005; Cantaloube *et al.*, 2006).

Protease e os inibidores da polimerase do HCV foram avaliados recentemente, entretanto, o seu uso na prática clínica pode ser inadequado devido ao aumento da taxa de eventos adversos e relatos de interrupções durante os ensaios (Hézode *et al.*, 2006). Já o transplante de fígado é a única opção terapêutica para pacientes que se encontram no estágio final da doença hepática (Lauer & Walker 2001; Miro *et al.*, 2006).

Para muitas infecções virais, os anticorpos neutralizantes fornecem uma correlação de proteção mais clara, e a geração de tais anticorpos é a base da maioria das vacinas que obtiveram sucesso. No entanto, a relação entre a produção de anticorpos e controle da viremia na infecção pelo HCV é muito mais complexa devido à enorme variabilidade genética do HCV, superando a do HIV. Além disso, o local de maior variabilidade está dentro da glicoproteína do envelope E2 (região hipervariável 1) que é a região mais imunogênica. Como consequência, raramente é possível relacionar a atividade de uma resposta de neutralização do vírus presentes em um determinado paciente ou inóculo em estudo (Zinkernagel, 2001; Simmonds, 2004).

O desenvolvimento de uma vacina eficaz deve superar os obstáculos da heterogeneidade e mutabilidade do vírus. Além do mais, três abordagens para o desenvolvimento de vacinas devem ser adotadas como prevenir a infecção inicial, evitar a persistência viral em indivíduos infectados e levar a resposta virológica sustentada em indivíduos que têm a infecção crônica (ex. vacinas terapêuticas) (Houghton & Abrignani, 2005).

1.2 Proteínas Recombinantes

Durante os anos de 1980 o termo biofármacos tornou-se sinônimo de proteínas terapêuticas produzidas pela tecnologia de DNA recombinante, incluindo também os anticorpos monoclonais, obtidos pela tecnologia de hibridoma. Posteriormente, os medicamentos a base de ácidos nucleicos usados para a proposta de terapia gênica e tecnologia de antisense, foram adicionados ao grupo (Walsh, 2002). Entretanto, os produtos baseados em proteínas recombinantes podem ser considerados, atualmente, os principais representantes desse grupo. O desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, na década de 1970, marcou o início da era da biotecnologia moderna. Alguns anos depois, em 1982, a insulina humana, desenvolvida pela empresa Genentech (EUA) chegou ao mercado, marcando de vez a aplicação industrial dessa tecnologia (Buckel, 1996).

Desde então, centenas de centros de pesquisa e empresas no mundo inteiro têm se empenhado na pesquisa, no desenvolvimento e na produção dos biofármacos (Demain, 2004). Nos Estados Unidos, dos novos medicamentos aprovados entre os anos de 2003 a 2006, 24% eram biofármacos. O resultado desses trabalhos é que há mais de 165 produtos aprovados em todo o mundo, com um mercado estimado, em 2004, em torno de 33 bilhões de dólares e projetado para cerca de 70 bilhões de dólares para o ano de 2010 (Walsh, 2006).

Com a introdução da nova classe de drogas recombinantes no mercado, um novo conceito da definição de substância foi introduzido também. Enquanto clássicos compostos de baixo peso molecular foram definidos com base em suas características físicas e químicas, as “drogas recombinantes” foram classificadas com base não somente sobre essas características, mas também sobre o processo de sua produção tendo em vista que todos os medicamentos recombinantes são isolados a partir de uma matriz extremamente complexa (uma célula viva).

As proteínas têm muitas vantagens sobre os compostos químicos como agentes terapêuticos. Por sua natureza, as proteínas são específicas na sua função tendo assim menor potencial para o desenvolvimento de reações idiossincráticas, reduzindo os efeitos colaterais. Além disso, elas podem desempenhar um importante potencial na terapia para doenças genéticas (Russell & Clarke, 1999). Os medicamentos recombinantes têm demonstrado ser extremamente seguros (Dingermann, 2008).

Em relação a estratégia de produção de proteínas recombinantes na forma de epitopos fusionados ou multiepitopo, em *Escherichia coli* tem se tornado objeto de estudo, visto que, atualmente, já existem kits para o diagnóstico de doenças que utilizam tais proteínas, como exemplo, os pedidos de patentes WO2005014627 e CN101419236 que descrevem proteínas para o diagnóstico de dengue e leptospirose, respectivamente.

Já em bancos de dados de publicações científicas internacionais, tem-se o exemplo do trabalho de Dipti *et al.*, (2006) que também utilizaram a estratégia de produção de proteínas multiepitopo para o diagnóstico de hepatite C.

Além disso, um kit de detecção de HCV (Flavicheck HCV[®] teste rápido) baseado na tecnologia multiepitopo já se encontra no mercado (Qualpro Diagnósticos, 2004). Este ensaio apresenta 100% de sensibilidade e 99,61% de especificidade.

2. Justificativa

Os kits imunoenzimáticos para o diagnóstico da hepatite C utilizam antígenos sintéticos e recombinantes (kits de terceira geração) ou uma combinação de anticorpos monoclonais e antígenos recombinantes (kits de quarta geração). Tais estratégias tornam os kits com custos de fabricação elevados inviabilizando seu uso na rotina em muitos países em desenvolvimento. Nesse sentido, o presente trabalho fornece uma estratégia de produção de proteína multiepitopo, em *E. coli*, que foi desenhada a partir de proteínas das regiões estruturais e não-estruturais do vírus da hepatite C contendo os epitopos virais dos genótipos mais prevalentes no Brasil e no mundo. Desta forma, ela será utilizada no desenvolvimento de kits de diagnóstico anti-HCV mais viáveis economicamente, visto que, esta técnica substituirá os diversos antígenos presentes nos kits de terceira e quarta geração por uma única cadeia polipeptídica multiepitopo. Esta técnica busca alcançar qualidade superior tanto nos quesitos, sensibilidade e especificidade através da adição de novos epitopos na cadeia polipeptídica, além dos já presentes nos kits atuais.

Tal estratégia apresenta interesse para o Complexo Industrial da Saúde (GECIS/SUS/MS) e para a indústria farmacêutica e biotecnológica visando a fabricação de kits de diagnósticos com baixos custos para sua viabilidade industrial, aliado a praticidade utilitária, oferecendo ao público consumidor, uma opção de menor custo e com qualidade no mercado de kits de diagnósticos atuais.

Para tanto, este projeto foi firmado em parceria com a WAMA DIAGNÓSTICA (CNPJ 66.000.787/0001-08), empresa brasileira localizada no município de São Carlos SP, que fabrica e comercializa kits para diagnóstico. Sendo assim, tal empresa substituirá as proteínas anti-HCV utilizadas para a fabricação de seus kits, atualmente importada, pela proteína multiepitopo desenvolvida neste projeto.

A presente proteína será patenteada, com o propósito de resguardar o seu direito de uso, como insumo em kits de diagnóstico para hepatite C, produção de anticorpos monoclonais e possível utilização da mesma para fins de pesquisa e desenvolvimento de vacinas, fármacos e medicamentos.

3. Objetivos

3.1 Geral

Expressar e purificar uma proteína multiepitopo recombinante desenhada a partir de sequências do vírus da hepatite C para ser utilizada em kits de diagnóstico para hepatite C.

3.2 Específicos

- Desenhar um gene sintético contendo epítopos virais das regiões do *core*, NS3, NS4A/B, NS5A/B dos genótipos mais prevalentes no Brasil e no mundo;
- Sub-clonar o gene sintético no vetor de expressão de *E. coli*;
- Expressar o gene clonado em *E. coli*;
- Purificar a proteína expressa;
- Analisar a atividade imunogênica da proteína multiepitopo com amostras de soros reagentes e não reagentes para hepatite C e reagentes para outras patologias;

4. Materials

4.1 Linhagens de *E. coli* para a clonagem e expressão heteróloga das proteína recombinantes

- **DH5 α** - F⁻ ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44 thi*⁻¹ *gyrA96 relA1* λ ⁻.
- **BL21 (λ DE3)** - F⁻ *ompT hsdS_B* (r_B⁻m_B⁻) *gal dcm* (DE3).

4.2 Meios de cultura e soluções para o cultivo de *E. coli*

Todos os meios de cultura utilizados para cultivo de microrganismos foram preparados com água destilada e ajustado o pH para 7,2 com ácido clorídrico e ou hidróxido de sódio 1 M e esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 minutos a 1 atm.

Meio Luria-Bertani (LB)

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

Meio LB-Ágar

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico	1,5 % (p/v)
---	-------------

Meio Yeast Tryptone (4YT)

Bacto triptona	3,2 % (p/v)
Extrato de levedura	2,0 % (p/v)
NaCl	0,5 % (p/v)

Meio 4YT-Ágar

Meio 4YT adicionado de ágar bacteriológico	1,5 % (p/v)
--	-------------

Solução estoque de IPTG 1 M

IPTG	0,71 g
H ₂ O q.s.p	3 mL

Solução estoque de ampicilina 100 mg/mL

Ampicilina (USB)	1 g
H ₂ O q.s.p	10 mL

Dissolver 1 g de ampicilina em 7 mL de H₂O, em seguida completar para 10 mL com H₂O Milli Q e homogeneizar, esterilizar por filtração em membrana millipore 0,22 µm. Estocar a -20 °C.

4.3 Reagentes

Os reagentes (qualidade P.A.), kits e anticorpos utilizados foram adquiridos da Merck (S/A), Synth, Amersham Biosciences, Sigma Chemical Co. Os meios de cultivo foram adquiridos da Difco™ e Sigma Chemical Co.

4.4 Soluções e tampões de corrida para gel de eletroforese

Tampão tris-borato EDTA (TEB) 10X

Trizma base	0,89 M
Ácido bórico	0,89 M
EDTA	0,08 M
pH ajustado para 8,0	

Tampão de Amostra (5X) para análise de DNA por eletroforese

TEB 10X	25 % (v/v)
Glicerol	50 % (v/v)
Azul de bromofenol	0,25 % (p/v)

Solução estoque brometo de etídeo (EtBr)

EtBr	10 mg/mL
A solução foi dissolvida em água. Concentração final para o uso:	5 µg/mL

4.5 Soluções e tampões para gel de poliacrilamida desnaturante

Tampão de Amostra para proteínas (2X)

Tris-HCl 1 M (pH 6,8)	0,2 M
SDS	4 % (p/v)
β-mercaptoetanol	4 % (v/v)

Azul de bromofenol	0,1 % (v/v)
Glicerol	20 % (v/v)

A solução foi estocada a -20 °C em alíquotas de 1 mL.

Acrilamida:Bis-Acrilamida (29:1)

Acrilamida	29 % (p/v)
Bis-acrilamida	1 % (p/v)
H ₂ O destilada	q.s.p 100 mL

A solução foi filtrada em papel de filtro e estocada em frasco escuro a 4 °C.

Tris-HCl 3M pH 8,8

Tris	3 M
Água destilada	q.s.p 100 mL

Ajustar o pH com HCl para 8,8.

Tris-HCl 0,5 M pH 6,8

Tris	0,5 M
Água destilada	q.s.p 100 mL

Ajustar o pH com HCl para 6,8.

Persulfato de Amônio (APS) 10% (p/v)

APS	1 g
H ₂ O	q.s.p 10 mL

Tampão de Corrida Tris-glicina 5x (Estoque)

Tris	25 mM
Glicina	190 mM
SDS	0,1 % (p/v)
H ₂ O destilada	q.s.p 1000 mL

SDS-PAGE 12%

Acrilamida/Bisacrilamida(29:1)	12 %
Tris-HCl (pH 8,8)	375 mM

SDS	0,1 %
APS	0,05 %
TEMED	0,05 %

SDS-PAGE 4%

Acrilamida/Bisacrilamida (29:1)	4 %
Tris-HCl (pH 6,8)	125 mM
SDS	0,1 %
APS	0,05 %
TEMED	0,1 %

Solução Corante SDS-PAGE

Metanol	40 % (v/v)
Ácido acético glacial	10 % (v/v)
Comassie blue	0,25 % (p/v)

Solução Descorante SDS-PAGE

Metanol	40 % (v/v)
Ácido acético glacial	10 % (v/v)

4.6 Soluções para Western Blot

Solução de Transferência (pH 8,3)

Tris-HCl	48 mM
Glicina	39 mM
SDS	0,037 % (p/v)
Metanol	20 % (v/v)

Tampão PBS 10X (Estoque)

NaCl	137 mM
Na ₂ HPO ₄	7 mM
NaN ₃	0,02 % (p/v)

Tampão PBST 1X

Tampão PBS 1X	1 L
Tween 20	0,05 % (v/v)

Solução Bloqueadora

Tampão PBST 1X	100 mL
Leite em pó desnatado	5 % (p/v)

APB (tampão para fosfatase alcalina - pH 9,5)

Tris-HCl	0,1 M
NaCl	0,1 M
MgCl ₂	5 mM

Solução Reveladora

APB	10 mL
BCIP (fosfato de bromo cloroindolil)	66 µL
NBT (azul de nitro tetrazólio)	33 µL

A diluição deve ser feita nesta ordem para evitar a formação de precipitado insolúvel.

4.7 Tampões para purificação de proteínas

Tampão de Lise

Ureia	8 M
NaH ₂ PO ₄	0,05 M
NaCl	0,3 M
Imidazol.	0,01 M
Ajustar o pH para 8,0	

Tampão de Lavagem

Ureia	8 M
NaH ₂ PO ₄	0,05 M
NaCl	0,3 M

Imidazol	0,02 M
Ajustar o pH para 8,0	

Tampão de Eluição

NaH ₂ PO ₄	0,05 M
NaCl	0,3 M
Imidazol	0,01 M
Ajustar o pH para 8,0	

4.8 Marcadores de massa molecular

Marcador 1kb DNA *Ladder plus* (Fermentas Life Sciences).

Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas Life Sciences).

Unstained Protein Molecular Broad Weight Marker (BioRad).

PAGE RULER™ PLUS Prestained Protein Ladde (Fermentas Life Sciences).

4.9 Soluções e Tampões para o ELISA

Tampão de Adsorção carbonato-bicarbonato

NaHCO ₃	0,1 M
Na ₂ CO ₃	3,3 mM
Ajustar o pH para 9.6	

Tampão de Lavagem

Tampão PBST 1X (item 4.6.3)

Solução de Bloqueio

Tampão PBS 1X	100 mL
Leite em pó desnatado	5 %

Solução Diluente do Soro

Tampão PBST 1X	100 mL
Leite em pó desnatado	5 %

Conjugado anti-IgG Humano Diluído 1/25000

Anticorpo anti-IgG humano (Fc específico) conjugado com peroxidase (Sigma)	1 µL
Tampão PBST 1X + 5 % leite em pó desnatado	25 mL

Soluções Reveladoras da peroxidase kit Wiener Lab. Lote: 0902010640

Revelador A: peróxido de hidrogênio 60 mmol/l em tampão citrato 50 mmol/l pH 3,2.	50 µL
Revelador B: tetrametilbenzidina (TMB) 0,01 mol/l em ácido clorídrico 0,1 N.	50 µL

SIGMA FAST™ OPD Peroxidase Substrate Tablet Set

OPD (<i>o</i> -Phenylenediamine Dihydrochloride)	0,4 mg/mL
Urea Peróxido de Hidrogênio	0,4 mg/mL
Tampão Citrato-Fosfato	0,05M
H ₂ O destilada	20mL

Solução Stopper kit Wiener Lab. Lote: 0902010640

Ácido sulfúrico 2 N	50 µL
---------------------	-------

5. Métodos

As sequências dos epitopos foram obtidas a partir do *site* European Hepatitis C Virus Database - <http://euhcvdb.ibcp.fr/euHCVdb/> (figuras 3 e 4).

```

1  MSTHPKPKRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPERRGRPLCVRATR CORE
51  KT SER SQPRGRRQPI PKARR PEGRTWAQPGYPWPLYGNE GCGWAGWLLS P
101  RGRSPQWGPPTDFRRRSRNLGKVIDTLT CGFADLHGXI ELVGAFLGGAARA
151  LAHGVRLVLE DGVNYATGNL DCCSF SIE LLALLSCLTVBASAYQVRNS SGL
201  YHVTNDCFNSSIVYEADAILHTPGCVPCVREGNASRCWVAVTPVATRD
251  GRLEPTQLRRHLDLLVGSATLCSALYVGDLCGSVFLVGQLETFSPRRHNT
301  TQDCNCSTYDGHITGHRMAWDMMNWSPTAALVVAQLLRI PQAIMDMIAG
351  AHWGVLAGIAYFSMVGNWAKVLVLLLFAGVDAETHVTGGSSAGRTAGLV
401  GLLT PGAKQNIQLINTNGSWHINSTALNCNESLNTGWLAGLFYQHKFNSS
451  CCBERLASCRRLTDFACWGDPI SYANGSGLDERFYCWHY DFR DCGIVDAK
501  SVCCPWWYCFTPSPVWVGTDRSGA PTYSBEGANDTDVFTVNTNRPPIGNMF
551  GCTMNSTGFTKVCGAPPCVIGGVGNNTLLCPTDCFRKH PEATY SRCGSG
601  FWITPRCHVDYFYRLWHYECTINYTIE KVRMYVGGVEHRLEAACNWT RGE
651  RCDLEDRDRSELSPDLLSTQWQVLPDSTTL PALSTGLIHLHGNIVDVQ
701  YLYGVGSSIASNAIKWEYVVLLELLADARVCSCLMMMLLISQAEAALEN
751  LVILLNAASLAGTHGLVSLVFFCEAWYLKGRWVPGAVYAFYGNWPLLLLL
801  LALPQRAYALDTEVAASCGGVVLVGLMALTLSPYYKRYI SWCMWVLYQFL
851  TRVEAOLHVWVPLNVR CGRDAVILIMCVVHPTLVFDIT KLLLAIPEGELW
901  ILQASLLKVYFVRVQGLLRICALARKIAGGHYVQMAIKLGLALTGTYYVY
951  NHLEFLRDWAHNGLRDLAVAVEPVYFSRME TKLI TWGADTAACGDIINGL
1001  PVSARRQBI LLGPADGMVSKGNRLLA PI TAYAQQTRGLLGCIT TSLTGR
1051  DRNQVGEVQLVSTATQTE LATCLNGVCMYVYHGAGERT LAS PKGPIVQM
1101  YTNVDQDLVGNPAPQGRSLT PCTCGSBDLYLVTRHADVI FVRRRGRDSRG
1151  SLLSFRPISY LKGS SGGFLLCRAGHAVGLE FRAAVCFRGVAKAVDFIPVEN
1201  LETTMRSEVFDNNS EPPAVPQSEFQVAHLHAPTGSGKSTKVPAAYAAQGYK
1251  VLVLNPSVAATLGF GAYLSKAHGVDPNIRTGVRTITGSPITYSTYKFL NS3
1301 ADGCGSGGAYDII CDECHSTDAT SILGI GTVLDQAE TAGARLIVFLATAT
1351  PPGSVTVSHPNIEEVALSTGEIPFYGKAI PLEVIKGRHLFVCHSKKC
1401  DE LAAKLVALGLNAVAYYRGLDVS VLP TSGDVVVVSTDALMTGTFGDFDS
1451  VIDCNTCVTQTFDFSLDPTETIETTTL PQDAYBRT QRRGRGTGRGKPGIYR
1501  FVADGERPSGME DSVLCECYDAGCANYELT PAETVRLRAYMNT PGLFV
1551  CQDHLKFMGVTGLTHLDAHFLSQTRQSGENFPYLVAYQATVCAHAQAP
1601  PPSNDQMWKCLIRLKEPTLHGPT PLYR LGAVQNBVTLTH PITKYIMT CMS
1651  ADLEVVTSTWVLVCCVLAALAAAYCLSTCCVYVCRIVLS CKD ALIDPREV NS4A
1701 TYQRFDEMERCSQHLIPYTECGMIAEQFKKAIGT.LQTAASRQAEVIT PAV
1751  QTNQKLEVFNAKHMWFI SGIQYLAGLSTLPGNPAIASLMAFTAAVTS P
1801  LTTGQTLLENLILGGVVAQAALAPGAATAFVGAGLAGAAI GOVGLGHVLD
1851  ILAGYGAGVAGALVAEKIMSCEVSTEDLVNLLPAILSPGALVGVVCAA
1901  LLRKHVGGEGAVQMMNRL LAFASRGNHVSPTHYV PESDAAAKVTALSS NS4B
1951  LTVTQLLRLHQWISSECT PCSGSWLRDIWDWICEVLS DFKWLRKALM
2001  DQLPGIPFVS CQRYRGVNRGDCIMHT RCHCGAEITGHVKNGTMRIVGPR
2051  TCRNMWSGTF PINAYTTGCTPLPAENYK FALNRSABEYVE IRRVGD FH
2101  YVSGMTTDLNLCPCQIPSEFEFTELDGVRLHRFAPCKPPLLEEVSEFRV
2151  LHEYDVGSQDPCEDFDVAVLTSM LTPSHITABAAGRRLARGSPDSMAS
2201  SSSAQI.SAPRI.KATCTANHDSPDAET.IRANI.LWRQFMCGNTT.VRSENKV
2251  VILDSFDPLVABEDEREVSVPABILRKSRRFARALPVWARFDY NPLVET NS5
2301 WKKEDYEPPVVHGCPLFPPRSPVPPPRKRTVVLTESTLSTALABLAK
2351  SFGSSSTSCI TCDNTTSSR DADSGCD DSDVESYSSMPDLEGE DCDIDL
2401  SDGSWSTVS SGADTEDVCC SMSY SWT GALVT PCAAEEQKLPINALSNSL
2451  LRHHNLVYSTTSRSACQRQKVTFDRLQVLD SHYQDVLKEVKAASKVKA
2501  NLLSVVEACSLT EPHSAKSKFYGAKDVRCHARKAVAHINSVWKDLLED S
2551  VTPIDTTIMARNEVFCVOPEKGRKPARLIVFDLGVRCCKMALYDVVS
2601  KLPLAVMGS SYGFQYSPGQRVEFLVQAWKS KKT PMGF SYDTRCFDSTVTE
2651  SDIRTBEAIYQCDDLDPQARVAIKSLT ERLYVGGPLTNSRGENCYRRCR
2701  ASGVLTTSCGNTLTCYI KARAACRAAGLQDCTMLVCGDDLVVICESAGVQ
2751  EDAASLRAFT EAMTRYSAFPGDPPQPEYDLELITSCSSNVSAHDGAGK
2801  VYYLT RDEPT FLARAWE TARHTFVNSWLGNI IMF APTLWARMILMTHFF
2851  SVLIARDQLEQALNCEIYGACYSIE PLDLPEI IQRLHGLSAE SLHSYSPG
2901  EINRVAACLRLKLVPELRAWRHRARSVRARILLERGGRAAI CGKYLENMAY
2951  RTKLKLTPIAAGRLLDLSGWTAGYSGGDIYHSVSHARPRWFPC LLLLLA
3001  AGVGIYLLPNR

```

Figura 3 - Sequência primária da poliproteína HCV. Em vermelho, as regiões correspondentes aos epitopos usados para construir a proteína multiepitopo r-MEHCV.

Core

MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLG	(1a)AF009606
MSTNPKPQKKNKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLG	(1a)M62321
MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLG	(1a)M67463
MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLG	(1a) r-MEHCV
MST<u>L</u>PKPQRKTKRNT<u>I</u>RRPQDVKFPGGGQIVGGV<u>Y</u>LLPRRGPRLG	(3a) r-MEHCV

NS3

YMSKAHGVDPNIRTGVRTITTTGSPITYSTYKFLADGGCSGGAYDIII	(1a)AF009606
YMSKAHGIDPNIRTGVRTITTTGSPITYSTYKFLADGGCSGGAYDIII	(1a)M62321
YMSKAHGVDPNIRTGVRTITTTGSPITYSTYKFLADAGCSGGAYDIII	(1a)M67463
YMSKAHGVDPNIRTGVRTITTTGSPITYSTYKFLADGGCSGGAYDIII	(1a) r-MEHCV

NS4A

IIPDREVLVYQEFDEMEECSQHLPYIEQGMLLAEQFKQKALGL	(1a)AF009606
IIPDREVLVYREFDEMEECSQHLPYIEQGMLLAEQFKQKALGL	(1a)M62321
IIPDREVLVYQEFDEMEECSQHLPYIEQGMLLAEQFKQKALGL	(1a)M67463
IIPDREVLVYREFDEMEECASHLPYIEQGMQLAEQFKQKALGL	(1b)D90208
IIPDREVLVYREFDEMEECASHLPYIEQGMQLAEQFKQKALGL	(1b)M58335
IIPDREVLVYQEFDEMEECSQHLPYIEQGMLLAEQFKQKALGL	(1a) r-MEHCV
IIPDREVLV<u>Y</u>REFDEMEEC<u>A</u>SHLPYIEQGM<u>Q</u>LAEQFKQKALGL	(1b) r-MEHCV

NS4B

IAFASRGNHVSPHYV	(1a)AF009606
IAFASRGNHVSPHYV	(1a)M62321
IAFASRGNHVSPHYV	(1a)M67463
IAFASRGNHVSPHYV	(1a) r-MEHCV

NS5

PPLVETWKKPDYEPVVH	(1a)AF009606
PPLVETWKKPDYEPVVH	(1a)M62321
PLLLETWKKPDYEPVVH	(1a)M67463
PPLLESWKDPDYVPPVVH	(1b)D90208
PPLLESWKDPDYVPPVVH	(1b)M58335
PPLVETWKKPDYEPVVH	(1a) r-MEHCV
PPLLES<u>W</u>KD<u>P</u>DY<u>V</u>PPVVH	(1b) r-MEHCV

Figura 4 - Alinhamento das diversas regiões imunodominantes de isolados HCV sorotipos 1a/b e 3a. As sequências utilizadas para este alinhamento foram obtidas do GenBank sob os números de acesso AF009606, M62321 e M67463 e do site <http://euhcvdb.ibcp.fr/euHCVdb/>. Em vermelho, estão as sequências selecionadas para compor a proteína multiepitopo. As diferenças nas sequências dos genótipos e subtipos de cada região estão sublinhadas. r-MEHCV representa a sequência consenso para o desenho da proteína multiepitopo construída nesse trabalho.

Esses epitopos foram distribuídos *in tandem* separados por um pequeno *linker* flexível formado por resíduos de glicina e serina. Com propósito de purificar a proteína recombinante expressa na bactéria, foi adicionado um segmento de 6 resíduos do aminoácido histidina (*His-tag*) (ver figura 5).

core (1a)	core (3a)		
MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRL	GSGSG MSTLPKPQRK		
	NS4A (1b)		
TKRNTIRRPQDVKFPGGGQIVGGVYVLP RRG PRL	GSGSG IIPDREVL YREFDEMEECAS		
	NS3 (1a)		
HLPYIEQGMQLAEQFKQKALGL	GSGSG YMSKAHGVDPNIRTGVRTITTGSPITYSTY GK		
	NS4A (1a)		
FLADGGCSGGAYDII I	GSGSG IIPDREVL YQEFDEMEEC SQHLPYIEQGMMLAEQFKQK		
NS5 (1b)	NS4B (1a)	NS5 (1a)	
ALGL	GSGSG PPLLESWKDPDYVPPVH	GSGSG IAFASRGNHVSPTHYV	GSGSG PPLVET
WKKPDYEPVHLEHHHHHHH			

Figura 5 - Sequência primária da proteína multiepitopo r-MEHCV, com as diversas regiões imunodominantes (*core* 1a e 3a, NS3, NS4A/B e NS5) e a terminação *His-tag* (HHHHHH), tamanho aproximadamente 34 kDa. Os *linkers* flexíveis estão destacados em vermelho.

Com a finalidade de acelerar e otimizar o processo de expressão heteróloga das proteínas, os epitopos selecionados que representam as proteínas *core* (1a), *core* (3a), NS4A (1b), NS3 (1a), NS4A (1a), NS5 (1b), NS4B (1a) e NS5 (1a) do genoma do HCV, foram sintetizados quimicamente e clonado no vetor pET 21a pela empresa *Epoch Biolabs*. Além disso, o gene foi desenhado com *codon usage* para ser expresso em *E. coli* e com sítios de restrição (enzimas *NdeI* e *XhoI*) nas extremidades do gene para facilitar a clonagem (figura 6).

CATATGAGTACAAACCCAAAACCTCAGCGCAAACAAAACGTAATACAAATCGTCGTCCACAGGATGTAAAGTTTCCAGGAGGCGGGCAGATAGTCGGGGCGTATACCTGTTACCACGTCGCGGTCCCTCGTTTAGGTAGTGGGTGAGTATGAGCACCTTACCCAAACCTCAGCGCAAGACCAAGCGTAACACGATCCGCCGTCCGCAGGACGTAAAGTTTCCGGGGGTGGTCAGATCGTGGCGGGGTGTACGTGTTACCAGCCCGTGGCCCACGTTTAGGCTCTGGTCTGGAATCATTCGGACCGTGAAGTGTTATATCGCGAGTTTGACGAAATGGAGGAGTGCAGCAAGTCACCTGCCATACATCGAGCAGGGCATGCAGCTGGCCGAGCAGTTTAAGCAGAAGGCTCTGGGTCTGGGTAGTGGTAGCGGTTATATGAGTAAAGCCACGGGGTTCGATCCCAATATACGCACTGGAGTTCGTAATAACGACGGGTTACCAATCACCTATAGTACTTATGGCAAGTTTCTGGCCGACGGAGGCTGTAGCGGTGGCGCGTATGATATTATTATTGGATCTGGCTCAGGGATTATCCCGATCGCGAGGTGCTGTACCAAGAGTTCGATGAAATGGAAGAATGTTACACAACATCTGCCGTATATTGAACAAGGTATGATGCTGGCGGAACAATTCAAACAGAAAGCACTGGGCCTGGGATCTGGCTCTGGCCCTCCGCTGCTGGAATCATGGAAAGATCCGGATTACGTGCCTCCCGTTGTTTCATGGTTCAGGTTCTGGTATTGCTTTCGCAAGCCGCGGAATCATGTTAGCCGACCCACTATGTTGGAAGCGGAAGCGGACCGCCGCTGGTTCGA AACCTGGAAGAAACCGGATTATGAACCTCCTGTTGTCCAC**CTCGAG**CACCACCACCACCACCAC

Figura 6 - Sequência nucleotídica do gene r-MEHCV com tamanho 948 bp. As sequências em vermelho representam os sítios de restrições nas extremidades 5' (*NdeI*) e 3' (*XhoI*). As sequências em azul representam os genes que codificam os aminoácidos histina.

Existem diversas opções de vetores a serem utilizados para expressão induzida de proteínas recombinantes em *E. coli*. Sendo assim, para expressão dos genes em *E. coli*, neste trabalho, foi escolhido um vetor de expressão da série pET (*Plasmid for expression by T7 RNA Polimerase*), o plasmídeo pET21a, por ser um sistema altamente controlável de expressão da proteína alvo, cuja expressão está sob o controle do promotor de transcrição bacteriófago T7

que é reprimido pela região operadora *lac* onde se liga o repressor *lac*. Para utilização deste vetor é preciso transformá-lo em uma célula que possua o gene da T7 polimerase no cromossomo, como é o caso da *E. coli* BL21 (DE3), que possui esse gene sob controle do promotor *lacUV5*. Além desse gene, o genoma possui o gene *lacI*, que codifica para o repressor *lac*, o qual se liga ao promotor *lac*, impedindo assim, que a T7 RNA polimerase seja produzida em ausência de IPTG. O gene *lacI* também está presente no vetor pET. Sob condições de repressão (ausência do indutor IPTG), tanto o gene da T7 RNA polimerase quanto o gene alvo estão transcricionalmente bloqueados por causa da ligação do repressor *lacI* na região operadora. Após a adição do indutor IPTG, a repressão é eliminada. (ver figuras 7 e 8). O vetor obtido foi denominado pETMEHCV.

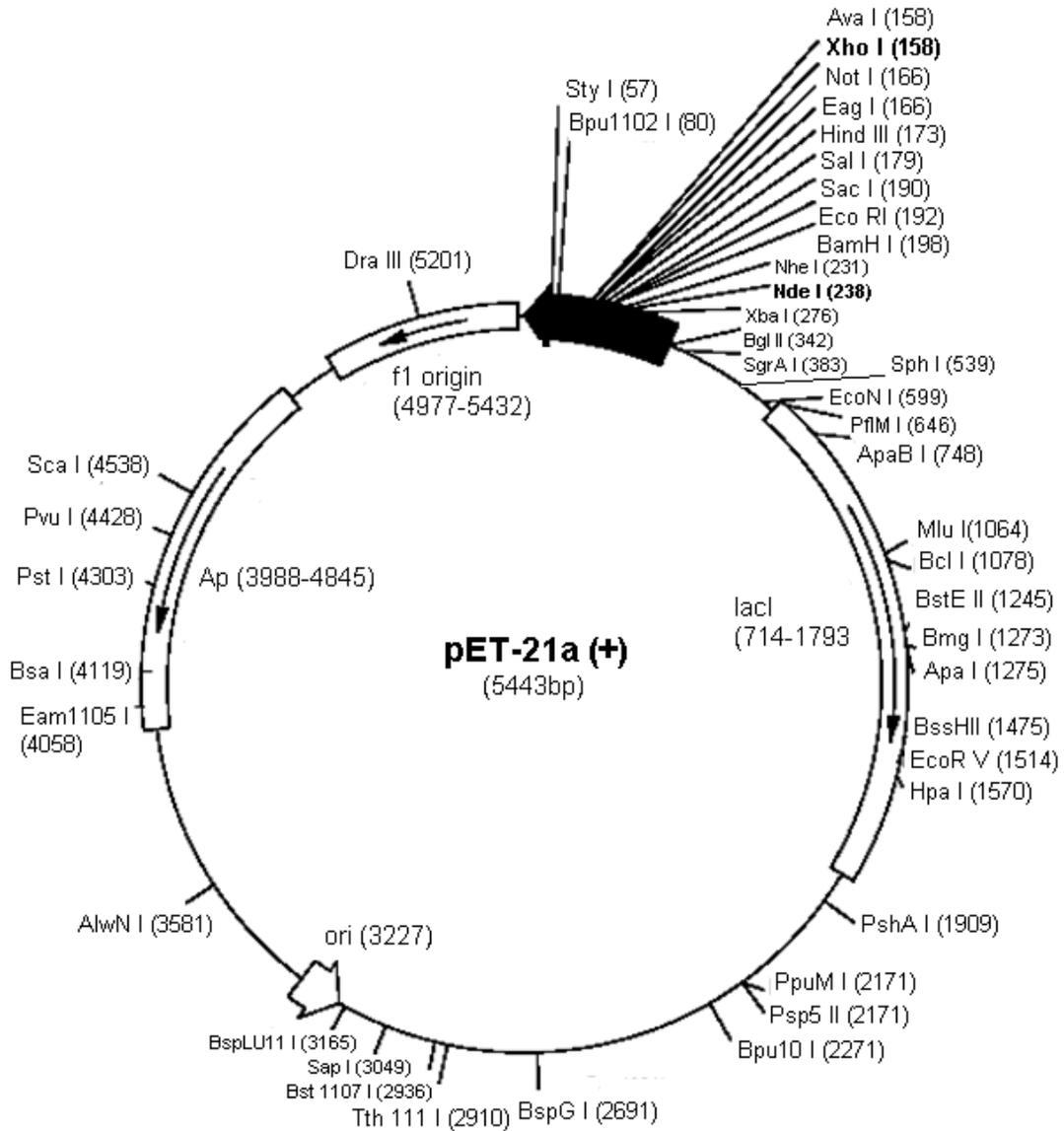
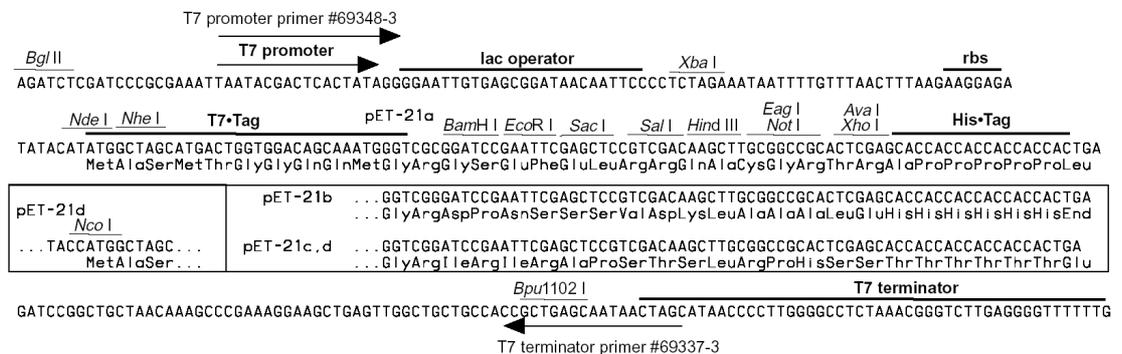


Figura 7 - Mapa físico do vetor pET-21a (extraído do catálogo de produtos da Novagen).



pET-21a-d(+) cloning/expression region

Figura 8 - Mapa da região do polylinker do vetor pET-21a. O gene sintético r-MEHCV foi clonado entre os sítios de *Nde*I e *Xho*I do vetor pET-21a, acrescido da sequência do *His-tag* no C-terminal (extraído do catálogo de produtos da Novagen).

5.3 Preparo de células termocompetentes *E. coli* DH5 α e BL21 (λ DE3) pelo método de (CaCl₂)

Inicialmente foram adicionados 20 μ L das células DH5 α ou BL21(λ DE3) em placa de Petri contendo meio LB ágar, em seguida com auxílio de bolinhas de vidro estéreis foram feitas estrias sobre o meio de cultura para o isolamento das colônias e posterior incubação a 37 °C por 16 horas. No outro dia, fez-se um pré-inóculo de uma colônia isolada em 5 mL de meio LB sob agitação de 250 rpm a 37 °C por 16 horas. Posteriormente, 2 mL deste pré-inóculo recém preparado foi adicionado em 30 mL de meio LB, seguido por agitação de 250 rpm a 37 °C até atingir a densidade óptica (OD_{600nm}) de 0.3.

Após atingir a OD desejada, a cultura de células foi transferida para um tubo 50 mL previamente resfriado e estéril, seguido de incubação no gelo por 15 minutos. Em seguida, a cultura de células foi centrifugada a 5000 x g por 10 minutos a 4 °C e o *pellet* obtido foi ressuscitado em 10 mL de CaCl₂ 100 mM seguido por incubação no gelo por 15 minutos. Centrifugou-se novamente a 5000 x g por 10 minutos a 4 °C e o *pellet* foi ressuscitado em 1 mL de CaCl₂ 100 mM com 15 % de glicerol. Em seguida, foram feitas alíquotas de 100 μ l da solução de células competentes resultantes e congeladas em nitrogênio líquido. Essas alíquotas foram armazenadas no freezer a -80 °C.

5.4 Transformação de *E. coli* DH5 α por choque térmico

Antes de iniciar a transformação, fez-se uma diluição 1:10 em H₂O Milli Q do plasmídeo pETMEHCV, obtendo uma concentração final de 1,0 ng/ μ L.

Na transformação foram adicionados 10 μ L dessa diluição em 100 μ L de células competentes DH5 α e incubado no gelo por 30 minutos. Posteriormente, foi aplicado o choque térmico a 42 °C por 90 segundos seguindo-se por mais uma incubação no gelo por 10 minutos e logo em seguida adicionado 1 mL de meio LB na solução (plasmídeo + célula competente) e incubado em “banho maria” a 37 °C por 1 hora, homogeneizando a cada 15 minutos. Em seguida, 50 e 20 μ L da solução foram plaqueadas em placas de Petri contendo 20 mL de meio LB ágar e 20 μ L de ampicilina utilizando bolinhas de vidro para fazer as estrias sobre o meio de cultura da placa. Centrifugou-se a solução restante a 5000 x g por 2 minutos e descartou-se 800 μ L do sobrenadante. Em seguida, o *pellet* obtido foi ressuscitado no restante do sobrenadante e 20 μ L do mesmo plaqueado em placa de Petri sob as mesmas condições descritas acima. Essas placas foram incubadas na estufa a 37 °C por 16 horas.

5.5 Extração de DNA plasmidial em pequena escala para análise de restrição

Após a transformação, as colônias isoladas foram inoculadas em alíquotas contendo cada 5 mL de meio LB e 5 µL de ampicilina (100 mg/mL), essas culturas foram crescidas sob agitação de 250 rpm a 37 °C por 16 horas. Para obtenção do plasmídeo intacto (pETMEHCV), foram feitas mini-preparações das culturas obtidas utilizando o kit “*Illustra plasmidPrep Mini Spin*” (GE Healthcare), conforme especificações do fabricante.

5.6 Digestão com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*

Para confirmação da liberação do inserto, o plasmídeo purificado foi digerido com enzimas de restrição da seguinte forma: 1 µg de DNA (25 µL do plasmídeo intacto pETMEHCV) foi digerido com 0,2 µL de *NdeI* e 2 µL de *XhoI* na presença de 4 µL de tampão NEB4, 0,4 µL de BSA e 6,6 µL de água Milli Q. O sistema foi incubado em banho maria a 37 °C por 2 horas. Posteriormente a análise desta digestão foi feita em gel de agarose 0,8 % com brometo de etídeo utilizando o marcador 1 kb DNA *Ladder plus* (Fermentas®).

5.7 Transformação de *E. coli* BL21 (λ DE3) por choque térmico

O plasmídeo obtido da mini-prep (item 5.5) foi transformado nas células competentes produzidas no (item 5.3) conforme protocolo de transformação por choque térmico descrito no item 5.4.

5.8 Indução da expressão do gene MEHCV em *E. coli*

Após a transformação, escolheu-se um clone isolado da placa de transformação, fez-se um pré-inóculo com o mesmo em 5 mL de meio 4YT mais 5 µL de ampicilina (100 µL/mL). A cultura foi crescida sob agitação de 250 rpm a 37 °C por 16 horas. Posteriormente, um inóculo foi feito adicionando 1,25 mL do pré- inóculo em 25 mL de meio 4YT mais 25 µL de ampicilina, seguindo-se incubação sob agitação de 250 rpm a 37 °C até atingir um crescimento celular com OD_{600nm} igual a 0,6. A partir daqui, iniciou-se a cinética de indução, foi retirado duas alíquota de 1 mL cada e centrifugadas a 5000 x g por dois minutos, o sobrenadante foi descartado e cada *pellet* obtido foi ressuspendido em 25 µL de tampão de amostra 2X SDS-PAGE, em seguida, juntou-se as duas alíquotas (tempo zero). No restante da

cultura foi adicionado 25 μ L de IPTG a 1 mM (agente indutor), seguido de incubação a 250 rpm a 37 °C.

Alíquotas da cultura foram coletadas de duas em duas horas (2 a 8 horas) e centrifugadas a 5000 x g por 2 minutos, cada *pellet* foi ressuspensionado com 50 μ L de tampão 2X SDS-PAGE para posterior análise em gel SDS-PAGE .

As alíquotas dos tempos 0, 2, 4, 6 e 8 horas foram analisadas no gel SDS-PAGE (Gel concentrador 5 % e separador 12 %). Após a corrida, o gel foi corado com *Coomassie Brilliant blue R-250* e descorado com metanol 40 % e ácido acético glacial 20 %.

O restante da cultura foi coletada por centrifugação a 5000 x g a 4 °C por 15 minutos e o *pellet* obtido foi armazenado no freezer a -80 °C para posterior purificação.

5.9 Purificação do r-MEHCV

O *pellet* contendo as células expressando r-MEHCV foi solubilizado com 1 mL de tampão de lise (item 4.7.1), seguido por incubação a 4 °C por 16 horas. Posteriormente, a amostra foi sonicada (5 pulsos de 10 segundos com intervalos de 1 minuto / Sonics Vibra Cell) e incubada no gelo por mais duas horas. As células lisadas foram centrifugadas a 5000 x g por 25 minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi transferido para um tubo Eppendorf de 1,5 mL contendo 500 μ L de resina *Ni Sepharose 6 Fast Flow* (Amersham Biosciences) pré-equilibrada com tampão de lise. O sistema foi incubado sob agitação no orbital por 1,5 horas a 4 °C. Em seguida, o sistema foi centrifugado a 5000 x g por 1 minuto e o sobrenadante denominado *flow-through* foi coletado para posterior análise no gel SDS-PAGE. Depois, a coluna foi lavada 4 vezes com tampão de lavagem (item 4.7.2), e eluída 3 vezes com tampão de eluição (item 4.7.2).

Após cada etapa de eluição, foram coletadas alíquotas do sobrenadante para posterior análise em gel SDS-PAGE.

As alíquotas obtidas anteriormente foram analisadas em dois géis SDS-PAGE (Gel concentrador 5 % e separador 12 %). Um dos géis foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R250*, e descorado com metanol 40 % e ácido acético glacial 20 %. O outro gel foi utilizado para imunodeteção da proteína (*Western blot*), por meio de uma membrana de nitrocelulose.

5.10 Western blot

Após a corrida do gel em cuba de eletroforese, o mesmo foi incubado na solução de transferência por 30 minutos. Posteriormente, a transferência para membrana de nitrocelulose

HybondTM - C Extra (Amersham Biosciences) foi realizada utilizando-se o transferidor *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (BIO-RAD) na amperagem de 15 mA por 15 minutos. Depois de realizada a transferência a membrana foi colocada na solução bloqueadora e incubada à temperatura ambiente por 2 horas sob leve agitação. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes com tampão PBST 1X homogeneizando cada lavagem por 5 minutos. Foi adicionado 50 mL do anticorpo diluído em PBS 1X (1:1000) *Monoclonal Anti-polyHistidine-Alkaline Phosphatase* (SIGMA-ALDRICH) e incubado à temperatura ambiente por 2 horas sob leve agitação. Novamente, a membrana foi lavada 3 vezes com tampão PBST 1X homogeneizando cada lavagem por 5 minutos, em seguida a membrana foi lavada uma vez com tampão APB. Posteriormente, foi adicionada a solução reveladora do kit *BCIP/NBT* (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. Após descartar a solução reveladora, lavou-se a membrana exaustivamente com água destilada e finalmente deixou-se a mesma secar à temperatura ambiente.

5.11 Ensaio imunoenzimático (ELISA) anti-HCV

Primeiramente, foi feita uma diluição da proteína r-MEHCV no tampão de adsorção. Em seguida, foi realizada a sensibilização da microplaca de poliestiro (Greener) através da adição de 100 µL/poço dessa diluição, de modo que a concentração final de proteína adsorvida foi de 20 ng/poço. A placa foi homogeneizada batendo gentilmente em suas laterais e posteriormente incubada a 4 °C na geladeira por 16 horas.

No outro dia, retirou-se a placa da geladeira e deixou-a por 10 minutos à temperatura ambiente. Depois, o material foi descartado e os poços foram lavados 3 vezes, utilizando-se um volume de 300 µL/poço de tampão de lavagem. Em seguida, foram adicionados 200 µL/poço da solução de bloqueio e incubado por uma hora a 37 °C. Descartou-se o material e os poços foram lavados 3 vezes, utilizando-se um volume de 300 µL/poço de tampão de lavagem. Subsequentemente, foram adicionadas 100 µL/ poço de amostras de soro humano (diluição 1/20 em tampão diluente do soro) e incubado por uma hora a 37 °C. Em seguida, o material foi descartado e os poços lavados 3 vezes, utilizando-se um volume de 300 µL/poço de tampão de lavagem. Posteriormente, foram adicionados 100 µL/poço do conjugado (1/25000) e incubado por uma hora a 37 °C. Descartou-se o material e os poços foram lavados 3 vezes, utilizando-se um volume de 300 µL/poço de tampão de lavagem. Em seguida, foram adicionados 50 µL do revelador A e 50 µL do revelador B do kit da Wiener Lab. e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, a reação foi parada

utilizando-se 50 µL/poço da solução *stopper* do kit da Wiener Lab. A absorbância foi lida no espectrofotômetro (*EnSpire™ 2300 Multilabel Reader* - PerkinElmer) no comprimento de onda 450 nm.

5.12 Dicroísmo Circular (CD)

Dicroísmo circular é uma técnica que permite investigar as alterações na estrutura secundária e terciária de proteínas. Pode ser aplicada a qualquer composto opticamente ativo que tenha um cromóforo que, no caso de proteínas e peptídeos, são as ligações amidas, as cadeias laterais de aminoácidos aromáticos e ligações dissulfeto. O princípio dessa técnica consiste na utilização da luz circularmente polarizada para direita e esquerda, na ausência de um campo magnético.

As medidas de dicroísmo circular da proteína r-MEHCV foram obtidas em um espectropolarímetro Jasco, modelo J-815, equipado com um controlador de temperatura *Peltier-Type Control System* PFD425S e um banho termostaticado. Os espectros foram coletados usando-se cubeta de quartzo de 2 mm de caminho óptico na região do UV-distante (195-260 nm). A concentração da proteína foi de 0,084 mg/mL e as medidas feitas nos tampões tris-HCl 5 mM, pH 7 e 8, a 25 °C. Os dados foram corrigidos pela contribuição do tampão e transformados em elipticidade molar por resíduos $[\theta]$, usando-se um peso médio do resíduo de 115 Da (Adler *et al.*, 1973).

O conteúdo de estrutura secundária da proteína foi estimado a partir dos espectros de dicroísmo circular na região do UV-distante, usando-se o programa CDNN (CD Spectra Deconvolution) (Bohm *et al.*, 1992). Esse programa compara o espectro observado com um conjunto de proteínas de estruturas conhecidas e ajusta o conteúdo de estrutura secundária até obter o melhor ajuste. Também utiliza cinco tipos de estruturas secundárias (α -hélice, folha- β antiparalela, folha- β paralela, voltas- β e estrutura irregular).

A termoestabilidade da proteína foi analisada a partir de espectros obtidos em temperaturas que variaram de 25 a 95 °C (adquiridos a cada 10 °C), na faixa de comprimento de onda de 195 a 260 nm. A curva de desnaturação térmica foi obtida no comprimento de onda fixo de 208 nm, variando a temperatura de 25 a 95 °C.

6. Resultados e Discussão

6.1 Análise de restrição

A partir do plasmídeo contendo o gene sintético foram realizados ensaio confirmatório da presença dos sítios de restrição e correta liberação do inserto inserido. Para tanto, após a seleção dos clones transformados com plasmídeo pETMEHCV em *E. coli* DH5 α , foi realizada extração dos plasmídeos, em pequena escala e, em seguida, estes foram digeridos com as endonucleases *Nde*I e *Xho*I para confirmação da clonagem do gene. Os sítios de restrição devem estar, exclusivamente, no início e fim da sequência desenhada liberando o inserto de maneira correta, sem que ocorra clivagem no meio da sequência (Figura 9).

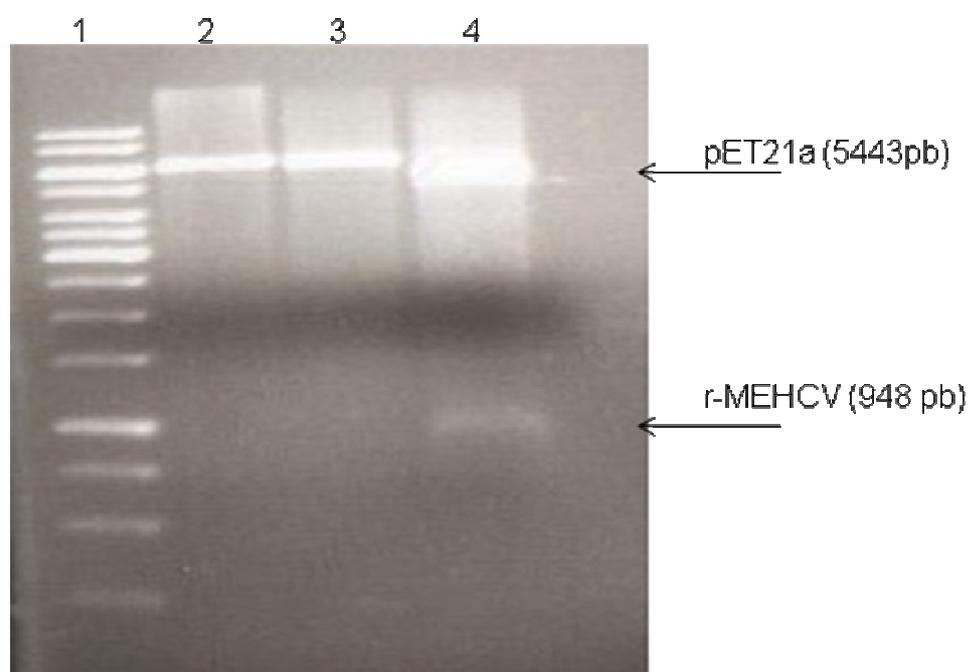


Figura 9. Análise de restrição do plasmídeo pETMEHCV para confirmação da clonagem do gene, em gel de agarose 1%. 1) Marcador 1kb DNA Ladder plus (Fermentas®) 2) Plasmídeo digerido com *Nde*I; 3) Plasmídeo digerido com *Xho*I; 4) Plasmídeo digerido com *Nde*I e *Xho*I.

Em gel de agarose 1 % foi possível observar duas bandas, uma correspondente ao vetor (5443 pares de bases) e outra correspondente ao inserto (948 pares de base), mostrando assim que o plasmídeo-inserto foi digerido nos sítios únicos para *Nde*I e *Xho*I.

6.2 Indução da expressão da proteína r-MEHCV em *E. coli* BL21 (λ DE3)

A expressão da proteína recombinante r-MEHCV foi realizada com a linhagem *E. coli* BL21 (λ DE3), utilizando-se o IPTG como agente indutor na concentração final de 1 mM. Uma alíquota foi coletada antes da adição de IPTG para a observação da ocorrência de alguma taxa de expressão basal (tempo zero). A taxa de expressão foi verificada nos seguintes tempos de indução (2h, 4h, 6h e 8h) através da análise em SDS-PAGE 12 %, aplicando-se no gel 10 e 20 μ L do marcador e das amostras respectivamente.

É perceptível que, no decorrer da indução, há um crescente aumento na quantidade da proteína expressa com o passar do tempo, atingindo uma concentração considerável após oito horas de indução. Sendo assim, foi identificada no gel uma banda de aproximadamente 37 kDa, correspondente a proteína recombinante (figura 10).

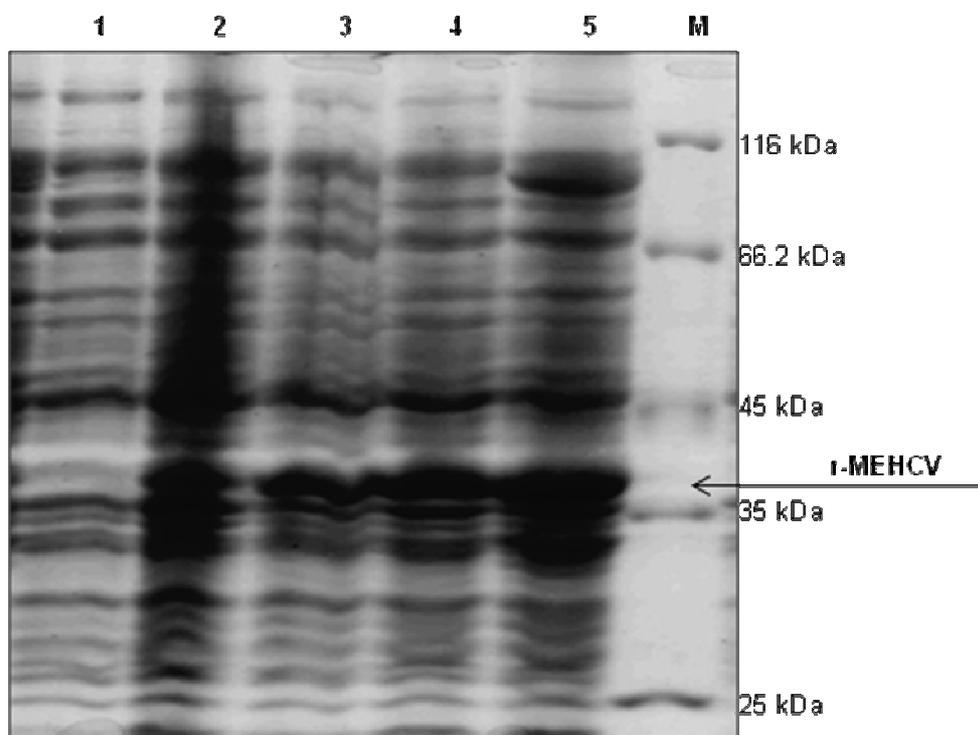


Figura 10 - Análise em gel SDS-PAGE 12% da cinética de indução da expressão da proteína r-MEHCV em *E. coli*. Amostras da cultura foram coletadas nos tempos: 0 h, 2 h, 4 h, 6 h e 8 h representadas respectivamente pelos números 1, 2, 3, 4 e 5. M marcador de massa molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas).

6.3 Purificação da proteína r-MEHCV

A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade utilizando resina acoplada ao níquel. A cromatografia de afinidade foi escolhida para purificação das proteínas de interesse devido as mesmas possuírem uma cauda de histidina advinda do vetor de expressão

pET21a utilizado. Esse método de purificação possui algumas vantagens, como a ligação específica e reversível da proteína alvo na coluna, além de alta seletividade e rendimento. Além disso, uma vantagem na adição dessa cauda é a fácil identificação da proteína por anticorpos anti-His em técnicas de imunoenensaio, como realizados neste trabalho. As amostras foram analisadas em gel desnaturante SDS-PAGE 12 %. Foram aplicados 10 μ L do marcador pré-corado e 20 μ L das amostras, sendo 16 μ L da amostra mais 4 μ L de tampão de amostra 5X (figura 11).

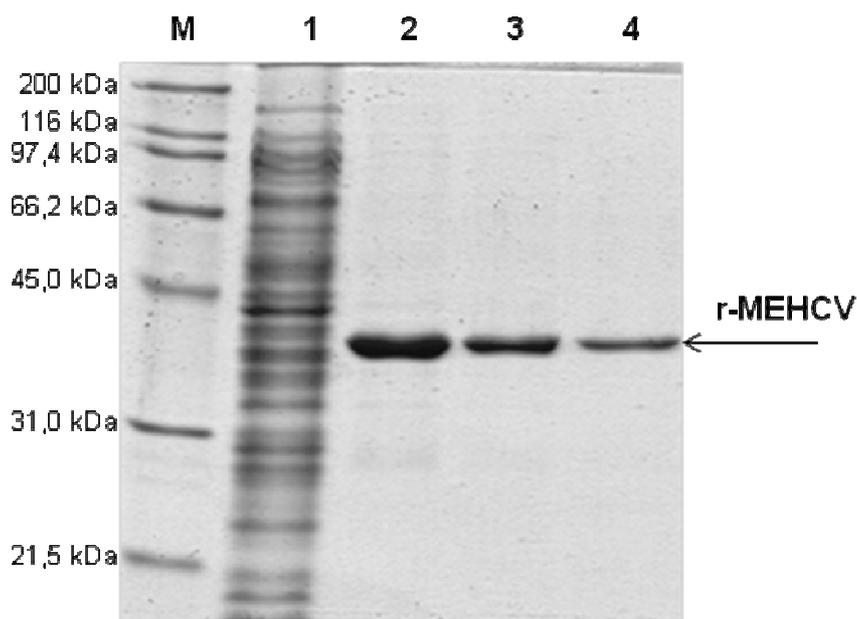


Figura 11 - Purificação da proteína r-MEHCV por cromatografia de afinidade Ni-NTA, analisada em gel SDS-PAGE 12%. M marcador de massa molecular *Unstained Protein Molecular Broad Weight Marker* (BioRad).; 1 *flow through*; 2, 3 e 4 representam a 1^a, 2^a e 3^a eluição respectivamente.

Nota-se que após quatro etapas de lavagem da coluna, foi possível obter a proteína r-MEHCV purificada nas três alíquotas de eluição (números 2, 3 e 4) praticamente livre de contaminação por outras proteínas de origem bacteriana.

Para confirmar a presença da proteína purificada foi feito a imunodeteção de proteína em membrana de nitrocelulose (*Western blot*) utilizando-se anticorpo monoclonal anti-poli-histidina conjugado com fosfatase alcalina diluído (1:1000) em tampão PBS 1X. Foram aplicados no gel destinado a fazer *Western blot* 5 μ L do marcador pré-corado e 20 μ L da amostra, sendo 16 μ L da mostra mais 5 μ L de tampão de amostra 5X (figura 12).

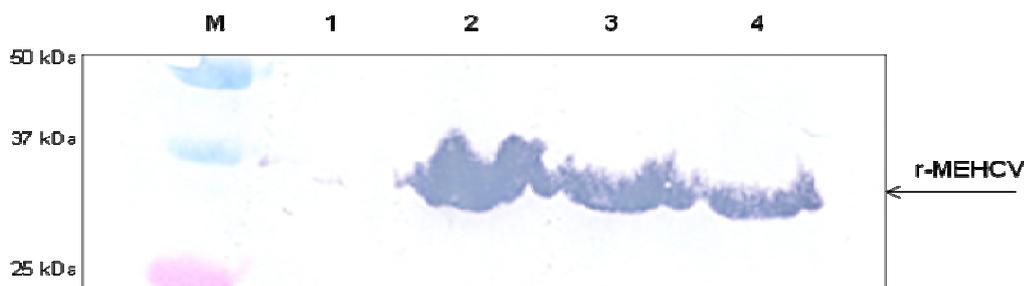


Figura 12 - Western blot da purificação da proteína r-MEHCV por cromatografia de afinidade Ni-NTA. Foi utilizado anticorpo anti-poli-histidina. M marcador de massa protéica pré-corado PAGE RULER™ (Fermentas); 1 *flow-through*; 2, 3 e 4 representam a 1ª, 2ª e 3ª eluição respectivamente.

Esta técnica permitiu a detecção da proteína r-MEHCV adsorvida em uma membrana de nitrocelulose (números 2, 3 e 4) pela reação com anticorpos específicos (anti-poli-histidina) que reconheceu o polipeptídeo que está sendo analisado.

6.4 – Análise prévia das amostras de soros humano anti-HCV a serem utilizadas no ensaio ELISA r-MEHCV.

As amostras de soros humanos fornecidas pela empresa WAMA DIAGNÓSTICA, utilizadas nos ensaios com ELISA r-MEHCV “caseiro” desenvolvido neste trabalho, foram previamente analisadas utilizando-se um kit disponível no mercado ELISA anti-HCV. Sendo assim, alíquotas desses soros foram encaminhadas para o laboratório de hepatites virais do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ) e analisadas com o kit ELISA (Hepanostika® HCV Ultra - M/S. BEIJING UNITED BIOMEDICAL CO. LTD., CHINA/Lote: BJ02598) que possui peptídeos sintéticos adsorvidos na microplaca de poliestireno que reconhecem anticorpos das regiões do *core*, NS3, NS4 e NS5 do vírus da hepatite C. O *cutoff* estabelecido neste kit foi com a OD igual a 0,404 nm (figura 13).

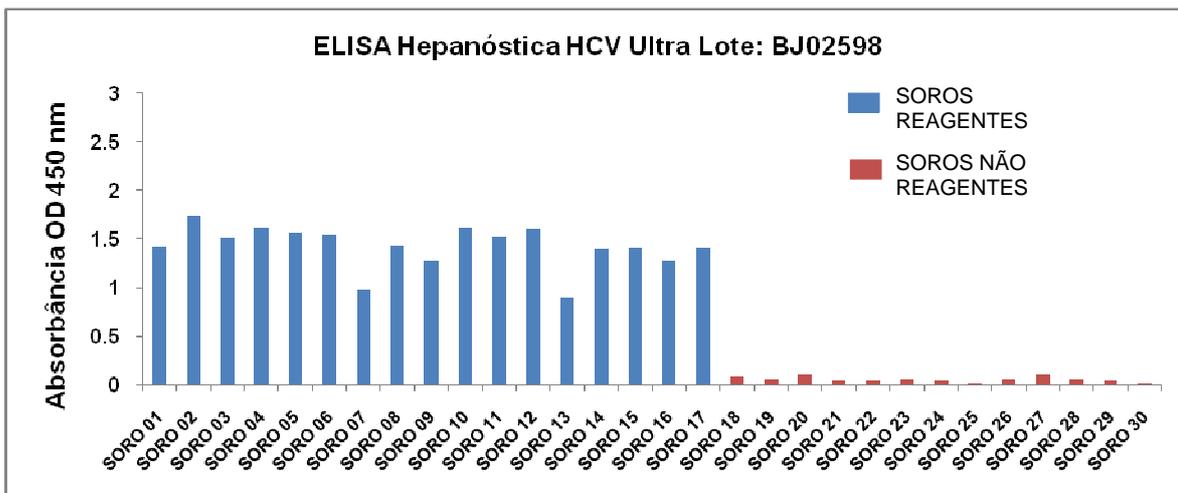


Figura 13 – Análise prévia das 30 amostras de soros humano que foram utilizadas no teste imunoenzimático com proteína r-MEHCV: O ensaio foi realizado com kit comercial Heparostika HCV Ultra. Os soros foram diluídos 1/10. As barras em azul representam os soros reagentes para HCV e as barras em vermelho os soros não reagentes para HCV. A absorbância foi lida no comprimento de onda 450 nm.

Das 30 amostras de soros analisadas, 17 (1 a 17) foram reagentes e 13 (18 a 30) não reagentes para HCV. Esses resultados tiveram 100 % de concordância com as informações repassadas pela empresa WAMA DIAGNÓSTICA, que especificou quais desses soros analisados eram reagentes e quais não eram reagentes para HCV. Entretanto, a empresa não repassou informações como qual o kit utilizado no ensaio e os resultados da absorbância obtida de cada soro. Deste modo, foi fundamental a análise desses soros utilizando um kit padronizado para ter acesso a essas informações que faltava e poder comparar os resultados obtidos com ELISA “caseiro” desenvolvido com a proteína multiepítipo r-MEHCV.

6.5 – ELISA r-MEHCV “caseiro”

Após a análise prévia das amostras de soros com um kit ELISA anti-HCV padronizado, estas mesmas amostras de soros foram analisadas em triplicatas contra a proteína r-MEHCV e os resultados foram obtidos através da média das absorbâncias de cada soro menos a média das absorbâncias do branco (0 ng de proteína adsorvida nos poços + soro anti-HCV reagente + anticorpo conjugado). Para realização deste ensaio a proteína r-MEHCV foi adsorvida na placa de poliestireno na concentração de 20 ng/poço. As amostras de soro humano foram diluídas 1/20 no tampão de diluição dos soros e a diluição do conjugado anti-IgG humano foi de 1:25000. A solução reveladora de peroxidase (A e B), assim como, a solução stopper foram adquirida de um kit comercial anti-HCV da empresa WIENER LABORATÓRIOS (ARGENTINA, Lote: 0902010640) e utilizadas conforme

instrução do fabricante. A leitura da placa foi realizada no espectrofotômetro (*EnSpire™ 2300 Multilabel Reader* - PerkinElmer) no comprimento de onda 450 nm (figura 14).

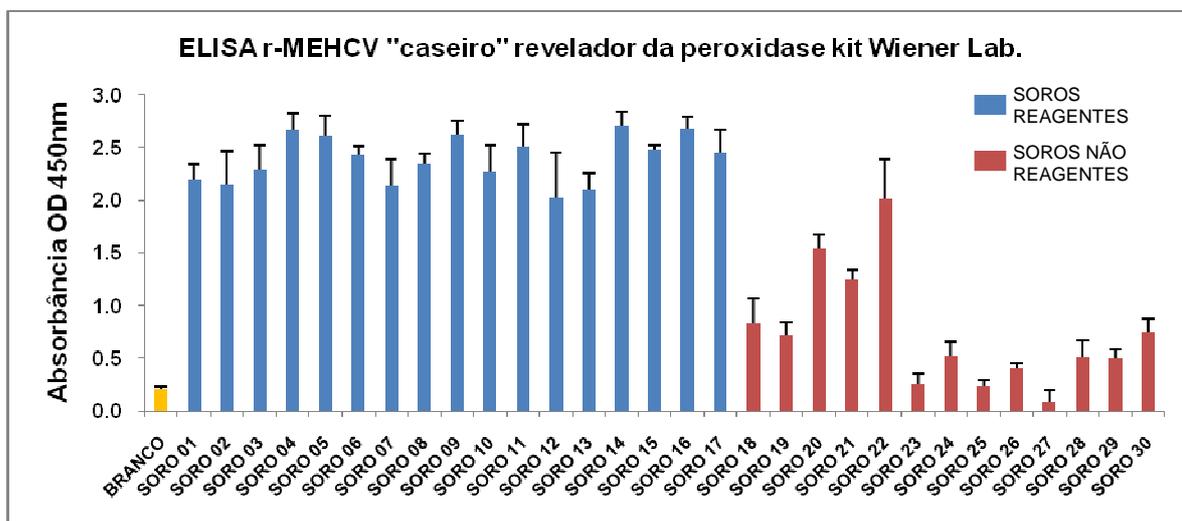


Figura 14 – ELISA r-MEHCV “caseiro” com amostras de soro humano reagente e não reagente para HCV utilizando o revelador da peroxidase do kit Wiener Lab. As barras representam a média das triplicatas de cada soro com seus respectivos desvio padrão. Foram adsorvidas 20ng/poço da proteína r-MEHCV na placa. Os soros foram diluídos 1/20 e o anticorpo α -IgG humano conjugado com peroxidase 1/25000. A barra de cor laranja representa o controle “branco” do ensaio (0 ng Proteína + soro reagente 1 + anticorpo conjugado). As barras em azul representam os soros reagentes para HCV e as barras em vermelho representam os soros não reagentes para HCV. A absorbância foi lida no comprimento de onda de 450 nm.

Comparando os resultados apresentados nas figuras 13 e 14, observa-se que as 17 amostras de soros reagentes para HCV analisadas no kit ELISA Heparostika HCV Ultra, foram também reagentes no ELISA r-MEHCV “caseiro”, pois, estes soros tiveram os valores das absorbâncias alto quando comparado com os valores das absorbâncias dos soros não reagentes no mesmo ensaio, sendo assim, o ensaio teve 100 % de concordância com Heparostika HCV Ultra, ou seja, não apresentaram resultados falsos negativo. Entretanto, estes soros reagentes tiveram os valores das absorbâncias no ELISA r-MEHCV maiores do que os valores obtidos com kit ELISA Heparostika HCV Ultra.

Em relação às amostras de soros não reagentes, os valores das absorbâncias obtidas no ELISA r-MEHCV também foram maiores do que os obtidos no kit ELISA Heparostika HCV Ultra, principalmente 3 soros (20, 21 e 22) que tiveram os valores de absorbâncias muito elevados. Resultados falsos positivo podem ocorrer com soros de mulheres grávidas e pacientes portadores de doenças auto-imunes que possuem auto anticorpos circulantes no soro. Diante disso, os soros 20, 21 e 22 podem ser oriundos de pacientes que se enquadram em alguma dessas condições e pelo fato deste ensaio tratar-se de um ELISA “caseiro”, ou seja, os reagentes que compõe este kit não estão adequadamente padronizados, a solução de bloqueio, por exemplo, pode ter sido ineficiente para estes soros. O uso dos reveladores da

peroxidase do kit da Wiener Lab. pode ter sido responsável pelos altos valores de absorvâncias obtidos neste ensaio, já que esses reveladores foram padronizados nas concentrações adequadas para serem utilizados com os outros reagentes do próprio kit.

Sendo assim, na tentativa de reduzir os altos valores de absorvância, um novo ELISA r-MEHCV “caseiro” foi feito utilizando os mesmos parâmetros do anterior, substituindo apenas os reveladores da peroxidase do kit da Wiener Lab. pelo revelador (*Sigma FASTTM OPD Peroxidase Substrate Tablet Set*), seguindo instruções de uso fornecidas pelo fabricante. Neste ensaio a absorvância foi lida no comprimento de onda de 450 nm (figura 15).

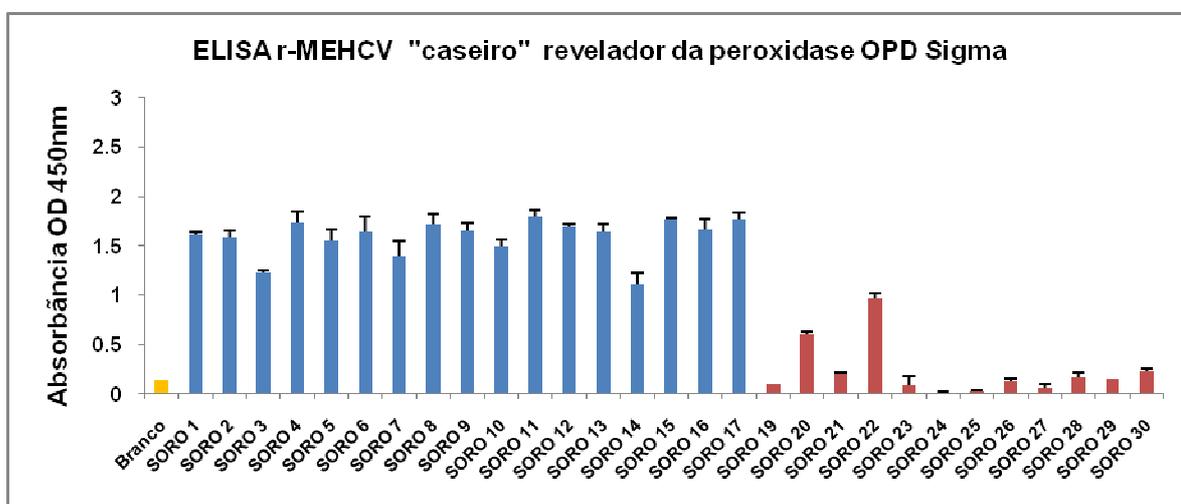


Figura 15 – ELISA r-MEHCV “caseiro” com amostras de soro humano reagente e não reagente para HCV utilizando o revelador da peroxidase OPD Sigma. As barras representam a média das triplicatas de cada soro com seus respectivos desvio padrão. Foram adsorvidas 20 ng/poço da proteína r-MEHCV na placa. Os soros foram diluídos 1/20 e o anticorpo α -IgG humano conjugado com peroxidase 1/25000. A barra de cor laranja representa o controle “branco” do ensaio (0 ng Proteína + soro reagente 1 + anticorpo conjugado). As barras em azul representam os soros reagentes para HCV e as barras em vermelho representam os soros não reagentes para HCV. A absorvância foi lida no comprimento de onda de 450 nm.

Comparando os resultados apresentados na figura 14 e 15, observa-se claramente que os valores das absorvâncias foram menores figura 15. Entretanto, os soros 20 e 22 continuam ainda com os valores das absorvâncias altos em relação aos demais soros sabidamente negativos, já o soro 21 foi possível observar uma leitura menor. Como dito anteriormente, trata-se de um ensaio “caseiro” no qual os reagentes não estão devidamente padronizados, está hipótese pode ser justificada pela melhora dos resultados obtidos com apenas a substituição do revelador de peroxidase. Uma solução de bloqueio adequada poderia talvez solucionar o problema encontrado com os soros 20 e 22, apesar de algumas soluções já terem sido testada sem sucesso (dados não mostrados).

A etapa de padronização requer condições adequadas e pessoal com experiência na área. Deste modo, toda etapa de padronização do kit será realizada pela empresa WAMA DIAGNÓSTICA que possui conhecimento na área.

Neste ensaio não foi possível testar o soro 18, pois o mesmo não tinha quantidade suficiente para ser analisada.

6.6 – ELISA r-MEHCV “caseiro” teste de reatividade cruzada.

Utilizando-se os mesmos parâmetros e sob as mesmas condições do ensaio anterior que utilizou o revelador da peroxidase OPD da Sigma, um novo ELISA r-MEHCV “caseiro” foi preparado com propósito de analisar se a proteína r-MEHCV interage com anticorpos presentes em amostras de soros humanos que são reagentes para outras patologias, ou seja, se ocorre “reação cruzada” com outros anticorpos não anti-HCV, gerando resultados falsos positivo.

Para tanto, foram analisadas 20 amostras de soros, sendo 3 reagentes para HCV, 3 não reagentes para HCV e 14 reagentes para outras patologias de acordo com o quadro 1.

Quadro 1- Soros humano reagentes para diversas patologias.

SOROS	PATOLOGIAS
*Branco	HCV (+)
1, 2 e 3	HCV (+)
4, 5 e 6	HCV (-)
7 e 8	HAV (vírus da hepatite A)
9, 10 e 11	HAV e HBsAg (antígenos de superfície do vírus da hepatite B)
12	HBsAg
13 e 14	RUB-IgG (Rubéola) e CMV-IgG (Citomegalovírus)
15	HBsAg
16	RUB-IgG, CMV-IgG e TOX-IgG (Toxoplasmose)
17	RUB-IgG e TOX-IgG
18	CMV-IgG
19	CMV-IgG e TOX-IgG
20	HBc

*Branco: 0 ng de proteína nos poços + soro reagente para HCV (4) + anticorpo conjugado.

Os soros foram analisados em triplicata e os resultados obtidos através da média das absorbâncias de cada soro menos a média das absorbâncias do branco (figura 16).

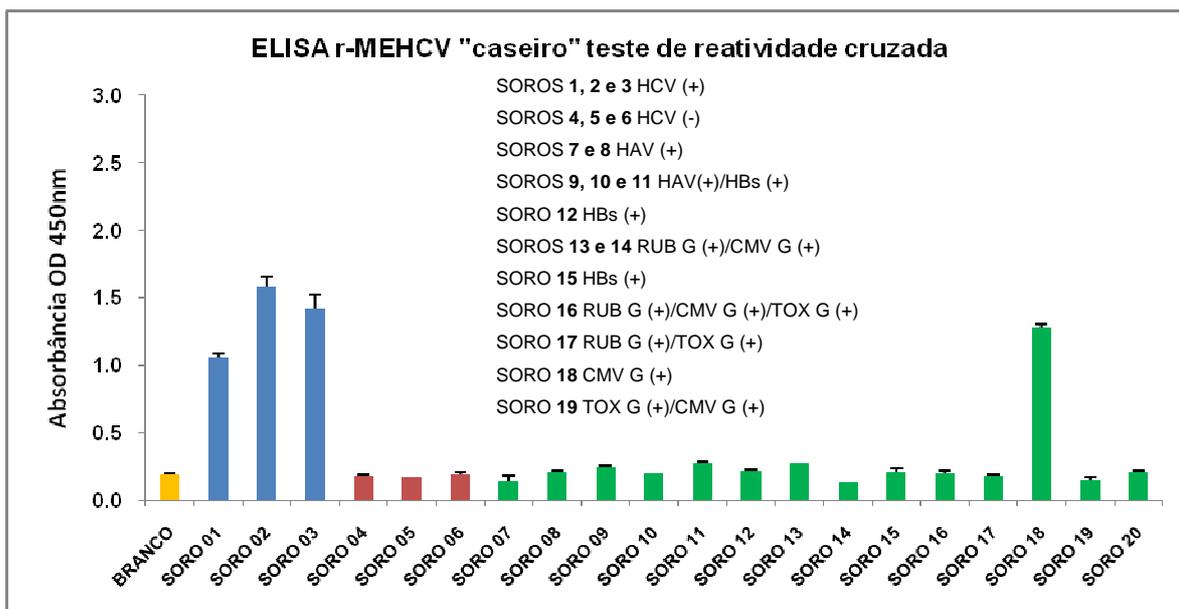


Figura 16 – ELISA r-MEHCV “caseiro” teste de reação cruzada com amostras de soros humanos reagentes para outras patologias: As barras representam a média das absorbâncias de cada soro em triplicata com seus respectivos desvios padrão. Foram adsorvidas 20 ng/poço na placa. Os soros foram diluídos 1/20 e o anticorpo α -IgG humano conjugado com peroxidase 1/25000. A barra de cor laranja representa o controle do ensaio “branco”, em azul, soros reagentes para HCV, em vermelho não reagente para HCV e em verde reagentes para outras patologias. A absorbância foi lida no comprimento de onda de 450 nm.

Diante dos resultados apresentados, observa-se que os anticorpos presentes na maioria dos soros de outras patologias não interagiram com a proteína r-MEHCV adsorvida na placa, pois, comparando os valores das absorbâncias obtidos nos soros anti-HCV reagentes (1, 2 e 3) com os valores das absorbâncias obtidos com os soros anti-HCV não reagente (4, 5 e 6) e os soros reagentes para outras patologias (7 a 20, com exceção do 18), observa-se que nestes os valores da absorbância foram menores. Entretanto, o soro 18 (CMV-IgG reagente) apresentou o valor da absorbância próximo ao dos soros anti-HCV reagentes (1, 2 e 3), porém, não se pode afirmar com apenas este ensaio que a proteína r-MEHCV reage com anticorpos anti-CMV IgG, tendo em vista, que esses anticorpos também estão presentes nos soros (13, 14, 16 e 19), que por sua vez, apresentaram os valores das absorbâncias próximos aos valores das absorbâncias obtidos com os soros anti-HCV não reagente, indicando neste caso que a proteína não reagiu com os anticorpos anti-CMV IgG .

Não obstante, isso reforça a hipótese levantada acima de que, por se tratar de um ELISA “caseiro”, a solução de bloqueio utilizada nos ensaios possa ser ineficiente para alguns soros e/ou também outros reagentes e parâmetros como, quantidade de lavagem da placa, tempo e temperatura de incubação de cada etapa, ainda não estão devidamente padronizados para este ensaio. Além do mais, estes soros não foram analisados em um kit comercial anti-HCV, portanto, o paciente (soro 18) pode ser HCV reagente.

6.8 – Dicroísmo Circular

Proteínas que apresentam sua estrutura secundária formada predominantemente por α -hélices exibem bandas dicroicas negativas em 208 e 222 nm e banda positiva entre 190 e 195 nm (figura 17).

A proteína r-MEHCV foi expressa a partir de um gene sintetizado constituído de nucleotídeos específicos que, supostamente, codificariam uma proteína de conformação aberta. Essa forma molecular foi devidamente planejada para ser expressa, visando a obtenção de uma molécula que apresentasse epitopos expostos ao solvente, o que facilitaria os teste de reconhecimento de anticorpos anti-HCV. No entanto, as análises de dicroísmo circular em pH 7 e 8 mostraram que essa proteína apresentou um padrão de dobramento compatível com estruturas secundária e terciária. O padrão de elipticidade dos espectros dicroicos é compatível com estruturas em α -hélices (banda em 208 e 222nm (figura 18) e folhas beta (218 e 190 nm).

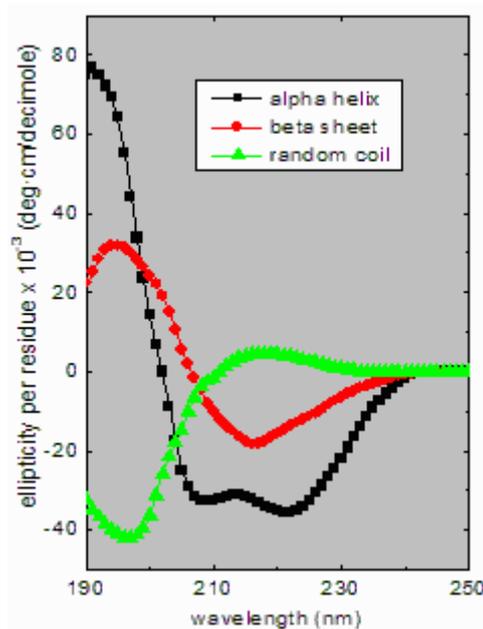


Figura 17 - Espectros dicroicos para proteínas com predominância de estruturas secundárias. Os espectros dicroicos ilustram estruturas secundárias: α -hélice (preto), folhas β (vermelho) e estruturas randômicas (verde) (http://www.ap-lab.com/circular_dichroism.htm).

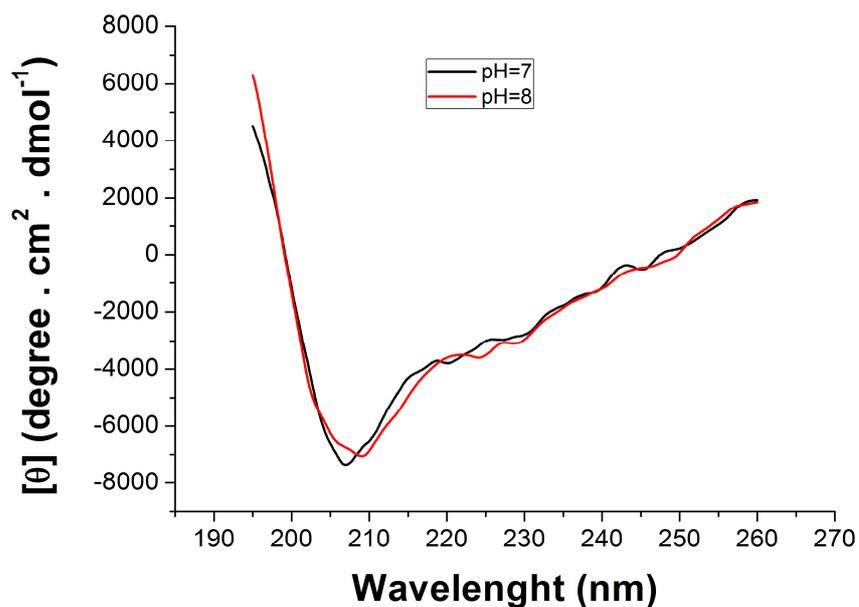


Figura 18 – Espectros de dicroísmo circular da proteína r-MEHCV em pH 7 e 8.

A estimativa do conteúdo e tipo de estrutura secundária da proteína foi baseada no espectro de dicroísmo circular na região do UV-distante, utilizando o programa CDNN. Para os cálculos, foi considerado o banco de dados de 33 proteínas com estrutura tridimensional conhecida, apresentando proteínas dos tipos: toda-alfa, toda beta, alfa/beta e alfa mais beta.

A porcentagem das estruturas secundárias da proteína r-MEHCV analisadas nos pH 7 e 8 em 25°C foram semelhantes, havendo uma predominância de folhas β na estrutura (quadro 2).

Quadro 2 – Predição da estrutura secundária da proteína r-MEHCV.

	195 – 260 nm	
	pH = 7	pH = 8
α -hélice	13,2%	12,7%
folhas- β antiparalelas	29,7%	29,9%
folhas- β paralelas	5,7%	5,6%
volta- β	20,1%	20,3%
estrutura desordenada	32%	32,5%
Soma total	100,7%	100,9%

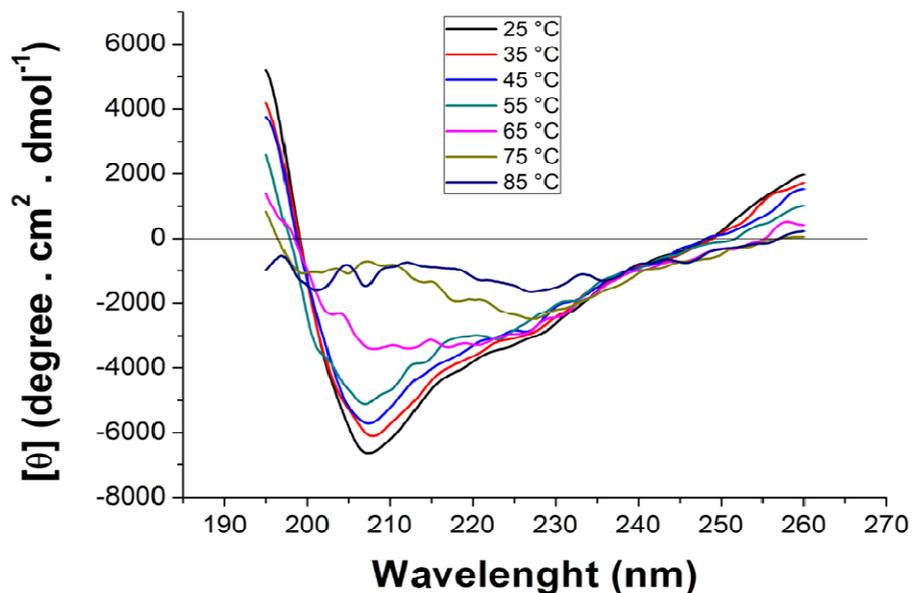


Figura 19 – Espectros de dicroísmo circular da proteína r-MEHCV em pH 7 sob ação de diferentes temperaturas. As bandas dicroicas sofreram alterações compatíveis com desnaturação térmica, indicada pelo desaparecimento do sinal dicroico.

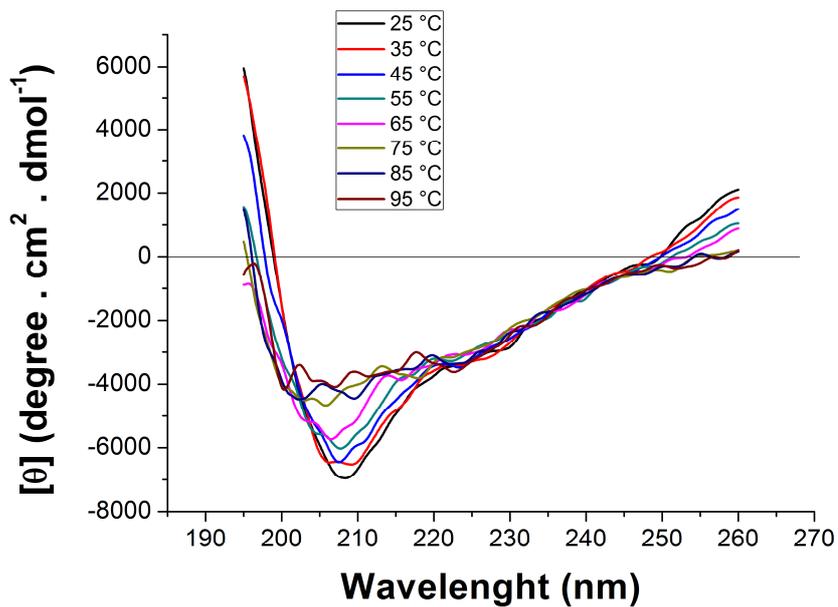


Figura 20 – Espectros de dicroísmo circular da proteína em pH 8 sob ação de diferentes temperaturas. As bandas dicroicas não sofreram grandes alterações compatíveis com desnaturação térmica, indicado pela perda gradual do sinal dicroico com o aumento da temperatura.

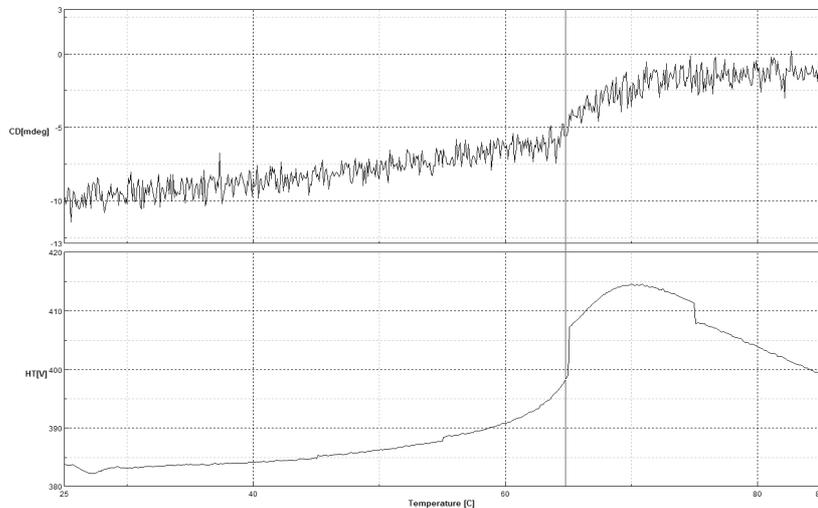


Figura 21 – Curva de desnaturação térmica da proteína r-MEHCV em tampão tris-HCl pH 7. A transição do estado nativo para desnaturado ocorre aproximadamente na temperatura de 65 °C e a desnaturação total ocorreu na temperatura 75°C, indicado pelo desaparecimento do sinal dicróico.

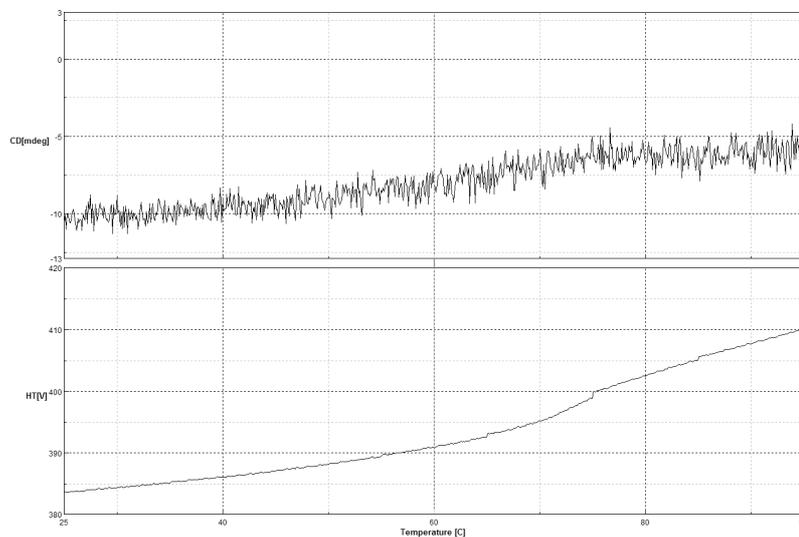


Figura 22 – Curva de desnaturação térmica da proteína r-MEHCV em tampão tris-HCl pH 8. Nestas condições a proteína teve maior estabilidade térmica indicado pela perda gradual do sinal dicróico sem perde-lo completamente.

Comparando os espectros dicróicos sob ação da temperatura (25 a 95°C) da r-MEHCV nos pH 7 (figura 19) e pH 8 (figura 20) observa-se claramente que essa proteína apresenta mudanças conformacionais e estabilidade térmica distintas sob ação dessas diferentes condições iônicas do meio. Em pH 7 a proteína perde em estabilidade estrutural apresentando

transição do estado nativo para o completamente desnaturado de 65°C a 75°C (figuras 19 e 21). Em contrapartida, em pH 8 a proteína apresentou maior estabilidade térmica, indicado pela diminuição gradual do sinal dicróico sem, no entanto, atingir valores próximos a zero (figura 20 e 22). Nessas condições, a proteína apresentou alterações conformacionais na faixa de temperatura entre 60°C e 65°C (figura 22), mas manteve-se parcialmente estruturada, mesmo na temperatura de 95°C.

As diferenças estruturais da r-MEHCV indicadas pela análise dos espectros dicróicos e das curvas de desnaturação térmica decorrem das diferenças do padrão de ionização das cadeias laterais de alguns aminoácidos (principalmente a histina). Nesse contexto, as distâncias e orientações de átomos que estão envolvidos com ligações não covalentes, responsáveis pela organização e estabilidade estrutural da proteína no microambiente modificado pela ação do pH, podem ter sido alteradas levando ao enfraquecimento ou ruptura dessas interações, o que comprometeu a estabilidade térmica da molécula.

7. Conclusões e Perspectivas

Este trabalho teve como objetivo a expressão e purificação de uma proteína multiepitopo recombinante desenhada a partir de sequências do vírus da hepatite C constituídos pelos epitopos na ordem: *core* (1a), *core* (3a), NS4A (1b), NS3 (1a), NS4A (1a), NS5 (1b), NS4B (1a) e NS5 (1a), para ser utilizada em kits de diagnóstico para hepatite C. Sendo assim, tal objetivo foi alcançado, tendo em vista, que após 8 horas de indução em *E. coli* obteve-se a proteína expressa (figura 10). E que através da cromatografia de afinidade utilizando resina acoplada ao níquel foi possível obter a proteína multiepitopo recombinante r-MEHCV purificada (figuras 11 e 12). Além do mais, foi possível demonstrar parcialmente através da elaboração de um ensaio, ELISA “caseiro” utilizando a proteína r-MEHCV, que a mesma reconhece anticorpos anti-HCV presente em soros humano, levando em consideração que, todos os soros sabidamente reagentes para HCV (figura 13), reagiram contra a proteína multiepitopo (figura 14) e que a maioria dos soros sabidamente não reagente para HCV (figura 13), com exceções de alguns, tiveram os valores das absorbâncias menores do que os valores das absorbâncias obtidos com os soros reagentes para HCV (figura 14). Adicionalmente, de acordo com os resultados apresentados na figura 16, foi possível demonstrar parcialmente que a proteína r-MEHCV não reagiu contra anticorpos presentes em soros humanos de pacientes infectados com outras patologias com exceção do soro 18.

Para obter um resultado completo desse estudo, primeiramente será preciso padronizar todos reagentes que compõe um kit de diagnóstico, tanto o ELISA quanto outras metodologias de kits de diagnósticos que se deseja desenvolver, validando esses kits com um número maior de soros reagentes para HCV e outras patologias e não reagente para HCV.

Apesar da proteína r-MEHCV ter sido expressa a partir de um gene sintetizado constituído de nucleotídeos específicos que, supostamente, codificariam uma proteína de conformação aberta, as análises de dicroísmo circular em pH 7 e 8 mostraram que essa proteína apresenta um padrão de dobramento compatível com estruturas secundária e terciária (figura 18). Entretanto, não é possível afirmar com apenas este ensaio se esta estruturação da proteína irá dificultar o de anticorpos anti-HCV.

Tendo em vista, que a proteína r-MEHCV desenvolvida neste projeto será utilizada em kits de diagnósticos, o processo de sua produção poderá ser otimizado pela empresa com o uso de fermentadores. Deste modo, uma quantidade maior de proteína poderá ser obtida visando atender a fabricação dos kits em escala comercial.

Além do mais, kits de diagnósticos anti-HCV utilizando a proteína r-MEHCV, como por exemplo, ELISA e os testes imunocromatográficos (testes rápidos) se encontram em fase de desenvolvimento na empresa WAMA DIAGNÓSTICA.

9. Referências Bibliográficas

- Adler, A.J.; Greenfield, N.J.; Fasman, G.D. (1973). Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides. *Methods Enzymol.* **27**: 675-735.
- Alberti, A., Noventa, F., Benvegna, L., Boccato, S., Gatta, A. (2002). Prevalence of liver disease in a population of asymptomatic persons with hepatitis C virus infection [summary for patients in *Ann. Intern. Med.* Dec. 17; **137(12)**: I36; PMID: 12484740].
- Alter, H. (1999). Discovery of non-A, non-B hepatitis and a identification of its etiology. *Am. J. Med.* **107**: 16-20.
- Alter, M.J., Coleman, P.J., Alexander, W.J., Kramer, E., Miller, J.K., Mandel, E., Hadler, S.C., Margolis, H.S. (1989). Importance of Heterosexual Activity in the transmission of hepatitis B and non-A, non-B hepatitis. *JAMA* **262**: 1201-1205.
- Alter, M.J., Kuhnert, W.L., Finelli, L. (2003). Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. *M.M.W.R. Recomm. Rep.* **52**: 1-13, 15.
- Amorim, R.M.S., Oliveira, C.P., Wyant, P.S., Cerqueira, D.M., Camara, G.N.L., Flores, L.S., *et al.* (2004). Hepatitis C virus genotypes in blood donors from the Federal District, Central Brazil. *Mem. I. Oswaldo Cruz* **99(8)**: 895-897.
- Bader TF. Diagnosis and transmission of hepatitis C *In*: Bader TF (ed) *Viral hepatitis: practical evaluation and treatment*. Hogrefe & Huber Publishers, Seattle, p. 135-158, 1995.
- Baril, M., Brakier-Gingras, L. (2005). Translation of the F protein of hepatitis C virus is initiated at a non-AUG codon in a +1 reading frame relative to the polyprotein. *Nucleic. Acids Res.* **33**: 1474–1486.
- Bartenschlager, R., Lohmann, V., Wilkinson, T., Koch, J.O. (1995). Complex formation between the NS3 serine-type protease of the hepatitis C virus and NS4A and its importance for polyprotein maturation. *J. Virol.* **69**: 7519–7528.
- Bartosch, B., Dubuisson, J., Cosset, F.L. (2003). Infectious hepatitis C pseudo-particles containing functional E1E2 envelope protein complexes. *J. Exp. Med.* **197**: 633–642.
- Bohm, G; Murh, R; Jaenicke, R. (1992). Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Engineering.* **5**: 191-195
- Bowden S. (2001). New hepatitis viruses: Contenders and pretenders. *J. Gastroen. Hepatol.* **(16)**: 124-131.
- Brady, B., Siebert, U., Sroczynski, G., Murphy, G., Husereau, D.R., Sherman, M., Wong, W., Mensinkai, S. (2007). Pegylated Interferon combined with Ribavirin for chronic hepatitis C virus infection: an economic evaluation [Technology report n° 82]. Ottawa, Canada: Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health (CADTH) 1-55.
- Brown, E.A., Zhang, H., Ping, L.H., Lemon, S.M. (1992). Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic. Acids Res.* **20**: 5041–5045.

- Buckel, P. (1996). Recombinant proteins for therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* **17** (12): 450-456
- Buti, M., San Miguel, R., Brosa, M., Cabases, J.M., Medina, M., Angel Casado, M., Fosbrook, L., Esteban, R. (2005). Estimating the impact of hepatitis C virus therapy on future liver-related morbidity, mortality and costs related to chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* **42** (5): 639-645.
- Campiotto, S., Pinho, J.R.R., Carrilho, F.J., Da Silva, L.C., Souto, F.J.D., Spinelli, V., *et al.* (2005). Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **38**(1): 41-49.
- Cantaloube, J.F., Laperche, S., Gallian, P., Bouchardeau, F., De Lamballerie, X., *et al.* (2006). Analysis of the 5' noncoding region versus the NS5b region in genotyping hepatitis C virus isolates from blood donors in France. *J. Clin. Microbiol.* **44**(6): 2051–2056.
- Carrere-Kremer, S., Montpellier-Pala, C., Cocquerel, L., Wychowski, C., Penin, F., Dubuisson, J. (2002). Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J. Virol.* **76**: 3720–3730.
- Chambers, T.J., Hahn, C.S., Galler, R., Rice, C.M. (1990). Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**: 649-688.
- Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., *et al.* (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**: 359-362.
- Crabbé, P. (1974). *Actividad optica, dispersion rotatória optica y dicroismo circular em quimica organica*. 1. ed. Washington, O. E. A., p. 13
- Dal Molin, G., Tiribelli, C., Campello, C. (2003). A rational use of laboratory tests in the diagnosis and management of hepatitis C virus infection. *Ann. Hepatol.* **2**: 76-83.
- Davis, G.L., Esteban-Mur, R., Rustgi, V., *et al.* (1998). Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. *New Engl. J. Med.* **339**: 1493 -1499.
- Deka N, Sharma MD, Mukerjee R. (1994). Isolation of the novel agent from human stool samples that is associated with sporadic non-A, non-B hepatitis. *J. Virol.* **68**: 7810-5.
- Demain A.L. (2004). *The Biopharmaceutical Revolution*.
http://pharmalicensing.com/public/articles/view/1130421281_4360dc215fedf - acesso 01/03/2011.
- Dingermann, T. (2008). Recombinant therapeutic proteins: Production platforms and challenges. *J. Biotechnol.* **3**: 90–97.
- Dipti, C.A., Jain, S.K., Navin, K. (2006). A novel recombinant multiepitope protein as a hepatitis C diagnostic intermediate of high sensitivity and specificity. *Protein Expres. Purif.* **47**(1): 319-328.

- Drummer, H.E., Maerz, A., Pountourios, P. (2003). Cell surface expression of functional hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. *F.E.B.S Lett.* **546**: 385–390.
- Dumoulin, F. L., Von dem Bussche, A., Li, L., Khamzina, J. R., Wands, T., Sauerbruch, Spengler, U. (2003). Hepatitis C virus NS2 protein inhibits gene expression from different cellular and viral promoters in hepatic and nonhepatic cell lines. *Virology* **305**: 260-266.
- Elazar, M., Liu, P., Rice, C.M., Glenn, J.S. (2004). An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication. *J. Virol.* **78 (20)**: 11393-11400.
- Esteban, J.I., Sauleda, S., Quer, J. (2008). The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J. Hepatol.* **48 (1)**: 148-162.
- European Association on the Studies on the Liver (EASL). (1999). EASL International Consensus Conference on hepatitis C. Paris, 26–27 February 1999. *J. Hepatol.* **31 (Suppl 1)**: 3-8.
- Farci, P. & Purcell, R.H. (2000). Clinical significance of the hepatitis C genotypes and quasiespecies. *Seminars in Liver Disease.* **20**: 103-126.)
- Franco, S., Tural, C., Clotet, B., Martínez, M.A. (2007). Complete nucleotide sequence of genotype 4 hepatitis C viruses isolated from patients co-infected with human immunodeficiency virus type 1. *Virus. Res.* **123(2)**: 161–169.
- Gale, M.J.Jr., Korth, M.J., Katze, M.G. (1998). Repression of the PKR protein kinase by the hepatitis C virus NS5A protein: a potential mechanism of interferon resistance. *Clin. Diagn. Virol.* **10**: 157–162.
- Giannini, C., Brechot, C. (2003). Hepatitis C virus biology. *Cell Death Differ.* **10(Suppl. 1)**: S27–S38.
- Gonzalez, M.E., Carrasco, L. (2003). Viroporins. *F.E.B.S Lett.* **552**: 28–34.
- Gretch, D.R. (1997). Diagnostic tests for hepatitis C. *Hepatology.* **26(Suppl 1)**: 43S – 47S.
- Gretton, S.N., Taylor, A.I., McLauchlan, J. (2005). Mobility of the hepatitis C virus NS4B protein on the endoplasmic reticulum membrane and membrane-associated foci. *J. Gen. Virol.* **86**: 1415–1421.

- Hézode, C., Forestier, N., Dusheiko, G., Ferenci, P., Pol, S., Goeser, T., Bronowicki, J.P., Bourlière, M., Gharakhanian, S., Bengtsson, L., McNair, L., George, S., Kieffer, T., Kwong, A., Kauffman, R.S., Alam, J., Pawlotsky, J.M., Zeuzem, S. (2009). Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *New Engl. J. Med.* **360(18)**:1839-1850.
- Honda, M., Ping, L.H., Rijnbrand, R.C., Amphlett, E., Clarke, B., Rowlands, D., Lemon, S.M. (1996). Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. *Virology.* **222**: 31–42.
- Houghton, M., Abrignani, S. (2005). Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus. *Nature.* **436**: 961–966.
- http://www.nearmedic.ru/upload/files/7_Murex_HCV_Ag_Ab_Combination.pdf
- http://www.tulipgroup.com/Qualpro_New/html/pack_inserts/Flavichek%20HCV%20WB.pdf
- acesso: 01/03/2011.
- Jacob, S., Baudy, D., Jones, E., *et al.* (1997). Comparison of quantitative HCV RNA assays in chronic hepatitis C. *Am. J. Clin. Pathol.* **107**: 362 – 367.
- Kadoya, H., Nagano-Fujii, M., Deng, L., Nakazono, N., Hotta, H. (2005). Nonstructural proteins 4A and 4B of hepatitis C virus transactivate the interleukin 8 promoter. *Microbiol. Immunol.* **49**: 265–273.
- Kim, J.L., Morgenstern, K.A., Lin, C., Fox, T., Dwyer, M.D., Landro, J.A., Chambers, S.P., Markland, W., Lepre, C.A., O'Malley, E.T., *et al.* (1996). Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell.* **87**: 343–355.
- Kurbanov, F., Tanaka, Y., Sugauchi, F., Kato, H., Ruzibakiev, R., Zalyalieva, M., *et al.* (2003). Hepatitis C virus molecular epidemiology in Uzbekistan. *J. Med. Virol.* **69(3)**: 367–375.
- Lauer, G.M., Walker, B.D. (2001). *Medical Progress: Hepatitis C virus infection.* *New Engl. J. Med.* **345(1)**: 41-52.
- Liu, Q., Bhat, R. A., Prince, A. M., Zhang, P. (1999). The hepatitis C virus NS2 protein generated by NS2-3 autocleavage is required for NS5A phosphorylation. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **254**: 572-577.
- Lok, A.S.F., Gunaratnum, N.T. (1997). Diagnosis of hepatitis C. *Hepatology.* **26(Suppl 1)**: 48S - 56S.
- Lu, L., Nakano, T., He, Y., Fu, Y., Hagedorn, C.H., *et al.* (2005). Hepatitis C virus genotype distribution in China: predominance of closely related subtype 1b isolates and existence of new genotype 6 variants. *J. Med. Virol.* **75(4)**: 538–549.
- Lu, R.H., Hwang, S.J., Chan, C.Y., *et al.* (1998). Quantitative measurement of serum HCV RNA in patients with chronic hepatitis C: comparison between Amplicor HCV

- Monitor system and branched DNA signal amplification assay. *J. Clin. Lab. Anal.* **12**: 121-125.
- Ma, H., Leveque, V., De Witte, A., Li, W., Hendricks, T., Clausen, S.M., Cammack, N., Klumpp, K. (2005). Inhibition of native hepatitis C virus replicase by nucleotide and non-nucleoside inhibitors. *Virology*. **332**: 8–15.
- Manns, M.P., McHutchison, J.G., Gordon, S.C., Rustgi, V.K., Shiffman, M., Reindollar, R., Goodman, Z.D., Koury, K., Ling, M., Albrecht, J.K. (2001). Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*. **358 (9286)**: 958-965.
- Martins, R.M.B., Teles, S.A., Freitas, N.R., Motta-Castro, A.R.C., Souto, F.J.D., Mussi, A., *et al.* (2006). Distribution of hepatitis C virus genotypes among blood donors from mid-west region of Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* **48(1)**: 53-55.
- McHutchinson, J.G., Gordon, S.C., Schiff, E.R., *et al.* (1998). Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *New Engl. J. Med.* **339**: 1485-1492.
- McLauchlan, J. (2000). Properties of the hepatitis C virus *core* protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J. Viral. Hepatitis*. **7**: 2–14.
- Mierendorf, R., Yaeger, K., and Novy, R. (1994) The pET system: your choice for expression. *Innovations* **1**: 1–3.
- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. A, B, C, D, E do diagnóstico da hepatites virais. Ministério da Saúde. 1ª edição, (2009), 25p. Brasília DF.
- Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Resolução RDC nº 153, de 14 de junho de 2004. Publicada no Diário Oficial da União de 24 de junho de 2004. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br> - acesso em 23fevereiro 2011.
- Miro, J.M., Laguno, M., Moreno, A., Rimola, A. (2006). Management of end stage liver disease (ESLD): what is the current role of orthotopic liver transplantation (OLT)? *J. Hepatol.* **44 (Suppl 1)**: 140-145.
- Mohsen, A.H. (2001). Trent HCV study group. The epidemiology of hepatitis C in a UK health regional population of 5.12 million. *Gut*. **48**: 707-713.
- Müller C., Pfeffel E., Peck-Radosavljevic M., Petermann D., Oesterreicher C. and Pidlich J. (1997). Prevalence of hepatitis G virus in patients with hepatocellular carcinoma. *J. Viral Hepatitis*. **(4)**: 411-414.
- National Institute of Health (NIH). (2002). National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of hepatitis C: 2002–June 10-12. *Hepatology*. **36 (5 Suppl 1)**: S3-20.

- Neumann-Haefelin, C., Timm, J., Spangenberg, H.C., Wischniowski, N., Nazarova, N., Kersting, N., Roggendorf, M., Allen, T.M., Blum, H.E., Thimme, R. (2008). Virological and immunological determinants of intrahepatic virus-specific CD8+ T-cell failure in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*. **47**: 1824-1836.
- Pawlotsky, J.M. (2006). Therapy of hepatitis C: from empiricism to cure. *Hepatology*. **43(Suppl 1)**: S207–S220.
- Pawlotsky, J.M., McHutchison, J.G. (2004). Hepatitis C. Development of new drugs and clinical trials: promises and pitfalls. Summary of an AASLD hepatitis single topic conference, Chicago, IL, February 27–March 1, 2003. *Hepatology* **39**: 554–567.
- Pellerin, M., Lopez-Aguirre, Y., Penin, F., Dhumeaux, D., Pawlotsky, J.M. (2004). Hepatitis C virus quasispecies variability modulates nonstructural protein 5A transcriptional activation, pointing to cellular compartmentalization of virus-host interactions. *J. Virol.* **78**: 4617–4627.
- Perz, J.F., Alter, M.J. (2006). The coming wave of HCV-related liver disease: dilemmas and challenges. *J. Hepatol.* **44**: 441–443.
- Poynard, T., Yuen, M.F., Ratziu, V., Lai, C.L. (2003). Viral hepatitis C. *Lancet*. **362**: 2095–2100.
- Rosenberg, S. (2001). Recent Advances in the Molecular Biology of Hepatitis. *J. Mol. Biol.* **313**: 461-464.
- Roth W.K., Waschke D., Marx S., Tschander S., Zeunem S., Bialleck H., Weber H., and Seifried E. (1997). Prevalence of hepatitis G virus and its strain variant, the GB agent, in blood donations and their transmission to recipients. *Transfusion*. (37): 651-656.
- Russell, C.S., Clarke, L.A. (1999). Recombinant proteins for genetic disease. *Clin. Genet.* **55**: 389–394.
- Saez-Alquezar, A., Bassit, L., Sabino, E.C. (2001). Hepatitis virais. In: Ferreira AW, Avila SLM, edit. *Diagnostico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes*. 2ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara; 74-91.
- Sakai, A., Claire, M.S., Faulk, K., Govindarajan, S., Emerson, S.U., Purcell, R.H., Bukh, J. (2003). The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *PNAS*. **100**: 11646-11651.
- Shi, S.T., & Lai, M.M.C. (2001). Hepatitis C viral RNA: challenges and promises. *Cell Mol Life Sci.* **58**: 1276-129.
- Simmonds, P. (1995). Variability of hepatitis C virus. *Hepatology*. **21**: 570-259.
- Simmonds, P. (2004). Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus—15 years on. *J. Gen. Virol.* **85**: 3173–3188.

- Simmonds, P., Alberti, A., Alter, H.J. (1994). Proposed system for the nomenclature hepatitis C viral genotypes. *Hepatology*. **19**: 1321-1324.
- Simmonds, P., J. Bukh, C. Combet, G. Deleage, N. Enomoto, S. Feinstone, P. Halfon, G. Inchauspe, C. Kuiken, G. Maertens, M. Mizokami, D. G. Murphy, H. Okamoto, J. M. Pawlotsky, F. Penin, E. Sablon, I. T. Shin, L. J. Stuyver, H. J. Thiel, S. Viazov, A. J. Weiner, and A. Widell. (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. **42**: 962–973.
- Takahashi, M., T. Nishizawa, Y. Gotanda, F. Tsuda, F. Komatsu, T. Kawabata, K. Hasegawa, M. Altankhuu, U. Chimedregzen, L. Narantuya, H. Hoshino, K. Hino, Y. Kagawa, and H. Okamoto. (2004). High prevalence of antibodies to hepatitis A and E viruses and viremia of hepatitis B, C, and D viruses among apparently healthy populations in Mongolia. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **11**: 392–398.
- Tanji, Y., Hijikata, M., Satoh, S., Kaneko, T., Shimotohno, K. (1995). Hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS4A has versatile functions in viral protein processing. *J. Virol.* **69**: 1575–1581.
- Tellinghuisen, T.L., Rice, C.M. (2002). Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 419–427.
- Walsh, G. (2002). Biopharmaceuticals and biotechnology medicines: an issue of nomenclature. *Eur. J. Pharm. Sci.* **15**: 135–138.
- Walsh, G. (2006). Biopharmaceutical benchmarks. *Nature Biotechnol.* **24** (7): 769-76.
- Wang, C., Le, S.Y., Ali, N., Siddiqui, A. (1995). An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region. *RNA*. **1**: 526–537.
- Williams, R. (2006). Global challenges in liver disease. *Hepatology*. **44**: 521-526.
- World Health Organization. (2001). Hepatitis C assays: Operational characteristics (Phase I). In *Blood safety and clinical technology*. Suíça, Geneva: 1-34.
- World Health Organization. (2002). Hepatitis C. Geneva, Switzerland: 1-69.
- World Health Organization: Hepatitis C.
[http://www.who.int/immunization/topics/hepatitis_c/en/index.html/] website 1999.
- Yan, Y., Li, Y., Munshi, S., Sardana, V., Cole, J.L., Sardana, M., Steinkuehler, C., Tomei, L., De Francesco, R., Kuo, L.C., Chen, Z. (1998). Complex of NS3 protease and NS4A peptide of BK strain hepatitis C virus: a 2.2 Å resolution structure in a hexagonal crystal form. *Protein. Sci.* **7**: 837–847.
- Zinkernagel, R.M. (2001). Maternal antibodies, childhood infections, and autoimmune diseases. *New. Engl. J. Med.* **345**: 1331–1335.