



**UFAM**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**

**PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES CORE, NS3, NS4b E NS5a DO  
VÍRUS DA HEPATITE C E CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE  
HUMORAL**

**WALTER LUIZ LIMA NEVES**

**MANAUS - AMAZONAS**

**2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**

**WALTER LUIZ LIMA NEVES**

**PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES CORE, NS3, NS4b E NS5a DO  
VÍRUS DA HEPATITE C E CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE  
HUMORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como parte do pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia na área de concentração "*Imunologia Básica e Aplicada*".

**Orientadora: Dra. Adriana Malheiro**

**Co-Orientador: Dr. Luis André Moraes Mariúba**

**MANAUS – AMAZONAS**

**2014**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

N518p      Neves, Walter Luiz Lima  
Produção das proteínas recombinantes Core, Ns3, Ns4b e Ns5a  
do vírus da hepatite c e caracterização da resposta imune humoral /  
Walter Luiz Lima Neves . 2014  
83 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Adriana Malheiro Alle Marie  
Coorientador: Luis André Morais Mariúba  
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. Hepatite C. 2. Proteínas . 3. Purificação. 4. Recombinantes. I.  
Marie, Adriana Malheiro Alle. II. Universidade Federal do Amazonas  
III. Título

**WALTER LUIZ LIMA NEVES**

**PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES CORE, NS3, NS4b E NS5a DO  
VÍRUS DA HEPATITE C E CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE  
HUMORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como parte do pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia na área de concentração "*Imunologia Básica e Aplicada*".

**APROVADO EM: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Luis André Moraes Mariúba (Presidente)**  
**Instituto Leônidas e Maria Deane (FIOCRUZ – AM)**

---

**Prof. Dr. Paulo Afonso Nogueira (Membro interno)**  
**Instituto Leônidas e Maria Deane (FIOCRUZ – AM)**

---

**Profa. Dra. Fernanda de Freitas Aníbal (Membro externo)**  
**Universidade Federal de São Carlos**

A minha amada avó ***Terezinha de Jesus Auzier e Lima*** aos meus pais, ***Ana Maria e Luiz Neves.***

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por me abençoar todos os dias, por me amar incondicionalmente, por nunca me abandonar nos momentos difíceis.

À minha mãe – avó **Terezinha de Jesus Auzier e Lima**, que recentemente Deus a levou para que ela fica-se ao seu lado, agradeço por todo amor que você me deu, por toda criação, por todos os ensinamentos, por proporcionar a melhor educação e formação para minha vida e sei que você estará sempre cuidando de mim e de toda a família como sempre fez. Te amo muito.

À minha mãe **Ana Maria Auzier e Lima**, por todo amor, por ser meu porto seguro e por me apoiar nessa difícil caminhada.

À meu pai **Luiz Ramos Neves**, por todo amor, compreensão e apoio durante essa caminhada.

Aos meus irmãos **Josué Ricardo, Leon Neves, Luciano Neves e Luiz jr**, por todo apoio, incentivo e torcida.

Aos meus sobrinhos **Daniela Fernanda e Luiz Felipe**, por todo amor e compreensão e pela companhia às vezes nas madrugadas de estudo. Amo vocês.

A toda minha **família**, pela compreensão de que por muitas vezes fiquei ausente e por toda confiança depositada em mim.

A minha orientadora **Adriana Malheiro**, pela confiança em mim depositada, pelas oportunidades e ensinamentos, por contribuir no meu crescimento, por me aguentar durante esses 6 anos de orientação e se Deus quiser mais 4 anos no doutorado. Muito obrigado.

Ao meu co-orientador **Luiz André Moraes Mariúba**, por me ajudar nessa difícil caminhada, por não deixar desanimar nas várias dificuldades que aconteceram durante o projeto, por todos os ensinamentos, paciência, apoio e amizade. Muito Obrigado.

Aos meus amigos do mestrado de imunologia – Turma 2012: **André Corado, Cacilda Satomi, Claudio Renato, Edalton Sanguino, Katiane dos Santos, Luciana Brito, Luciana Tezza, Nilberto Dias, Suellen Nunes e Willian Fuzita**, pela amizade e apoio durante toda nossa caminhada juntos.

A toda minha família da minha segunda casa NAEP-Hemoam, **Allyson Guimarães, Andrea Tarragô, João Paulo Pimentel, Nadja Garcia**, por todo o apoio, ajuda e confiança no meu trabalho, e pelos momentos de solidariedade nos momentos difíceis e pelos momentos de descontração.

A todos os meus amigos da FIOCRUZ – AM, **Alessandra, Carol, Edilene, David, Fernanda, Helber, Keila, Késsia, Juliane, Leidiane, Lucas, Lorrane, Milla, Yuri, George, Victor, Paula Taquita, Diogo**, por todo apoio, pela ajuda nos momentos de sufoco e pelos momentos de descontração.

Ao **Dr. Paulo Afonso e Dra. Patrícia**, pela solidariedade em dispor em seu laboratório.

A todos nossos **professores** do mestrado de imunologia, por passarem todos seus conhecimentos contribuindo para nossa formação.

Ao **Programa de Pós-graduação em imunologia Básica e aplicada** e a todos os seus integrantes, pela ajuda, pela oportunidade de capacitação, qualificação profissional e concretização deste trabalho.

Ao **Instituto Leônidas e Maria Deane- ILMDF/IOCRUZ – AM** por proporcionar a realização deste projeto de pesquisa.

À **Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM)** por todo o apoio para realização de experimentos.

À Fundação de **Amparo a Pesquisa do estado do Amazonas (FAPEAM)** e **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pela bolsa de mestrado e auxílio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste sonho.



***“Por isso não tema, pois estou com você;  
não tenha medo, pois sou o seu Deus.  
Eu o fortalecerei e o ajudarei;  
Eu o segurei com a minha mão direita  
vitoriosa.”***

**Isaías 41:10**

## RESUMO

**Introdução:** As infecções hepáticas causadas por vírus estão entre as mais graves, com prevalência no mundo todo. Segundo dados da OMS, o Vírus da Hepatite C (HCV) acomete cerca de 170 milhões de pessoas em todo o mundo, o que corresponde a aproximadamente 3% da população mundial. Desse total, nota-se que a maioria dos indivíduos (80%) não desenvolve resposta virológica sustentada, evoluindo para infecção crônica. **Objetivo:** Produzir, expressar e purificar as proteínas recombinantes CORE, NS3, NS4b e NS5a do vírus da Hepatite C, otimizadas para *E. coli* e analisar a reatividade destas proteínas frente aos soros de pacientes com hepatite C crônica. **Material e Métodos:** Os genes recombinantes das proteínas CORE (594pb), NS3 (897pb), NS4b (804pb), NS5a F1 (678pb) e NS5a F2 (692pb) foram construídos e otimizados para expressão em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Sítios de enzimas de restrição foram adicionados nas sequências para realizar a subclonagem em vetor pRSET, o qual inclui a sequência de aminoácidos da proteína da cauda 6XHIS. Soros de pacientes com hepatite C crônica obtidos em estudos prévios, foram usados para avaliar a reatividade contra as proteínas recombinantes produzidas. **Resultados e conclusão:** Logo, as proteínas recombinantes CORE, NS3, NS4b, NS5a F1 e NS5a F2 foram expressas com sucesso em hospedeiro *E.coli*. Estas foram purificadas em condições nativa e desnaturada utilizando coluna de níquel. As proteínas recombinantes CORE e NS5 F2 foram imunorreativas para um pool de soros de pacientes com hepatite C crônica, não sendo detectada reatividade com soros negativos. Não foi observado nenhuma reatividade para porção N-terminal da proteína NS5a. Estudos futuros buscaram analisar a reatividade individual de um grande número pacientes, para cada proteína recombinante.

**Palavras-chave:** Hepatite C, proteínas, purificação.

## ABSTRACT

**Introduction:** Liver infections caused by viruses are among the most serious ones, with worldwide prevalence. According to WHO data, the Hepatitis C Virus (HCV) affects approximately 170 million people around the world, representing approximately 3% of world population. Of this total, the majority of individuals (80%) did not develop sustained virologic response, progressing to chronic infection. **Objective:** Production, expression and purification of HCV proteins CORE, NS3, NS4b and NS5a in *E. coli* and analysis of its reactivity with serum of chronic hepatitis C patients. **Methods:** Recombinant genes of CORE (594pb), NS3 (897pb), NS4b (804pb), NS5a F1 (678pb) and NS5a F2 proteins were constructed (692pb) for optimized expression in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Restriction enzymes sites were added to the sequences for subcloning in pRSET, which include a 6xHIS tagged in the recombinant protein amino acid sequence. Sera of patients with chronic hepatitis C obtained in previous study were used in western blot to evaluate its reactivity with recombinant proteins produced. **Results and conclusion:** The recombinant proteins were expressed in *E. coli* showed a higher concentration in the insoluble portion. Each protein was purified in native and denatured condition using nickel column. CORE and NS5a F2 proteins were reactive to antibodies present in the sera of patients, and did not reacted with negative patients sera. Any reactivity was observed against the N-terminal portion of NS5a. Further studies will try to analyze individual reactivity of a large number of patients against each recombinant protein.

**Keywords:** Hepatitis C, protein purification.

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

|   |    |
|---|----|
| Quadro 1: Dados da expressão das proteínas: plasmídeos de expressão (pRSET), respectivas enzimas de restrição e o tamanho do gene. .... | 35 |
| Quadro 2: Cepas e plasmídeos utilizados para clonagem e expressão das proteínas recombinante.....                                       | 40 |
| Quadro 3 – Quadro das análises de bioinformática das sequência de aminoácidos das proteínas recombinantes .....                         | 50 |
| <br>  |    |
| Tabela 1: Sequências de DNAs otimizados para <i>E. coli</i> das proteínas do HCV .....  | 36 |
| Tabela 2: Sequências de aminoácidos das proteínas (CORE, NS3, NS4b, NS5a F1 e NS5a F2).....   | 37 |
| Tabela 3: sequência de aminoácidos das proteínas recombinantes expressas em <i>E. coli</i> .....  | 49 |
| Tabela 4: Tradução dos sequenciamentos de DNA das proteínas recombinantes ...   | 55 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Distribuição geográfica mundial da infecção da hepatite C.....   | 13 |
| Figura 2: Distribuição dos genótipos do vírus da Hepatite C nas diferentes estados do Brasil. Apresenta o número absoluto de cada genótipo encontrado na região. ...   | 15 |
| Figura 3: Estrutura do virion HCV.....   | 16 |
| Figura 4: Genoma do vírus da Hepatite C.....   | 16 |
| Figura 5: Mapa do plasmídeo pSMART com várias regiões presentes nele.....  | 38 |
| Figura 6: Mapa do plasmídeo pRSET A com várias regiões presentes nele. ....  | 39 |
| <b>Figura 7:</b> Digestão dos plasmídeos de clonagem pSMART e a presença dos fragmentos CORE, NS3, NS4b e NS5a F2 na altura esperada. ....   | 51 |
| Figura 8: Digestão do plasmídeo de clonagem pSMART e a presença do fragmento NS5a F1 na altura esperada. ....  | 52 |
| Figura 9: Confirmação da ligação correta dos genes recombinantes CORE, NS3, NS4b e NS5a F2 ao vetor de expressão pRSET A. ....   | 54 |
| Figura 10: Confirmação da ligação correta do gene recombinante NS5a F1 ao vetor de expressão pRSET A.....  | 54 |
| Figura 11: Gel SDS – PAGE 15% da purificação do sobrenadante do extrato bacteriano das proteínas CORE, NS3, NS4b e NS5a F1/F2 coradas com nitrato de prata. ....   | 56 |
| Figura 12: SDS – PAGE 15% da purificação das proteínas CORE, NS4b e NS5a F1/F2 da porção solúvel do extrato bacteriano corados por comassie brilhante.....   | 57 |
| Figura 13: Western blot das proteínas recombinantes CORE, NS3, NS4b e NS5a F1/F2 das porções solúvel e insolúvel do extrato bacteriano. ....   | 58 |
| Figura 14: A – immunoblot das proteínas CORE, NS3, NS4b, NS5a F1 e NS5a F2 utilizando pool de soros HCV +. B – immunoblot das proteínas CORE, NS3, NS4b, NS5a F1 e NS5a F2 utilizando pool de soros de pacientes negativo para HCV. .... | 59 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ALT** – Alanina aminotransferase

**CD4** – Cluster differentiation 4

**CD8** – Cluster differentiation 8

**CD81** – Cluster differentiation 81

**CTLs** – Células T citotóxicas

**CLDN** – Claudina

**C-terminal** – Carboxi-terminal

**DC** – Células Dendriticas

**D.O** – Densidade ótica

**DTT** – Dithiothreitol

**ELISA** – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

**FHEMOAM**- Fundação hospitalar de hematologia e hemoterapia do Amazonas

**Foxp3** – Forkhead Box P3

**HCV** - Vírus da Hepatite C

**HLA** – Antígeno leucocitário humano

**IFN** – Interferon

**IL** – Interleucina

**IPTG** – Isopropílico  $\beta$ -D-1 thiogalactopyranosine

**IRF- 3** – Fator regulador de interferon- 3

**ISG**- Genes estimuladores de Interferon

**JAK** – Janus Kinase

**LDL**- Lipoproteína de baixa densidade

**MHC** - Complexo principal de histocompatibilidade

**mL**- mililitro

**NF- $\kappa$ B** – Fator nuclear kappa B

**NK**- Natural killer

**NKT**- Natural killer T

**NS** - Região não- estrutural

**N-terminal** – Amino terminal

**OMS**- Organização Mundial de Saúde

**PAGE** – Eletroforese em gel de poliacrilamida

**PBS** – Phosphate-Buffered Saline

**PCR** - Reação em cadeia da polimerase

**RIG – I** Gene indutível pelo ácido retinóico I

**RNA** - Ácido ribonucleico

**SOCS** - supressores da sinalização da citocina

**SR-BI** - Receptor scavenger B tipo I

**STAT** - Transdutores de sinais e ativadores da transcrição

**TBE** – Tampão Tris Ácido Bórico - EDTA

**TGF-  $\beta$**  - Fator de crescimento transformador – beta

**T<sub>H</sub>** - Células T helper

**TLR** – Receptor do tipo toll

**TNF- $\alpha$**  - Fator de necrose tumoral- alfa

**$\mu$ l** – Microlitro

**U.V** – Ultra violeta

**WHO** – World Health Organization





## Sumário

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>10</b> |
| <b>2. EPIDEMIOLOGIA</b> .....  | <b>13</b> |
| <b>3. VÍRUS DA HEPATITE C (HCV)</b> .....  | <b>15</b> |
| <b>4. TRANSMISSÃO</b> .....  | <b>19</b> |
| <b>5. IMUNOPATOGÊNESE</b> .....  | <b>20</b> |
| 5.1 Entrada do HCV nas células hospedeiras .....   | 20        |
| 5.2 Resposta imune inata e adaptativa .....  | 21        |
| <b>6. OBJETIVOS</b> .....  | <b>29</b> |
| 6.1 Objetivo Geral .....   | 29        |
| 6.2 Objetivos Específicos .....  | 29        |
| <b>7. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | <b>31</b> |
| 7.1 Tipo de Estudo .....   | 31        |
| 7.2 Fluxograma de desenvolvimento do estudo .....  | 32        |
| <b>7.3 População do Estudo</b> .....   | <b>33</b> |
| 7.4 Conservação das Amostras .....   | 33        |
| 7.5 Aspectos Éticos.....   | 33        |
| 7.6 Produção das proteínas recombinantes .....   | 34        |
| 7.6.1 Desenhos dos genes sintéticos para produção das proteínas recombinantes .....                                | 34        |
| 7.6.2 Digestão do Vetor de Clonagem com Enzimas de Restrição.....  | 38        |
| 7.6.3 Subclonagem em Vetor de Expressão pRSET .....  | 39        |
| 7.6.4 Precipitação por acetato de amônia .....   | 40        |
| 7.6.5 Preparação de Célula Competente para a Inserção do Plasmídeo Recombinante -<br>Transformação em Top 10 ..... | 41        |
| 7.6.6 Crescimento e Seleção das Colônias .....   | 42        |
| 7.6.7 Extração Plasmidial e Digestão para Confirmação da Orientação do Inseto.....                                 | 42        |
| 7.6.8 Sequenciamento.....  | 43        |
| 7.6.9 Transformação de Células Eletrocompetentes ( <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS).....                            | 43        |
| 7.6.10 Cultivo e Indução das Proteínas do HCV .....  | 44        |
| 7.6.11 Análise da Expressão das Proteínas .....  | 44        |
| 7.6.12 Purificação das Proteínas Recombinantes .....   | 45        |
| 7.6.13 Western blot.....   | 46        |
| 8.4 Análise da Expressão das Proteínas .....   | 56        |

|  |           |
|--|-----------|
| 8.4.1 Purificação da porção solúvel do extrato bacteriano .....  | 56        |
| 8.4.2 Purificação da porção insolúvel do extrato bacteriano .....  | 57        |
| O gel SDS – PAGE corado com comassie brilhante (figura 12), demonstra a recuperação das proteínas recombinantes da porção insolúvel do extrato bacteriano em uma concentração maior, quando comparadas a recuperação da porção solúvel. .... | 57        |
| 8.4.3 Western blot das porções solúvel e insolúvel do extrato bacteriano.....  | 58        |
| 8.4.4 Immunoblot das proteínas recombinantes.....  | 59        |
| <b>8.5 Discussão .....</b>   | <b>61</b> |
| <b>8.6 Conclusão .....</b>   | <b>70</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>72</b> |

## *Introdução*

---

## INTRODUÇÃO

As infecções hepáticas causadas por vírus estão entre as mais graves, com altas prevalências no mundo todo. Os vírus da Hepatite A, B, C, D e E são os mais comuns causadores das hepatites virais (CDC, 2010). Contudo, somente os vírus da Hepatite B, C e D são causadores de hepatites que podem evoluir para doenças graves do fígado ocasionando quadros de cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (SILVA et al., 2012).

A infecção causada pelo vírus da hepatite C (HCV) é um grave problema de saúde pública (EL-SAADANY et al., 2013). Na maioria das vezes ocasiona infecção assintomática aumentando o risco de evolução para uma infecção crônica e o desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular. Aproximadamente 80% dos casos de infecções pelo HCV levam à infecção crônica e 20% desses pacientes apresentam doenças hepáticas graves (SEEFF, 2002). O processo de cronicidade da doença é observado após o hospedeiro não desenvolver uma resposta virológica sustentada devido aos mecanismos de escape viral. Estes mecanismos interferem diretamente nas respostas imune tanto inata quanto adaptativa, impedindo as vias de sinalização e produção de citocinas antivirais (ASHFAQ et al., 2011).

Considerando que até o presente momento não existem vacinas ou tratamentos prévios contra o vírus da Hepatite C além do que, há muitos resultados indeterminados nos kits de detecção do HCV e a maioria dos infectados não sabem que são portadores crônicos do vírus, a produção das proteínas recombinantes do vírus da Hepatite C, obtidas nesta pesquisa é de grande importância para o melhor entendimento da resposta imune contra o HCV, assim como, a utilização na

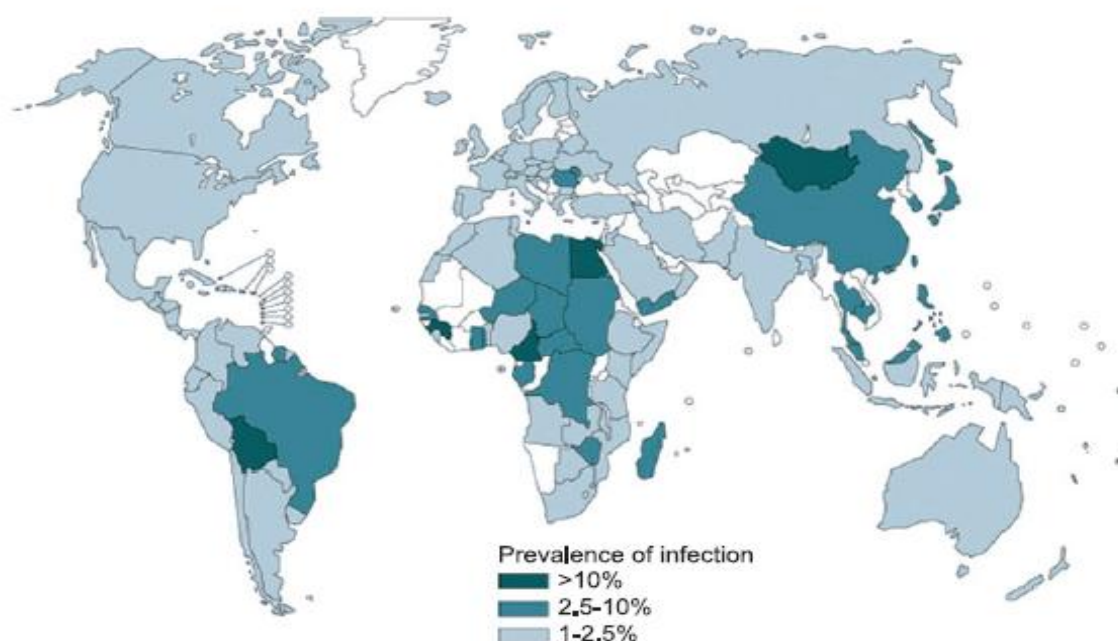
produção de teste de detecção do vírus com uma maior sensibilidade que os testes sorológicos atuais.

*Revisão Bibliográfica*

---

## 2. EPIDEMIOLOGIA

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, a Hepatite C é um problema de saúde pública em todo mundo (**Figura 01**), acometendo cerca de 150 a 200 milhões de pessoas. A mortalidade por ano chega a 350.000, sendo causadas por doenças graves relacionadas à infecção pelo HCV (WHO, 2012).



**Figura 1: Distribuição geográfica mundial da infecção da hepatite C**

**Fonte:** WHO, 2007

A distribuição da doença na América Latina e Central apresenta prevalência com taxas de 6,3%, 1,14%, 1,2% e 0,3% em Porto Rico, Brasil, México e Chile respectivamente (SY; JAMAL, 2006).

Aproximadamente 5,3 casos a cada 100 mil habitantes são confirmados para HCV (MS, 2011). Segundo o Ministério da saúde (2009) a prevalência brasileira de casos de hepatite C está estimada em torno de 1 a 2%. A distribuição geográfica de

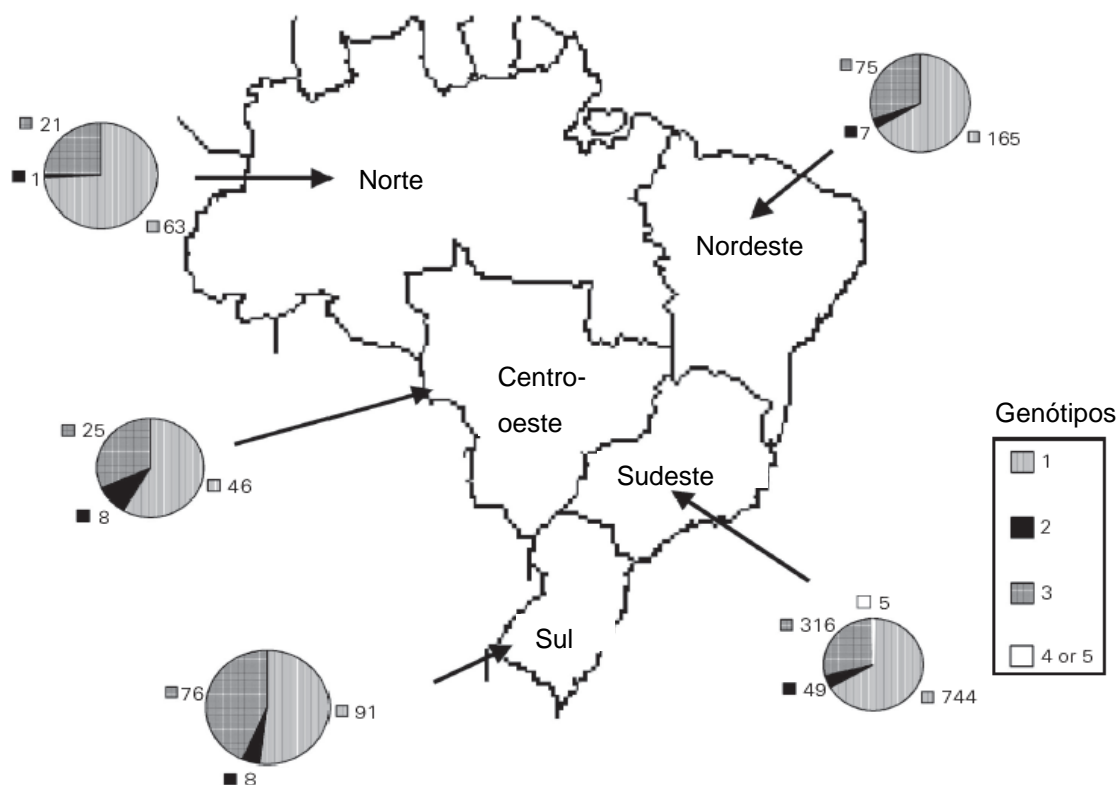
candidatos a doação de sangue positivos para anti-HCV mostra a região norte com 2,12%, seguida da região sudeste com 1,43%, nordeste com 1,19%, centro-oeste 1,04% e região sul com 0,65% (MARTINS et al., 2010).

A prevalência do HCV na Região Amazônica do Brasil mostra-se elevada em comparação com as outras regiões do país onde, as maiores taxas observadas foram nos estados do Acre (5,9%), Pará (2%) e do Amazonas (0,8%) (OLIVEIRA-FILHO *et al.*, 2010; SAWADA *et al.*, 2011).

A distribuição dos genótipos do HCV é modificada de acordo com os continentes estudados, sendo que os de maior prevalência são os genótipos 1, 2 e 3, com os subtipos 1a, 1b, 2c e 3a, encontrados em todas as regiões do mundo. Os genótipos 4, 5 e 6 foram descritos em áreas restritas e distintas, com predomínio do genótipo 4 e 5 nas regiões do Egito, África e oriente Médio, enquanto que o genótipo 6 apresenta uma maior prevalência na Indochina (SARTRE et al., 2005; LOPES et al., 2009).

Embora, dados de prevalência do HCV na população brasileira sejam limitados, a distribuição genotípica apresenta um predomínio do genótipo 1 (64,9%), seguido pelos genótipos 3 (30,2%), 2 (4,6%), 4 (0,2%) e 5 (0,1%) (**Figura 02**) (CAMPIOTTO et al., 2005). No estado no Amazonas a maior prevalência genotípica foi do genótipo 1, seguido pelos genótipos 3 e 2 (CAMPIOTTO et al., 2005; TORRES et al., 2009).



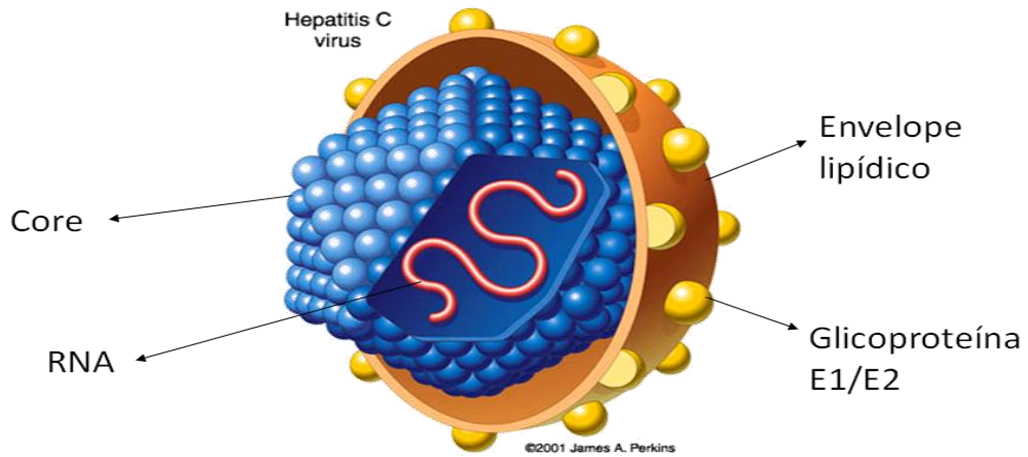


**Figura 2: Distribuição dos genótipos do vírus da Hepatite C nas diferentes estados do Brasil. Apresenta o número absoluto de cada genótipo encontrado na região.**

Fonte: CAMPIOTTO *et al.*, 2005, modificado.

### 3. VÍRUS DA HEPATITE C (HCV)

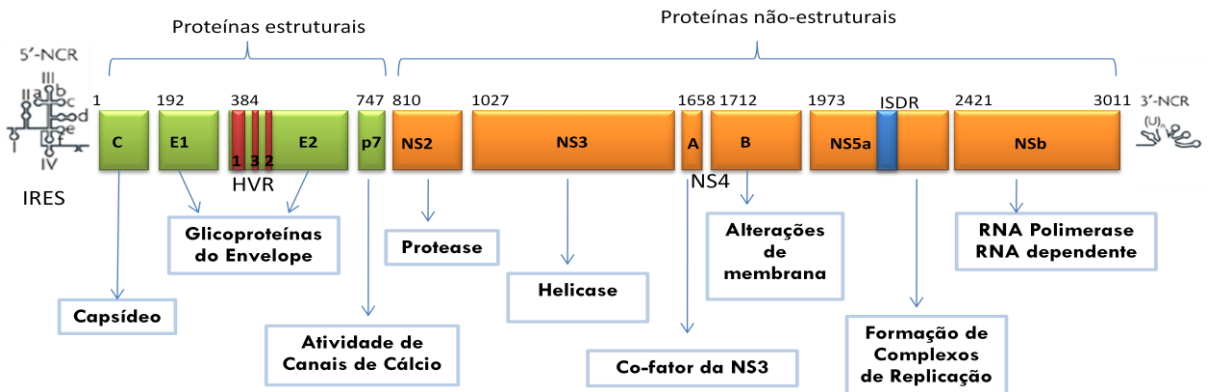
O vírus da hepatite C exibe uma conformação esférica com cerca de 30 a 60 nm de diâmetro. A partícula viral é envolta por uma membrana celular derivada dos hepatócitos dos hospedeiros com a presença de glicoproteínas virais E1 e E2. O genoma é formado por RNA, que é cercado pelo nucleocapsídeo, formado pela proteína C (CORE) (**Figura 03**).



**Figura 3: Estrutura do virion HCV**

Fonte: Adaptado de James, 2001

O HCV pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Hepacivirus* (MORADPOUR; BLUM, 2004). O genoma viral do HCV é formado por um ácido ribonucleico de fita simples, apresentando polaridade positiva composta por 9.600 nucleotídeos, havendo uma região codificante com uma longa fase aberta de leitura (Open Reading Frame – ORF) que traduz uma poliproteína com 3 mil aminoácidos (CHOO et al., 1988). A fração N-terminal codifica as proteínas estruturais CORE, E1/E2 e proteína P7, enquanto que as proteínas não estruturais NS2, NS3, NS4A, NS4B NS5A e NS5B são codificadas em outra parte do genoma (CHOO et al., 1988; SHUKLA et al., 1995) (Figura 04).



**Figura 4: Genoma do vírus da Hepatite C.**

Fonte: Adaptado de MORADPOUR et al., 2007.

A proteína do CORE possui características químicas capazes de permitir a ligação ao RNA viral, formando o nucleocapsídeo. Há relatos, que a proteína do CORE apresenta interações com diversas proteínas celulares, comprometendo várias funções das células hospedeiras como no processo de apoptose, na transcrição gênica, nas vias de sinalização celular, além do metabolismo dos lipídeos (TELLINGHUISEN; RICE, 2002; FOKA et al., 2014).

As proteínas transmembranas E1 e E2 são glicoproteínas do envelope do HCV que apresentam participação importante na entrada e fusão do vírus na célula hospedeira (BARTOSCH; DUBUISSON; et al., 2003).

A proteína P7 é um polipeptídeo clivado da proteína E2 com 63 aminoácidos que apresenta a capacidade de formar hexâmeros com a atividade de canais de cálcio, há suposições que essa proteína esteja envolvida na persistência viral, mas sua participação na replicação viral permanece desconhecida (CARRÈRE-KREMER et al., 2002; GRIFFIN et al., 2003).

Dentre as proteínas não estruturais, a NS2 e NS3 tem a função de clivagem de todas as proteínas não estruturais, com atividade de helicase e NTPase (*Nucleosil Trifosfato Hidrolase*) pela NS3 durante a replicação viral (GRAKOUIT et al., 1993; PENIN, FRAÇOIS et al., 2004; APPEL et al., 2007).

A proteína NS4A apresenta a função de atuar como co-fator da proteína NS3 e participa da hiperfosforilação da proteína NS5A. A proteína NS4B é uma proteína integral de membrana apresentando um importante papel na formação do complexo de replicação viral, tendo como função de atuar como estrutura de fixação na membrana do retículo endoplasmático e agir como fator de inibição da atividade antiviral de IFN- $\alpha$  (EGGER et al., 2002).

NS5A é uma fosfoproteína de estrutura e função desconhecida. Ela tem atraído grande interesse devido ao seu potencial papel na modulação da resposta ao interferon, além de outras propriedades como a participação da ativação transcricional e envolvimento na regulação da proliferação celular e das vias de ativação celular (EGGER et al., 2002; PAWLOTSKY, 2004; PENIN, FRANÇOIS et al., 2004; HUGHES et al., 2009; JIANG; LUO, 2012). A proteína NS5B é uma enzima com importância chave promovendo a síntese de novos genomas de RNA do HCV, atuando com sua função de RNA polimerase. A proteína não estrutural 5B sintetiza uma fita de RNA complementar de polaridade negativa que usa o genoma viral como molde, seguido da síntese do RNA genômico a partir da fita negativa (SCHMIDT-MENDE et al., 2001; FRANCESCO; MIGLIACCIO, 2005).

O genoma do HCV apresenta uma elevada taxa de replicação, podendo gerar em 24 horas cerca de  $10^{12}$  *virions* no hospedeiro infectado. Essa elevada taxa de replicação pode causar mutações e erros na leitura da polimerase durante o processo, tornando heterogêneo o genoma do HCV (HERRMANN et al., 2000).

As mudanças observadas no genoma do HCV possibilitaram a classificação desse vírus em 7 genótipos denominados HCV-1 a HCV- 7. Além disso, pequenas mutações em cada genótipo originaram os subtipos dos genótipos relatados ( $\pm$  100 subtipos), sendo identificados por letras minúsculas (ex: HCV-1a) (NAKANO et al., 2011).

A evolução clínica da doença está relacionada com os genótipos apresentados, visto que o genótipo 1 é considerado o mais agressivo, pois está associado as lesões hepáticas graves e pouca resposta ao tratamento indicado, enquanto comparados com os genótipos 2 e 3 (HARRIS et al., 2007).

#### 4. TRANSMISSÃO

O HCV é transmitido por várias formas, sendo que a forma mais eficiente se dá através da exposição ao sangue contaminado, em transfusões sanguíneas, transplantes de órgãos e o uso de drogas injetáveis com compartilhamento de seringas contaminadas. Além disso, foram relatados casos de infecção por acidentes com materiais perfuro-cortantes, exposição a fluidos corporais e transmissão sexual (HOWE et al., 2005; ALTER, 2007).

As hemotransfusões aparecem como uma das maiores causas de transmissão do HCV. O uso de sangue e seus derivados assim como, órgãos transplantados de indivíduos contaminados com esse vírus, representam um alto risco na ausência de um teste diagnóstico para detecção do patógeno. Estudo com pacientes hemofílicos transfundidos antes da implantação dos testes sorológicos nos bancos de sangue demonstram que cerca de 90% desses pacientes foram contaminados com o vírus C (ALTER, 2007; MAIA et al., 2009)

O compartilhamento de seringas contaminadas para o uso de drogas injetáveis foi responsável pela maioria das infecções pelo HCV nos Estados Unidos e Austrália. No entanto, a incidência entre usuários de drogas injetáveis caiu a partir da década de 90 (SHEPARD et al., 2005).

A transmissão ocupacional através da exposição percutânea durante a realização de tatuagens e perinatal durante a gravidez tem sido relatadas (MARTINS et al., 2010). Estimativas apontam que os níveis de transmissão materno-fetal podem atingir 25%, sendo que esse número pode aumentar nos casos de co-infecção com o HIV (PARTHIBAN et al., 2009).

## 5. IMUNOPATOGÊNESE

### 5.1 Entrada do HCV nas células hospedeiras

Os mecanismos de entrada do HCV nas células ainda não estão completamente elucidados, contudo vários co-receptores são utilizados pelas proteínas estruturais E1 e E2 do vírus para adentrar a célula hospedeira. A presença da proteína transmembranar CD81, receptor scavenger B tipo I (SR-BI), ocludina e claudina-1 facilitam a entrada do HCV. O receptor scavenger classe B tipo I (SR-BI) foi o primeiro fator de entrada estudado na célula alvo, considerado como padrão de ligação à proteína viral E2, através da região hipervariável I (HVR-I). Além dessas moléculas, o receptor de lipoproteína de alta densidade (HDL-R) é usado pelo vírus, que se associa com lipoproteínas formando partículas lipovirais ricas em colesterol para facilitar sua entrada nos hepatócitos (SCARSELLI et al., 2002; BARTOSCH; VITELLI; et al., 2003; EVANS et al., 2007; SCHOLTES et al., 2012). O SR-BI atua como o principal receptor para a lipoproteína de alta densidade (HDL). Esse receptor é altamente expresso no fígado promovendo a captura seletiva do colesterol HDL para dentro dos hepatócitos (MEREDITH et al., 2012).

Outro fator de entrada que está envolvido em muitas funções incluindo adesão, morfologia, proliferação e diferenciação celular é a tetrasparina (CD81) humana, constituída de 4 domínios transmembrânicos, que são dois domínios curtos intracelular e dois longos extracelular. Os fatores SR-BI juntamente com a CD81 estão envolvidos nas fases iniciais de entrada do HCV, gerando uma troca

conformacional nas glicoproteínas do envelope E1/E2, facilitando assim, a fusão e endocitose viral (MEREDITH et al., 2012).

Outras proteínas ativas atuantes na entrada do HCV nas células alvo são as proteínas claudin- 1 (CLDN1) e ocludina (OCLN), apesar de não apresentarem uma interação diretamente com o vírus. No entanto, a CLDN1 pode interagir com a CD81 como parte do complexo receptor para o HCV (EVANS et al., 2007; PLOSS et al., 2009).

## **5.2 Resposta imune inata e adaptativa**

O vírus da hepatite C tem a capacidade de infectar tanto as células hepáticas, quanto as células do sistema imune (BARNABA, 2010). O reconhecimento do vírus pelas células da imunidade inata é mediado pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), presentes principalmente nas células dendríticas e monócitos. Os principais receptores envolvidos na indução da resposta imune e produção de interferon do tipo I são os receptores do tipo Toll (TLR) e Nod-like (BLACKARD et al., 2006; BARNABA, 2010). Os receptores toll TLR-3 e TLR-7 encontrados no endossoma reconhecem RNA de fita dupla e simples, respectivamente. Esses receptores ativam as vias TRIF (domínio contendo adaptadores de indução do interferon- $\beta$ ) e IRF (fator regulador de interferon) para a produção de interferon, quando reconhecido por TLR-3. O reconhecimento via TLR-7 ativa a via MyD88 e fator de transcrição NF- $\kappa$ B para produzirem as citocinas pró-inflamatórias (HOSHINO et al., 2006).

As proteínas do CORE e NS3 do HCV são reconhecidas pelo TLR-2 associados com TLR1 e TLR6 que sinalizam para a produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8.

TLR-4 é ativado pela proteína NS5A induzindo assim a produção de IFN do tipo I e IL-6 (MACHIDA et al., 2006; SATO et al., 2007).

Apesar do papel crucial desses receptores, estudos recentemente “*in vitro*” tem demonstrado que as proteínas NS3A, NS4A e NS5A agem bloqueando e inibindo a produção de IFN- $\beta$  pelos hepatócitos e células imunes. Enquanto que as proteínas do CORE do HCV inibem diretamente o fator regulador 3, e o fator de transcrição NF- $\kappa$ B que estão diretamente relacionados com a produção de IFN (LIN et al., 2006).

Após o reconhecimento dos peptídeos virais pelas células dendríticas (DCs) presentes no fígado, ocorre a migração destas para os linfonodos e ativação dos linfócitos T auxiliares, através das moléculas co-estimulatórias CD80/CD86 e pelas moléculas do antígeno leucocitário humano de classe II (HLA II). Essas células são antígenos-específicas e vão expressar moléculas CD40 e secretar TNF- $\alpha$  e outras citocinas pró-inflamatórias que vão potencializar a resposta imune (HIROISHI et al., 2010).

As DCs irão estimular ainda a ativação dos linfócitos T citotóxicos (CTLs), através da apresentação de antígenos via moléculas de HLA tipo I e a diferenciação dos linfócitos T naíve em células de perfil T<sub>H</sub>1, após a liberação de Interleucina-12 (IL-12). A produção das citocinas IL-2 e IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T<sub>H</sub>1 irão induzir a proliferação dos CTLs específicos contra o HCV (HIROISHI et al., 2010).

O interferon (IFN) é uma citocina chave para ação antiviral e é secretada tanto por células da imunidade inata quanto pelas células da imunidade adaptativa. Essas citocinas são caracterizadas pela sua capacidade antiviral e podem ser divididas em interferon do tipo I (IFN- $\alpha/\beta$ ), tipo II (IFN- $\gamma$ ) e tipo III (IFN- $\lambda$ 1- $\lambda$ 2- $\lambda$ 3), que usam



receptores específicos para mediar a sinalização celular. Essas citocinas atuam como um potente agente antiviral e são codificadas pelos genes de estimulação de interferon (ISGs) (DICKENSHEETS et al., 2012).

Além de apresentar uma ação antiviral o IFN tem um papel na regulação da IL-12p70, que é uma citocina crucial para o perfil  $T_H1$  (GAUTIER et al., 2005). As citocinas secretadas pelos linfócitos  $TCD4^+$  de perfil  $T_H1$  (IFN e IL-12) parecem estar relacionadas com uma infecção auto-limitada durante a fase aguda da doença, contudo citocinas do perfil  $T_H2$  (IL-4) podem contribuir para a cronicidade da infecção (BYRNES et al., 2007; DAVTYAN et al., 2013).

Durante a terapia antiviral contra o HCV os níveis de citocinas de perfil  $T_H1$ , principalmente o interferon, aumentam em consonância com a terapia medicamentosa. Em contrapartida as citocinas de perfil  $T_H2$  tendem a diminuir com a diminuição da carga viral (THIMME et al., 2002; DAVTYAN et al., 2013).

A forte resposta mediada pelos linfócitos  $TCD4^+$  e  $TCD8^+$  pode estar envolvida com a eliminação viral, estabelecendo uma proteção a reinfecção. Porém, o papel da resposta humoral ainda não está claro em relação à proteção contra o vírus (SEMMO et al., 2006). A produção de anticorpos pelos linfócitos B durante resposta imune humoral é fundamental na neutralização de partículas virais livres, e para impedir a entrada do vírus nas células não infectadas do hospedeiro. Porém, apesar da existência de anticorpos neutralizantes, como aqueles contra a região E2 do HCV, a resposta humoral ainda é ineficiente, provavelmente pela rápida seleção de variantes de escape ou por uma falha desses anticorpos em induzir a eliminação do vírus (SEMMO et al., 2006).

O fígado apresenta uma grande população de células natural killer (NK) e NKT da imunidade inata que atuam na modulação da resposta adaptativa e ação antiviral (CROTTA et al., 2002; SWAIN, 2010). Essas células participam do aumento da expressão de receptores de ativação e na citotoxicidade da doença crônica (CROTTA et al., 2002).

Semanas após a infecção pelo vírus da hepatite C pode-se encontrar linfócitos T, específicos para HCV no sangue periférico e no fígado (REHERMANN, 2009). Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> específicos para o HCV desempenham um papel importante na eliminação do vírus na fase aguda e crônica da doença. Embora estejam em maior quantidade no tecido hepático, essas células possuem uma menor capacidade de citotoxicidade e produção deficiente de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , além do aumento na expressão do receptor programador de morte-1 (PD-1). Tal fenômeno tem sido relacionado com a presença de interleucina 10 (IL-10) no fígado, que diminui a resposta efetora das células T CD8<sup>+</sup> específicas ao HCV (ACCAPEZZATO et al., 2004; BARNABA, 2010; TAN et al., 2012).

Na resposta mediada pelas células TCD4<sup>+</sup>, é observado um aumento na produção de IFN- $\gamma$  e IL-2, principalmente na infecção aguda e em pacientes com níveis elevados de ALT. As células TCD4<sup>+</sup> ajudam a manter a resposta antiviral das células B e das células de memória TCD8<sup>+</sup> e sua menor atuação na resposta pode estar relacionada à progressão da infecção crônica (MISSALE et al., 1996).

Os linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> que produzem o fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) contribuem também para evolução para fase crônica da doença, suprimindo a resposta antiviral. No entanto, a produção das citocinas regulatórias TGF- $\beta$  e IL-10 podem proteger o hospedeiro infectado diminuindo o dano hepático. Quanto as células T regulatórias CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> (Treg), estas

parecem ser estimuladas durante a infecção pelo HCV e apresentam uma função moduladora na inflamação, estabelecendo um equilíbrio entre a resposta pró e anti-inflamatória (ALATRAKCHI et al., 2007).

Vários fatores influenciam na resposta contra o vírus da hepatite C. As proteínas do HCV interferem na produção de interferon (IFN) nos hospedeiros infectados bloqueando a via Jak-STAT (KIM et al., 2009).

As proteínas virais do HCV modulam a resposta celular endógena e a produção e sinalização do IFN- $\alpha$ . As proteínas do CORE atuam impedindo a fosforilação do STAT1 e a proteína não estrutural NS5A impede a translocação da proteína fosforilada STAT1 (pSTAT1) para o núcleo celular (LIN et al., 2006).

Os ativadores de transcrição e ativadores de sinal (STAT) possuem sete membros (STAT 1, 2, 3, 4, 5a, 5b e 6), focalizados em suas funções de sinalização (SCHINDLER et al., 2007). A Janus kinase é responsável pela transcrição dos STATs ativando uma cascata de tradução de sinais para muitas citocinas e fatores de crescimento. As vias JAK (JAK 1-2-3 e Tyk2) e STAT (STAT1-2-3-4-5a-5b e 6) dependem de resíduos de tirosina específicos para serem ativadas. Quando ativadas são fosforiladas, resultando na dimerização do STAT e translocação nuclear (HOSUI et al., 2003).

A ativação das vias JAK/STAT se dá pela ligação dos seus ligantes aos receptores específicos, ativando a tirosina kinase, a fosforilação e dimerização dos STATs e pôr fim a modulação dos genes alvos STAT dimerizados. A cascata de transdução de sinal JAK/STAT quando ativada acabam mediando à ação dos interferons assim como de outras interleucinas e fatores de crescimento (BODE et al., 2003).

No caso do STAT-1 as vias JAK1, JAK2 e STAT-1 são fosforiladas e o STAT-1 é homodimerizado, resultando em uma translocação nuclear e estimulando a produção de IFN do tipo I (HOSUI et al., 2003).

Os interferons do tipo I quando ligados no receptor de interferon (IFNAR) ativam a fosforilação JAK1 e Tyk2 que após uma fosforilação dos STATs expressam os genes ISGs (NOVICK; COHEN, 1994).

Diferentemente do interferon do tipo I que é produzido por várias células como, por exemplo, os hepatócitos, o interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) que é do tipo II é restrito somente aos linfócitos T e células NK (MIHM et al., 2004).

A presença citoplasmática do HCV nos hepatócitos ativa o STAT3 e conseqüentemente eleva a expressão da interleucina 6 (IL-6) além da gp130 e do receptor de leptina. Somente o receptor de leptina de cadeia longa (receptor Ob) tem a capacidade de ativar a via de sinalização JAK2/STAT3 nos hepatócitos (BASU et al., 2006).

A IL-10 inibe a resposta pró-inflamatória das células da imunidade inata e adaptativa. A sinalização de IL-10 se dá pela fosforilação do STAT3 após a ligação da IL-10 ao seu receptor específico, ativando as JAK1 e TyK2 (PESTKA et al., 2004).

O tempo de duração de sinalização ao núcleo para a produção de uma citocina pode ser de minutos ou mesmo horas. Por essa razão a transdução de sinal apresenta um controle rígido por inativação e remoção das moléculas STATs ativadas, e um dos mecanismos importantes que atuam nesse controle são os supressores de sinalização de citocinas (SOCS) (BODE et al., 2003).

Supõem-se que vírus da hepatite C na maioria das vezes consegue escapar da resposta imunológica antiviral ativando e mediando a via do SOCS que vão

regular e inibir a ativação do STAT-1 dos hepatócitos (VELDT et al., 2012). Por inativar e inibir a transdução de sinais de citocinas principalmente os IFNs, os vírus podem utilizar esse mecanismo para inibir a resposta antiviral (BODE et al., 2003).

Assim, esses genes são ativados e controlados pelos receptores associados à fosfatases, supressores de sinalização de citocinas (SOCS) e inibidor de proteínas STATs ativadas (PIAS3). Através desses controladores das vias JAK/STAT as proteínas virais poderiam inibir a indução das citocinas antivirais e conseqüentemente diminuir a ação da resposta imune ao agente infeccioso (HEIM et al., 1999).

*Objetivos*

---

---

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo Geral

- Produzir, expressar e purificar as proteínas recombinantes CORE, NS3, NS4b e NS5a do vírus da Hepatite C, otimizadas para *E. coli* e analisar a reatividade destas proteínas frente aos soros de pacientes com hepatite C crônica.

### 6.2 Objetivos Específicos

- Desenhar os genes sintéticos (CORE, NS3, NS4 e NS5) do vírus da Hepatite C, otimizados para *Escherichia coli*;
- Subclonar os genes sintéticos (CORE, NS3, NS4 e NS5) em vetor de expressão de *E. coli*;
- Expressar os genes clonados de *Escherichia coli*;
- Purificar as proteínas do HCV (CORE, NS3, NS4 e NS5) expressas;
- Testar e analisar a reatividade das proteínas recombinantes do HCV produzidas frente a soros de indivíduos infectados com o vírus da Hepatite C.



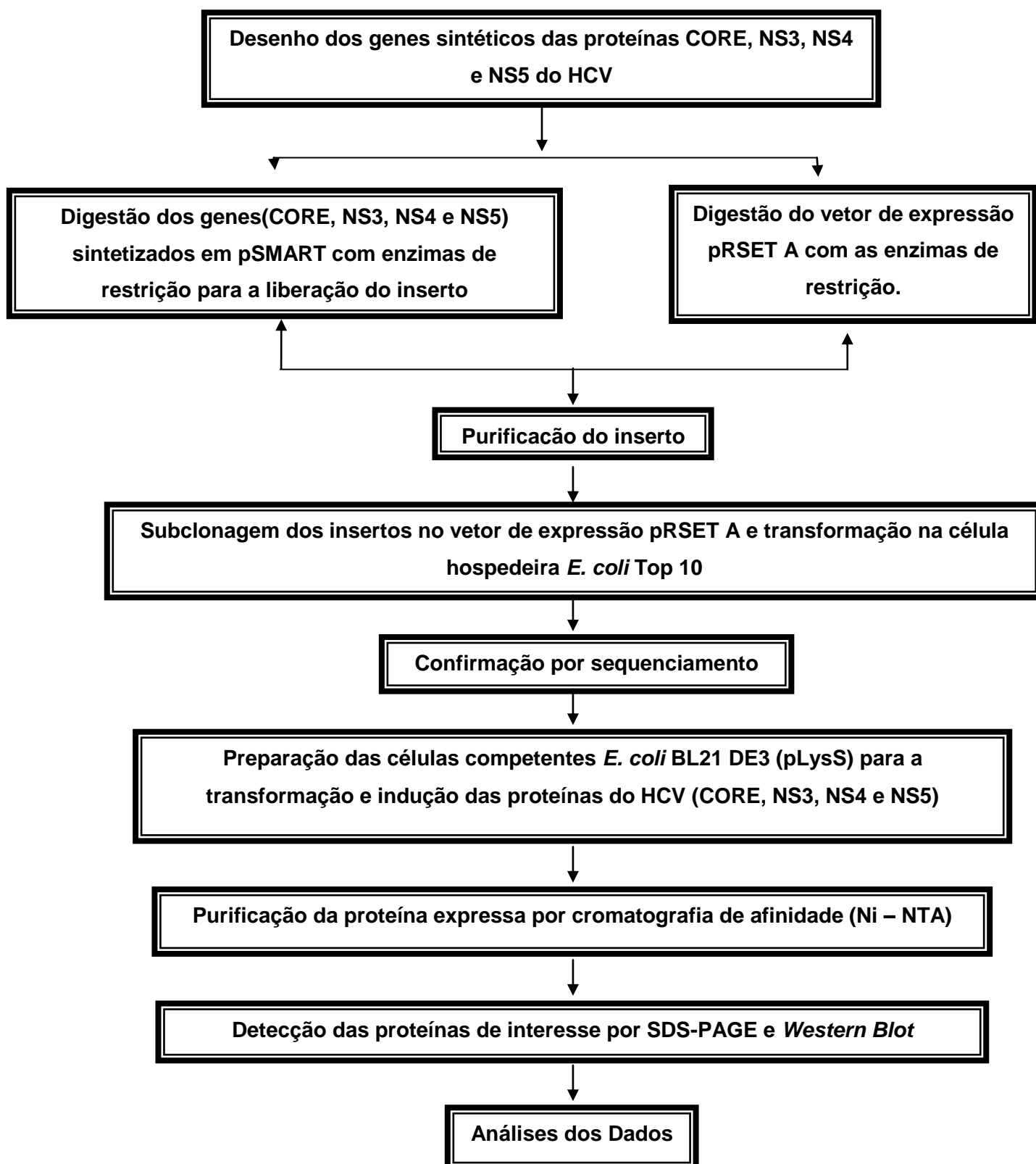


## 7. MATERIAL E MÉTODOS

### 7.1 Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo descritivo, transversal, constituindo subprojeto de um estudo maior da linha de pesquisa sobre o vírus da hepatite C intitulado: **“Produção de Proteínas do CORE, NS3, NS4 e NS5 para caracterização da resposta imune celular e humoral em pacientes com Hepatite C na Amazônia”**, desenvolvidos pelo grupo de Pesquisa “Imunologia Básica e Aplicada” da Universidade Federal do Amazonas, em parceria com a Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado (FMT – HVD), Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD) - Fiocruz Amazônia e Universidade Federal do Pará.

## 7.2 Fluxograma de desenvolvimento do estudo



### **7.3 População do Estudo**

As amostras de soros que fizeram parte desta pesquisa foram provenientes do estudo de Soriane Cruz (2013), onde as amostras foram coletadas no centro de pesquisa da FMT-HVD no período de setembro de 2011 a janeiro de 2013. Foram coletadas amostras de indivíduos com diagnóstico sorológico positivo para Hepatite C (Anti-HCV) pelo método de ELISA, de ambos os sexos, com idade entre 18 a 65 anos e sem tratamento prévio para infecção pelo vírus da Hepatite C. Foram excluídos pacientes co-infectados com os vírus da Hepatite A, B, D, E vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), os que já haviam iniciado o tratamento da hepatite C e aqueles que apresentavam cirrose descompensada.

O grupo controle utilizados neste projeto foram de candidatos a doadores de sangue da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas que não apresentaram resultados positivos nos testes de triagem sorológicas para Hepatites virais, HIV, Sífilis, Doença de Chagas e HTLV I e II.

### **7.4 Conservação das Amostras**

As amostras de soros utilizadas neste estudo foram armazenadas na soroteca da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas e mantidas a -20° C para a manutenção do material biológico.

### **7.5 Aspectos Éticos**

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.

**CAAE: 19381813.5.0000.0009.**

As amostras sanguíneas utilizadas no presente estudo estão vinculadas ao projeto: “**Avaliação da resposta imune e frequência do polimorfismo de TNF- $\alpha$ -308 em pacientes com Hepatite C**”, aprovado pelo comitê de ética FMT- HVD CAAE: 00330114000-09.

## **7.6 Produção das proteínas recombinantes**

### **7.6.1 Desenhos dos genes sintéticos para produção das proteínas recombinantes**

As sequências dos genes utilizados para o desenho das proteínas recombinantes foram baseadas no depósito no *gene bank* ACJ37216.1 (gi|212675045, polyprotein [Hepatitis C virus *subtype* 1a, NCBI]). A sequência correspondente a cada gene foi inserida no programa de correção de “viés de códon” para *Escherichia coli*, disponibilizado pelo *site* da empresa *IDT*, buscando assim otimizar a expressão das proteínas neste hospedeiro. Foram adicionados sítios de restrição para as enzimas *Xho*I, no início dos genes, e *Pst*I, no final. O gene NS5 foi dividido ao meio em dois fragmentos (F1 e F2), sendo possível uni-los através de um sítio para enzima *Bam*HI. NS3, devido a sua grande extensão, foi inicialmente analisado no programa “MHC *class II binding prediction*”, visando selecionar os epítomos mais relacionados com uma resposta celular. Cinco regiões foram selecionadas, sendo adicionados os mesmos sítios de restrição citados anteriormente em suas extremidades.

Estas informações foram enviadas ao fabricante de genes sintéticos (*IDT - Integrated DNA Technologies*) para síntese. Análise de bioinformática para

identificar a massa molecular esperada de cada proteína foi realizada no programa *Protparam* (<http://web.expasy.org/protparam/>).

| PROTEÍNAS | ENZIMAS DE RESTRIÇÃO | PLASMÍDEO DE EXPRESSÃO | TAMANHO DO GENE |
|-----------|----------------------|------------------------|-----------------|
| CORE      | XhoI e PstI          | pRSET A                | 594 pb          |
| NS3       | XhoI e PstI          | pRSET A                | 897 pb          |
| NS4b      | XhoI e PstI          | pRSET A                | 804 pb          |
| NS5a F1   | XhoI e EcoRI         | pRSET A                | 678 pb          |
| NS5a F2   | BamHI e PstI         | pRSET A                | 692 pb          |

**Quadro 1:** Dados da expressão das proteínas: plasmídeos de expressão (pRSET), respectivas enzimas de restrição e o tamanho do gene.

Tabela 1: Sequências de DNAs otimizados para *E. coli* das proteínas do HCV

| PROTEÍNAS      | SEQUÊNCIA DE DNA   |
|----------------|--|
| <b>CORE</b>    | CTC GAG CAT ATG ATG TCA ACG AAC CCT AAA CCG CAA CGT AAA ACG AAA CGC AAC ACC AAC CGC CGT CCG CAG GAT GTC AAA TTT CCG GGC GGC GGG<br>CAG ATT GTG GGT GGT TAC TTA CTT CCA CGC CGT GGC CCG CGT CTC GGC GTA CGT GCC ACA CGG AAG ACC AGC GAG CGG TCT CAG CCG CGT GGC<br>CGC CGT CAA CCA ATT CCG AAA GCT CGT CGT CCA GAG GGT CGT GCC TGG GCA CAA CCT GGC TAT CCC TGG CCA CTC TAT GGC AAT GAG GGG TGC GGA<br>TGG GCG GGC TGG CTG TCC CCG CAC GGA TCC CGG CCC AGC TGG GGT CCA ACA GAC CCG CGT CGT CGC AGC CGC AAT CTG GGT AAG GTA ATT GAT<br>ACT TTG ACG TGC GGG TTT GCA GAT TTA ATG GGC TAC ATT CCG CTG GTG GGC GCG CCG CTG GGC GGT GTG GCA AAG GCT CTG GCG CAT GGT GTT CCG<br>GTC CTG GAG GAT GGA GTG AAC TAT GCA ACC GGT AAT CTG CCA GGA TGT AGT TTT TCA ATT TTC CTG CTC GCT CTC CTC TCC TGT CTG ACC GTA CCG<br>GCG AGT GCC TAA CTG CAG  |
| <b>NS3</b>     | <b>CTCGAG CATATG</b> TGT ATC ATT ACG TCA TTG ACA GGT CGT GAT AAA AAT CAA GTG GAA GGC GAA GTT CAA ATC GTC TCA ACA GCG GCT CAG ACG TTC<br>CTG GCG ACA TGC ATT AAT GGC GTT TGC TGG AGC GTT TAT CAC GGA GCA GGC ACC CGC ACT ATT GCG TCG CCG AAA GGG CCG GTC ATC CAG ATG TAT<br>ACC AAC GTT GAC AAG GAT TTG <b>CCATGG</b> CAG GGC TAC AAA GTA CTG GTA CTT AAC CCG TCC GTT GCG GCT ACC CTG GGT TTT GGC GCA TAT ATG TCC<br>AAG GCG CAT GGT GTT GAA CCG AAT ATC CGC ACG GGG GTT CCG ACC ATC ACC ACT GGC AGC CCG ATT ACA TAC AGT ACG TAC GGT AAA TTT CTT GCC<br>GAT GGT GGG TGC <b>GTCGAC</b> ACG GAT GCG ACC TCA ATC CTC GGC ATT GGG ACT GTG CTG GAC CAA GCG GAA ACG GCT GGC GCC CGC TTA GTG GTC CTG<br>GCA ACG GCA ACC CCA CCG GGG TCC GTA ACG <b>GGATCC</b> ATT CCC TTC TAT GGT AAG GCT ATC CCG CTC GAA GCT ATT AAG GGC GGT CGC CAT CTG ATC<br>TTT TGC CAC TCG AAA AAG AAA TGT GAT GAA CTC GCC GCG AAA CTG GTT GCC CTG GGT ATT AAC GCC GTA GCG TAC TAT CCG GGC TTA GAC GTC TCA<br>GTG ATC CCG ACC AGC GGC GAT GTC <b>GAATTC</b> CCG TAC CTG GTC GCG TAT CAA GCA ACC GTT TGT GCC CGC GCC CAG GCA CCC CCA CCG AGC TGG GAC<br>CAA ATG TGG AAA TGT CTG ATT CCG CTG AAG CCC ACT TTA CAT GGC CCA ACC CCG TTG CTG TAT CCG TTA GGG GCC GTG CAG AAT GAA GTC ACC CTC<br>ACC CAC CCT GTT ACC AAA <b>TAA</b> CTGCAGAGCTT |
| <b>NS4b</b>    | CTC GAG CAT ATG AGT CAG CAT TTG CCT TAT ATT GAG CAG GGA ATG ATG CTC GCC GAA CAG TTT AAA CAG AAA GCA TTA GGT CTC TTG CAG ACA GCG<br>TCG CGT CAG GCG GAA GTG ATC ACT CCC GTT GTC CAG ACG AAT TGG CAG AAA CTT GAA GCG TTT TGG GCG AAA CAC ATG TGG AAC TTC ATC TCC GGT<br>ATT CAG TAT TTA GCA GGT CTT AGC ACG CTC CCG GGC AAT CCA GCA ATC GCT TCT CTC ATG GCG TTT ACA GCG GCT GTC ACG TCA CCA CTG ACT ACC<br>AGT CAG ACC TTG CTG TTC AAC ATC TTA GGT GGT TGG GTT GCG GCC CAG CTC GCA GCA CCG GGT GCC GCA ACG GCG TTC GTG GGG GCG GGC CTG GCA<br>GGT GCG GCT ATC GGA TCC GTG GGG CTG GGC AAA GTG TTA GTC GAC ATT TTA GCT GGT TAT GGC GCC GGT GTG GCG GGT GCC CTG GTG GCC TTC AAA<br>ATC ATG TCG GGC GAA ACT CCG TCG ACC GAA GAT CTG GTT AAT CTC CTG CCT GCA ATC TTG AGT CCT GGG GCG TTA GTG GTT GGC GTG GTT TGC GCA<br>GCC ATT CTG CGT CGC CAT GTA GGT CCG GGT GAA GGT GCT GTT CAA TGG ATG AAC CGC CTC ATC GCG TTC GCC AGC CGC GGC AAC CAT GTG TCC CCG<br>ACC CAT TAC GTT CCT GAA TCG GAC GCG GCT GCC CGC GTA ACG ACG ATC TTA AGC AGC CTG ACG GTG ACT CAG CTG CTG CGT CGT CTG CAC CAG TGG<br>ATC TCT TCA GAA TGC ACC ACC CCC TGC TAA CTG CAG  |
| <b>NS5a F1</b> | CTC GAG CAT ATG TCG GGC TCC TGG CTG CCG GAT ATT TGG GAT TGG ATT TGT GAG GTG CTT AGC GAC TTT AAG ACT TGG CTG AAA GCC AAG CTG ATG<br>CCG CAA CTC CCG GGC ATC CCC TTT GTG TCG TGT CAG CGT GGC TAC CGT GGT GTC TGG CCG GGG GAT GGT ATT ATG CAT ACA CGT TGC CAT TGC GGC<br>GCG GAA ATT ACG GGT CAT GTG AAG AAC GGT ACG ATG CGC ATT GTG GGC CCG CGC ACG TGC CGT AAT ATG TGG AGC GGC ACA TTT CCA ATT AAC GCA<br>TAT ACC ACG GGT CCT TGC ACG CCG TTA CCG GCC CCC AAT TAC AAG TTC GCT CTG TGG CCG GTC TCA GCG GAA GAA TAT GTC GAG ATC CGT CAA GTA<br>GGG GAC TTT CAT TAC GTG ACT GGG ATG ACT ACA GAT GAC CTG AAA TGT CCG TGC CAG GTG CCA TCG CCC GAG TTC TTC ACT GAA TTA GAT GGC GTT<br>CGC TTG CAC CGT TTT GCG CCC CCG TGT AAA CCC CTG CTG CGT GAA GAA GTG AGC TTC CGT GTG GGC CTG CAC GCG TAT CCG GTC GGC TCG CAG CTG<br>CCC TGC GAG CCT GAA CCC GAC GTC ACG GTC GTC ACC AGT ATG CTG ACC GAT CCG TCC CAC ATT ACG GCA GAA GCG GCA GGA CGC CGC CTG GCA CGC<br>GGA TCC GAA TTC   |
| <b>NS5a F2</b> | GGA TCC CCG CCG TCA TTA GCG TCG TCC TCG GCC TCA CAG CTT TCC GCG CCT TCT CTG AAA GCC ACG TGC ACC GCG AAT CAC GAT TCA CCG GAC GCG<br>GAG CTG ATT GAA GCT AAC CTG CTG TGG CGT CAG GAA ATG GGC GGA AAC ATT ACC CCG GTA GAG AGC GAG AAC AAA GTC GTA ATC TTG GAC AGC TTC<br>GAC CCT CTT GTC GCT GAA GAA GAC GAG CCG GAG ATC AGT GTT CCG GCA GAG ATT CTG CGT AAG CAC CGC CGC TTT GCG CGC GCG CTT CCG GTC TGG<br>GCG CGC CCG GAT TAC AAC CCA CCG CTG CTG GAA ACT TGG AAG AAA CCG GAC TAT GAA CCC CCG GTC GTA CAT GGT TGC CCG TTG CCT CCG CCA CAG<br>TCG CCG CCG GTG CCC CCC CCT CGC AAA AAA CGC ACC GTT GTT CTG ACG GAG TCA ACC GTA AGT ACC GCG TTG GCC GAA CTT GCC ACG AAA TCT TTT<br>GGC TCA CCG AGT ACC TCT GGA GTG ACG GGC GAT AAT CGC ACC ACG CCG TCG GAA CCG GCC TCA AGT GGC TGC CCA CCG GAC AGC GAC GCA GAG TCG<br>CAC TCT TCA ATG CCG CCT CTC GAA GGT GAA CCT GGC GAC CCC GAT CTG AGT GAT GGG TCA TGG AGT ACG GTG TCG TCG GGT ACC GGC ACC GAG GAC<br>GTC GTT TGC TGC TAA CTG CAG   |

**Tabela 2:** Sequências de aminoácidos das proteínas (CORE, NS3, NS4b, NS5a F1 e NS5a F2)

| PROTEÍNAS      | SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS   |
|----------------|--|
| <b>CORE</b>    | LEHMSSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVRATRKTSESRQ<br>PRGRRQPIPKARRPEGRAWAQPGYPWPLYGNEGCGWAGWLLSPHGSRPSWGPTDPRRRSR<br>NLGKVIDTLTCGFADLMGYIPLVGAPLGGVAKALAHGVRVLEDGVNYATGNLPGCSFSIF<br>LLALLSCLTVPASA-LQ   |
| <b>NS3</b>     | LEHMCIIITSLTGRDKNQVEGEVQIVSTAAQTFLATCINGVCWSVYHGAGTRTIASPKGPV<br>IQMYTNVDKDLPWQGYKVLVLPNSVAATLFGAYMSKAHGVEPNIRTGVRTITTGSPITY<br>STYGFADGGCVDTDATSILGIGTVLDQAETAGARLVLATATPPGSVTGSIIFYGKAI<br>PLEAIKGRHLIFCHSKKKCDELAAKLVALGINAVAYYRGLDVSVIPTSGDVEFPYLVAY<br>QATVCARAQAPPPSWDQMWKCLIRLKP TLHGPTPLLYRLGAVQNEVTLTHPVTK-LQKL |
| <b>NS4b</b>    | LEHMSQHLPYIEQGMMLAEQFKQKALGLLQOTASRQAEVITPVVQTNWQKLEAFWAKHMWN<br>FISGIQYLAGLSTLPGNPAIASLMAFTAAVTSPLTTSQTLLFNILGGWVAAQLAAPGAAT<br>AFVAGLAGAAIGSVGLGKVLVDILAGYGAGVAGALVAFKIMSGETPSTEDLVNLLPAIL<br>SPGALVVGVCAAILRRHVGPEGAVQWMNRLIAFASRGNHVSPTHYVPESDAAARVTII<br>LSLTVTQLLRRLHQWISSECTTPC-LQ                                |
| <b>NS5a F1</b> | LEHMSGSWLRDIWDWICEVLSDFKTWLKAKLMPQLPGIPFVSCQRGYRGVWRGDGIMHTR<br>CHCGAEITGHVKNGTMRIVGPRTCRNMWSGTFPINAYTTGPCTPLPAPNYKFALWRVSAE<br>EYVEIRQVGFHYVTGMTDDDKCPCQVPSPEFFTELDGVRHLRFAPPCKPLLEEVFSFR<br>VGLHAYPVGSQLPCEPEPDVTVVTSMLTDP SHITAEAAAGRRLARGSPPSLASSASQLSA  |
| <b>NS5a F2</b> | PSLKATCTANHDS PDAELIEANLLWRQEMGGNITRVESENKVVILDSFDPLVAEEDEREI<br>SVPAEILRKHRRFARALPVWARPDYNPPLLETWKKPDYEPVHVHGCPLPPPQSPVPPPR<br>KKRTVVLTSTVSTALAEATKSFSGSPSTSGVTGDNATTPSEPASSGCPPDSDAESHSSM<br>PPLEGEPGDPDLSDGSWSTVSSGTGTEDVVCC-LQ   |

## 7.6.2 Digestão do Vetor de Clonagem com Enzimas de Restrição

O gene sintético produzida pelo fornecedor *IDT Integrated DNA Technologies* em plasmídeo de clonagem pSMART (figura 05), foi digerido de acordo a produção de cada proteína recombinante. Utilizou-se 1,5µl de cada enzima de restrição (*Invitrogen TM*), 2,5µl do vetor de clonagem pSMART, 2µl tampão das respectivas enzimas e completou-se com H<sub>2</sub>O para um volume final de 20µl, seguida de incubação a 37 ° C por 1 hora. Posteriormente, o produto foi submetido à eletroforese em tampão TBE 1X a 100 V, utilizando agarose na concentração 1.5%, para a verificação das respectivas bandas em gel. Em seguidas as bandas obtidas da digestão foram purificadas, através do kit Gel Extraction Kit (250) Qiaquick ® (QIAGEN ®), conforme as instruções do fabricante.

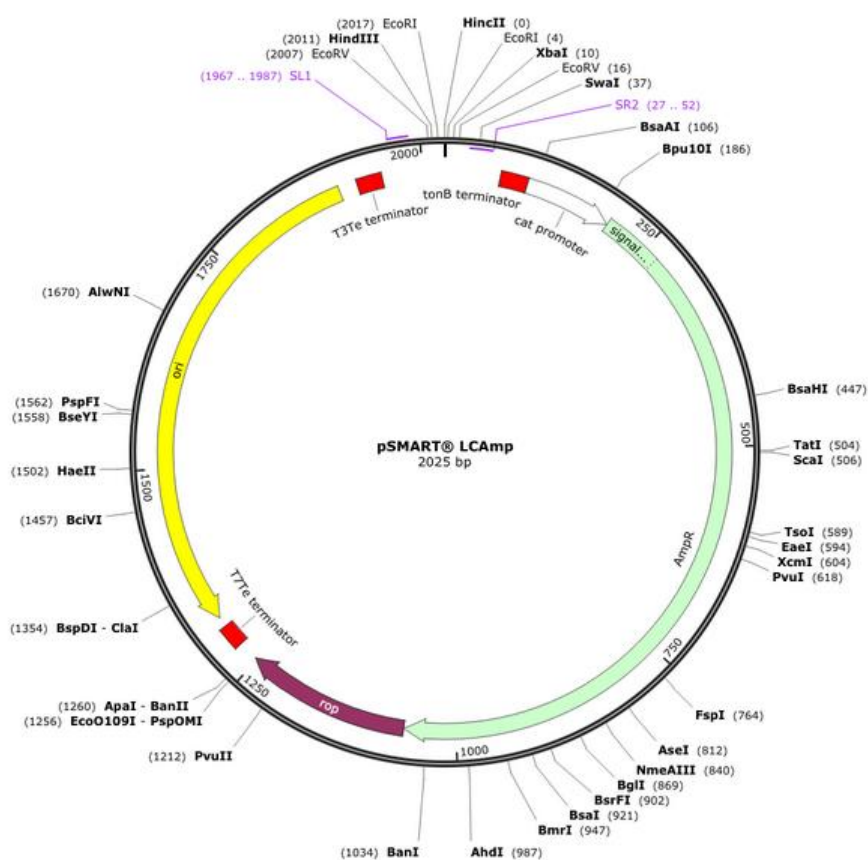


Figura 5: Mapa do plasmídeo pSMART com várias regiões presentes nele

Fonte: Disponível em: <http://www.snapgene.com>



### 7.6.3 Subclonagem em Vetor de Expressão pRSET

Os fragmentos, depois de digeridos e purificados foram ligados ao vetor de expressão pRSET (*invitrogen<sup>TM</sup>*) (**Figura 04**). Utilizou-se a proporção 3:1 (fragmento: vetor) para ligação em plasmídeo de expressão utilizando a enzima T4-Ligase (*Invitrogen<sup>TM</sup>*). O volume final de 50  $\mu$ l foi dividido entre os outros reagentes que compõem a reação, foi então incubadas no termociclador a uma temperatura de 16  $^{\circ}$ C por 16 horas.

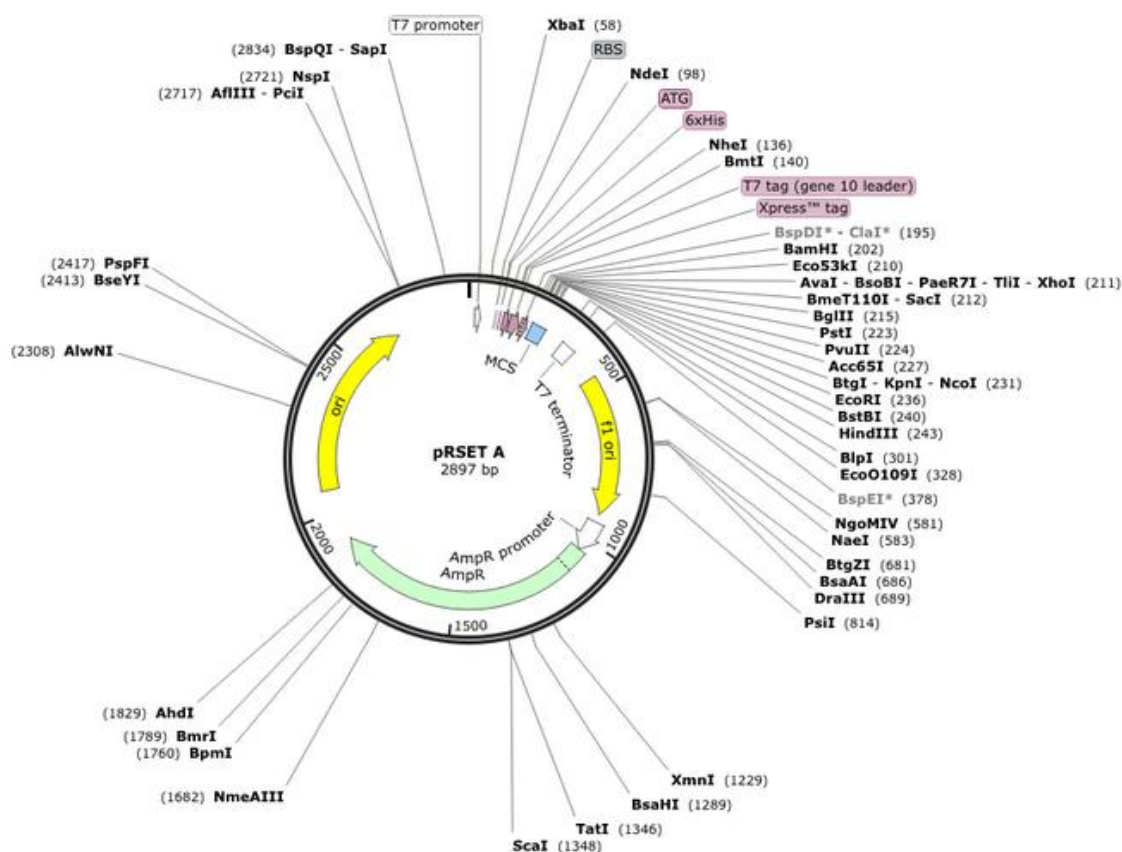


Figura 6: Mapa do plasmídeo pRSET A com várias regiões presentes nele.

Fonte: Disponível em: <http://www.snapgene.com>

| CEPAS BACTERIANAS      | CARACTERISITCAS                         | FABRICANTE        |
|------------------------|---|-------------------|
| <b>TOP 10</b>          | <i>E. coli</i> para ensaios de clonagem | <i>Invitrogen</i> |
| <b>BL21(DE3) pLyss</b> | <i>E. coli</i> para expressão proteica  | <i>Invitrogen</i> |
| PLASMÍDEOS             |   |                   |
| <b>pSMART</b>          | Vetor de clonagem                       | <i>IDT</i>        |
| <b>pRSET A</b>         | Vetor de expressão                      | <i>Invitrogen</i> |

**Quadro 2:** Cepas e plasmídeos utilizados para clonagem e expressão das proteínas recombinante.

#### 7.6.4 Precipitação por acetato de amônia

Após a incubação de 16 horas a 16 °C foi transferido o volume final da ligação de 50µl que estavam em microtubos de PCR para microtubos de 1,5mL. Foram adicionados 10% do volume final da ligação de acetato de amônia 7,5 M, 2,5µl de glicogênio (1µl para cada 20µl de solução) e foi bem homogeneizado. Após essa etapa adicionou-se 125µl de álcool 100% (2,5 x o volume final da solução) e incubou-se por 60 minutos a -20 °C. Em seguida centrifugou-se por 40 minutos na potência máxima (16.400 rpm), após a centrifugação eliminou-se o álcool por inversão. Adicionou-se 100µl de álcool a 70% previamente gelado e centrifugou-se por 5 minutos na potência máxima. Depois de feita essa etapa o álcool foi eliminado

por inversão e deixou-se secar no fluxo laminar por 15 minutos e o pellet foi ressuspensionado em 2,5µl de H<sub>2</sub>O mili-Q.

#### **7.6.5 Preparação de Célula Competente para a Inserção do Plasmídeo Recombinante - Transformação em Top 10**

Antes da realização da transformação, foi preparada a célula quimicamente competente de *E. coli* TOP 10 (*Invitrogen*<sup>TM</sup>), sendo esta utilizada na primeira transformação, a outra foi realizada na *E. coli*, cepa BL21(DE3) pLysS (*Invitrogen*<sup>TM</sup>). Para o preparo de *E. coli*, cepa TOP 10 e BL21(DE3) pLysS (*Invitrogen*<sup>TM</sup>), quimicamente competente, utilizou-se o protocolo fornecido pelo grupo de Pesquisa em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas. Resumidamente, as bactérias foram incubadas em 300 ml de LB líquido até atingir D.O de 0.5 e, posteriormente, centrifugadas a 4.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C e o “pellet” foi ressuspensionado sucessivas vezes em tampão glicerol 10%.

Do produto resultante da ligação e precipitação (fragmento dos genes das proteínas do HCV+ pRSET) foi retirado 1µl e colocado em criotubo contendo 50µl de bactérias competentes da espécie *Escherichia coli*, linhagem TOP 10, em seguida incubada por cinco minutos em gelo. Posteriormente, colocou-se o conteúdo em cubeta de eletroporação para o choque térmico a 1.900 V no eletroporador. Em seguida adicionou-se ao conteúdo 450 µl de LB + (glicose 0,4% e MgCl<sub>2</sub> 20 mM final) e foram submetidas a crescimento por 1 hora a 37°C, sob agitação constante.

### **7.6.6 Crescimento e Seleção das Colônias**

Após o crescimento, as bactérias transformadas foram semeadas em placas de Petri com meio LB-ágar contendo 100µg/mL de ampicilina. Logo, as placas foram incubadas a 37°C por um período de 12 horas. As colônias transformantes, que apresentaram resistência a ampicilina, foram escolhidas aleatoriamente, repicadas organizadamente em uma segunda placa de LB Agar, com ampicilina e mantidas a 37 °C por 16 h.

### **7.6.7 Extração Plasmidial e Digestão para Confirmação da Orientação do Inseto**

No dia seguinte, as colônias foram cultivadas em 3 ml de meio LB líquido contendo ampicilina, a 37 ° C, por 16 horas. Posteriormente realizou-se um Miniprep das colônias, utilizando o kit Qiaprep spin (*QIAGEN*), conforme as recomendações do fabricante.

A orientação do inserto foi verificada por digestão. Utilizou-se 1,5µl de cada enzima de restrição (*Invitrogen*<sup>TM</sup>), 2,5µl do fragmento ligado ao vetor de clonagem pRSET A, 2µl do tampão das respectivas enzimas e completou-se com H<sub>2</sub>O para um volume final de 20µl, seguida de incubação a 37 ° C por 1 hora. Posteriormente, o produto foi submetido à eletroforese em tampão TBE 1X a 100 V, utilizando agarose na concentração 1.5%, para a verificação das respectivas bandas em gel.

### 7.6.8 Sequenciamento

Para o conhecimento da sequência de bases nitrogenadas correspondente ao gene em questão, realizou-se o sequenciamento das amostras (plasmídeo com o inserto das respectivas proteínas) em parceria com a Plataforma de Sequenciamento da Fundação Oswald Cruz / AM. Para esta reação, utilizou-se o oligo universal T7 senso e anti-senso em um analisador genético Abi 3100 (*Applied Biosystems*). Posteriormente, realizou-se a análise do sequenciamento por Bioinformática utilizando as ferramentas disponíveis online *Translate tool (Expasy)* e BLASTp (NCBI).

### 7.6.9 Transformação de Células Eletrocompetentes (*E. coli* BL21(DE3) pLysS).

Após a confirmação do inserto no plasmídeo de expressão, através da digestão com as respectivas enzimas de restrição e sequenciamento, realizou-se a inserção do plasmídeo em célula competente BL21. Para a inserção do plasmídeo de expressão recombinante, em célula bacteriana *E. coli* BL21 (DE3) pLysS quimicamente competente, utilizou-se o mesmo método de transformação por eletroporação e cultivo em LB ágar, porém desta vez foram utilizados os antibióticos ampicilina (100µg/mL) e clorofenicol (34µg/mL) para o crescimento bacteriano em placas foram . Por conseguinte, as colônias que apresentaram resistência a ampicilina e clorofenicol foram selecionadas por possuírem o plasmídeo com inserto e transformadas.

### 7.6.10 Cultivo e Indução das Proteínas do HCV

As colônias transformadas foram cultivadas em 3 ml de LB contendo os seguintes antibióticos, ampicilina (100µl/mL) e clorofenicol (34µl/mL) por 16 horas a 37 °C sob agitação constante. Após o crescimento das colônias, foram adicionados 1,5mL deste pré-inóculo em 500 mL de meio LB contendo os respectivos antibióticos. Posteriormente, o conteúdo foi incubado a 37°C sob agitação constante até atingir uma absorbância de  $A_{600} = 0.6$  D.O. A esse crescido foi adicionado reagente indutor IPTG na concentração final de 1mM. O conteúdo foi incubado a 37 °C sob agitação constante, por três horas e centrifugado a 4.000 rpm, por 15 minutos, a 4 °C.

### 7.6.11 Análise da Expressão das Proteínas

Para a análise da expressão das proteínas recombinantes (CORE; NS3; NS4; NS5), utilizou-se a técnica de eletroforese em gel poliacrilamida-SDS-PAGE 15% SDS-(*running gel*) e 5% (*stacking gel*), na presença da solução acrilamida/bisacrilamida 30%, Tris 1M pH 8.8, persulfato de amônia a 10% (APS); dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e 6µl de Temed e água miliQ para um volume final de aproximadamente 15ml. As proteínas foram aplicadas no gel com tampão de corrida (Tris 0,01M, pH 6,8; SDS 10%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,06% e DTT a 4%) e em seguida denaturadas por aquecimento á 95°C por 10 minutos. A eletroforese foi realizada sob corrente constante de 100 V até a coloração do azul de bromofenol alcance a extremidade inferior do gel. Após corrida em gel de

poliacrilamida, fixou-se a proteína em solução corante contendo azul de Coomassie (Coomassie blue 0,2%), ácido acético glacial 7%, etanol 40%, diluídos em H<sub>2</sub>O destilada, que além de fixá-las, mantém as proteínas desnaturadas. Uma vez coradas, foram submetidas à descoloração, utilizando os mesmos reagentes citados acima, exceto o Coomassie, para visualização e análise de proteínas.

#### **7.6.12 Purificação das Proteínas Recombinantes**

A proteína foi purificada pela técnica denominada Cromatografia de Afinidade com Metal Imobilizado (IMAC). Neste estudo, utilizou-se a coluna de purificação contendo íons Ni<sup>2+</sup> (*Qiagen*®) em afinidade a cauda de Histidina inserida na proteína. As retenções das proteínas do HCV foram testadas em várias concentrações de imidazol, em duplicata. Para a realização da purificação das proteínas recombinantes, a cultura do induzido, foi centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em tampão de lise contendo, 20mM Tris pH8.0, 500mM NaCl, 1mM de PMSF e glicerol a 10%. Em seguida, foram submetidas ao processo de lise celular por sonicação. O produto da sonicação foi centrifugado por 15 min a 14000 rpm e o sobrenadante recuperado. A coluna de purificação contendo íons Ni<sup>2+</sup> foi previamente lavada com H<sub>2</sub>O e tampão de lise. Posteriormente, foi adicionado o sobrenadante lisado, contendo a proteína (de 1 em 1 ml). Em seguida foram realizadas lavagem para verificar a retenção das proteínas HCV na coluna, seguindo as seguintes concentrações de Imidazol 20mM; 40mM; 60mM; 80mM. O tampão de eluição com imidazol foi adicionada sempre de duas vezes de 500 µl, nas seguintes concentrações: 200mM,

300Mm, 400Mm e 500Mm de Imidazol sendo separadas em alíquota E1 e E2. Todas as alíquotas foram armazenadas a -20°C. O monitoramento deste processo foi realizado através de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS-PAGE 15%. As proteínas foram quantificadas utilizando o método de Bradford (*Bio-Rad®*) e densidade óptica por espectrofotômetro. E seguida, todas as eleições das proteínas que foram visualizadas no gel SDS-PAGE e quantificadas, foram submetidas à diálise em membranas de 0,2mm, para retirada do excesso do imidazol e dos outros reagentes.

Para a purificações em condições denaturadas, aos mesmos tampões descritos no parágrafo acima foram adicionados 8 M de ureia e 0,01% de Beta-mercaptoetanol em pH 8.0. O processo de lavagem da coluna foi realizado mediante alteração do pH do mesmo tampão para 6.3, até não ser observada mais proteínas em corante vermelho de Ponceau. A eluição foi realizada neste tampão em pH 4.5.

#### **7.6.13 Western blot**

A detecção da presença da cauda de polihistidina nos antígenos recombinantes foi realizada pela técnica de “immunoblot”(TOWBIN et al., 1979). Para isso, as proteínas foram separadas por eletroforese SDS-PAGE 15% e transferidas por eletroforese para membrana de PVDF, ambos embebidos em tampão 0,025 M Tris, 0,192 M glicina, pH 8.5, e metanol 20%.

O sistema foi colocado em uma cuba específica para eletrotransferência (*Semidry system, Bio-rad, Hercules, USA*) sendo submetido á uma voltagem constante de 12 Volts durante 65 minutos. Após ser retirada do sistema, a membrana foi mantida no mesmo tampão de transferência descrito, até o momento da



revelação. Posteriormente, realizou-se a revelação utilizando kit comercial Western breeze (*Invitrogen*<sup>TM</sup>), seguindo as recomendações do fabricante.

Os “immunoblot” (figura 14) feitos para reconhecimento das proteínas pelos anticorpos do soros de pacientes com HCV, foram usados como anticorpo primário um pool de 10 soros HCV+ e pool de 10 soros controles negativos para HCV na diluição de 1:500. Como secundário foi utilizado anti-IgG humano biotilado, posteriormente adicionado streptavidina para a revelação com o substrato.



## 8. Análise de bioinformática

As sequências dos aminoácidos foram analisadas e traduzidas utilizando o programa *Expasy Protparam*, como mostrado no quadro 03. A tabela 03 mostra a sequência de aa das proteínas recombinantes. O quadro 03 demonstra o número de aa, potencial isoelétrico, o peso molecular, a estabilidade e o tempo médio de vida em *E. coli* de cada proteína.

**Tabela 3:** sequência de aminoácidos das proteínas recombinantes expressas em *E. coli*

| PROTEÍNAS      | SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS  |
|----------------|---|
| CORE+pRSET A   | MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRWGSLEHMMSTNPKPQRKTKRNTNRRPQ<br>DVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVRATRKTSESRQPRGRRQPIPKARRPEGRAWAQPG<br>YPWPLYGNEGCGWAGWLLSPHGSRPSWGPTDPRRRSRNLGKVIDTLTCGFADLMGYIPLV<br>GAPLGGVAKALAHGVRVLEDGVNYATGNLPGCSFSIFLLALLSCLTVPASA   |
| NS3+pRSET A    | MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRWGSLEHMCIIITSLTGRDKNQVEGEVQI<br>VSTAAQTFLATCINGVCWSVYHGAGTRTIASPKGPVIQMYTNVDKDLPWQGYKVLVNLPS<br>VAATLGFAYMSKAHGVEPNIRTGVRTITTGSPITYSTYKFLADGGCVDTDATSILGIG<br>TVLDQAEETAGARLVVLATATPPGSVTGSIIFYGKAIPLEAIKGRHLIFCHSKKCCDELA<br>AKLVALGINAVAYYRGLDVSVIPTSGDVEFPYLVAYQATVCARAQAPPPSWDQMWKCLIR<br>LKPTLHGPTPLLYRLGAVQNEVTLTHPVTK |
| NS4b+pRSET A   | MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRWGSLEHMSQHLPYIEQGMLLAEQFKQK<br>ALGLLQTASRQAEVITPVVQTNWQKLEAFWAKHMWNFISGIQYLAGLSTLPGNPAIASLM<br>AFTAAVTSPLTTSQTLFNI LGGWVAAQLAAPGAATAFVGAGLAGAAIGSVGLGKVLVDI<br>LAGYGAGVAGALVAFKIMSGETPSTEDLVNLLPAILSPGALVGVVCAAILRRHVGPGE<br>AVQWMNRLIAFASRGNHVSPTHYVPESDAAARVTTILSSLTVTQLLRRHLQWISSECTP<br>C                                |
| NS5aF1+pRSET A | MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRWGSLEHMSGSWLRDIWDWICEVLSDFK<br>TWLKAKLMPQLPGIPFVSCQRYRGVWRGDGIMHTRCHCGAEITGHVKNGTMRIVGPRTC<br>RNMWSGTFP INAYTTGPCTPLPAPNYKFALWRVSAEYVEIRQVGFHYVTGMTTDDLKC<br>PCQVPSPEFFTELDGVRLHRFAPPCKPLLEEVSVFRVGLHAYPVGSQLPCEPEPDVTVVT<br>SMLTDPSHITAEAAGRRLARGSEFEA  |
| NS5aF2+pRSET A | MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRWGSPPSLASSASQLSAPSLKATCTAN<br>HDSFDAELIEANLLWRQEMGNI TRVESENKVVILDSFDPLVAEEDEREISVPAEILRKH<br>RRFARALPVWARPDYNPPLLETWKKPDYEPVHVHGCPLPPPQSPVPPPRKKRTVVLTES<br>TVSTALAEELATKSFSGPSTSGVTGDNATTPSEPASSGCPPSDAESHSMPPLEGEPGDF<br>DLSDGSWSTVSSGTGTEDVCC  |

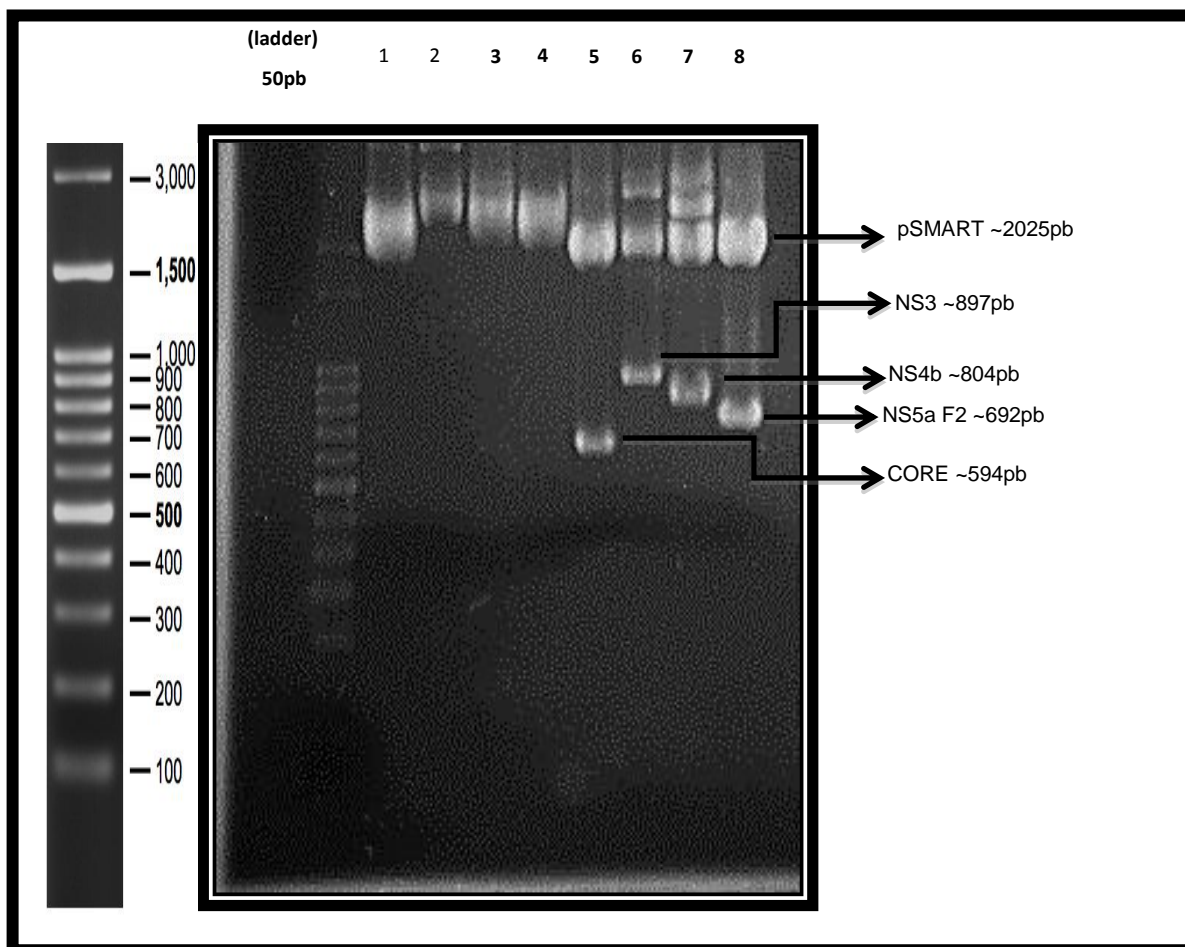
|                | Número de AA | pI    | kDa    | Estabilidade | Tempo de vida em <i>E.coli</i> | GRAVY  |
|----------------|--------------|-------|--------|--------------|--------------------------------|--------|
| <b>CORE</b>    | 231aa        | 10.62 | 25 kDA | Instável     | >10 horas                      | -0.664 |
| <b>Ns5a F1</b> | 266aa        | 6.52  | 30 kDA | Estável      | >10 horas                      | -0.438 |
| <b>Ns5a F2</b> | 262aa        | 4.88  | 28 kDA | Instável     | >10 horas                      | -0.671 |
| <b>Ns4b</b>    | 301aa        | 6.89  | 31 kDA | instável     | >10 horas                      | 0.211  |
| <b>Ns3</b>     | 330aa        | 8.35  | 35 kDA | Estável      | >10 horas                      | -0.054 |

**Quadro 3** – Quadro das análises de bioinformática das sequências de aminoácidos das proteínas recombinantes

### 8.1 Clonagem dos genes sintéticos

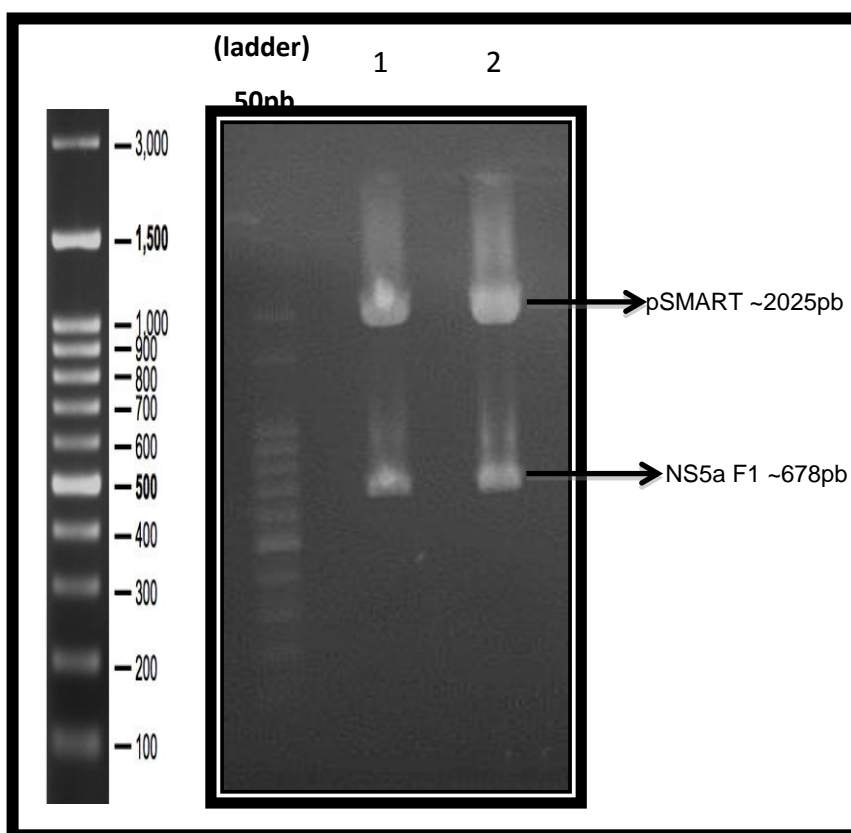
Os genes sintéticos das proteínas (CORE, NS3, NS4b, NS5a F1 e NS5a F2) produzidos em plasmídeo de clonagem pSMART, foram digeridos pelas suas enzimas de restrição, de acordo com a produção de cada proteína recombinante desenhada, para verificar a presença dos genes inseridos do vetor de clonagem e o tamanho de cada inserto. Como demonstra as figuras 07 e 08, foi observado que correspondiam ao tamanho esperado de cada gene, assim como seus respectivos sítios de clonagens. Os poços 1 a 4 (figura 07) representam os plasmídeos de clonagem pSMART com a presença dos fragmentos das proteínas recombinantes CORE, NS3, NS4b e NS5a F2 sem digestão pelas enzimas de restrição. O poço 5 representa a digestão das enzimas de restrição XhoI/PstI do pSMART com a presença do fragmento de 594 pb do gene da proteína recombinante da proteína CORE. O poço 6 representa a digestão das enzimas de restrição XhoI/PstI do pSMART com a presença do fragmento de 897 pb do gene da proteína recombinante da proteína NS3. O poço 7 representa a digestão das enzimas de restrição XhoI/PstI do pSMART com a presença do fragmento de 804 pb do gene da proteína recombinante da proteína NS4b. O poço 7 representa a digestão das

enzimas de restrição BamHI/PstI do pSMART com a presença do fragmento de 692pb do gene da proteína recombinante da proteína NS5a F2.



**Figura 7:** Digestão dos plasmídeos de clonagem pSMART e a presença dos fragmentos CORE, NS3, NS4b e NS5a F2 na altura esperada.

Como demonstrado na figura 8, foram feitas a digestão dos insertos da proteína NS5a fragmento 1, pelas enzimas de restrição específica XhoI/EcoRI e as bandas dos genes sintéticos obtidas. Os poços 1 a 2 representam os plasmídeos de clonagem pSMART digeridos pelas enzimas de restrição XhoI/EcoRI, liberando os fragmentos de ~678 pb das proteínas recombinante NS5a F1.



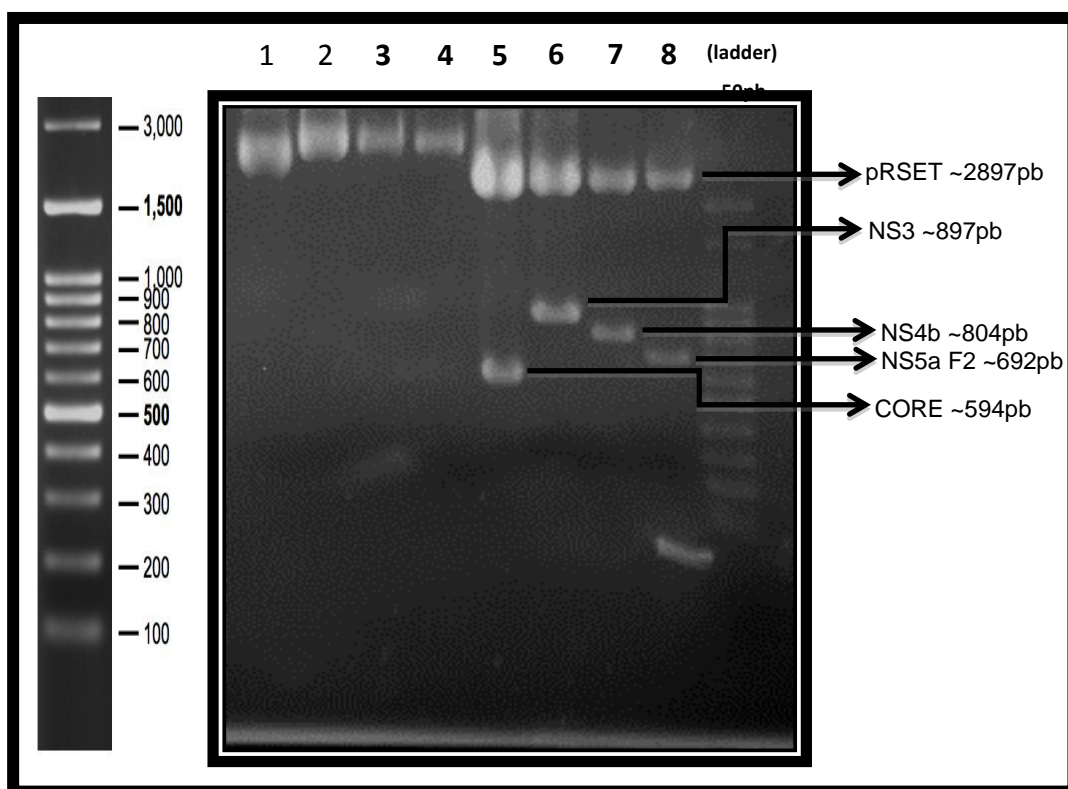
**Figura 8:** Digestão do plasmídeo de clonagem pSMART e a presença do fragmento NS5a F1 na altura esperada.

## 8.2 Subclonagem dos genes sintéticos em vetor de expressão pRSET A

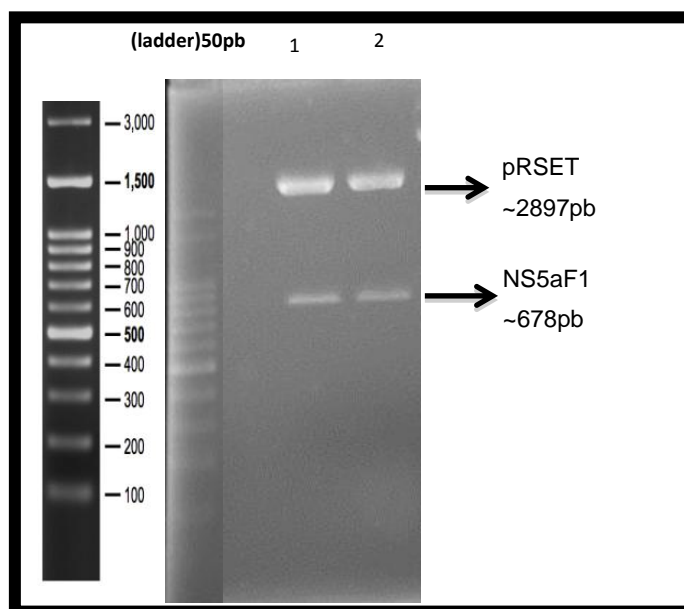
Após a clonagem dos genes sintéticos foi feita a digestão e purificação dos mesmos, assim como do vetor de expressão pRSET A e ligação dos insertos ao vetor de expressão, transformados em células hospedeiras *E. coli* TOP10 para realização da subclonagem como, descrito anteriormente em material e métodos. Posteriormente à subclonagem foi realizada a extração plasmidial das colônias transformantes, e em seguida a digestão do vetor de expressão pRSET A, visando

confirmar que os genes recombinantes de interesse foram ligados corretamente. Pode-se observar na figura 09 e 10 a confirmação da ligação correta dos genes recombinantes ao vetor de expressão. Os poços de 1 a 4 (fig. 9) apresentam o vetor de expressão ligados as proteínas recombinantes (CORE, NS3, NS4b e NS5a F2), intactos sem digestão. O poço 5 apresenta a digestão do vetor de expressão com as enzimas XhoI/PstI liberando o fragmento de ~594 pb, confirmando a ligação do gene recombinante da proteína CORE ao vetor de expressão pRSET A. O poço 6 apresenta a digestão do vetor de expressão com as enzimas XhoI/PstI liberando o fragmento de ~897 pb, confirmando a ligação do gene recombinante da proteína NS3 ao vetor de expressão pRSET A. O poço 7 apresenta a digestão do vetor de expressão com as enzimas XhoI/PstI liberando o fragmento de ~804 pb, confirmando a ligação do gene recombinante da proteína NS4b ao vetor de expressão pRSET A. O poço 8 apresenta a digestão do vetor de expressão com as enzimas BamHI/PstI liberando o fragmento de ~692 pb, confirmando a ligação do gene recombinante da proteína NS5a F2 ao vetor de expressão pRSET A.

Na figura 10, os poços 1 e 2 confirmam a liberação de um fragmento ~678 pb e ligação do gene recombinante NS5a F1 ao vetor de expressão pRSET A. O poço 3 mostra o vetor de expressão pRSET A intacto sem digestão.



**Figura 9:** Confirmação da ligação correta dos genes recombinantes CORE, NS3, NS4b e NS5a F2 ao vetor de expressão pRSET A.



**Figura 10:** Confirmação da ligação correta do gene recombinante NS5a F1 ao vetor de expressão pRSET A.



### 8.3 Análise do sequenciamento

Os genes confirmados pela digestão foram analisados pela plataforma de sequenciamento do Instituto Leônidas e Maria Deane (FIOCRUZ – AM), onde foram utilizados prêmios senso e anti-senso da região promotora T7 presente no vetor de expressão pRSET A. Os resultados do sequenciamento foram traduzidos e verificados no BLASTp para comprovar a presença do inserto no vetor de expressão. Na tabela 04 apresentam-se os resultados da tradução do sequenciamento de DNA dos genes das proteínas recombinantes. Os sequenciamentos foram analisados no programa *Eletropherogram quality analysis*, disponível no site da EMBRAPA.

**Tabela 4:** Tradução dos sequenciamentos de DNA das proteínas recombinantes

---

#### CORE

HHHHHHXMTNMTXAQHMXPHLYNHHHNDLWGSELEHMSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVK  
 FPGGQIVRGVYLLPRRGPRLGVRATRKTSESRQPRARRQPIPKAPRPKGRAWAQLGYSW  
 PFYGNEGCEWAGLVACPPTNPGQLGAKKPRPSQPTPGKGIKI

#### NS3

HHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRWGSELEHMCIIITSLTGRDKNQVEGEVQIVST  
 AAQTFLATCINGVCWSVYHGAGTRT IASPKGRSSRCIPTLTRICHGRATKYWYLTRPLRL  
 PWGFWRIYVQAWC

#### NS4b

HHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRWGSELEHMSQHLPYIEQGMLLAEQFXQKALG  
 LLQTASRHAEVI TPVVQTNWHKLEAFWANTCGTSSPVFSIYTA

#### NS5 F1

HHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRWGSELEHMSGSWLRDIWDWICEVLSDFKTWL  
 KAKLMPQLPGIPFVSCQRGYRGVWRGDGIMHTRCHCGAEITVHVKNGTMRIVGPRTCRNM

#### NS5 F2

HHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRWGSPPSLASSASQLSAPSLKATCTANHD  
 SPDAELIEANLLWRQEMGGNITRVESENKVVWDSFDPVVAEEDEREISVPAEILLSTAA  
 LRGRFRLGAPEYNPPLLETGKNRIITPGLMGG

## 8.4 Análise da Expressão das Proteínas

### 8.4.1 Purificação da porção solúvel do extrato bacteriano

Na figura 11 demonstra-se o SDS-PAGE das proteínas recombinantes recuperadas da porção solúvel do extrato bacteriano, purificadas por cromatografia de afinidade em coluna com resina de níquel e coradas com nitrato de prata. Nos poços de 1 a 5 podemos observar as proteínas CORE, NS3, NS4b, NS5a F1 e NS5a F2, com seus respectivos pesos moleculares (~25 kDa, ~35 kDa, ~31 kDa, ~30 kDa, ~28 kDa), respectivamente. Observou-se uma diferença no peso molecular da proteína NS5a F2, que está descrita com peso de ~35 kDa. Também foi possível detectar que estas proteínas apresentaram clivagens.

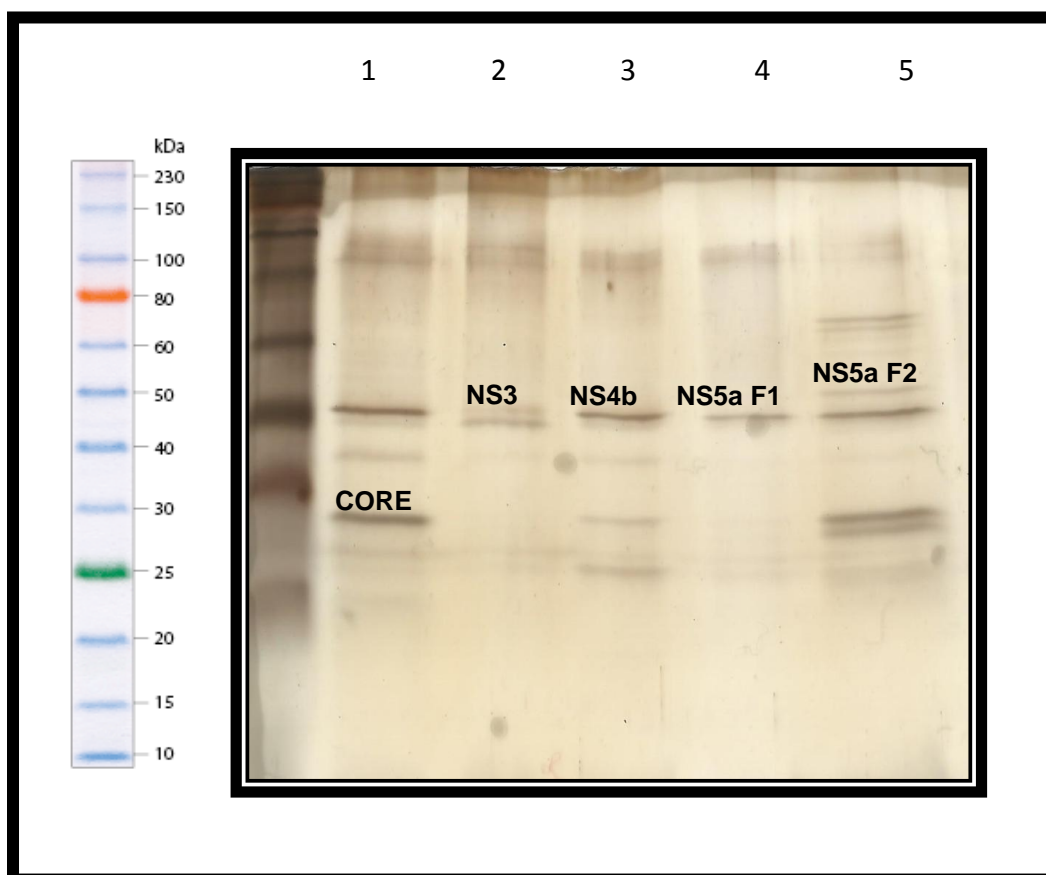


Figura 11: Gel SDS – PAGE 15% da purificação do sobrenadante do extrato bacteriano das proteínas CORE, NS3, NS4b e NS5a F1/F2 coradas com nitrato de prata.

#### 8.4.2 Purificação da porção insolúvel do extrato bacteriano

O gel SDS – PAGE corado com comassie brilhante (figura 12), demonstra a recuperação das proteínas recombinantes da porção insolúvel do extrato bacteriano em uma concentração maior, quando comparadas a recuperação da porção solúvel. Observou-se uma alta concentração das proteínas. Nos poços de 1 a 5 podemos observar as proteínas CORE, NS3, NS4b, NS5a F1 e NS5a F2, com seus respectivos pesos moleculares (~25 kDa, ~35 kDa, ~31 kDa, ~30 kDa, ~28 kDa), respectivamente.

Podemos observa que principalmente nas proteínas CORE, NS3 e NS4b ainda apresentaram resíduos acima do seu peso molecular, necessitando assim de mais purificações para se obter somente as bandas desejadas (proteínas do HCV). As proteínas NS5a F1 e F2 apresentaram uma menor concentração em relação as demais proteínas recuperadas do “pellet” do extrato bacteriano, porém demonstraram um grau de pureza maior.

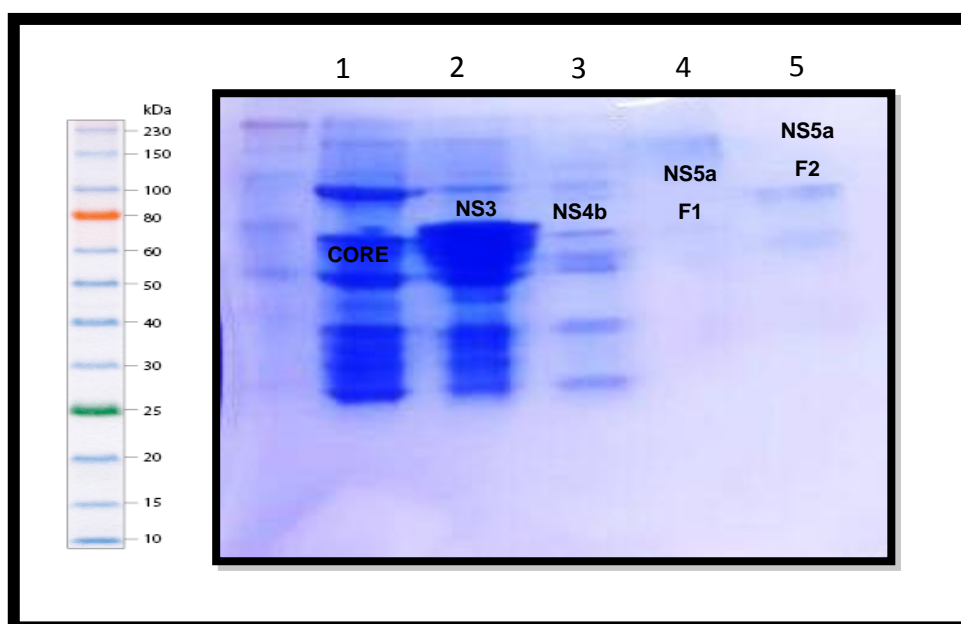
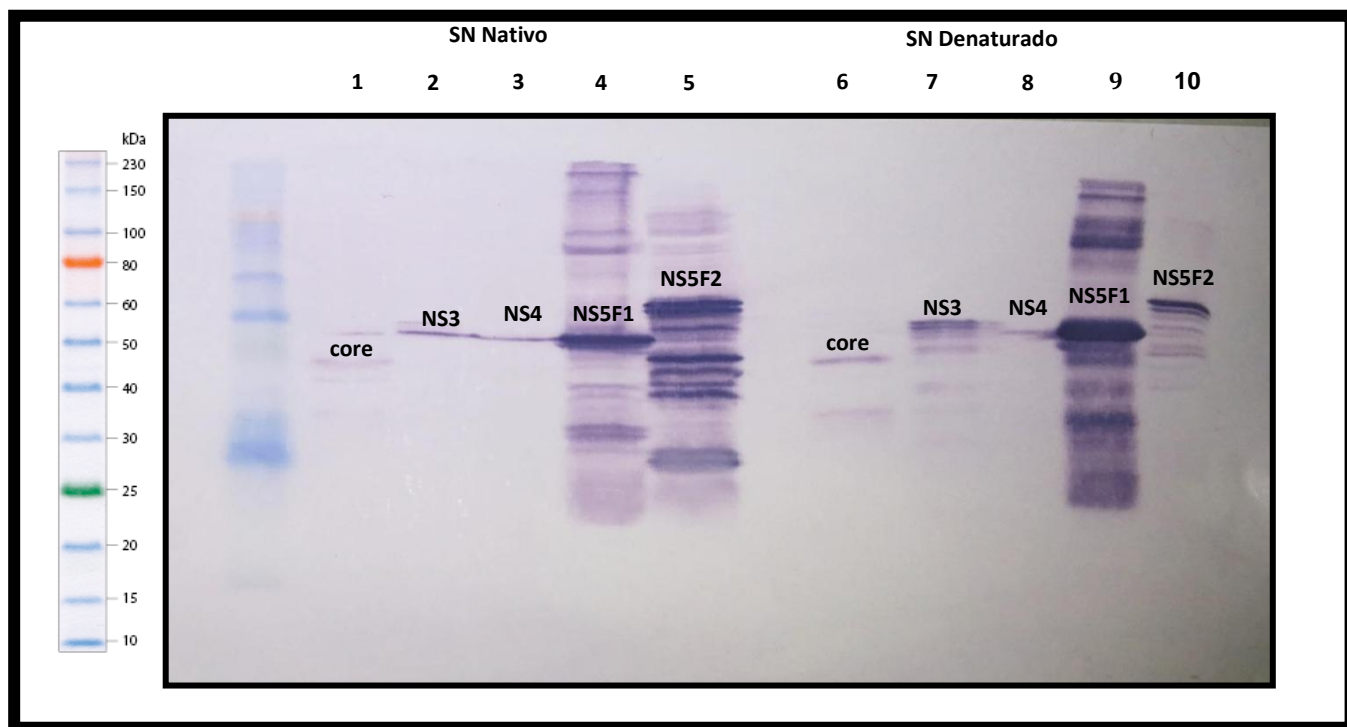


Figura 12: SDS – PAGE 15% da purificação das proteínas CORE, NS4b e NS5a F1/F2 da porção solúvel do extrato bacteriano corados por comassie brilhante.

### 8.4.3 Western blot das porções solúvel e insolúvel do extrato bacteriano

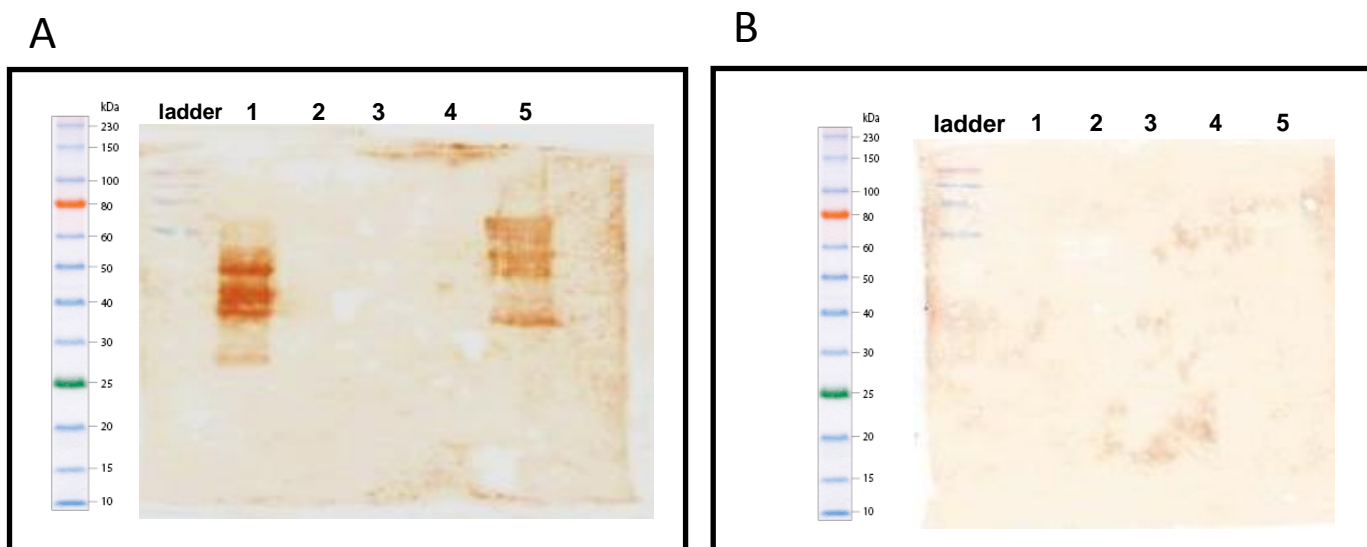
A figura 13 apresenta o western blot das proteínas recombinantes expressas em *E.coli* BL21 (DE3) pLysS das porções, solúvel e insolúvel do extrato bacteriano. Observamos que todas as proteínas foram expressas em ambas as porções. Os poços de 1 a 5 representam as proteínas CORE, NS3, NS4b e NS5a F1/F2 recuperadas da porção solúvel. Os poços de 6 a 10 representam as proteínas CORE, NS3, NS4b e NS5a F1/F2 recuperadas da porção insolúvel. O nome de cada proteína indica o local e massa molecular no qual cada uma delas se apresentou. Foi observado também, assim como nos géis SDS-PAGE anteriores (figura 11 e 12) que as proteínas do CORE, NS3 e NS4, são expressas em maior concentração na porção solúvel do extrato bacteriano. As proteínas NS5a F1/F2 são expressas em boa concentração em ambas as porções.



**Figura 13:** Western blot das proteínas recombinantes CORE, NS3, NS4b e NS5a F1/F2 das porções solúvel e insolúvel do extrato bacteriano.

#### 8.4.4 Immunoblot das proteínas recombinantes

Os resultados do immunoblot utilizando pool de 10 soros positivos (figura 14a) e pool de 10 soros negativos para HCV (figura 14b), demonstraram que as proteínas recombinantes CORE e NS5a F2, porção C-terminal na sua forma linear, foram reconhecidas por anticorpos presentes nos soros dos pacientes HCV+. O mesmo não foi observado pelos soros controles, a qual não houve reatividade para nenhuma das proteínas analisadas. Os poços de 1 a 5 das figuras 14a e 14b representam as proteínas CORE, NS3, NS4b, NS5a F1 e NS5a F2 respectivamente. Por outro lado, foi observado que não houve reatividade para as proteínas NS3, NS4b e NS5a F1.



**Figura 14:** A – immunoblot das proteínas CORE, NS3, NS4b, NS5a F1 e NS5a F2 utilizando pool de soros HCV +. B – immunoblot das proteínas CORE, NS3, NS4b, NS5a F1 e NS5a F2 utilizando pool de soros de pacientes negativo para HCV.

*Discussão*

---

---

## 8.5 Discussão

O vírus da hepatite C apresenta genoma viral com polaridade positiva composta por 9.600 nucleotídeos, que traduz uma poliproteína com 3 mil aminoácidos (CHOO et al., 1988) que codifica a fração N-terminal das proteínas estruturais CORE, E1/E2 e proteína P7, enquanto que as proteínas não estruturais NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B são codificadas em outra parte do genoma (CHOO et al., 1988; SHUKLA et al., 1995).

As proteínas estruturais e não estruturais do HCV são as responsáveis pela entrada do vírus nos hepatócitos e pela tradução durante a replicação do genoma viral. Além disso, essas proteínas estão envolvidas na progressão da doença para fase crônica, suprimindo uma resposta virológica sustentada do perfil  $T_H1$  que poderia levar ao *clearance* viral (EGGER et al., 2002; BYRNES et al., 2007; DAVTYAN et al., 2013).

A proteína do CORE apresenta interações com diversas proteínas celulares, comprometendo várias funções das células hospedeiras como no processo de apoptose, na transcrição gênica, nas vias de sinalização celular, além do metabolismo dos lipídeos (TELLINGHUISEN; RICE, 2002; FOKA et al., 2014). As proteínas não estruturais 2 e 3 apresentam a função de clivagem de todas as proteínas não estruturais, com atividade de helicase e NTPase durante a replicação (GRAKOUIT et al., 1993; PENIN, FRAÇOIS et al., 2004; APPEL et al., 2007). A proteína NS4A apresenta a função de atuar como co-fator da proteína NS3 e participa da hiperfosforilação da proteína NS5A. A proteína NS4B é uma proteína integral de membrana apresentando um importante papel na formação do complexo de replicação viral, tendo como função de atuar como estrutura de fixação na membrana do retículo endoplasmático, agir como fator de inibição da atividade

antiviral de IFN- $\alpha$ , além de ter uma importância chave, pois promove a síntese de novos genomas de RNA do vírus da Hepatite C, atuando com sua função de RNA polimerase (SCHMIDT-MENDE et al., 2001; EGGER et al., 2002; FRANCESCO; MIGLIACCIO, 2005).

As proteínas do vírus da hepatite C são reconhecidas pelos receptores de reconhecimento padrão, ativando principalmente a via de transcrição de citocinas pro-inflamatórias e via da citocina antiviral, como o interferon. Porém, apesar do papel crucial desses receptores, estudos recentes “*in vitro*” tem demonstrado que as proteínas NS3A, NS4A e NS5A agem bloqueando e inibindo a produção de IFN- $\beta$  pelos hepatócitos e células imunes, bem como, a proteína do CORE do HCV inibe diretamente o fator regulador 3 e o fator de transcrição NF- $\kappa$ B que estão diretamente relacionados com a produção de interferon (LIN et al., 2006; MACHIDA et al., 2006; SATO et al., 2007).

No presente trabalho o objetivo principal foi produzir, expressar e purificar as proteínas recombinantes CORE, NS3, NS4b e NS5a do vírus da Hepatite C, otimizadas para *E. coli*. As proteínas foram expressas a partir de genes sintéticos desenhados para ligação em pRSET A e otimizados para expressão hospedeiro *E. coli*. O gene recombinante da proteína NS3, como relatado na metodologia teve sua seqüência gênica reduzida a regiões reconhecidas por tipos e subtipos de antígenos leucocitários humanos (HLA). Esta modificação se deu pelo fato da grande extensão proteica da NS3 (apresentando 631aa).

Os genes sintéticos foram subclonados em vetor pRSET A utilizando as enzimas de restrição mencionadas anteriormente (Quadro 01) como confirmado no sequenciamento de DNA (tabela 04). As bactérias *E.coli* (DE3) pLysS foram transformadas com os plasmídeos e foi possível analisar a expressão



citoplasmáticas das proteínas recombinantes. Também foi possível observar que todas as proteínas poderiam ser recuperadas da porção solúvel e insolúvel do lisado bacteriano (figura 14). Contudo, ao realizarmos os ensaios de purificação das proteínas, houve dificuldade na recuperação de algumas proteínas no sobrenadante nativo, do extrato bacteriano. As proteínas CORE, NS3 e NS4 apresentaram uma melhor recuperação no “pellet” tratados com uréia e  $\beta$ -mercaptoetanol. As proteínas NS5a fragmento 1 e fragmento 2 foram recuperadas em ambas as porções.

Dipti, Jain, & Navin (2006) expressaram em hospedeiro *E. coli* uma nova proteína recombinante, utilizando epítomos das proteínas do CORE, NS3, NS4I, NS4II e NS5, usados nos kits de terceira geração e adicionaram o epítomo da proteína CORE 3g, que havia sido encontrado na Índia. Estes autores produziram uma quimera com todos os 6 epítomos das proteínas, afim de avaliar o reconhecimento de anticorpos contra as proteínas do HCV. Os epítomos unidos foram expressos em *E. coli* e a proteína do sobrenadante do extrato bacteriano foi purificada por Ni-NTA. A proteína produzida neste estudo apresentou no western blot uma elevada sensibilidade e especificidade, para os anticorpos presentes no soro de pacientes positivos para HCV.

Mihailova et al., (2006) utilizaram como vetores de expressão das proteínas, os plasmídeos pQE-60 e pQE-30, que apresentam no seu genoma sequências para expressão da cauda de histidina e promotor T5 e utilizam *E. coli*. As proteínas produzidas no trabalho em questão foram as, CORE (1-98 aa), NS3 (202-482 aa) e um tetrâmero da porção da região hipervariável da proteína estrutural E2. As proteínas produzidas no presente trabalho foram purificadas em Ni-NTA a partir do sobrenadante do extrato bacteriano. As proteínas recombinantes expressas e purificadas foram utilizadas para imunização em camundongos, e foi possível

observar que todas as 3 proteínas foram capazes induzir uma elevada taxa de anticorpos, quando testadas contra os soros dos camundongos, através do método ELISA direto. A elevada imunogenicidade observada neste estudo mostrou que os fragmentos produzidos, das proteínas recombinantes, podem ser candidatas a inclusão na produção de vacinas.

Os dados apresentados (quadro 03) demonstram o índice de hidrofobicidade médio (GRAVY) das proteínas recombinantes, que quanto mais negativo o resultado do GRAVY, mais a proteína é hidrofílica, e quanto mais positivo o resultado mais hidrofóbica será a proteína (KYTE; DOOLITTLE, 1982). Em nosso estudo foi possível observar que apenas a proteína NS4b das cinco proteínas recombinantes produzidas apresentou hidrofobicidade, pelo cálculo do GRAVY, mas isso não foi observado pois a melhor recuperação de todas as proteínas expressas foi na porção insolúvel do extrato bacteriano. Podemos sugerir que esse fato de maior hidrofobicidade ocorra devido a uma indução para que as *E. coli* BL21 (DE3) pLysS produzam uma elevada taxa de expressão das proteínas recombinantes, levando essas células ao estresse, fazendo com que formem agregados das proteínas expressas, formando os corpúsculos de inclusão (VILLAVERDE; CARRIÓ, 2003). Acredita-se que as formações desses agregados das proteínas recombinantes expressas elevam a taxa de hidrofobicidade, justificando a sua melhor recuperação na porção insolúvel do extrato bacteriano.

Back e colaboradores (2000) ao produzirem as proteínas NS3 (aa 1027 – 1214) e NS4 (aa 1658 – 1710) em *E. coli* (DE3) pLysS demonstraram que somente a NS4 apresentou elevada taxa de aminoácidos hidrofóbicos, levando a proteína ser insolúvel. Estes autores sugeriram que esta seria a razão existe da dificuldade de recuperar a proteína NS4 da porção solúvel do extrato bacteriano, assim como

observado em nossos estudos. Back e colaboradores (2000) relataram um método para tornar a proteína NS4 solúvel, ligando-a a uma maltose, obtendo assim melhores resultados.

Baghbani-arani e colaboradores (2012) observaram em seu estudo, onde expressaram um fragmento da proteína CORE do vírus da Hepatite C subclonados em vetor pET-24a em vários tipos de *E.coli*, que a purificação da porção solúvel do lisado bacteriano não seria eficaz apresentando baixa concentração da proteína, que a maior parte da proteína expressa estava sob a forma de corpúsculo de inclusão sendo recuperadas no “pellet” do lisado bacteriano.

Observamos que as proteínas tanto da porção solúvel, quanto da insolúvel apresentaram clivagens, gerando proteínas de massa moleculares menores do que o tamanho esperado. Acredita-se que este fato ocorra devido às proteases presentes na célula de expressão *E. coli* BL21 (DE3) pLysS que reconhecem sítios de clivagem nas proteínas expressas. Uma alternativa seria o uso durante a indução da expressão das proteínas do antibiótico rifampicina, que apresenta a ação de inibir a RNA polimerase da célula de expressão *E.coli* (DE3) pLysS, fazendo com que somente a T7 RNA polimerase seja expressa, levando à proteína recombinante de interesse (WEHRLI; STAEHELIN, 1971). Estudo feito por Kalamvoki e colaboradores (2002), relatou que a expressão em *E.coli* da proteína recombinante NS5a da porção C-terminal, apresentou múltiplas bandas da proteína expressa, corroborando com que foi observado em nosso trabalho.

As proteínas recuperadas do extrato bacteriano foram utilizadas para diversos ensaios de ELISA (dados não mostrados) e foi observada uma alta reatividade cruzada, quando utilizados os soros controles (não reativos para HCV). Porém, esta reatividade não foi observada nos ensaios por western blot. Provavelmente, este

fato ocorra porque as proteínas quando utilizadas para os ensaios imunoenzimáticos estão na sua forma nativa enovelada, podendo apresentar epítomos conformacionais, enquanto que nos ensaios de western blot as proteínas são denaturadas, e utilizadas na sua forma linear, por esse motivo acredita-se que os epítomos formados na proteína nativa reconhecidos pelos anticorpos dos indivíduos controles negativos para HCV pelo método de ELISA, não são reconhecidos pelos mesmos anticorpos quando a proteína apresenta-se na forma linearizada, visto que os mesmo soros foram usados para ambas às técnicas.

Nos ensaios de western blot foram utilizados pool de soros de pacientes positivos para HCV e observou-se uma alta reatividade de anticorpos contra as proteínas do CORE e NS5a F2 (porção C-terminal), o mesmo não foi observado para as proteínas NS4b, NS3 e NS5a F1 (porção N-terminal). Estes dados corroboram os de SILLANPÄÄ et al., (2009) que demonstraram que de 9 proteínas do HCV produzidas utilizando o Baculovírus, somente algumas apresentaram reatividade contra os anticorpos de 68 pacientes positivos para HCV por western blot. Sendo que as proteínas CORE (97%), NS3 (86%), NS4b (68%) e NS5a (53%) apresentaram maior reatividade para os anticorpos presentes nos soros HCV<sup>+</sup>. Chen e colaboradores (1999), avaliaram a resposta humoral de anticorpos contra as proteínas do vírus da hepatite C de 60 pacientes com hepatite C crônica. Foi demonstrado nos ensaios imunoenzimáticos do presente estudo, que 98% das amostras apresentaram anticorpos com a proteína estrutural E2, 97% para proteína do CORE, 88% para proteína NS3, 68% para proteína NS5 e 48% para proteína NS4.

Estudo feito por Kalamvoki e colaboradores (2002), observou a expressão em *E. coli* de diferentes frações da proteína NS5a, dividindo a proteína nas porções N-

terminal e C-terminal com a finalidade de observar a reatividade de anticorpos presentes no soro de 39 pacientes positivos para HCV para cada porção da proteína. Foi observado nos ensaios de immunoblot e ELISA que 54% dos soros dos pacientes foram reativos para porção N-terminal da proteína NS5a e 51% foram reativas para porção C-terminal da proteína recombinante NS5a, observando que na sua população estudada ambas as porções da proteína NS5a apresentam epítomos imunorreativos. Em nosso estudo foi observado no immunoblot realizado com o pool de 10 soros de pacientes com HCV, que apenas a porção C-terminal (NS5a F2) apresentou reatividade, sugerindo que nas amostras utilizadas no pool não apresentavam anticorpos contra a porção N-terminal da proteína recombinante NS5a.

O fato de que apenas as proteínas do CORE e NS5a F2 do HCV foram reconhecidas pelos anticorpos presentes no pool de soros dos pacientes positivos, indica que a reatividade não foi contra a cauda de histidina, pois na figura 13 nós podemos observar que todas as proteínas foram reconhecidas pelo anticorpo anti-histidina. Para estudos futuros, como os ensaios de estímulo celular para a análise da resposta imune *in vitro*, a cauda será retirada por metodologia já padronizada (dados não mostrados), utilizando a enzima enterokinase, uma vez que, a cauda de histidina poderia levar a ativação da resposta imune (RANDOLPH, 2012). Em relação aos ensaios feitos para analisar resposta imune humoral, DALAGIORGOU e colaboradores (2011) relatou em seu estudo a produção de proteínas do CORE em três sequências de aminoácidos diferentes (sequências maiores CORE + 1a e CORE + 1b foram adicionadas a cauda de histidina, e a sequência menor CORE + 1b/s não foi adicionada a cauda de histidina). A comparação da reatividade dos soros positivos para HCV frente às proteínas marcadas e não marcadas com a

cauda de histidina, demonstrou que não houve diferença estatística entre as proteínas com cauda e sem cauda.

Devido a reatividade cruzada encontrada pelo método ELISA no presente estudo, o próximo passo será testar as proteínas produzidas por “Dot Blot”, utilizando soros conhecidamente positivos para o HCV, individualmente contra as 5 proteínas recombinantes produzidas (CORE, NS3, NS4b, NS5a F1 e NS5a F2). Além disso, o sucesso na produção das proteínas do HCV nos leva a perspectivas futuras, como sua utilização em ensaios de estimulação celular, in vitro, para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na evolução da infecção pelo HCV, que levam a eliminação do vírus ou a cronificação e evolução da doença.

*Conclusão*

---

## 8.6 Conclusão

- O desenho dos genes sintéticos das proteínas CORE, NS3, NS4b e NS5a F1 e NS5a F2 permitiu a expressão das proteínas em *E. coli* (DE3) pLysS, observando a presença das proteínas tanto no sobrenadante quanto na porção insolúvel do extrato bacteriano;
- A purificação das proteínas recombinantes utilizando a cromatografia de afinidade em coluna com resina de níquel foi obtida com êxito;
- As proteínas CORE, NS3, NS4b apresentaram hidrofobicidade, sendo recuperadas em maior concentração na porção insolúvel do lisado bacteriano. As proteínas NS5a fragmento 1 e NS5a fragmento 2 foi recuperada em ambas as porções;
- As proteínas do CORE e NS5 F2 foram reconhecidas por anticorpos de soros positivos para HCV. Não observamos reatividade contra a NS5 F1, porção N-terminal da proteína.



## *Referências bibliográficas*

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCAPEZZATO, D.; FRANCAVILLA, V.; PAROLI, M.; et al. Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8 + T cell population in chronic hepatitis C virus infection. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 7, p. 2–11, 2004.

ALATRAKCHI, N.; GRAHAM, C. S.; DER, H. J. J. VAN; et al. Hepatitis C Virus ( HCV ) -Specific CD8 + Cells Produce Transforming Growth Factor  $\beta$  That Can Suppress HCV-Specific T-Cell Responses Hepatitis C Virus ( HCV ) -Specific CD8  $\alpha$  Cells Produce Transforming Growth Factor  $\beta$  That Can Suppress HCV-Specific T-Cell. **Journal of Virology**, v. 81, p. 5882–5892, 2007.

ALTER, M. J. Epidemiology of hepatitis C virus infection. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 13, n. 17, p. 2436–2441, 2007.

APPEL, N.; SCHALLER, T.; PENIN, F.; BARTENSCHLAGER, R. From Structure to Function : New Insights into Hepatitis C Virus RNA Replication \*. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 15, p. 9833–9836, 2007.

ASHFAQ, U. A; JAVED, T.; REHMAN, S.; NAWAZ, Z.; RIAZUDDIN, S. An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. **Virology journal**, v. 8, n. 1, p. 161, 2011. BioMed Central Ltd. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3086852&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 30/1/2013.

BACK, S. H.; KIM, J. E.; RHO, J.; et al. Expression and purification of an active, full-length hepatitis C viral NS4A. **Protein expression and purification**, v. 20, n. 2, p. 196–206, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11049744>>. Acesso em: 8/9/2014.

BAGHBANI-ARANI, F.; ROOHVANDV, F.; AGHASADEGHI, M. R.; et al. Expression and characterization of Escherichia coli derived hepatitis C virus ARFP/F protein. **Molecular Biology**, v. 46, n. 2, p. 226–235, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1134/S0026893312020033>>. Acesso em: 9/9/2014.

BARNABA, V. Hepatitis C virus infection: a “liaison a trois” amongst the virus, the host, and chronic low-level inflammation for human survival. **Journal of hepatology**, v. 53, n. 4, p. 752–61, 2010. European Association for the Study of the Liver. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20673595>>. Acesso em: 8/1/2013.

BARTOSCH, B.; DUBUISSON, J.; COSSET, F. Infectious Hepatitis C Virus Pseudoparticles Containing Functional E1 – E2 Envelope Protein Complexes. **Journal Exp Med**, v. 197, n. 5, p. 633–642, 2003.

BARTOSCH, B.; VITELLI, A.; GRANIER, C.; et al. Cell Entry of Hepatitis C Virus Requires a Set of Co-receptors That Include the CD81 Tetraspanin and the SR-B1 Scavenger Receptor \*. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 43, p. 41624–41630, 2003.

BASU, A.; MEYER, K.; LAI, K. K.; et al. Microarray analyses and molecular profiling of Stat3 signaling pathway induced by hepatitis C virus core protein in human hepatocytes. **Virology**, v. 349, p. 347–358, 2006.

BLACKARD, J. T.; KEMMER, N.; SHERMAN, K. E. Extrahepatic Replication of HCV : Insights Into Clinical. **Hepatology**, v. 44, n. 1, p. 15–22, 2006.

BODE, J. G.; LUDWIG, S.; EHRHARDT, C.; et al. IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 17, n. 3, p. 488–90, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12551851>>. .

BYRNES, A. A; LI, D.-Y.; PARK, K.; et al. Modulation of the IL-12/IFN-gamma axis by IFN-alpha therapy for hepatitis C. **Journal of leukocyte biology**, v. 81, n. 3, p. 825–34, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17148690>>. Acesso em: 14/4/2013.

CAMPIOTTO, S.; PINHO, J.; CARRILHO, F.; et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 41–49, 2005.

CARRÈRE-KREMER, S.; MONTPELLIER-PALA, C.; COCQUEREL, L.; et al. Subcellular Localization and Topology of the p7 Polypeptide of Hepatitis C Virus. **Journal of viral hepatitis**, v. 76, n. 8, p. 3720–3730, 2002.

CDC. Viral Hepatitis Surveillance United States, 2010. ,2010.

CHEN, M.; SÄLLBERG, M.; SÖNNERBORG, A; et al. Limited humoral immunity in hepatitis C virus infection. **Gastroenterology**, v. 116, n. 1, p. 135–43, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9869611>>. .

CHOO, Q.; KUO, G.; WEINER, A. M. Y. J.; et al. Isolation of a cDNA Clone Derived from a Blood- Borne Non-A , Non-B Viral Hepatitis Genome. **Scientific reports**, v. 13545, n. 1987, 1988.

CROTTA, S.; STILLA, A.; WACK, A.; et al. Inhibition of Natural Killer Cells through Engagement of CD81 by the Major Hepatitis C Virus Envelope Protein. **J Exp Med**, v. 195, n. 1, p. 35–41, 2002.

CRUZ, S. **AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO DE TNF-  $\alpha$ - 308 EM PACIENTES COM HEPATITTE C SORIANE**, 2013.

DALAGIORGOU, G.; VASSILAKI, N.; FOKA, P.; et al. High levels of HCV core+1 antibodies in HCV patients with hepatocellular carcinoma. **The Journal of general virology**, v. 92, n. Pt 6, p. 1343–51, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21307221>>. Acesso em: 7/9/2014.

DAVTYAN, T. K.; POGHOSYAN, D. A; SUKIASYAN, A. G.; GRANT, M. D. The anti-idiotypic antibody 1F7 stimulates monocyte interleukin-10 production and induces endotoxin tolerance. **Journal of inflammation (London, England)**, v. 10, n. 1, p. 14, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23561395>>. Acesso em: 14/4/2013.

DICKENSHEETS, H.; SHEIKH, F.; PARK, O.; GAO, B.; DONNELLY, R. P. Interferon-lambda (IFN- $\lambda$ ) induces signal transduction and gene expression in human hepatocytes but not in lymphocytes or monocytes. **Journal of leukocyte biology**, v.

93, n. March, p. 377–385, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23258595>>. Acesso em: 1/3/2013.

DIPTI, C. A.; JAIN, S. K.; NAVIN, K. A novel recombinant multiepitope protein as a hepatitis C diagnostic intermediate of high sensitivity and specificity. **Protein expression and purification**, v. 47, n. 1, p. 319–28, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16504539>>. Acesso em: 8/9/2014.

EGGER, D.; WÖLK, B.; GOSERT, R.; et al. Expression of Hepatitis C Virus Proteins Induces Distinct Membrane Alterations Including a Candidate Viral Replication Complex. **Journal of Virology**, v. 76, n. 12, p. 5974–5984, 2002.

EL-SAADANY, S.; ZIADA, D.; BASSAT, H. EL; et al. The role of hepatic expression of STAT1, SOCS3 and PIAS1 in the response of chronic hepatitis C patients to therapy. **Can J Gastroenterol**, v. 27, n. 2, p. 13–17, 2013.

EVANS, M. J.; HAHN, T. VON; TSCHERNE, D. M.; et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. **Nature**, v. 446, n. April, p. 801–805, 2007.

FOKA, P.; DIMITRIADIS, A.; KYRATZOPOULOU, E. A complex signaling network involving protein kinase CK2 is required for hepatitis C virus core protein - mediated modulation of the iron - regulatory hepcidin gene expression. **cellular and Molecular Life Sciences**, , n. 3, 2014.

FRANCESCO, R. DE; MIGLIACCIO, G. Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. **Nature**, v. 436, n. August, 2005.

GAUTIER, G.; HUMBERT, M.; DEAUVIEAU, F.; et al. A type I interferon autocrine – paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. **JEM**, v. 201, n. 9, p. 1435–1446, 2005.

GRAKOUIT, A.; MCCOURT, D. W.; WYCHOWSKI, C.; FEINSTONE, S. M.; RICETTI, C. M. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 90, n. November, p. 10583–10587, 1993.

GRIFFIN, S. D. C.; BEALES, L. P.; CLARKE, D. S.; et al. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug , Amantadine. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 535, p. 34–38, 2003.

HARRIS, H. E.; ELDRIDGE, K. P.; HARBOUR, S.; et al. Does the clinical outcome of hepatitis C infection vary with the infecting hepatitis C virus type ? **Journal of viral hepatitis**, v. 14, p. 213–220, 2007.

HAZARI, S.; CHANDRA, P. K.; POAT, B.; et al. Impaired antiviral activity of interferon alpha against hepatitis C virus 2a in Huh-7 cells with a defective Jak-Stat pathway. **Virology journal**, v. 7, n. 36, p. 36, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2831880&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

HEIM, M. H.; MORADPOUR, D.; BLUM, H. E. Expression of Hepatitis C Virus Proteins Inhibits Signal Transduction through the Jak-STAT Pathway Expression of Hepatitis C Virus Proteins Inhibits Signal Transduction through the Jak-STAT Pathway. **Journal of Virology**, v. 73, n. 10, p. 8469–8475, 1999.

HERRMANN, E.; NEUMANN, A. U.; SCHMIDT, J. M.; ZEUZEM, S. Hepatitis C virus kinetics. **Antiviral Therapy**, v. 5, p. 85–90, 2000.

HIROISHI, K.; EGUCHI, J.; ISHII, S.; et al. Immune Response of Cytotoxic T Lymphocytes and Possibility of Vaccine Development for Hepatitis C Virus Infection. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2010, p. 10, 2010.

HOSHINO, K.; SUGIYAMA, T.; MATSUMOTO, M.; et al. LETTERS I k B kinase- a is critical for interferon- a production induced by Toll-like receptors 7 and 9. **Nature**, v. 440, n. April, p. 949–953, 2006.

HOSUI, A.; OHKAWA, K.; ISHIDA, H.; et al. Hepatitis C virus core protein differently regulates the JAK-STAT signaling pathway under interleukin-6 and interferon-gamma stimuli. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 31, p. 28562–71, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12764155>>. Acesso em: 4/11/2012.

HOWE, C. J.; FULLER, C. M.; OMPAD, D. C.; et al. Association of sex , hygiene and drug equipment sharing with hepatitis C virus infection among non-injecting drug users in New York City. **Drug and alcohol dependence**, v. 79, n. 0376, p. 389–395, 2005.

HUGHES, M.; GRETTON, S.; SHELTON, H.; et al. A Conserved Proline between Domains II and III of Hepatitis C Virus NS5A Influences both RNA Replication and Virus Assembly □. **Journal of Virology**, v. 83, n. 20, p. 10788–10796, 2009.

JIANG, J.; LUO, G. Cell Culture-Adaptive Mutations Promote Viral Protein-Protein Interactions and Morphogenesis of Infectious Hepatitis C Virus. **Journal of Virology**, v. 86, n. 17, p. 8987–8997, 2012.

KALAMVOKI, M.; MIRIAGOU, V.; HADZIYANNIS, A; et al. Expression of immunoreactive forms of the hepatitis C NS5A protein in E. coli and their use for diagnostic assays. **Archives of virology**, v. 147, n. 9, p. 1733–45, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12209313>>. Acesso em: 11/9/2014.

KIM, K.-A.; LIN, W.; TAI, A. W.; et al. Hepatic SOCS3 expression is strongly associated with non-response to therapy and race in HCV and HCV/HIV infection. **Journal of hepatology**, v. 50, n. 4, p. 705–11, 2009. European Association for the Study of the Liver. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3146466&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 28/11/2012.

KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **Journal of molecular biology**, v. 157, n. 1, p. 105–32, 1982. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7108955>>. .

LIN, W.; KIM, S. S.; YEUNG, E.; et al. Hepatitis C Virus Core Protein Blocks Interferon Signaling by Interaction with the STAT1 SH2 Domain Hepatitis C Virus Core Protein Blocks Interferon Signaling by Interaction with the STAT1 SH2 Domain. **Journal of Virology**, v. 80, n. 18, p. 9226, 2006.

LOPES, C. L. R.; TELES, S. A.; ESPÍRITO-SANTO, M. P.; et al. Prevalence , risk factors and genotypes of hepatitis C virus infection among drug users , Central-Western Brazil. **Revista Saúde Pública**, v. 43, p. 43–50, 2009.

MACHIDA, K.; CHENG, K. T. H.; SUNG, V. M.; et al. Hepatitis C Virus Induces Toll-Like Receptor 4 Expression , Leading to Enhanced Production of Beta Interferon Hepatitis C Virus Induces Toll-Like Receptor 4 Expression , Leading to Enhanced Production of Beta Interferon and Interleukin-6. **Journal of viral hepatitis**, v. 80, n. 2, p. 866, 2006.

MAIA, V.; MARTINS-FILHO, O. A.; TORRES, L.; MALHEIRO, A. Hepatitis C Virus Screening and Clinical Monitoring of Biomarkers in Patients Undergoing Hemodialysis. **Journal of Medical Virology**, v. 1231, n. March, p. 1220–1231, 2009.

MARTINS, T.; SCHIAVON, J.; SCHIAVON, L. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C. **Revista Associação medica Brasileira**, p. 107–112, 2010.

MEREDITH, L. W.; WILSON, G. K.; FLETCHER, N. F.; MCKEATING, J. A. Hepatitis C virus entry : beyond receptors. **Rev. Med. Virol**, v. 22, n. March, p. 182–193, 2012.

MIHAILOVA, M.; FIEDLER, M.; BOOS, M.; et al. Preparation of hepatitis C virus structural and non-structural protein fragments and studies of their immunogenicity. **Protein expression and purification**, v. 50, n. 1, p. 43–8, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16889980>>. Acesso em: 8/9/2014.

MIHM, S.; FRESE, M.; MEIER, V.; et al. Interferon type I gene expression in chronic hepatitis C. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 84, n. 9, p. 1148–59, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15208644>>. Acesso em: 4/11/2012.

MISSALE, G.; BERTONI, R.; LAMONACA, V.; et al. Different Clinical Behaviors of Acute Hepatitis C Virus Infection Are Associated with Different Vigor of the Anti-viral Cell-mediated Immune Response. **Journal Clin. Invest**, v. 98, n. 5, p. 706–714, 1996.



MORA, M. **Estudos sobre infecções pelos vírus da Hepatite B (HBV), Hepatite C (HCV), Hepatite Delta (HDV) e vírus GB-C (GBV-C) em diferentes regiões da América do Sul**, 2011.

MORADPOUR, D.; BLUM, H. A primer on the molecular virology of hepatitis C. **Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver**, v. 24, p. 519–525, 2004.

MS. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde - Relatório de Situação - Amazonas. ,2011.

NAKANO, T.; LAU, G. M. G.; LAU, G. M. L.; SUGIYAMA, M.; MIZOKAMI, M. An updated analysis of hepatitis C virus genotypes and subtypes based on the complete coding region. **Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver**, p. 339–345, 2011.

NOVICK, D.; COHEN, B. The Human Interferon  $\alpha$  /  $\beta$  Receptor: Characterization and Molecular Cloning. **Cell**, v. 77, n. 6, p. 391–400, 1994.

PARTHIBAN, R.; SHANMUGAM, S.; VELU, V.; et al. Transmission of hepatitis C virus infection from asymptomatic mother to child in southern India. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 13, p. 394–400, 2009.

PAWLOTSKY, J. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. **TRENDS in Microbiology**, v. 12, n. 2, 2004.

PENIN, F.; BRASS, V.; APPEL, N.; et al. Structure and Function of the Membrane Anchor Domain of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 39, p. 1–10, 2004.

PENIN, F.; DUBUISSON, J.; REY, F. A.; MORADPOUR, D.; PAWLOTSKY, J. Structural Biology of Hepatitis C Virus. **Hepatology**, , n. 1, p. 5–19, 2004.

PESTKA, S.; KRAUSE, C. D.; SARKAR, D.; et al. I NTERLEUKIN -10 AND R ELATED C YTOKINES AND R ECEPTORS. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 929–79, 2004.

PLOSS, A.; EVANS, M. J.; GAYSINSKAYA, V. A.; et al. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. **Nature**, v. 457, n. 7231, p. 882–886, 2009. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature07684>>. .

RANDOLPH, T. W. The two faces of His-tag: immune response versus ease of protein purification. **Biotechnology journal**, v. 7, n. 1, p. 18–9, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22213648>>. Acesso em: 9/9/2014.

REHERMANN, B. Science in medicine Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses : a tale of coevolution and coexistence. **Science in medicine**, v. 119, n. 7, p. 1745–1754, 2009.

SARTRE, T.; VESSIE, A.; TIMBA, I.; et al. Distribution and Heterogeneity of Hepatitis C Genotypes in Hepatitis Patients in Cameroon. **Journal of Medical Virology**, v. 398, n. July, p. 390–398, 2005.

SATO, K.; ISHIKAWA, T.; OKUMURA, A.; et al. Expression of Toll-like receptors in chronic hepatitis C virus infection. **Hepatology**, v. 22, p. 1627–1632, 2007.

SCARSELLI, E.; ANSUINI, H.; CERINO, R.; et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. **The EMBO journal**, v. 21, n. 19, p. 5017–5025, 2002.

SCHINDLER, C.; LEVY, D. E.; DECKER, T. JAK-STAT Signaling : From Interferons to Cytokines \*. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 28, p. 20059–20063, 2007.

SCHMIDT-MENDE, J.; BIECK, E.; PENIN, F.; et al. Determinants for Membrane Association of the Hepatitis C Virus RNA-dependent RNA Polymerase \*. **The Journal of biological chemistry**, v. 246, n. 11, p. 44052–44063, 2001.

SCHOLTES, C.; RAMIÈRE, C.; RAINTEAU, D.; et al. High plasma level of nucleocapsid-free envelope glycoprotein-positive lipoproteins in hepatitis C patients. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 56, n. 1, p. 39–48, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22290760>>. Acesso em: 5/4/2013.

SEEFF, L. Natural history of chronic hepatitis C. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 36, n. 5 Suppl 1, p. S35–46, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12407575>>. Acesso em: 1/3/2013.

SEMMO, N.; LUCAS, M.; KRASHIAS, G.; et al. patients a decade after early therapy  
To the editor: **Blood**, v. 107, n. 6, p. 4570–4571, 2006.

SHEPARD, C. W.; FINELLI, L.; ALTER, M. J. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. **Lancet infect Dis**, v. 5, p. 558–67, 2005.

SHUKLA, D.; HOYNE, P.; WARD, C. Evaluation of complete genome sequences and sequences of individual gene products for the classification of hepatitis C viruses. **Archives of virology**, v. 140, p. 1747–1761, 1995.

SILLANPÄÄ, M.; MELÉN, K.; PORKKA, P.; et al. Hepatitis C virus core , NS3 , NS4B and NS5A are the major infection. **Virology journal**, v. 12, p. 1–12, 2009.

SILVA, A.; VITORINO, R.; ESPERIDIÃO-ANTONIO, V.; et al. Hepatites virais : B , C e D : atualização \*. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n. 3, p. 206–18, 2012.

SWAIN, M. G. Natural Killer T Cells within the Liver: Conductors of the Hepatic Immune Orchestra. **Immunology and Liver Disease**, v. 28, p. 7–13, 2010.

SY, T.; JAMAL, M. Epidemiology of Hepatitis C Virus ( HCV ) Infection. **International Journal of Medical Science**, v. 3, n. 2, p. 41–46, 2006.

TAN, A. C. L.; ERIKSSON, E. M. Y.; KEDZIERSKA, K.; et al. Polyfunctional CD8(+) T cells are associated with the vaccination-induced control of a novel recombinant influenza virus expressing an HCV epitope. **Antiviral research**, v. 94, n. 2, p. 168–78, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22504097>>. Acesso em: 6/12/2012.

TELLINGHUISEN, T. L.; RICE, C. M. Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. **Current opinion in microbiol**, v. 5, p. 419–427, 2002.

THIMME, R.; BUKH, J.; SPANGENBERG, H. C.; et al. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance , persistence , and disease. **Microbiology**, v. 99, n. 11, p. 15661–15668, 2002.

TORRES, K.; MALHEIRO, A.; TATENO, A.; et al. Hepatitis C Virus in Blood Donors , Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 2007–2009, 2009.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. **Biotechnology (Reading, Mass.)**, v. 24, n. 9, p. 145–9, 1979. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1422008>>. .

VELDT, B. J.; DUARTE-ROJO, A; THOMPSON, A J.; et al. Recipient IL28B polymorphism is an important independent predictor of posttransplant diabetes mellitus in liver transplant patients with chronic hepatitis C. **American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons**, v. 12, n. 3, p. 737–44, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22300408>>. Acesso em: 4/11/2012.

VILLAVERDE, A.; CARRIÓ, M. M. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. **Biotechnology letters**, v. 25, n. 17, p. 1385–95, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14514038>>. .

WEHRLI, W.; STAEHELIN, M. Actions of the rifamycins. **Bacteriological reviews**, v. 35, n. 3, p. 290–309, 1971. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=378391&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Media centre: **Hepatitis C**, fact sheet N 164, june de 2012. Disponível em URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>. Acessado em 25 de Abril de 2013.

