

Universidade Estadual Paulista
“Julio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara

**DESENVOLVIMENTO DE TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO PARA
DETECÇÃO DE ANTÍGENO CIRCULANTE DO VÍRUS DA HEPATITE C**

ANGELA YUMICO MIKAWA

*Tese Apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas
de Araraquara da Universidade Estadual Paulista para
Obtenção do Título de Doutor em Análises Clínicas – Sub-
área: Imunologia Clínica*

Orientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa
Co-Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva

Araraquara - SP
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

M636d Mikawa, Angela Yumico
Desenvolvimento de teste imunocromatográfico para detecção de antígeno circulante do vírus da hepatite C / Angela Yumico Mikawa. – Araraquara, 2006.
171 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas

Orientador: Paulo Inácio da Costa

Co-orientador: Flávio Henrique da Silva

1. Hepatite C – Vírus. 2. Proteína do core. 3. Antígeno. 4. Anticorpo. 5. Teste imunocromatográfico. I. Costa, Paulo Inácio., orient. .II. Silva, Flávio Henrique. III. Título.

CDD: 616.925

CAPES:40300005

TERMO DE APROVAÇÃO

NOME DO AUTOR: **ANGELA YUMICO MIKAWA**

TÍTULO DO TRABALHO: Desenvolvimento de teste imunocromatográfico para detecção de antígeno circulante do vírus da hepatite C

TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR

PRESIDENTE E ORIENTADOR: **Prof. Dr. PAULO INÁCIO DA COSTA**

INSTITUIÇÃO: Universidade Estadual Paulista - UNESP - Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - SP

SEGUNDO EXAMINADOR: **Prof. Dr. ANTÔNIO ALCI BARONE**

INSTITUIÇÃO: Universidade de São Paulo - USP - Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina São Paulo - SP

TERCEIRO EXAMINADOR: **Prof. Dr. BENEDITO ANTÔNIO LOPES DA FONSECA**

INSTITUIÇÃO: Universidade de São Paulo - USP - Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - SP

QUARTO EXAMINADOR: **Profª Dra. MARIA TERESA MARQUES NOVO**

INSTITUIÇÃO: Universidade Federal de São Carlos - UFSCar - Departamento de Genética e Evolução - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde de São Carlos - SP

QUINTO EXAMINADOR: **Profª Dra. NORMA DE PAULA CAVALHEIRO**

INSTITUIÇÃO: Universidade de São Paulo - USP - Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina São Paulo - SP

Araraquara, 02 de junho de 2006.

- **LOCAL DO DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA / BOLSA**

Trabalho realizado:

- ❖ No Laboratório de Imunologia Clínica - Biologia Molecular e Referência Regional em DST/AIDS, Núcleo de Atendimento à Comunidade (NAC) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Unidade Auxiliar da UNESP de Araraquara - Departamento de Análises Clínicas, Disciplina de Imunologia Clínica
- ❖ No Laboratório de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos

- **APOIO FINANCEIRO:**

- ❖ CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho - Bolsa Doutorado (Processo: 142240/2003-6)
- ❖ Núcleo de Atendimento à Comunidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara pelo suprimento de alguns materiais que foram essenciais para a realização deste trabalho

Dedico este trabalho

Aos meus pais Toshio e Eiko pelos enormes ensinamentos e por jamais terem deixado de me incentivar. Em sua simplicidade sempre foram símbolos de persistência, determinação e muita luta. Agradeço a educação - a base de tudo que sou hoje - e o mais que sempre fizeram por mim! Faltam-me palavras para expressar o quanto são importantes para mim!

Aos meus irmãos, Gina, Ricardo e Marcílio e meus sobrinhos, Karine, Patrícia e Willian pelo incentivo e apoio nas decisões e, sobretudo, por serem uma constante presença em minha vida.

Ao Luiz Adelar Guelfi por sua presença, carinho, compreensão e paciência: por nunca ter deixado de me incentivar nessa árdua, mas gratificante, caminhada.

Agradeço a Deus pelo conforto nas horas difíceis, pela força, saúde, paz interior e pelas pessoas especiais encontradas ao longo desses anos. Por conceder-me serenidade necessária para aceitar as coisas que não posso modificar, coragem para transformar aquelas que posso e sabedoria para distinguir umas das outras.....

As coisas acontecem na hora certa

As coisas acontecem exatamente quando devem acontecer!

Momentos felizes, louve a Deus.

Momentos difíceis, busque a Deus.

Momentos silenciosos, adore a Deus.

Momentos dolorosos, confie em Deus.

Cada momento, agradeça a Deus.

Agradeço aos que muito contribuíram para a realização deste trabalho, especificamente:

à Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Imunologia Clínica da UNESP, pela estrutura física e operacional para a realização deste trabalho

Ao Laboratório de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, onde parte deste trabalho foi realizada

ao Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa pela amizade e orientação; por ter me recebido em seu laboratório e ter me dado oportunidade de continuar o caminho da pesquisa, permitindo-me trilhar novas e fascinantes veredas e superar os novos desafios ao longo destes anos

ao Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva, a quem respeitosamente admiro por sua dedicação ao ensino e à ciência; sou-lhe grata por sua orientação e pela atenção com que sempre me recebeu

ao corpo docente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara e do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara pela contribuição em minha formação profissional

aos funcionários da Biblioteca do Instituto da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelos serviços prestados e pela ajuda na correção das referências bibliográficas

aos funcionários do Laboratório de Imunologia Clínica do Centro de Referência Diagnóstica (CRD): Keila Parra Alves Pinto, Milton Aurélio Marques da Silva, Maria Eugênia M. C. da Silva, Jussara H. C. Lessi, Maria Teresa Iannotti e Maria Inês da Silva

aos funcionários e aos pós-graduandos do Laboratório de Micologia Clínica, pelo auxílio prestado

ao Laboratório de Bioquímica Clínica e em especial ao funcionário Marcos Aparecido Dangona pelo apoio e auxílio

aos funcionários da Seção de Pós Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela atenção às Professoras Dra. Cleni Mara Marzochi Machado e Dra. Maria Teresa Marques Novo, que participaram da Banca de Qualificação e contribuíram com sugestões importantes para melhoria do trabalho e, principalmente, por serem pessoas especiais e terem me ajudado muito em fases importantes do trabalho

à Professora Dra. Yara Maria Lucisano Valim e à Farmacêutica Bioquímica Ana Elisa Caleiros Seixas Azzolini do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto, pela sempre atenção e presteza, e especialmente, por ter tornado possível a concretização da etapa de purificação do anticorpo em seu laboratório

às minhas amigas Sandra Antônia Tagliavini Santos e Fátima Aparecida Iagame pelos ensinamentos e incentivo e, sobretudo, pela amizade de sempre de todos esses anos

às minhas amigas Ana Paula Munhoz, Juliana Cristina da Silva e Ana Cláudia Gonçalves pelo apoio, torcida e carinho

à Rosana Bellan de Oliveira e Silva pela convivência, companhia, estímulo e por sua amizade ao longo de todos esses anos

aos amigos do Laboratório de Imunologia Clínica: Prof. Dra. Iracilda Zeppone Carlos Marisa Polesi, Ana Carolina Urbaczek, Michelle Rocha, Micheli Sassa, Danielle Cardoso Maia, Flávia C. Mascia Lopes, Fernanda Paulin Benzatti (Ber) e Fernanda Lopes Kinouchi pelo convívio agradável no decorrer de todos esses anos

aos pós-graduandos do Laboratório de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos Viviane Nogaroto, Andrea Gianotti, Cesar Sommer e em especial Luis Reyes pela amizade e auxílio em algumas fases do trabalho

e a todos que colaboraram de maneira direta ou indireta para a concretização deste trabalho:

Cada um que passa em nossa vida,

E nos deixa um pouco de si mesmo...

Passa sozinho

Há os que levam muito,

Porque cada pessoa é única para nós,

Mas não há os que não levam nada...

E nenhuma substitui a outra...

Há os que deixam muito,

Cada um que passa em nossa vida,

Mas não há os que não deixam nada..

Passa sozinho,

Esta é a mais bela realidade da vida.

Mas não vai só...

A prova tremenda da importância de cada um,

Cada um que passa em nossa vida,

É que ninguém se aproxima do outro por acaso...

Leva um pouco de nós mesmos,

(Antoine de Saint-Exupéry)

*“De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de podemos ser interrompidos antes de terminar...
Façamos da interrupção um novo caminho;
Da queda um passo de dança;
Do medo uma escada;
Do sonho uma ponte;
E da procura...
Um encontro”*

Fernando Sabino

SUMÁRIO

	<i>Página</i>
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS	18
ABREVIATURAS	19
RESUMO	20
ABSTRACT	22
1. INTRODUÇÃO	24
1.1. Histórico	25
1.2. Epidemiologia da Infecção pelo VHC	26
1.3. Morfologia e Organização Genômica do VHC	27
1.4. Variabilidade Genética do VHC	30
1.5. Replicação Viral	32
1.6. História Natural	34
1.7. Aspectos Clínicos	36
1.8. Manifestações Extra-Hepáticas	36
1.9. Transmissão	37
1.9.1. Transusão de sangue e hemoderivados	37
1.9.2. Uso de drogas injetáveis ou inaladas	37
1.9.3. Exposição nos estabelecimentos de saúde	38
1.9.4. Exposição entre parceiros sexuais	38
1.9.5. Exposição perinatal	39
1.10. Terapia	40
1.11. Diagnóstico	42
1.11.1. Testes Sorológicos	42

1.11.2. Testes Moleculares	45
1.11.3. Perspectivas da Utilização do Core na Detecção do VHC	46
2. OBJETIVOS	50
3. MATERIAL E MÉTODOS	52
3.1. Fluxograma de Trabalho	53
3.2. Seleção de Amostras	54
3.3. Isolamento e Amplificação do Gene do <i>CORE</i> do VHC	56
3.3.1. Isolamento do RNA Viral	56
3.3.2. Estudo dos Oligonucleotídeos Iniciadores	57
3.3.3. Reação de Transcrição Reversa do RNA-VHC	59
3.3.4. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	59
3.3.4.1. PCR Primeira Fase	59
3.3.4.2. Hemi-Nested PCR (Segunda Fase)	60
3.4. Reação de PCR para Adicionar Sítios de Restrição	61
3.5. Preparação do Gel de Agarose.....	62
3.6. Clivagem Enzimática do Produto de PCR	63
3.7. Purificação do Produto Amplificado	63
3.8. Expressão da Proteína do <i>Core</i> VHC	64
3.8.1. Vetor de Expressão pET	64
3.8.2. Preparo do Vetor pET28a-VHC	64
3.8.3. Preparo do Vetor pET42a-VHC	65
3.8.4. Ligação dos Produtos Amplificados ao Vetor pET	66
3.8.5. Preparo de Células Competentes	67
3.8.6. Transformação Bacteriana	67
3.8.7. Seleção de Clones Recombinantes	68

3.8.8. Extração Plasmidial	68
3.8.9. Seqüenciamento	69
3.8.10. Indução da Expressão Gênica	70
3.8.11. Análise das Proteínas	70
3.8.12. Teste de Solubilidade	71
3.9. Purificação da Proteína Expressa	71
3.9.1. Cromatografia de Afinidade em Coluna de Níquel	71
3.9.2. Cromatografia de Afinidade em Coluna de Glutathiona	72
3.10. Imunodeteção	73
3.10.1. Transferência e Reatividade da Proteína Recombinante	73
3.10.2. Slot Blot	74
3.11. Reação Imunoenzimática para Detecção de Anticorpos Anti-VHC	75
3.12. Imunização de Camundongos para Produção de Anticorpos Anti-Core VHC	76
3.13. Purificação da Fração IgG Anti-Core de Camundongo	78
3.14. Imunização de Coelhos para Produção de Anticorpos Anti-Core VHC	79
3.15. Purificação de Fração IgG Anti-Core VHC de Coelho	80
3.15.1. Precipitação da Fração IgG	80
3.15.2. Purificação em Coluna DEAE-Celulose	80
3.16. Preparo de Anticorpos Anti-Core VHC	81
3.17. Teste Imunocromatográfico	81
3.17.1. Conjugação da Solução Coloidal de Ouro com Anticorpo Policlonal Anti-Core VHC	81
3.17.1.1. Anticorpos Produzidos em Camundongos	82
3.17.1.2. Anticorpos Produzidos em Coelhos	83

3.17.2. Imobilização do Anticorpo na Membrana de Nitrocelulose	84
3.17.3. Preparo da Membrana de Fibra de Vidro	85
3.17.4. Construção da Fita para Teste Imunocromatográfico	86
3.17.5. Teste de Reatividade do Teste Imunocromatográfico	89
4. RESULTADOS	90
4.1. Identificação de Amostras VHC Positivas	91
4.2. Extração do RNA Viral e RT-PCR para a Região do <i>Core</i>	91
4.3. Clonagem e Seleção de Clones Recombinantes	93
4.4. Seqüenciamento do Produto Clonado	94
4.5. Expressão das Proteínas Completa (191 Aa) e Parcial (136aa) do <i>Core</i> VHC em Plasmídeo pET28a	96
4.6. Purificação das Proteínas do <i>Core</i> Expressas no pET 28a	98
4.7. Expressão das Proteínas Completa (191 Aa) e Parcial (136aa) do <i>Core</i> VHC em Plasmídeo pET42a	99
4.8. Purificação da Proteína GST-C136	101
4.9. Imunodeteção	102
4.10. Detecção de Anticorpos Anti-Core pelo Método ELISA	110
4.11. Produção de Anticorpo Policlonal Anti-GST-C136 em Camundongos ...	111
4.12. Produção de Anticorpo Policlonal Anti-GST- <i>Core</i> em Coelho	113
4.13. Purificação dos Anticorpos Policlonais	114
4.13.1. Anticorpos Produzidos em Camundongos	114
4.13.2. Anticorpos Produzidos em Coelhos	115
4.14. Condições pH e Concentração do Anticorpo Anti-GST-C136 Produzido em Camundongo	117
4.15. Condições pH e Concentração do Anticorpo Anti-GST-C136 VHC	

Produzido em Coelho	119
4.16. Teste com a Membrana De Nitrocelulose	121
4.17. Teste Imunocromatográfico com Proteína Adicionada: Anticorpo de Detecção Anti-GST-C136 de Camundongo	123
4.18. Teste Imunocromatográfico com Soro Positivo para VHC: Anticorpo de Detecção Anti-GST-C136 de Camundongo	124
4.19. Teste Imunocromatográfico com a Proteína Adicionada: Anticorpo de Detecção Anti-GST-C136 de Coelho	125
4.20. Teste Imunocromatográfico com Soro Positivo para VHC: Anticorpo de Detecção Anti-GST-C136 de Coelho	127
5. DISCUSSÃO	129
6. CONCLUSÕES	140
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	142
8. ANEXOS	165

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Representação esquemática da organização do RNA genômico do VHC	28
Figura 2 - Fluxograma de trabalho	53
Figura 3 – Representação esquemática da genotipagem	55
Figura 4 – Região do <i>core</i> do VHC amplificada	58
Figura 5 – Sítio de múltipla clonagem e expressão do pET28a	65
Figura 6 – Sítio de múltipla clonagem e expressão do pET42a	66
Figura 7 – Representação da montagem da fita imunocromatográfica	87
Figura 8 – Interpretação do resultado no teste imunocromatográfico	88
Figura 9 – Amplificação por PCR da região codificadora do <i>core</i>	92
Figura 10 – Seleção de colônias recombinantes pET42a-core 408pb	94
Figura 11 – Seleção de colônias recombinantes pET42a-core 573pb	94
Figura 12 – Alinhamento da seqüência clonada correspondente à região completa do core VHC de 573pb	95
Figura 13 – Alinhamento da seqüência clonada correspondente à região parcial do core VHC de 408pb	96
Figura 14 – Análise em gel de poliacrilamida 15% da expressão da proteína His-C136 (17kDa)	97
Figura 15 – Análise em gel de poliacrilamida 15% da expressão da proteína His-C191 (23kDa)	97
Figura 16 – Análise da purificação da proteína His-C136 em gel de poliacrilamida 15%.....	98
Figura 17 – Análise da purificação da proteína His-C191 em gel de poliacrilamida 15%.....	98
Figura 18 – Análise em gel de poliacrilamida 15% da expressão da proteína GST-C136	

(44kDa)	100
Figura 19 – Análise em gel de poliacrilamida 15% da expressão da proteína GST-C191 e da GST	100
Figura 20 – Análise em gel de poliacrilamida 15% da purificação da proteína GST-C136 (44kDa) em coluna de afinidade a glutaciona	101
Figura 21A – Análise em gel de poliacrilamida 15% da expressão da proteína His-C136 (17kDa)	103
Figura 21B – Reação de imunodeteção da proteína recombinante His-C136	103
Figura 22A – Análise em gel de poliacrilamida 15% da expressão da proteína GST-C136	104
Figura 22B – Reação de imunodeteção da proteína recombinante GST-C136	104
Figura 23A – Análise em gel de poliacrilamida 15% da expressão da proteína GST-C136	106
Figura 23B – Reação de imunodeteção da proteína recombinante GST-C136	106
Figura 24A – Reatividade dos anticorpos anti-VHC	108
Figura 24B – Teste de especificidade da proteína recombinante	108
Figura 25 – <i>Slot Blot</i> realizado com 0,048µg a 38,40µg da proteína recombinante	109
Figura 26 – Reatividade dos anticorpos anti-GST-C136 produzido em camundongo	112
Figura 27 – Reatividade dos anticorpos anti-core VHC produzidos em coelho	113
Figura 28 – Reatividade do anti-GST-C136 produzido em camundongo e purificado em coluna <i>HiTrap protein G</i>	114
Figura 29 – Purificação do anticorpo produzido em coelho utilizando cromatografia DEAE-celulose	115
Figura 30 – Reatividade dos anticorpos anti-GST-C136 produzidos em coelho e purificados em coluna DEAE-celulose	116

Figura 31 – Determinação das condições ótimas para conjugação do anticorpo anti-GST-C136 produzido em camundongo com a solução coloidal de ouro	118
Figura 32 – Determinação das condições ótimas para conjugação do anticorpo anti- <i>core</i> VHC produzido em coelho com a solução coloidal de ouro.....	120
Figura 33 – Teste imunocromatográfico com as membranas de nitrocelulose de alto fluxo	122
Figura 34 – Teste imunocromatográfico mostrando reatividade com 0,25µg a 12,0µg da proteína recombinante adicionada ao soro	123
Figura 35 – Teste imunocromatográfico realizado soro positivo para o VHC	124
Figura 36 – Teste imunocromatográfico mostrando reatividade com 1,5µg a 6,0µg da proteína recombinante adicionada ao soro	126
Figura 37 – Teste imunocromatográfico realizado soro positivo para o VHC	128
Figura 38 – Sequência codificadora do <i>core</i> do VHC	166
Figura 39 – Sequenciamento do gene do <i>core</i> do VHC clonado no pET28a	167
Figura 40: Representação esquemática código genético e os aminoácidos codificados ...	168
Figura 41: Representação esquemática do vetor pET28a	170
Figura 42: Representação esquemática do vetor pET42a	171

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

	Página
Tabela 1 – Sensibilidade e valor preditivo do ELISA para detecção de anticorpos anti-VHC	43
Tabela 2 – Relação dos oligonucleotídeos iniciadores obtidos da <i>Applied Biosystems</i> e utilizados nas reações de amplificação	57
Tabela 3 – Protocolo de amplificação da primeira reação de PCR	60
Tabela 4 – Protocolo de amplificação da reação da segunda reação de PCR	61
Tabela 5 – Protocolo de amplificação da reação para adicionar sítios de clivagem para as enzimas <i>Nco I / Nde I</i> e <i>Bam HI</i>	62
Tabela 6 – Valores de absorvância empregando a proteína GST-C136 realizada em soros positivos para o VHC e para as principais doenças inflamatórias ou infecciosas crônicas	111
Tabela 7 – Abreviação dos aminoácidos	169

ABREVIATURAS

Bam HI - Enzima de Restrição Extraída do Microorganismo *Bacillus amyloliquefaciens* H

BSA – Soro Albumina Bovina

C - Core

c-DNA - DNA fita complementar

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

dNTP – Desoxinucleosídeo Trifosfato

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

g – Velocidade de Sedimentação em Unidade Gravitacional

GST - Glutathione S-Transferase

IgG - Imunoglobulina G

kDa - Kilo Daltons = 1000 Daltons

LB - Luria Bertani - Meio Cultura para Crescimento Bacteriano

M – Molar

Nco I - Endonuclease de Restrição Extraída do Microorganismo *Nocardia coralline*

Nde I - Enzima de Restrição Extraída do Microorganismo *Neisseria denitrificans*

ORF - Open Reading Frame

PBS - Solução Salina Tamponada Fosfatada

RNA – Ácido Ribonucléico

RNase - Ribonuclease

rpm - Rotação por Minuto

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

UTR - Untranslated Regions

UV – ultravioleta

RESUMO

A região estrutural do gene do vírus da hepatite C (VHC) consiste de três regiões: o *core* (C) (codifica proteínas do nucleocapsídeo), o E1 e o E2 (que codificam proteínas do envelope), e a não estrutural, consiste de pelo menos quatro domínios (NS2-NS5) que codificam as proteínas funcionais. A proteína do *core* possui seqüência de aminoácidos altamente conservada entre os diferentes isolados do VHC, sendo utilizada em vários testes diagnósticos comerciais para a detecção de anticorpos anti-VHC. Fundamentado na importância da proteína *core* do VHC em testes diagnósticos, este trabalho teve como proposta o desenvolvimento de um teste rápido, de fácil exequibilidade, boa sensibilidade e especificidade para detecção do antígeno do *core* circulante do VHC, baseado no processo imunocromatográfico. Para atingir este objetivo, foram realizados o isolamento do RNA viral do VHC (genótipo 1b) e a amplificação da seqüência de 408pb do *core* do VHC por meio da técnica de RT-PCR. Este produto foi clonado em vetor pET42a. O vetor recombinante foi introduzido em bactérias da linhagem Rosetta (DE3). Após o cultivo das colônias, a indução foi realizada em concentração final de 0,4mM de IPTG (Isopropil- β -D-Tiogalactosídeo). As bactérias foram lisadas e as frações solúvel e insolúvel, analisadas em gel de poliacrilamida 15%, mostrando uma banda aparente de 44kDa, tamanho esperado da proteína recombinante fusionada a GST (Glutathione-S-Transferase). A proteína recombinante do *core* foi confirmada por imunodetecção utilizando soro positivo para o VHC e mostrou alto potencial de aplicação em diagnóstico sorológico pela ausência de reatividade cruzada com amostras positivas para outras doenças infecciosas e boa reatividade encontrada no teste de *immunoblot*. A seguir, a proteína foi purificada e empregada para produção de anticorpos em camundongos e coelhos para ser aplicada no ensaio imunocromatográfico. Posteriormente à padronização das condições ideais, realizamos a avaliação da metodologia desenvolvida. Para se obter a curva dose-resposta, a proteína recombinante foi diluída em concentrações de 0,20 a 800 μ g em soro

negativo para VHC. Resultado positivo foi obtido em intervalo de concentração do antígeno de 0,25µg a 12,0µg e 1,5µg a 6,0µg para anticorpo anti-*core* VHC produzido em camundongo e em coelho, respectivamente. Quando testada em amostra VHC+, a positividade estava presente, fracamente, na diluição do soro 1:30 e com maior intensidade em 1:20, 1:10, 1:4 e 1:2 para o teste construído com anticorpo produzido em camundongo, e para o gerado em coelho, visível fracamente na diluição 1:10 e mais intenso nas diluições 1:4 e 1:2. Em altas concentrações não se observou resultado, apesar de o antígeno estar presente, provavelmente, pela saturação do anticorpo de detecção fixado à membrana e, conseqüentemente, o conjugado colóide-anticorpo-*core* não encontraria sítios livres para se ligar, sendo apenas detectado pelo anticorpo de captura. No teste imunocromatográfico, verificamos que o anticorpo de coelho revelou-se menos sensível para detecção do antígeno do *core* que o produzido em camundongo. Embora observada esta limitação, o desenvolvimento do ensaio imunocromatográfico proposto neste trabalho alcançou resultado satisfatório, mostrando-se capaz de detectar o antígeno do *core* em amostra positiva para o VHC. Após pequenas adaptações do método imunocromatográfico desenvolvido neste trabalho para detecção da proteína do *core* em amostra VHC+, a sua utilização abre perspectivas para uso no diagnóstico da hepatite C em fase de pré-oroconversão, contribuindo para diminuir a possibilidade de resultados falso-negativos em casos de infecção recente; na utilização em acidentes ocupacionais, onde um resultado rápido é necessário e também no monitoramento da terapêutica.

Palavras-Chaves: vírus da hepatite C, proteína do *core*, antígeno, anticorpo, teste imunocromatográfico

ABSTRACT

The structural region of the hepatitis C virus (HCV) is encoded by three genes: core (C) (it encodes nucleocapsid proteins), E1 and E2 (that encode envelope proteins). The nonstructural region is constituted by at least four domains (NS2-NS5) that encodes the functional proteins. The core protein possesses amino acids sequences highly conserved among several HCV strains isolated. It is used in several tests commercial diagnosis for the detection of antibodies anti-VHC. The HCV core protein shows immense significance in the diagnosis tests. Therefore this research had as proposal the development of a rapid investigation, easy performance, high-quality sensibility and specificity for detection of the VHC core antigen based on the immunochromatographic process. Toward to achieve this aim we accomplished the isolation of the viral HCV RNA (genotype 1b) and performed the amplification of the HCV core 408pb sequence through the RT-PCR technique. This product was cloned into pET42a vector. The recombinant plasmid was transformed into Rosetta (DE3) cell line strain. Cell cultures were grown and induced with final concentration of 0,4mM of IPTG (isopropyl - β - D- thiogalactoside). After induction, the cell were harvest and the soluble and insoluble fractions were analyzed by polyacrilamide gel 15% showing a band with an approximate molecular weight of 44kDa, expected size for this GST-fused (Glutathione-S-Transferase) recombinant protein. The recombinant protein was confirmed by immunological detection using HCV positive serum. It showed high application in serological diagnosis because of the absence of cross reactivity with positive samples for other infectious diseases and moreover for the specificity and sensibility which was reached in the immunoblot test. The recombinant protein was purified and used for production of antibodies in mice and rabbits. Subsequently, it was applied in the immunochromatographic analysis after purification. Then, we accomplished the evaluation of the developed methodology under optimal conditions. The recombinant protein was diluted in concentrations from 0.20 μ g to 800 μ g in negative serum

for HCV in order to obtain dose-responses of the analytical system to confirm assay performance. Positive result was obtained in antigen concentration interval of the 0.25 μ g to 12.0 μ g and 1.5 μ g to 6.0 μ g using anti-core HCV antibody produced in mouse and in rabbit, respectively. When tested in sample HCV+, the positivity was found weakly in the dilution of the serum 1:30 and with larger intensity in 1:20, 1:10, 1:4 and 1:2 dilutions for the test prepared with antibody produced in mouse. The antibody that was generated in rabbit reacted weakly in 1:10 and more intense in the 1:4 and 1:2 dilutions. In higher concentrations than this, any results were not observed. Though the antigen was present the saturation of the antibody detection fixed in the membrane and consequently colloid-antibody-core conjugated it would not find free site to bind. It will only be detected by the capture antibody. In the immunochromatographic test, we demonstrated that the rabbit antibody revealed less sensitive for detection of the core antigen that produced it in mouse. The immunochromatographic method development proposed in this study achieved good result. It was shown capable to identify the core antigen in HCV positive sample although we had observed this limitation related with the antigen concentration. The immunochromatographic technique was developed in this study for detection of the core protein in sample VHC+ and it will open new perspectives for use in the diagnosis of the hepatitis C during the early seroconversion phases. In addition it can contribute to reduce the possibility of false-negative results in cases of recent infection and in the use in occupational accidents where a fast result is necessary and in therapeutic monitoring.

Keywords: hepatitis C virus, core protein, antigen, antibody, immunochromatographic test

1 – INTRODUÇÃO

1.1. HISTÓRICO

No passado as epidemias de icterícias que ocorriam durante as guerras ou através do compartilhamento de seringas em clínicas médicas sugeriam a existência de dois diferentes tipos de doenças, uma transmitida pelo sangue e outra por material fecal. A década de 60 foi marcada por grandes estudos e achados, fornecendo subsídios para o estabelecimento de estratégias de controle de doenças. O grande marco das descobertas sobre a etiologia das hepatites data de 1967, em que Blumberg et al. revelaram que os anticorpos presentes no soro de pacientes que receberam múltiplas transfusões reagiam com antígenos presentes no soro de aborígenes australianos. Esse antígeno foi denominado de Austrália (AgAu) e estes mesmos pesquisadores descobriram sua relação com hepatites virais. Posteriormente o AgAu foi introduzido nos ensaios de triagem em bancos de sangue. Neste mesmo ano, Krugman et al. (1967) comprovaram a existência de dois agentes etiológicos distintos que causavam hepatite, um chamado de MS1 (agente infeccioso) e outro MS2 (presente no soro), posteriormente denominados de hepatites A e B, respectivamente. Após o desenvolvimento de testes diagnósticos para os vírus da hepatite A e B na década de 70 foi reconhecido um agente etiológico responsável por hepatite transfusional não associado nem ao vírus A e nem ao B. O termo hepatite não-A e não-B (HNANB) foi introduzido por Prince et al. (1974) para designar esses casos.

Vários estudos com esse agente foram realizados envolvendo chimpanzés na década de 80. No entanto, somente com Choo et al. (1989), juntamente com pesquisadores da *Chiron Corporation* e do *Center for Disease Control* (CDC), através dos avanços da biologia molecular, puderam clonar e expressar RNA extraído de chimpanzés infectados. Esses pesquisadores construíram uma biblioteca genômica de cDNA derivado de plasma de chimpanzé infectado utilizando como vetor um bacteriófago λ g11. Esse fago foi empregado para que o polipeptídeo codificado pelo cDNA fosse expresso e, posteriormente, submetido à

triagem com soro de um paciente crônico infectado com HNANB. Foram rastreados aproximadamente 10^6 fagos λ g11 recombinantes para identificar o clone positivo de cDNA, denominado clone 5-1-1. Vários ensaios concomitantes à clonagem foram realizados para confirmar a origem viral desse clone, sendo constatado como um RNA simples fita com tamanho estimado entre 5.000 e 10.000 nucleotídeos, possuindo uma única *ORF* (*open reading frame*) com características similares às famílias *Togaviridae* e *Flaviviridae*. A partir de então o vírus causador da HNANB passou a ser designado de vírus da hepatite C (VHC) (CHOO et al., 1989).

Após a clonagem do gene do VHC, Kuo et al. (1989) desenvolveram um ensaio em que clones de leveduras recombinantes expressavam a proteína 5-1-1 como um peptídeo fusionado à enzima superóxido desmutase (SOD). Esse polipetídeo, chamado c100-3, foi o primeiro antígeno utilizado para testes de captura de anticorpos virais (anti-VHC) circulantes. A partir deste desenvolvimento testes sorológicos foram desenvolvidos utilizando várias regiões estruturais e não-estruturais do VHC, e a triagem de casos, anteriormente classificados como HNANB, mostraram que eram causados pelo VHC.

1.2. EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO VHC

A infecção pelo vírus da hepatite C (VHC), atualmente, é reconhecida como a causa primária da hepatite “não A, não B” associada à transfusão (CHOO et al., 1989). A Organização Mundial de Saúde estima que cerca de 3% (entre 170 a 250 milhões de pessoas) da população mundial sejam portadoras da hepatite C crônica, e aproximadamente 3 a 4 milhões de pessoas tornam-se infectadas a cada ano. É, atualmente, a principal causa de transplante hepático em países desenvolvidos, e responsável por 60% das hepatopatias crônicas (WHO, 2003).

Nos Estados Unidos, nos países da Europa e no Japão a prevalência atinge médias percentuais de 1% a 2% da população total. O país com a maior incidência é o Egito, com mais de 15% de sua população infectada. No Brasil os dados ainda são muito precários, mas estudos realizados em doadores de sangue estimam uma incidência de 1,2%, com diferenças regionais: Norte atingindo 2,1%; Nordeste 1%; Centro-Oeste 1,2%; Sudeste 1,4% e Sul 0,4% (CVE, 2002).

1.3. MORFOLOGIA E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO VHC

O vírus da hepatite C é um vírus envelopado com cerca de 50 a 70nm de diâmetro, fita positiva de RNA e pertence ao gênero do *Hepacivirus* e à família *Flaviridae*. Seu genoma é constituído por cerca de 9.500 nucleotídeos com regiões curtas não codificadoras e hiperconservadas nas extremidades 5' e 3' *UTR* (*Untranslated Regions*), flanqueando uma única *ORF* (*Open Reading Frame*) (HOUGHTON et al., 1991). A região 5' *UTR*, altamente conservada, possui 341 nucleotídeos com uma estrutura secundária complexa que funciona como uma *IRES* (*Internal Ribosome Entry Site*), que permite a ligação direta do RNA viral ao ribossomo da célula infectada, próxima ao códon de iniciação da *ORF*, possibilitando a tradução das proteínas virais (Di BISCEGLIE, 1999; BARTENSCHLAGER e LOHMANN, 2000; ROSEMBERG, 2001). A 3' *UTR* é dividida em três regiões: um segmento hipervariável de 40 nucleotídeos, uma cauda poli-U variável em extensão e uma região altamente conservada de 98 nucleotídeos, essencial para replicação *in vivo* (Di BISCEGLIE, 1999; BARTENSCHLAGER e LOHMANN, 2000; ROSEMBERG, 2001). A *ORF* codifica uma poliproteína precursora de aproximadamente 3.010 resíduos de aminoácidos que é clivada via mecanismos de sinalização do hospedeiro e proteases virais, em cerca de 10 diferentes proteínas estruturais e não estruturais (NS) (ENCKE et al., 1998), como demonstra a Figura 1.

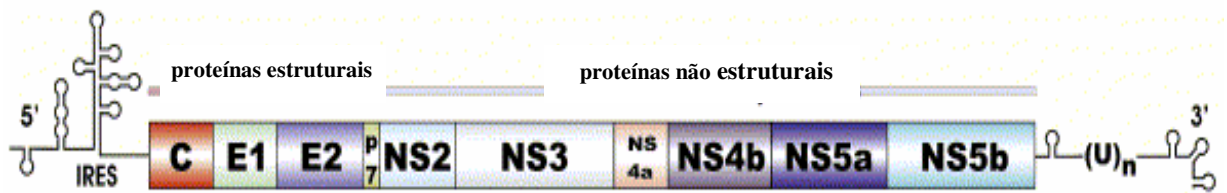


Figura 1: Representação esquemática da organização do RNA genômico do VHC. O genoma é constituído por 9.500 nucleotídeos. As regiões 5'UTR que contêm *IRES* (*Internal Ribosome Entry Site*) e a 3'UTR flanqueiam a *ORF* (*Open Reading Frame*), cuja poliproteína correspondente é clivada em proteínas estruturais e não estruturais. Proteínas estruturais: o C (*Core*), E1 e E2 (glicoproteínas de envelope 1 e 2, respectivamente) estão localizadas na porção N-terminal da poliproteína. Proteínas não estruturais: NS2-5 (proteínas não estruturais 2 ao 5). P7: proteína P7, localizada na extremidade 3' de E2 (Extraído de ROINGEARD et al., 2004).

A região estrutural consiste de três genes: o *core* (*C*) (codifica proteínas do nucleocapsídeo), o E1 e o E2 (que codificam proteínas do envelope) (STADHOUDERS e COOREMAN, 1997). A proteína do *core* possui seqüência de aminoácidos altamente conservada entre os diferentes isolados do VHC (KATO et al., 1990; OKAMOTO et al., 1990; CHOO et al., 1991), sendo utilizada como importante alvo antigênico em vários testes diagnósticos comerciais para a detecção de anticorpos anti-VHC. É uma proteína fortemente básica, sendo o principal constituinte do nucleocapsídeo e, além disso, parece estar associada a diversas funções, como modulação da transcrição gênica, proliferação, morte e sinalização celular, podendo interferir com metabolismo lipídico e suprimir a resposta imune do hospedeiro via mecanismos ainda não conhecidos (McLAUHLAN, 2000; LAI e WARE, 2000; KATO, 2000). Inicialmente, a proteína do *core* apresentava um total de 191 aminoácidos em análises de transcrição e tradução *in vitro* (HIJIKATA et al., 1991). No

entanto, vários grupos inferiram que um segundo processamento da porção hidrofóbica C-terminal do *core* poderia ocorrer durante seu processo de maturação, resultando em proteínas de pesos moleculares de 21kDa, 19kDa ou 16kDa (LO et al., 1994; LIU et al., 1997; YASUI et al., 1998). As proteínas de envelope E1 e E2 do VHC são altamente glicosiladas e apresentam 30 e 70kDa, respectivamente. Estudos demonstram que as duas glicoproteínas de envelope apresentam função fundamental em diferentes etapas do ciclo de replicação do VHC, atuando de forma essencial para entrada, ligação ao receptor e fusão com a membrana da célula hospedeira (BARTENSCHLAGER e LOHMANN, 2000; BARTOSCH et al., 2003). Na seqüência da glicoproteína de envelope E2 foram identificadas duas regiões hipervariáveis: a região hipervariável 1 (HVR1), abrangendo os 27 primeiros aminoácidos e diferindo aproximadamente 80% entre os genótipos VHC (FARCI et al., 1996), e a região hipervariável 2 (HVR2), encontrada em vírus pertencente ao genótipo 1 do VHC, com 7 aminoácidos (posição 91-97) e 100% de diversidade entre as seqüências (KATO, 2001). Para a proteína p7, estudos apontam que possa mediar a permeabilidade de íons e formar hexâmeros e, até mesmo, apresentar importante função na maturação e liberação da partícula viral (GRIFFIN et al., 2003; PAVLOVIC et al., 2003).

A região não estrutural consiste de pelo menos quatro domínios (NS2-NS5) que codificam as proteínas funcionais, ou seja, as enzimas RNA polimerase RNA-dependente, replicase/helicase, serina protease e metaloprotease (STADHOUDERS e COOREMAN, 1997). A NS2 e o domínio aminoterminal do NS3 constituem a protease NS2-3 que catalisa a clivagem do sítio NS2-NS3 (BARTENSCHLAGER e LOHMANN, 2000). A NS3 é uma molécula bifuncional: possui na extremidade amino-terminal uma serina protease que cliva os sítios NS3/4A, NS4A/B, NS4B/5A e NS5A/B e na carboxi-terminal atividades nucleotídeo-trifosfatase (NTPase) e helicase, essenciais para tradução e replicação do VHC (Di BISCEGLIE, 1999; TAYLOR et al., 2000; BARTENSCHLAGER e LOHMANN, 2000). A

NS4A é uma proteína de 54 aminoácidos e atua como um cofator, formando um complexo estável com a NS3. Este complexo é requerido para eficiente processamento das proteínas da região NS (BARTENSCHLAGER et al., 1994; LANDRO et al., 1997). A proteína NS4B é uma proteína altamente hidrofóbica de 261 aminoácidos e sua função ainda é desconhecida. A NS5A é altamente fosforilada nos resíduos serina da região central (TANJI et al., 1995). O nível de fosforilação é influenciado pela NS4A via interação direta do NS5A (ASABE et al., 1997). Embora a função da NS5A no ciclo viral do VHC não seja ainda conhecida, estudos revelam a associação entre os aminoácidos 2209 a 2248 e a sensibilidade ou resistência ao interferon (IFN), podendo esta região ser utilizada para se estabelecer um prognóstico à terapia (ENOMOTO et al., 1996). A NS5B apresenta 591 aminoácidos e foi identificada como RNA polimerase dependente de RNA (LOHMANN et al., 1997; YAMASHITA et al., 1998).

1.4. VARIABILIDADE GENÉTICA DO VHC

O genoma do VHC exibe significante variabilidade genética, como resultado de mutações espontâneas que ocorrem durante a replicação viral. Devido a essa variabilidade encontrada, um sistema consenso de nomenclatura foi proposto por Simmonds et al. (1994), onde os grupos principais do vírus são designados como genótipos e discriminados com numerais arábicos e os subtipos, dentro de um mesmo genótipo, são indicados por letras minúsculas por ordem de descoberta. Existem, pelo menos, 6 genótipos e mais de 50 subtipos descritos (LIANG et al., 2000; STUMPF e PYBUS, 2002). A terminologia utilizada para apresentar a complexidade (tipo e subtipo) viral é baseada no grau de variabilidade de seus nucleotídeos: genótipos do VHC-RNA diferem aproximadamente 30% a 35% em sua seqüência nucleotídica completa; subtipos (pertencentes a um mesmo

genótipo) 20% a 25%; isolados 5% a 10%, e, quasispécies menos que 2% (STUMPF e PYBUS, 2002).

O termo quasispécies refere-se a uma mistura heterogênea de vírus, diferindo somente por poucos nucleotídeos, em um mesmo hospedeiro infectado com o VHC e contribui para o escape imune viral, estabelecendo uma infecção crônica no hospedeiro, e para a resistência do hospedeiro às drogas utilizadas no tratamento (BUKH et al., 1995a). Essas variantes podem ser geradas pela substituição de nucleotídeos ocorrida devido à falta de fidelidade da RNA polimerase RNA dependente ou pela combinação da adaptação viral e pressão imune. A existência de quasispécies dificulta o desenvolvimento de vacinas para o VHC e favorece a perpetuação do vírus no organismo. A taxa de mutação no organismo humano é de cerca de $1,5$ a $2,0 \times 10^{-3}$ substituições de bases por sítio do genoma ao ano (BUKH et al., 1995b). Esta diversidade genética não é distribuída de maneira regular no genoma viral. As regiões não codificadoras são relativamente conservadas, enquanto as regiões do envelope, especialmente a região hipervariável 1 (HVR1), apresentam taxa de mutação maior. Indivíduos que desenvolvem infecção crônica apresentam uma diversidade dessa região significativamente elevada após 8 a 11 semanas quando comparados a pacientes que eliminam o vírus durante a fase aguda (FARCI et al., 2000).

Os genótipos têm uma distribuição geográfica distinta. Alguns genótipos do VHC, como 1a, 1b, 2a, 2b e 3a, têm distribuição em todo o mundo; outros, como 5a e 6a, somente são encontrados em regiões geográficas específicas (SMITH et al., 1997; STUMPF e PYBUS, 2002). Além da distribuição geográfica, os genótipos estão associados a diferentes graus de severidade na doença crônica do fígado e também na resposta ao interferon (IFN) utilizado no tratamento. A heterogeneidade genética do VHC pode ser a explicação para algumas diferenças biológicas observadas na infecção dos pacientes. Em particular, o genótipo 1b tem sido associado a maior severidade da doença hepática do que outros

genótipos, incluindo o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (BRUNO et al., 1997; TANAKA et al., 1998). Além disso, estudos revelam que pacientes cronicamente infectados com o VHC genótipo 1 respondem menos favoravelmente a monoterapia com interferon ou interferon peguilado ou em combinação com ribavirina, comparado com pacientes infectados com os genótipos 2 ou 3 (McHUTCHISON et al., 1998, POYNARD et al., 1998).

1.5. REPLICAÇÃO VIRAL

A infecção pelo VHC é caracterizada pela replicação viral nos hepatócitos, mas pode infectar outras células extra-hepáticas, tais como as mononucleares do sangue periférico e as biliares. Estas infecções de células não hepáticas estariam atuando como potenciais reservatórios, contribuindo para a seleção de variantes e a persistência viral (GIANNINI e BRÉCHOT, 2003).

Alguns modelos, para elucidar as etapas do ciclo e da replicação viral, têm sido propostos. A glicoproteína E2 do VHC liga com alta afinidade a uma alça do CD81, uma tetra-espamina encontrada na superfície de muitas células, incluindo hepatócitos (PILERI et al., 1998). No entanto, o CD81 isoladamente não é suficiente para mediar a entrada celular do vírus, e vários outros co-fatores podem estar atuando nessa interação. Os receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDLr) (AGNELLO et al., 1999) e receptor *scavenger* tipo B classe I (SR-BI) (SCARSELLI et al., 2002) apresentariam grande importância nessa relação com o VHC. Diversos estudos relatam a associação presente entre a infecção do vírus e o metabolismo de lipídeos no fígado. Partículas do VHC circulantes mostram densidade heterogênea, o que poderia refletir a ligação destes vírus ao VLDL (lipoproteínas de densidade muito baixa) e LDL (lipoproteína de baixa densidade). A literatura suporta a teoria de que as lipoproteínas poderiam proporcionar acréscimo da infectividade por certos componentes do soro humano (MEUNIER et al., 2005; LAVILLETTE et al., 2005). Além

disso, a relação do VHC com LDL parece aumentar a entrada deste vírus mediada pela SR-BI e proteger as partículas virais de anticorpos neutralizantes (BARTOSCH et al., 2005).

Após a entrada do vírus na célula hospedeira, há a liberação do RNA viral fita simples positiva no citoplasma da célula hospedeira. O genoma fita positiva dos vírus serve de molde para a tradução e replicação, dando origem às interações entre fatores de tradução do hospedeiro e replicação do RNA. Todos os vírus caracterizados como RNA fita-positiva organizam o complexo de replicação do RNA nas membranas intracelulares, formando vesículas ou outros rearranjos da membrana (AHLQUIST et al., 2003). Além disso, estudos relatam que ocorre a produção e a liberação de nucleocapsídeos não envelopados do VHC na circulação sanguínea e o acúmulo de partículas do *core* em células do fígado durante uma fase inicial da infecção, o que representa um meio não convencional pelo qual o vírus engana a resposta imune do hospedeiro e assegura uma infecção persistente via interação com receptores de complemento (gC1qR) e ocasiona a redução da resposta dos linfócitos T (KITTLESEN et al., 2000; MAILLARD et al., 2001).

As pesquisas para o entendimento do ciclo do VHC e sua patogênese eram bastante limitados devido à ausência de um sistema eficiente de cultura de células e modelos animais de infecção. O sistema *replicon* revolucionou a pesquisa no processo de replicação. O *replicon* consiste no RNA genômico do vírus capaz de se auto-replicar exclusivamente em células do hepatoma humano (Huh7) (LOHMANN et al., 1999; BLIGHT et al., 2000). No entanto, as etapas de infecção e entrada na célula e a liberação viral não puderam ser analisadas por este sistema, devido à ausência de expressão proteínas do VHC e a deficiência de secreção de partículas virais ou encapsulação (LOHMANN et al., 1999; BLIGHT et al., 2000; KATO et al., 2003). Wakita et al. (2005) gerou o *replicon* para o genótipo 2a (JFH-1) que foi isolado de um paciente com hepatite fulminante (KATO et al., 2003). Neste trabalho, a replicação foi eficiente em diferentes tipos celulares, no entanto, a seqüência completa

(JFH-1) produzia partículas virais infecciosas mas não podiam ser mantidos em culturas de células (WAKITA et al., 2005; ZHONG et al., 2005). Um estudo recente, desenvolvido por Lindenbach et al. (2005), representou o primeiro trabalho em que a replicação e a produção de partículas virais mantinham-se infecciosas em cultura de células. Ainda, esta replicação foi inibida por Interferon- α (NF- α) e por várias drogas antivirais. Neste trabalho, foi construído um genoma quimérico utilizando a região do core e NS2 cepas do VHC da linhagem J6 (genótipo 2a) e H77 (genótipo 1a), chamado de FL-J6/JFH. Este genoma replica e produz altos níveis de vírus infecciosos em cultura de células. Este mesmo sistema (FL-J6/JFH) foi utilizado para verificar a viabilidade desses vírus *in vivo*, pelo emprego de dois modelos animais, chimpanzés e camundongos (LINDENBACH et al., 2006). Este estudo comprovou a capacidade do FL-J6/JFH se replicar nestes dois modelos e, ainda, obteve-se sucesso na recuperação deste vírus e a manutenção de sua infectividade em cultura de células (LINDENBACH et al., 2006). Estes sistemas desenvolvidos nos últimos anos representam o alicerce para o promover importante progresso nos aspectos que envolvem o ciclo viral e o desenvolvimento de drogas mais eficazes para o controle do VHC.

1.6. HISTÓRIA NATURAL

A história natural do VHC é bem variável. Os pacientes com hepatite C desenvolvem doença crônica e lenta, sendo que a maioria (90%) é assintomática ou apresenta sintomas muito inespecíficos, como letargia, dores musculares e articulares, cansaço, náuseas ou desconforto no hipocôndrio direito (MORTON e KELEN, 1998). Após infecção pelo VHC, cerca de 55% a 80% dos indivíduos tornam-se infectados crônicos. A idade está relacionada ao risco de evolução para a cronicidade e à progressão da doença. Entre crianças e jovens adultos a eliminação espontânea ocorre em torno de 40% a 45% e o desenvolvimento de cirrose em 2% a 4% após 20 anos de infecção (VOGT et al., 1999; KENNY-WALSH,

1999). No entanto, indivíduos com idade mais avançada eliminam o vírus menos frequentemente (aproximadamente 20%) e cerca de 20% a 30% progridem para cirrose após 20 anos ou mais de infecção (FREEMAN et al., 2001).

Entre os indivíduos que desenvolvem cirrose o risco para descompensação hepática é de aproximadamente 1,4% a 6,9% (SERFATY et al., 1998; BENVEGNO et al., 2004). A prevenção de complicações relacionadas ao fígado, incluindo cirrose e carcinoma hepatocelular, é um importante alvo da terapia antiviral. O risco e benefício da terapia antiviral requerem o conhecimento da história natural da infecção e antecipação do risco futuro para complicação hepática. Diversos fatores têm sido considerados como potenciais prognósticos da evolução da infecção em fase aguda para a crônica. Estes fatores incluem o tempo de infecção, subtipo viral, quasispécies, carga viral e o modo de infecção (ALTER, 1999) e, ainda, a co-infecção com o vírus da hepatite B, o vírus da imunodeficiência humana (HIV), o nível de alanina aminotransferase (ALT), ferro e nível de ferritina (WAWRZYNOWICZ-SYCZEWSKA et al., 2004). A variabilidade clínica da hepatite C pode estar relacionada à mutação viral ocorrida no curso da infecção somado às variações na resposta do hospedeiro (KOBAYASHI et al., 1996).

Persistindo a viremia, o dano hepático progride um estágio de atividade ou fibrose a cada 7 a 10 anos. Aproximadamente 20% a 30% dos portadores de hepatite C crônica desenvolvem cirrose após 10 a 20 anos de infecção (RODGER et al., 2000; FREEMAN et al., 2001; BENVEGNO et al., 2004). Em populações imunocomprometidas, incluindo pacientes transplantados, há maior risco para doença hepática progressiva em comparação com os imunocompetentes. A raça também é um fator adicional que influencia a progressão para fibrose. Recentes estudos sugerem que americanos descendentes de africanos podem apresentar doença histológica mais branda comparada aos caucasianos, mas

comprovam uma maior taxa de evolução para carcinoma hepatocelular (SUGIMOTO et al., 2003).

1.7. ASPECTOS CLÍNICOS

A infecção pelos vírus da hepatite pode apresentar desde formas assintomáticas até sintomáticas com evolução grave para hepatite fulminante. Outro aspecto importante é a ausência de icterícia em mais de 50% dos casos das hepatites virais, e sintomas não específicos com evolução para a cronicidade (MORTON e KELEN, 1998). Os sintomas mais frequentes na fase aguda, quando presentes, são cansaço intenso, colúria, acolia fecal, febrícula, mal estar gastrointestinal e icterícia encontrados em cerca dos 30% dos pacientes (MORTON e KELEN, 1998; CVE, 2002). O período de latência clínica oscila entre 2 semanas a 6 meses, porém o mais comum é de 6 a 12 semanas após a infecção. A maioria dos pacientes apresenta um quadro clínico oligossintomático, com picos de ALT (alanina aminotransferase) (CVE, 2002).

1.8. MANIFESTAÇÕES EXTRA-HEPÁTICAS

Várias manifestações extra-hepáticas têm sido descritas em associação com a infecção crônica pelo VHC. A doença que é mais frequentemente associada com o VHC é a crioglobulinemia mista. Embora seja detectada em 30% a 50% dos doentes com hepatite crônica C, a crioglobulinemia é geralmente assintomática. A síndrome clínica da crioglobulinemia com artralguas, doença de *Raynaud* e púrpura é rara (1% a 5%). A glomerulonefrite membranoproliferativa é rara, mas pode ser grave. A infecção pelo VHC é provavelmente um fator que favorece a expressão clínica da porfíria cutânea tardia (NOCENTE et al., 2003).

Outras situações extra-hepáticas têm sido descritas, mas a associação com o VHC não está claramente estabelecida. Estas incluem a artrite soronegativa, a tireoidite auto-imune, o líquen plano, certo tipo de úlceras de córnea, a fibrose pulmonar idiopática, a poliarterite nodosa, a anemia aplástica, síndrome de Sjögren e certos linfomas não Hodgkin (HERRERO et al., 1993; YAMABE et al., 1995; SCOTT et al., 1997; LUNEL e CACOUB, 1999; NOCENTE et al., 2003).

1.9. TRANSMISSÃO

1.9.1. TRANSFUSÃO DE SANGUE E HEMODERIVADOS

A infecção pelo VHC é disseminada fundamentalmente pela exposição parenteral ao sangue ou derivados de sangue de pessoas infectadas. Atualmente, com o surgimento de exames para detecção da hepatite C, a incidência anual vem caindo. Isso é mais significativo em receptores de transfusões, pois essa era a principal via de transmissão. No Brasil, a Portaria nº 1.376 do Ministério da Saúde de 19 de novembro de 1993 que define as normas técnicas destinadas a disciplinar a coleta, o processamento e a transfusão de sangue total, componentes e derivados em todo o território nacional, dispõe sobre a obrigatoriedade de todos os estabelecimentos hemoterápicos realizarem teste individualizado para pesquisa de hepatite C em candidatos a doadores de sangue (BRASIL, 1993). Anteriormente os transplantes de órgãos, como rins, coração e fígado implicavam em um alto risco de transmissão do VHC, o qual foi praticamente eliminado com a triagem dos doadores.

1.9.2. USO DE DROGAS INJETÁVEIS OU INALADAS

O uso de drogas injetáveis ou inaladas é o principal modo de transmissão do VHC. Ocorre por meio de seringas compartilhadas ou materiais contaminados utilizados no

preparo da droga. Alguns estudos mostram que a taxa de infecção pelo VHC em jovens usuários é 4 vezes maior do que a infecção pelo HIV. Após 5 anos de uso até 90% dos usuários podem estar infectados (CDC, 1998; HAGAN et al., 2005).

1.9.3. EXPOSIÇÃO NOS ESTABELECIMENTOS DE SAÚDE

O risco de soroconversão após um acidente pérfuro-cortante com paciente positivo para o VHC é de 3,4% (variando de 0% a 10%) (FIGUEIREDO et al., 2003). No Brasil não há muitos dados relacionados à infecção VHC em profissionais da saúde. Takahama et al. (2005) encontraram que entre 267 dentistas, 0,4% foi positivo para o VHC, evidenciando a ocorrência de risco profissional da infecção pelo VHC em odontologia. Segundo estudos, a frequência do vírus C em profissionais de saúde tem sido relativamente baixa, porém podem ser considerados pertencentes a grupo de risco e os relatos de soroconversão através da análise por genotipagem reforçam a ocorrência de transmissão ocupacional (FIGUEIREDO et al., 2003). Não há nenhuma medida quimioprolática que reduza o risco de infecção de transmissão do vírus da hepatite C após exposição. Dados disponíveis sugerem que o interferon só atua efetivamente quando a infecção pelo VHC está estabelecida e não teria eficácia na profilaxia pós-exposição. Os estudos ainda não confirmam o benefício profilático com o uso de imunoglobulinas (TORRES et al., 2000).

1.9.4. EXPOSIÇÃO ENTRE PARCEIROS SEXUAIS

A transmissão sexual da hepatite C pode ocorrer, embora seja bem menos frequente que na hepatite B e ineficiente para a disseminação do vírus. Estudos realizados com parceiros fixos de pessoas VHC positivo e sem outros riscos encontraram uma taxa de prevalência de apenas 1,5% (CDC, 1998). Estudo realizado por Zylberberg et al. (1999) analisaram 24 casais através da seqüência e da análise filogenética das cepas do VHC. A

análise filogenética foi conclusiva em 7 dos 11 casais geneticamente concordantes. Em 3 casais houve diferenciação das cepas do VHC entre 1 a 3 nucleotídeos com seqüência similar de 98%, sugerindo que estes cônjuges foram infectados através de fonte comum. As cepas presentes em outros 4 casais diferiram pelo menos de 4 a 15 nucleotídeos, demonstrando que a probabilidade de origem em comum era remota. Em outro estudo recente entre 24 casais estudados, 22 (91,7%) apresentaram concordância entre os subtipos virais e altos índices de similaridade da região NS5b (CAVALHEIRO, 2004). Essa similaridade encontrada entre os isolados do VHC entre casais suporta a hipótese de transmissão entre esses casais, no entanto, os altos índices de compartilhamento de utensílios de uso pessoal impossibilitaram a associação desses dados com a transmissão sexual do VHC (CAVALHEIRO, 2004). De comum, a maior parte das pessoas nessa categoria tem um padrão sócio econômico desfavorável e geralmente está associado a muitas outras doenças infecciosas (CDC, 1998). A exposição a material cortante ou perfurante de uso coletivo não devidamente esterilizado ou descartável, como em procedimentos médico-odontológicos, tatuagem, acupuntura, manicure/pedicure, *piercing*, materiais de uso pessoal (barbeadores, escovas dentais, depiladores, lâminas) representam vias potenciais de infecção para o VHC (FOCCACIA et al., 2002).

1.9.5. EXPOSIÇÃO PERINATAL

A média de infecção entre crianças nascidas de mães VHC positivas é de aproximadamente 6% (com estudos mostrando variações de 0% a 25%) e de 17% (variando de 5% a 35%) se houver co-infecção com o HIV (CDC, 1998). A transmissão pode estar associada ao genótipo e à carga viral elevada do VHC (CDC, 1998; FERRERO et al., 2003). Em um estudo recente, Mok et al. (2005) analisaram 290 crianças expostas verticalmente à infecção pelo VHC. Dessas, 54 foram diagnosticadas como VHC-RNA positivas e, ainda,

dezessete (31%) apresentaram positividade nos primeiros 3 dias de vida; e provavelmente, teriam adquirido a infecção no período intrauterino. Nesse trabalho a infecção pelo VHC foi diagnosticada por PCR RNA-VHC qualitativo e por testes para detecção de anticorpo, considerando-se a criança infetada verticalmente pelo VHC se apresentasse o RNA-VHC positivo em pelo menos dois períodos distintos, e se o teste para detecção do anticorpo de VHC fosse positivo após os 18 meses de idade. Os autores concluem, nesse estudo, que pelo menos um terço das crianças infetadas pelo VHC adquiriram-no durante a fase intrauterina. Embora a transmissão pós-parto não possa ser excluída, os dados sugerem que seja rara (MOK et al., 2005).

1.10. TERAPIA

A finalidade da terapia antiviral para o VHC é a erradicação viral e a prevenção de complicações hepáticas. O sucesso do tratamento é definido como uma resposta virológica sustentada, ou seja, RNA do VHC indetectável por ensaio qualitativo após 24 semanas do término da terapia (WONG et al., 2005). A monoterapia com interferon representou o melhor tratamento para infecção pelo VHC por vários anos, produzindo resposta sustentada em menos que 20% dos pacientes. A introdução da terapia combinada dupla, interferon- α (IFN- α) injetado subcutaneamente três vezes por semana e ribavirina oral diária, marcou um avanço para o tratamento (SARACCO et al., 2003). A combinação de interferon peguilado associado a ribavirina é o procedimento de escolha para a infecção crônica para o VHC (WONG et al., 2005). No Brasil, a Portaria nº 863 da Secretaria de Assistência à Saúde - SAS/Ministério da Saúde de 4 de novembro de 2002 preconiza o uso de interferon peguilado associado a ribavirina apenas para pacientes com genótipo 1 e fibrose significativa (BRASIL, 2002). O tratamento para hepatite C é recomendado para pacientes entre 18 a 60 anos de idade, com níveis enzimáticos (ALT - alanina aminotransferase)

persistentemente elevados, RNA-VHC plasmático detectável e inflamação hepática crônica com fibrose e grau moderado de atividade inflamatória confirmada através de biópsia (LIANG et al., 2000).

O IFN- α exerce efeitos antivirais, imunomodulador e anti-fibrinogênico e está associado à diminuição da viremia do VHC, à melhora da função hepática (diminuindo os níveis de ALT) e, também, aos riscos reduzidos para o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (STADHOUDERS e COOREMAN, 1997; TAYLOR et al., 2000). Além disso, inibe a interação do vírus com a célula hospedeira, impedindo que as fases subseqüentes a sua replicação ocorra e induz a resposta imunológica do hospedeiro, ativando macrófagos, células *natural killer* e células T citotóxicas (STADHOUDERS e COOREMAN, 1997). A ribavirina é um análogo nucleosídeo que possui atividade antiviral, e quando utilizada isoladamente, diminui a inflamação hepática e os níveis de ALT, mas não é capaz de diminuir a viremia nos pacientes (MORTON e KELEN, 1998; LIANG et al., 2000; BONKOVSKY e MEHTA, 2001).

Vários estudos têm demonstrado que a combinação IFN- α com ribavirina aumenta a resposta sustentada em 30% a 40%; no entanto, apresenta uma relação de dependência com o genótipo presente (TAYLOR et al., 2000). Pacientes infectados com os genótipos 2 e 3 do VHC apresentam chances duas vezes maiores de manifestarem uma resposta virológica sustentada em comparação com indivíduos com genótipo 1. Além disso, o tempo de tratamento dos infectados com os genótipos 2 e 3 foi efetivo tanto com 24 semanas quanto com 48 e, para aqueles apresentando o genótipo 1, a taxa de resposta foi significativamente mais alta com 48 semanas (30%) do que com 24 (17%) (LIANG et al., 2000; ERENZOY, 2001). Deste modo, a genotipagem tornou-se uma importante ferramenta para se estabelecer as estratégias de tratamento (ERENZOY, 2001).

1.11. DIAGNÓSTICO

Após a identificação e caracterização molecular da hepatite “não-A, não-B” por Choo et al. (1989), vários testes diagnósticos baseados na detecção de anticorpos VHC em amostras sorológicas foram desenvolvidos e refinados. Atualmente, duas categorias de testes são utilizadas para o diagnóstico de pacientes infectados pelo VHC: testes sorológicos, que detectam anticorpos contra o VHC (anti-VHC) e testes moleculares que identificam, quantificam ou caracterizam componentes da partícula viral. Um diagnóstico preciso da infecção pelo VHC é necessário antes de se tomar qualquer medida terapêutica.

1.11.1. TESTES SOROLÓGICOS

Os testes comercializados para detecção do anti-VHC são o ensaio imunoenzimático - ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). As quatro gerações para diagnóstico de anticorpos para o VHC que foram desenvolvidas até o momento utilizam ou proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos e uma melhora da sensibilidade na detecção foi introduzida a cada nova geração, conforme mostra a Tabela 1 (GRETCH, 1997; GONÇALES e GONÇALES Jr, 2004). O teste anti-VHC de primeira geração, ensaio imunoenzimático I (ELISA-I), incorporava o epítipo c100-3 localizado na região não-estrutural NS4, o qual, atualmente, não é mais utilizado na prática clínica, devido à falta de sensibilidade e especificidade. O ELISA-II incorpora duas proteínas recombinantes do VHC: c22-3 (derivada da região estrutural ou *core*) e c33c (derivada da região não-estrutural NS3), enquanto o ELISA-III utiliza antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos e detecta anticorpos para quatro proteínas recombinantes do VHC (*core*, NS3, NS4 e NS5) (SCHIFF et al., 1999). O ELISA-IV incorpora o antígeno NS3 recombinante e peptídeos sintéticos do *core*, NS4 e NS5.

O período médio para detecção da soroconversão foi reduzido a cada geração desenvolvida: 7 a 8 semanas para ELISA-III comparados com 10 semanas para ELISA-II e 16 semanas para ELISA-I (GRETCH, 1997) mas, em indivíduos sob imunossupressão, a detecção de anticorpos tanto na fase aguda quanto na crônica da infecção viral mostra-se prejudicada pelos métodos sorológicos convencionais (MITSUI et al., 1992). Para o ELISA-IV ainda não existem dados na literatura disponíveis comparando a sua sensibilidade e sua especificidade com os demais testes diagnósticos disponíveis.

Tabela 1. Sensibilidade e valor preditivo do ELISA para detecção de anticorpos anti-VHC

Ensaio	Sensibilidade ¹	Baixa Prevalência ²	Alta Prevalência ²
ELISA-I	70-80%	30-50%	70-85%
ELISA-II	92-95%	50-61%	88-95%
ELISA-III	97%	25%	Não realizado

Abreviação: ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*; anti-VHC: anticorpos para o VHC; ¹: Baseado em achados clínicos e detecção do RNA-VHC por PCR (*Polymerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia pela Polimerase); ²: Valor preditivo comparado ao RIBA (*Recombinant Immunoblot Assay* - ensaio imunoblot recombinante). Fonte: GRETCH, 1997

Além de resultados falso-negativos que se pode encontrar em pacientes hemodialisados e imunossuprimidos, falso-positivos do teste ELISA são observados, eventualmente, em população de baixo risco. Valores elevados de amino-transferases em associação com fatores de alto risco são sugestivos de infecção ativa pelo vírus da hepatite C, e testes adicionais devem ser requeridos para confirmar a infecção (GRETCH, 1997).

Uma ampla variedade de testes sorod diagnósticos suplementares estão disponíveis para detectar soropositividade dos resultados obtidos com teste de triagem por

ELISA. O diagnóstico do VHC pode ser confirmado pelo RIBA (*Recombinant Immunoblot Assay* - Ensaio Imunoblot Recombinante), produzido pela *Chiron Corporation* (Emeryville, CA, Estados Unidos). O RIBA identifica anticorpos anti-VHC e apresenta uma especificidade maior que o ELISA (LOK e GUNARATNAM, 1997). As modificações do RIBA foram surgindo simultaneamente com os dos testes ELISA. Até o momento foram desenvolvidas três gerações (MEDINA e SCHIFF, 1995), sendo que o RIBA-I não é mais comercializado. Os testes RIBA II e III têm sido empregados na avaliação diagnóstica em indivíduos com baixa probabilidade de infecção pelo VHC e reação positiva para o ELISA (GRETCH, 1997, SCHIFF et al., 1999). O RIBA consiste em um ensaio de realização mais simples e de boa reprodutibilidade em comparação com os testes para pesquisa do RNA viral (LOK e GUNARATNAM, 1997); no entanto, em doadores de sangue somente 50% dos RIBA III positivos apresentam confirmação da infecção quando realizados para ensaio de PCR (*Polymerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia pela Polimerase) (DAMEN et al., 1995; LOK e GUNARATNAM, 1997). O teste utiliza antígenos e peptídeos do genótipo 1 do VHC, o que pode comprometer os resultados na avaliação de pacientes infectados com outros genótipos (DOW et al., 1996). Dessa forma, o RIBA é pouco utilizado na rotina laboratorial pelo seu elevado custo e não se apresentar tão sensível quanto os testes moleculares.

O método para determinação do genótipo que utiliza sorotipagem baseia-se na detecção de anticorpos genótipo-específicos contra epitopos do VHC. As principais vantagens da técnica de sorotipagem são o baixo custo e maior facilidade de realização, em comparação com testes de biologia molecular (CAVALHEIRO et al., 2002; ELSAWY et al., 2005). Os testes comerciais utilizam diferentes técnicas: ELISA competitivos (Murex HCV-1-6, Murex Diagnostics, Reino Unido) ou imunoblot (RIBA HCV Serotyping Assay, Chiron Diagnostics, Estados Unidos) (BRANDÃO et al., 2001).

1.11.2. TESTES MOLECULARES

Em infecção recente, o melhor marcador, e único disponível até o momento, é a determinação do RNA-VHC, uma vez que a soroconversão ocorre entre 4 a 20 semanas após a infecção. A presença do RNA-VHC plasmático define infecção ativa pelo vírus e pode ser detectado após 1 a 3 semanas após a exposição (HOOFNAGLE, 1997).

Os ensaios de detecção qualitativa do RNA do VHC são baseados na amplificação por PCR do DNA complementar (cDNA) obtido por transcrição reversa (RT-PCR). A especificidade destes ensaios excede a 99%. Um único teste positivo para o RNA do VHC confirma a replicação ativa do VHC, mas um único resultado negativo isolado não garante que o paciente não seja virêmico. Um seguimento clínico-laboratorial com a pesquisa do RNA do VHC deverá ser feito para confirmar a ausência de replicação ativa do VHC. Uma vez confirmada a infecção pelo VHC, a repetição do teste qualitativo para o RNA do VHC, em seguimento clínico, porém sem tratamento, não apresenta nenhuma utilidade diagnóstica. A maioria dos pacientes permanece virêmico e um resultado negativo pode meramente refletir um declínio transiente na carga viral abaixo do limite de detecção do ensaio utilizado (SCHIFF et al., 1999). Outro método empregado para a detecção qualitativa do RNA-VHC, ainda em investigação, é a amplificação mediada pela transcrição (TMA - *transcription mediated amplification*). É um método simples, rápido e apresenta limite de detecção de 50 cópias/mL dos principais genótipos do VHC (SCHIFF et al., 1999).

A carga viral do VHC no soro ou plasma reflete as taxas de replicação viral e de eliminação do vírus pelo hospedeiro. Foram desenvolvidas duas técnicas para a quantificação do VHC: uma utiliza a tecnologia da PCR e a outra do DNA ramificado (branched-DNA). O teste produzido pela Roche Molecular Systems (Amplicor HCV Monitor 2.0) emprega a tecnologia da PCR, enquanto o da Chiron Diagnostics (Quantiplex HCV RNA 2.0) adota a técnica do DNA ramificado. A principal indicação para solicitação de carga viral,

na prática médica, é a definição do tempo de tratamento combinado (interferon/ribavirina) de pacientes com hepatite crônica pelo VHC (BRANDÃO et al., 2001). Outro procedimento empregado para quantificação do RNA-VHC, ainda em investigação, que apresenta resultados promissores é o sistema de detecção em tempo real (PCR *real time*) (TAKEUCHI et al., 1999, ENOMOTO et al., 2001).

A determinação dos genótipos VHC pode ser feita pela análise direta da sequenciamento direto da região 5' UTR (TruGene, Visible Genetics, Canadá), pela hibridização reversa sobre sondas de oligonucleotídeos genótipo-específico (INNO-LiPA, Innogenetics, Bélgica) e pela técnica de RFLP (*restriction fragment length polymorphism*). A hibridização reversa é um teste comercial que permite a determinação fácil e rápida de 6 genótipos e seus subtipos. O ensaio é baseado nas variações encontradas na região 5' não codificadora (5' UTR) de diferentes genótipos do VHC. O sequenciamento, considerado como padrão ouro, também discrimina os genótipos e subtipos do VHC com segurança. Quando houver indicação de tratamento clínico com interferon alfa ou interferon peguilado ou do transplante hepático deve ser realizado exame de genotipagem viral. O teste de genotipagem apresenta importância clínica, principalmente em relação ao tempo e resposta à terapêutica antiviral (VIGANI, 2004). Em estudo recente, relata-se uma nova técnica para genotipagem do VHC com resultados promissores que utiliza a PCR em tempo real (PCR *real time*). Nesse estudo, 37 indivíduos foram identificados como genótipos 1, 2 e 3a, obtendo-se 100% de correlação com a genotipagem por sequenciamento ou pela hibridização reversa (MOGHADDAM et al., 2006).

1.11.3. PERSPECTIVAS DA UTILIZAÇÃO DO CORE NA DETECÇÃO DO VHC

O desenvolvimento de testes imunoenzimáticos para detecção do antígeno do *core* do VHC apresenta como principal vantagem sua realização em laboratórios não-

especializados, com diminuição de custos e a possibilidade de substituir a complexa determinação do RNA-VHC. A quantificação e a detecção do antígeno do *core* têm obtido sucesso em muitos ensaios, considerando-as como um acurado e preciso marcador indireto da replicação viral, apresentando alta sensibilidade e especificidade (JOLIVET-REYNAUD et al., 1998; LOPES et al., 2000; PETERSON et al., 2000; BOUVIER-ALIAS et al., 2002). A detecção do *core* total do VHC durante a terapia tem-se mostrado extremamente útil, predizendo e monitorando a eficácia do tratamento com interferon associado a ribavirina (BOUVIER-ALIAS et al., 2002). Dessa forma, o antígeno do *core* do VHC apresenta grande utilidade clínica, oferecendo uma valiosa ferramenta no diagnóstico e monitoramento de pacientes infectados pelo VHC e permitindo um prognóstico precoce da resposta virológica durante tratamento nas 4 primeiras semanas, e com maior precisão aos 3 meses (MAYNARD et al., 2003).

Fundamentado na importância e na sensibilidade para detecção desta proteína e pelas limitações observadas no ELISA, bem como pelo alto custo dos testes moleculares na detecção do VHC, um diagnóstico para determinação direta do antígeno circulante representa uma alternativa plausível para ser empregada na triagem de doadores de sangue e acidentes ocupacionais. A utilização de um teste rápido e sensível baseado no princípio imunocromatográfico para detecção do antígeno do *core* do VHC seria de extrema consideração. Para o VHC existem disponíveis no mercado apenas alguns testes rápidos empregados para detecção de anticorpos anti-VHC e, até o momento, não há nenhum teste para detecção de antígeno circulante do VHC para uso comercial. O sistema de imunocromatografia, para detecção de antígenos circulantes, baseia-se no princípio da imunocaptura, onde dois anticorpos ligam epítopos distintos: anticorpo de detecção que liga complexo antígeno-anticorpo conjugado ao gerador de sinal (comumente utilizados são as pérolas de látex e partículas coloidais de ouro) e anticorpo de captura, imobilizado na

superfície sólida para controle do teste (BIRNBAUM et al., 1992; NILSSON et al., 1995; LAITINEN e VUENTO, 1996; PAEK et al., 1999). As pérolas de látex, sintetizadas a partir de polímeros orgânicos e contendo corantes de diversos pigmentos são, convencionalmente, utilizadas como geradores de sinal em ensaios rápidos (MOLDAY et al., 1975; QUASH et al., 1978; BIRNBAUM et al., 1992; NILSSON et al., 1995). O anticorpo é fixado à superfície destas pérolas por adsorção física ou ligação covalente, dependendo da propriedade externa e da presença de grupos funcionais (grupos aminos ou carboxílicos). O sistema coloidal de ouro pode ser obtido em laboratório pela redução de $AuCl_2$ (HANDLEY, 1989; DISCIPIO, 1996). Esses colóides são obtidos em solução pelo equilíbrio entre as forças eletrostáticas de repulsão e de atração *London-Van der Walls* entre as partículas (ALBRECHT, 1993). A adição de substâncias iônicas torna a força de atração maior que a de repulsão, conduzindo a agregação acompanhada de mudança de cor, de vermelho para azul (BAUDHUIN, 1989). O anticorpo é adsorvido diretamente na superfície da partícula, mediado por forças *London-Van der Walls* e interações hidrofóbicas para a conjugação (PAEK et al., 1999). Este sistema é bastante simples para leitura e o sinal colorimétrico da imunocromatografia gerado pode ser estimado qualitativa ou semi-quantitativamente e este princípio será aplicado para construção de um método diagnóstico para detecção do antígeno do *core* do VHC.

Dessa forma, considerando-se: 1) a preocupação para a detecção precoce desta infecção, principalmente em bancos de sangue ou em trabalhadores da área da saúde expostos a acidentes ocupacionais com pacientes infectados pelo VHC; 2) que não há disponível nenhum teste rápido para detecção direta de antígenos do vírus da hepatite C; 3) que os métodos diagnósticos da infecção pelo vírus da hepatite C são de grande relevância clínica e podem ser utilizados como marcadores de cronicidade e indicativos da eficácia terapêutica; 4) que o País tem destinado grande investimento financeiro ao tratamento de pacientes com Hepatite C; e 5) que os testes rápidos e sensíveis representam potencial a ser

empregado como uma alternativa rápida para uma triagem em pacientes imunocomprometidos ou mesmo em locais onde não há uma infra-estrutura laboratorial, esse trabalho propõe o desenvolvimento de um teste rápido, de fácil exeqüibilidade, de boa reatividade para detecção do antígeno *core* circulante do VHC, baseado no processo imunocromatográfico. O desenvolvimento desse teste deverá contribuir para o diagnóstico da hepatite C em fase de pré-soroconversão, diminuindo a possibilidade de resultados falso-negativos em casos de infecção recente, e para o monitoramento da terapêutica com imunomodulador (Interferon) e/ou antiviral (Ribavirina).

2 – OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um teste imunocromatográfico direto, sensível e específico para detecção qualitativa da proteína do *core* do Vírus da Hepatite C em amostra de soro humano, com leitura macroscópica.

Este objetivo deverá ser alcançado através da clonagem e expressão do gene que codifica a proteína do *core* do vírus da hepatite C, a purificação e a produção de anticorpos policlonais anti-*core* VHC em camundongo e coelho, seguido pela purificação da fração IgG e montagem do teste imunocromatográfico.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1. FLUXOGRAMA DE TRABALHO

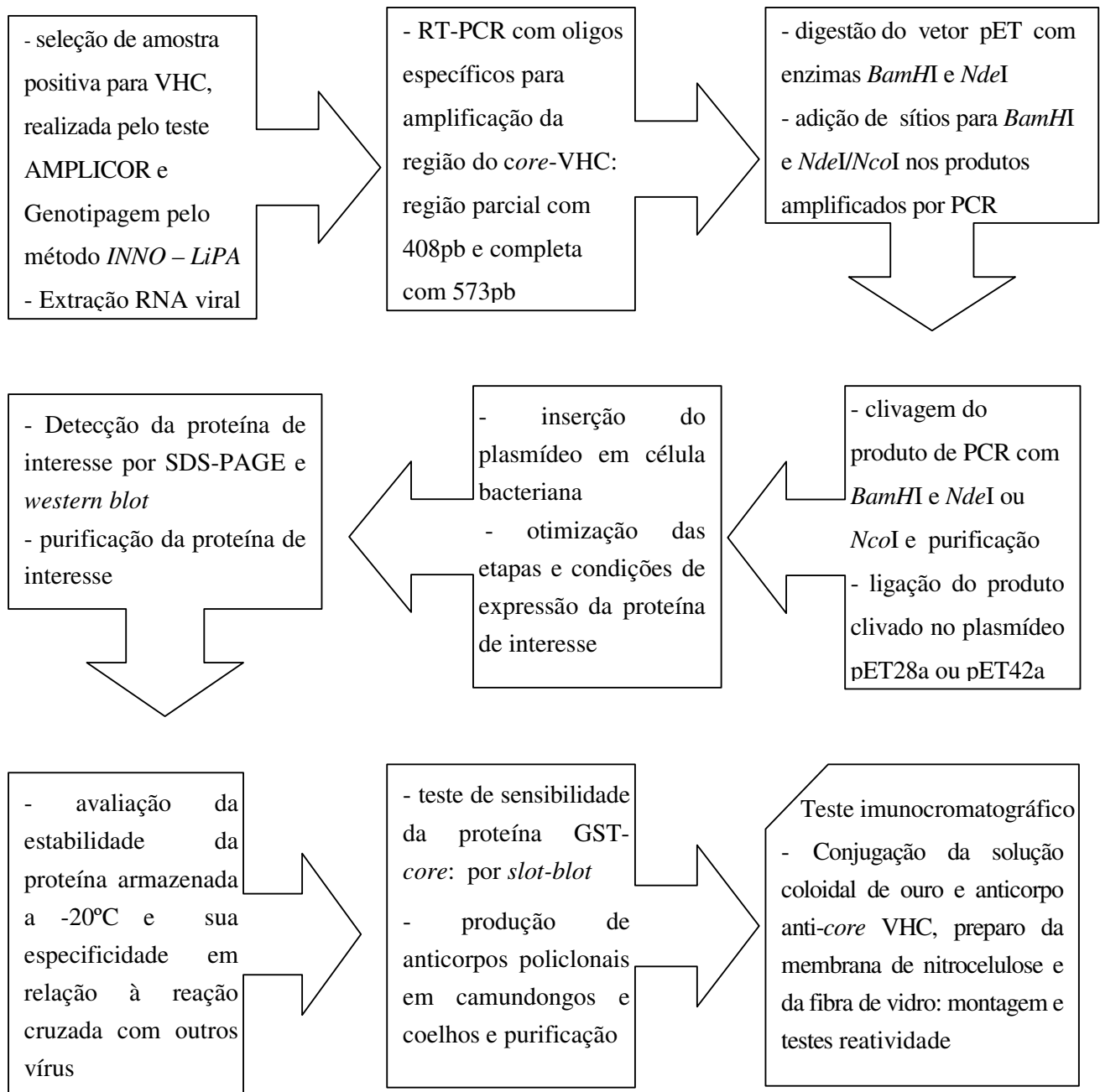


Figura 2: Fluxograma de trabalho. Esquema demonstrando, resumidamente, as etapas do processo laboratoriais realizadas neste trabalho.

3.2. SELEÇÃO DE AMOSTRAS

As amostras positivas para o VHC, genótipos 1a, 1b, 2b e 3, foram obtidas a partir de material enviado ao Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Centro de Referência Diagnóstica do Núcleo de Atendimento à Comunidade (CRD - NAC) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, integrante dos programas Estadual de Hepatites Virais e Nacional de DST/AIDS. Este material foi submetido ao diagnóstico pelo uso do teste comercial AMPLICOR Hepatitis C Virus Test, version 2.0 (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA). É um ensaio qualitativo *in vitro* para detecção do RNA-VHC e baseia-se em cinco processos principais: preparação da amostra; obtenção do cDNA por transcrição reversa do RNA alvo; amplificação por PCR (reação em cadeia pela polimerase) do DNA complementar (cDNA) alvo; hibridização dos produtos amplificados com sondas oligonucleotídicas específicas e detecção destes produtos, por determinação colorimétrica. Quando positivas, as amostras foram genotipadas utilizando o método comercial INNO – LiPA HCV II (Innogenetics, Bélgica). Este teste permite a identificação de 6 genótipos do VHC e seus subtipos, conforme esquematizado na Figura 3. O princípio desse ensaio baseia-se na variação encontrada na região 5' UTR de diferentes genótipos (STUYVER et al., 1993). As sondas tipo específicas possuem uma cauda poli-T (timina), ligada à membrana de nitrocelulose. Os produtos amplificados por PCR com oligonucleotídeos iniciadores, marcados com biotina na posição 5', hibridizam-se apenas com a seqüência da sonda específica sobre a membrana de nitrocelulose. As amostras (n=4) identificadas como pertencente ao genótipo 1a, 1b, 2b e 3 foram submetidas à análise comparativa pelo método imunocromatográfico.

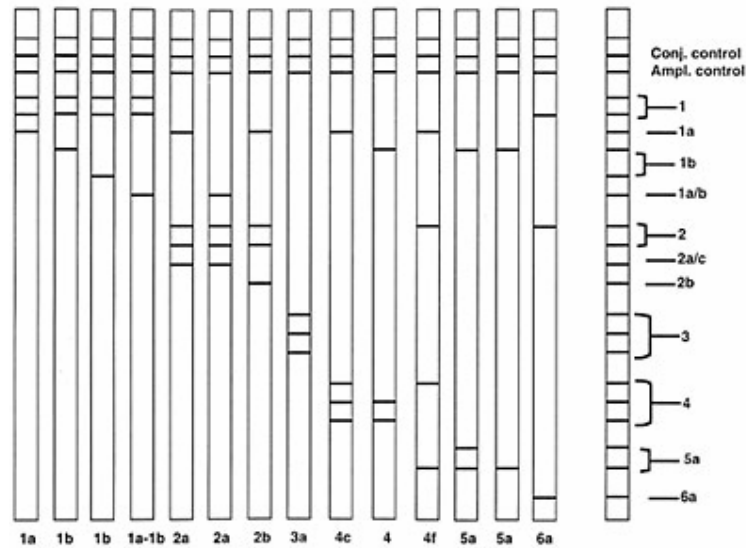


Figura 3: representação esquemática da genotipagem pelo processo de hibridização reversa, identificando os 6 genótipos principais e subtipos.

Para verificar reatividade cruzada, soros de pacientes com doenças inflamatórias ou infecciosas crônicas: ASO (anti estreptolisina O), PCR (proteína C reativa), Fator Reumatóide, Chagas, Sífilis, HTLV-I e II (vírus T-linfotrópicos humanos I e II) e auto anticorpos contra antígenos intracelulares (FAN) também foram testados para a proteína recombinante expressa e para o ensaio imunocromatográfico desenvolvido.

Os soros utilizados como controle (n=20) foram provenientes de doadores de sangue atendidos pelo Núcleo de Hemoterapia e Hemoderivados do Núcleo de Atendimento à Comunidade (NAC) da faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

3.3. ISOLAMENTO E AMPLIFICAÇÃO DO GENE DO *CORE* DO VHC

3.3.1. ISOLAMENTO DO RNA VIRAL

O ácido nucléico viral (VHC) foi isolado a partir de 100µL de soro, sob condições estéreis em fluxo laminar dentro de, no máximo, 4 horas após a coleta do

sangue ou a partir do material estocado a - 80°C, adaptando-se a técnica descrita por Boom et al. (1990). A amostra foi submetida à extração do RNA genômico viral em 900µL de tampão de lise (50mM Tris-HCl pH 6,4; 1,3% triton-X100; 5M tiocianato de guanidina; 20mM EDTA) e o RNA viral, isolado pela adição de 50µL de partículas de sílica ao tampão de lise. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, a suspensão foi centrifugada a 10.000g por 40 segundos, duas vezes com o tampão de lavagem (50Mm Tris-HCl pH 6,4; 5M tiocianato de guanidina), duas vezes com etanol a 70% e uma vez com acetona. Após a secagem a 56°C por 10 minutos, o ácido nucléico foi eluído pela adição de 50µL do tampão de eluição (Tris-HCl; pH=8,0). Os tubos foram incubados a 56°C durante 10 minutos com agitação a cada 2 minutos para facilitar o processo de eluição do RNA. A suspensão foi centrifugada a 10.000g por 5 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo de microcentrífuga, livre de DNase e RNase para, posteriormente, ser utilizado em reações de amplificação.

Alternativamente, outro método para extração do RNA viral foi realizado utilizando o kit QIAGEN, efetuado conforme as especificações do fabricante (QIAamp RNA Mini Kit Hand, QIAGEN). Em tubo de microcentrífuga foram adicionados 560µL do tampão de lise (AVL) e 140µL de soro. O tubo foi agitado por 15 segundos em vórtex e incubado por 10 minutos a 25°C. Foram adicionados 560µL de etanol 100% a esta solução e o tubo agitado em vórtex por 15 segundos. Uma parte dessa mistura (630µL) foi transferida para uma coluna (QIAamp spin column) acoplada a tubo de microcentrífuga de 2mL e centrifugada a 6.000g por 1 minuto. O filtrado foi descartado e repetiu-se o procedimento com a solução restante. À coluna foram adicionados 500µL do tampão de lavagem (AW1) e centrifugou-se 6.000g por 1 minuto, descartando o filtrado. O processo foi repetido utilizando 500µL do tampão de lavagem (AW2) com centrifugação de 20.000g durante 3 minutos. A coluna foi colocada em tubo

limpo de 1,5mL e 60µL de tampão de eluição (AVE), à temperatura ambiente, foram adicionados à coluna. Este tampão contém H₂O livre de RNase e 0,04% de azida sódica para prevenir crescimento bacteriano e contaminação com RNases. O tubo foi incubado durante 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugado a 6000g por 1 minuto. O RNA viral é estável por aproximadamente um ano quando estocado a -70°C.

3.3.2. ESTUDO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

A Tabela 2 resume os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR para obtenção do gene que codifica a região do *core*, as seqüências empregadas, a localização no gene do VHC (AF 333324 - *Blastn GenBank* - NCBI) e orientação.

Tabela 2: Relação dos oligonucleotídeos iniciadores obtidos da *Applied Biosystems* e utilizados nas reações de amplificação: seqüências sintetizadas, localização no gene do VHC (AF 333324 - *Blastn GenBank* - NCBI) e orientação.

OLIGOS	SEQÜÊNCIAS	POSIÇÃO	ORIENTAÇÃO
968R	5' GTTGGAGCAGTCGTTTCGTGAC 3'	968 – 947	Antisenso
VHCC-S	5' ATGAGCACAAATCCTAAACCTC 3'	342 – 364	Senso
VHCC-A	5' AGCGGAAGCTGGGATGGTCAAA 3'	914 – 893	Antisenso
VHCC-AI	5' GTACCCCATGAGGTCGGCGAAG 3'	749 – 728	Antisenso
VHCC-S SR	5' -CCATGGCACATATGAGCACAAATCCTAAAC - 3'	342 – 364	Senso: sítios <i>Nco</i> I, <i>Nde</i> I
VHCC-A SR	5' - CAGGATCCTTAAGCGGAAGCTGGGATGGT - 3'	914 – 893	Antisenso: sítio <i>Bam</i> HI
VHCC-AI SR	5' - TTGGATCCTTAGTACCCCATGAGGTCGGC - 3'	749 – 728	Antisenso: sítio <i>Bam</i> HI

* **CCATGG:** sítio de restrição para a enzima *Nco* I; **CATATG:** sítio de restrição para a enzima *Nde* I, **GGATCC:** sítio de restrição para a enzima *Bam* HI; **TTA:** códon terminação.

O oligonucleotídeo 968R, sintetizado conforme descrito por Alam et al. (2002), foi utilizado na reação de transcrição reversa e na primeira reação de PCR juntamente com o VHCC-S. Na reação subsequente foram empregados os iniciadores VHCC-S e VHCC-

A para amplificar produto de 573pb, e VHCC-S e VHCC-AI para resultar em um produto de 408pb. A amplificação da região de 408pb e 573pb do *core* do vírus da hepatite C foi realizada a partir de um estudo da seqüência completa do RNA do VHC, genótipo 1b, AF 333324, registrada em banco de dados (*Blastn GenBank*). Os oligonucleotídeos iniciadores foram sintetizados para as seqüências senso 342 – 364 (VHCC-S), anti-sensos, 914 – 893 (VHCC-A) e 749 – 728 (VHCC-AI) com 22 nucleotídeos.

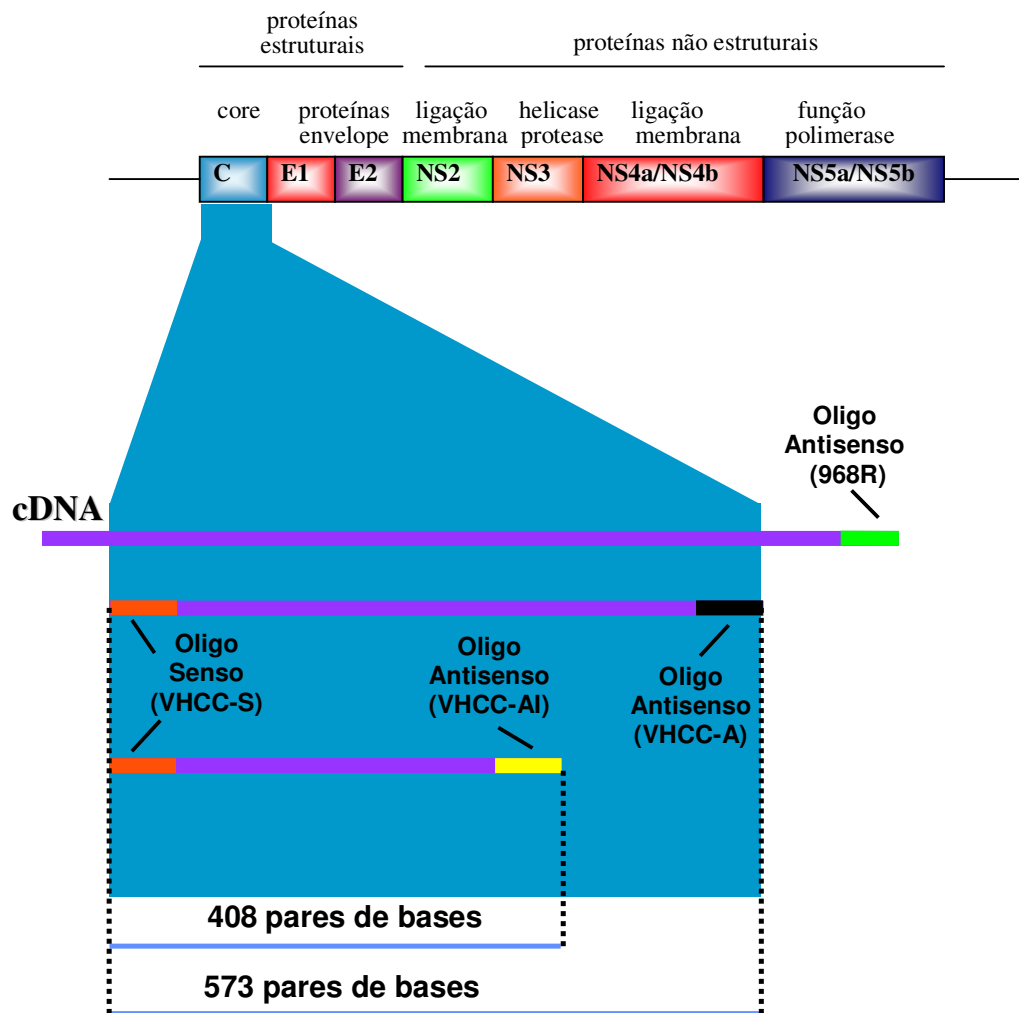


Figura 4: Região do *core* do VHC amplificada. A região de amplificação 408pb e 573 pb, a localização dos oligo-iniciadores utilizados nas reações: **Oligo Senso:** VHCC-S e **Oligos Anti-Senso:** 968R, VHCC-A e VHCC-AI.

3.3.3. REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA DO RNA-VHC

A síntese do cDNA do VHC foi realizada utilizando a SuperScript™ II RNase H Reverse Transcriptase (Invitrogen – Life Technologies), conforme especificações do fabricante em termociclador Gene Amp 2400 Perkin Elmer.

Em um microtubo eppendorf livre de DNases e RNases foram adicionados 5,0µL de RNA isolado, 1,0µL do oligonucleotídeo 968R 50pM (*Applied Biosystems*), 1,0µL de dNTP 10mM, 5,0µL água Milli-Q. Os tubos foram aquecidos a 65°C durante 5 minutos e resfriados no gelo com seqüente adição de 4,0µL de *5X first strand buffer* (Tris – HCl pH 8,3 250 mM; KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM), 2,0µL de DTT 0,1M (Dithiothreitol) (Invitrogen - Life Technologies). Após essa etapa, os tubos foram homogeneizados e incubados a 42°C durante 2 minutos. Transcorrido esse tempo, adicionou-se à reação 1,0µL da enzima transcriptase reversa SuperScript II RNase H Reverse Transcriptase 200U (Invitrogen – Life Technologies) com incubação a 42°C durante 50 minutos e em seguida aquecida a 70°C por 15 minutos para inativação da enzima.

3.3.4. REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

3.3.4.1. PCR PRIMEIRA FASE

As reações foram realizadas no aparelho termociclador Gene Amp 2400 (Perkin Elmer). Essa primeira etapa de amplificação, empregando o c-DNA, foi executada utilizando o seguinte protocolo de amplificação:

TABELA 3: Protocolo de amplificação da primeira reação de PCR

Componentes	Concentração Final	Volume
Produto da reação de RT	–	2,0µL
Tampão PCR s/ Mg ⁺⁺ 10X	1X	5,0µL
MgCl ₂ 50mM	1,5mM	1,5µL
Mistura de dNTP 10mM	0,2mM	1,0µL
Oligo VHCC-S 50pM	1,0pM/µL	1,0µL
Oligo 968R 50pM	1,0pM/µL	1,0µL
Taq DNA polimerase (5U/µL)	2,0U	0,4µL
Água Milli-Q	-	38,1µL
		50,0 µL

A mistura de reação foi submetida a 35 ciclos térmicos com as seguintes temperaturas e tempo: 94°C por 30 segundos para desnaturação, 55°C por 45 segundos para anelamento, 72°C por 1 minuto para extensão.

3.3.4.2. HEMI-NESTED PCR (SEGUNDA FASE)

O produto obtido na primeira fase foi utilizado na reação de *Hemi-Nested* PCR com a finalidade de aumentar a especificidade da reação, empregando-se as seguintes condições:

TABELA 4: Protocolo de amplificação da reação da segunda reação de PCR

Componentes	Concentração Final	Volume
Produto da reação de PCR	-	2,0 μ L
Tampão PCR s/ Mg ⁺⁺ 10X	1X	5,0 μ L
MgCl ₂ 50mM	1,5mM	1,5 μ L
Mistura de dNTP 10mM	0,2mM	1,0 μ L
Oligo VHCC-S 50pM	1,0pM/ μ L	1,0 μ L
Oligo VHCC-A ou VHCC-AI 50pM	1,0pM/ μ L	1,0 μ L
Taq DNA polimerase (5U/ μ L)	2,0U	0,4 μ L
Água Milli-Q	-	37,1 μ L
		50,0 μ L

A mistura de reação foi submetida a 35 ciclos térmicos com as seguintes temperaturas e tempo: 94°C por 30 segundos para desnaturação, 55°C por 45 segundos para anelamento, 72°C por 1 minuto para extensão. Ao final dos ciclos, o produto amplificado foi analisado em gel de agarose a 2%, após ser corado com brometo de etídeo 0,5 μ g/mL e visualizado em um transluminador de ultravioleta.

3.4. REAÇÃO DE PCR PARA ADICIONAR SÍTIOS DE RESTRIÇÃO

O produto obtido na reação de *Hemi-Nested* PCR foi utilizado como molde para adicionar sítios de restrição para as enzimas *Nco* I/*Nde* I e *Bam* HI para, posteriormente, ser clivado e clonado no vetor de expressão pET28 ou pET42, na orientação correta.

TABELA 5: Protocolo de amplificação da reação para adicionar sítios de clivagem para as enzimas *Nco* I / *Nde* I e *Bam* HI

Componentes	Concentração Final	Volume
Produto da reação de PCR	–	1,0µL
Tampão PCR s/ Mg ⁺⁺ 10X	1X	5,0µL
MgCl ₂ 50mM	1,5mM	1,5µL
Mistura de dNTP 10mM	0,2mM	1,0µL
Oligo VHCC-S SR 50pM	1,0pM/µL	1,0µL
Oligo VHCC-A SR ou VHCC-AI SR 50pM	1,0pM/µL	1,0µL
Taq DNA polimerase (5U/µL)	2,0U	0,4µL
Água Milli-Q	-	38,6µL
		50,0µL

A mistura de reação foi submetida a 35 ciclos térmicos com as seguintes temperaturas e tempo: 94°C por 30 segundos para desnaturação, 55°C por 45 segundos para anelamento, 72°C por 1 minuto para extensão. Ao final dos ciclos, o produto amplificado foi analisado em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL e visualizado em um transluminador de ultravioleta. Este produto de PCR, contendo os sítios de restrição, foi purificado do gel para a etapa posterior de clivagem enzimática.

3.5. PREPARAÇÃO DO GEL DE AGAROSE

A agarose foi solubilizada em 80mL de tampão TBE 1X (solução estoque 10X - Tris 1M/Ácido bórico 0,9M/ EDTA 10mM pH 8,3) em quantidade dependente da concentração requerida. Após completa solubilização, a agarose foi adicionada em suporte acrílico e resfriada até a polimerização. O gel foi coberto com tampão TBE 1X

(aproximadamente 1mm acima do gel). A amostra amplificada foi aplicada no gel e a migração eletroforética ocorreu a 100V por aproximadamente 1 hora. O gel foi corado em solução de brometo de etídio 0,5mg/mL e visualizado sob luz UV.

3.6. CLIVAGEM ENZIMÁTICA DO PRODUTO DE PCR

Em tubos de microcentrífugas de 1,5mL foram adicionados 1µg do produto de PCR contendo os sítios para enzimas *Bam* HI e *Nde* I/*Nco* I, 10 unidades da enzima *Bam* HI (Fermentas, Life Sciences) e 10 unidades de *Nde* I ou *Nco* I (Fermentas Life Sciences), 8µL tampão 10X concentrado (10mM Tris-HCl pH 8,0, 100mM KCl, 10mM MgCl₂, 0,1mg/mL BSA) e de água Milli Q estéril para volume final de 40µL. A reação foi incubada em banho maria a 37°C durante uma noite.

3.7. PURIFICAÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO

A purificação dos produtos de PCR foi realizada com o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison, WI, USA), conforme especificação do fabricante e brevemente descrita. A cada 10mg de gel de agarose foi adicionado 10µL de solução de ligação (4,5M de isotiocianato de guanidina; 0,5M de acetato de potássio pH 5,0) em um tubo de microcentrífuga. O tubo foi incubado a 50°C a 60°C por 10 minutos ou até solubilização completa do gel e rapidamente centrifugado. Uma mini-coluna foi colocada em tubo coletor para cada gel solubilizado. A mistura foi transferida para a mini-coluna e incubada por 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugada 10.000g por 1 minuto. O filtrado resultante foi descartado e 700µL da solução de lavagem (10mM de acetato de potássio pH 5,0; 80% de etanol; 16,7µM EDTA pH 8,0) foram adicionados à coluna e nova centrifugação idêntica à anterior foi realizada. Esse processo de lavagem foi repetido com

500µL de tampão, seguido por uma centrifugação de 10.000g durante 5 minutos. A seguir o tampão foi descartado. Outra centrifugação, 10.000g por 1 minuto, foi efetuada para retirada do excesso da solução presente na coluna e esta foi colocada em um tubo limpo. Diretamente sobre a coluna foram adicionados 50µL de água livre de nuclease e novamente centrifugada a 10.000g por 1 minuto. O material eluído da coluna foi utilizado para a clonagem em vetores de expressão.

3.8. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DO *CORE* VHC

3.8.1. VETOR DE EXPRESSÃO pET

Vários vetores de expressão encontram-se disponíveis no mercado para a expressão heteróloga de proteínas em *Escherichia coli*. Os mais referidos são da série pET (plasmid for expression by T7 RNA polymerase), cuja expressão está sob controle do promotor de transcrição $\phi 10$ e dos sinais de iniciação de tradução s10 da proteína do gene 10 (a principal proteína do capsídeo) do bacteriófago T7. A grande vantagem deste vetor é que o inserto clonado é transcrito pela RNA polimerase do bacteriófago T7, que é muito seletiva e ativa, sendo capaz de alongar cadeias de RNA aproximadamente cinco vezes mais rápido que a RNA polimerase de *E. coli*. Alguns vetores da série pET apresentam o promotor T7-lac, colocando a expressão da proteína sob controle lac e reduzindo portanto o *background* de expressão da proteína alvo na ausência de IPTG (Isopropil- β -D-Tiogalactosídeo) (pET SYSTEM MANUAL, 2002).

3.8.2. PREPARO DO VETOR pET28a-VHC

O plasmídeo pET28a possui uma seqüência próxima ao sítio de múltipla clonagem que codifica seis histidinas. Essa “cauda” de histidina (“His-Tag”) é expressa em

fusão com a proteína recombinante e facilita a purificação da proteína expressa. A cauda pode ser removida após clivagem da proteína híbrida com Trombina. A Figura 5 ilustra o sítio de múltipla clonagem e expressão do vetor pET28a.

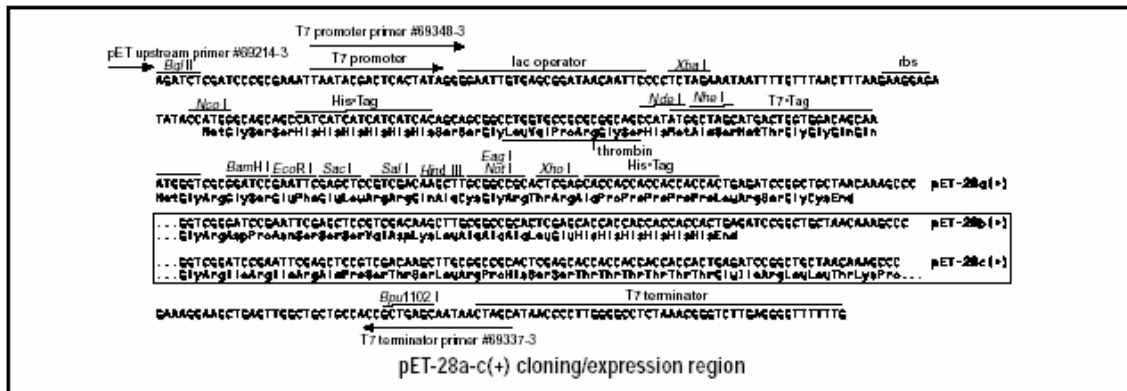


Figura 5: Sítio de múltipla clonagem e expressão do pET28a (Novagen)

O produto da amplificação (408 e 573pb), contendo as seqüências palindrômicas específicas, foi clivado com as enzimas *Nde I* e *Bam HI*, submetido à eletroforese em gel de agarose e, posteriormente, purificado pelo método *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison, WI, USA). Este produto foi clonado no vetor pET28a previamente clivado com estas mesmas enzimas.

3.8.3. PREPARO DO VETOR pET42a-VHC

O plasmídeo pET42a permite a clonagem e expressão do gene de interesse em fusão com a GST (Glutathione S-Transferase). A proteína híbrida pode ser purificada por cromatografia de afinidade em coluna de glutathione e a proteína de fusão pode ser removida após clivagem da proteína híbrida com Fator Xa. A Figura 6 ilustra o sítio de múltipla clonagem e expressão do vetor pET42a.

As reações de ligação foram realizadas com enzima T4 DNA ligase a 4°C durante 16 horas usando 50ng de vetor em um volume final de 10µL.

3.8.5. PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES

Cepa bacteriana *E. coli*, linhagem Rosetta (DE3) ou BL21 (DE3), mantida em estoque a -80°C, foi semeada em meio de cultura LB líquido (1% triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl) e incubada durante 24 horas a 37°C. Uma colônia foi inoculada em 5,0mL de meio LB líquido e colocada a crescer durante uma noite à 37°C sob agitação a 200rpm. A seguir, 1mL desta suspensão bacteriana foi inoculada em 100ml de meio LB e mantida sob agitação a 37°C até que a absorbância a 600nm atingisse o valor entre 0,4 a 0,6. Neste ponto, as células foram isoladas por centrifugação a 2.500g durante 5 minutos a 4°C, o precipitado foi ressuspensão, gentilmente, em 1/3 do volume original com CaCl₂ 0,1M e mantido em gelo durante 30 minutos. A suspensão foi novamente centrifugada e as células suspensas em 1/10 de volume de CaCl₂ 0,1M. Para preparo da célula competente da linhagem Rosetta (DE3), o antibiótico cloranfenicol (100mg/mL) (Merck) foi acrescentado ao meio nas etapas de crescimento. A suspensão bacteriana competente foi estocada a -80°C com adição de 15% de glicerol até o momento do uso.

3.8.6. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

Uma alíquota da reação de ligação foi utilizada para transformar bactérias competentes *E. coli*, da linhagem Rosetta (DE3) ou BL21 (DE3), pelo método do choque térmico. Para realizar a transformação, duzentos microlitros de células competentes foram descongeladas em gelo e acrescentou-se a 10µL da reação de ligação, homogeneizou-se suavemente e foi proporcionado um choque térmico à 42°C por 90 segundos. Adicionou-se

800µL de meio LB (1% triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl) líquido, incubou-se por 1 hora a 37°C e 200µL desse crescimento foram plaqueados em meio LB Agar LB (1% triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl, 1,5% de ágar) contendo antibiótico kanamicina (Merck) (25mg/mL).

3.8.7. SELEÇÃO DE CLONES RECOMBINANTES

As colônias obtidas após incubação a 37°C por 16 horas foram analisadas quanto à presença de clones recombinantes utilizando PCR de colônias com oligonucleotídeos do vetor (T7 promoter: 5'TAATACGACTCACTATAGGG3' e T7 terminator: 5'TATGCTAGTTATTGCTC-AGC3'). Uma pequena amostra das colônias escolhidas foram colocadas em tubos de microcentrífugas contendo 25µL de água. Os tubos foram aquecidos a 100°C durante 5 minutos. A PCR foi realizada utilizando 1µL da solução obtida após aquecimento, tampão de PCR 1X (20mM Tris-HCl pH 8,0, 50mM KCl), 1,5mM MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP, 5pM de cada oligonucleotídeo e 0,5U Taq DNA polimerase em um volume final de 10µL. A mistura de reação foi submetida a 30 ciclos térmicos com as seguintes temperaturas e tempo: 94°C por 60 segundos para desnaturação, 50°C por 60 segundos para anelamento, 72°C por 60 segundos para extensão. Ao final dos ciclos, o produto amplificado foi analisado em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL e visualizado em um transluminador de ultravioleta.

3.8.8. EXTRAÇÃO PLASMIDIAL

As colônias contendo o gene de interesse foram repicadas em 3,0mL de meio LB (1% triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl) contendo antibiótico kanamicina (25mg/mL) e incubadas a 200rpm de rotação em agitador (Forma Scientific). A extração e

purificação plasmidial foi realizada pelo método de lise alcalina de células, como resumidamente descrito a seguir. A cultura foi centrifugada a 10.000g por 2 minutos e o sedimento suspenso em 200µL de solução I (100mM Tris-HCl, pH 7,5, 10mM de EDTA e 400µg/mL de RNase). Após a adição de 200µL da solução II (0,2N NaOH e 1% SDS), o tubo foi homogeneizado gentilmente e o DNA bacteriano foi precipitado pelo acréscimo de 200µL da solução III (acetato de potássio 3M pH 4,8). Após centrifugação, o DNA plasmidial foi precipitado com 420µL de isopropanol à temperatura ambiente por 10 minutos. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 250µL de etanol 70% gelado, seguido pela lavagem com etanol 100%. Após secagem, o precipitado foi ressuspenso em 25µL de água.

3.8.9. SEQÜENCIAMENTO

Os vetores construídos durante este trabalho foram seqüenciados para confirmação da seqüência e orientação correta dos fragmentos inseridos, através do método químico de seqüenciamento de DNA (SANGER et al., 1977), em seqüenciador automático “ABI™ Prism™ 377 Fluorescent Sequencer”, utilizando o kit “DyEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing” (Amersham Biosciences), conforme orientação do fabricante. As condições de amplificação foram: 1 ciclo inicial de 96°C durante 2 minutos seguidos por 35 ciclos de 95°C durante 20 segundos, 50°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 minuto. A reação foi precipitada em etanol para remover os dideoxinucleotídeos marcados não incorporados e o produto gerado em cada reação foi submetido à separação e detecção usando o seqüenciador “ABI™ Prism™ 377 Fluorescent Sequencer”

3.8.10. INDUÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

As colônias recombinantes foram crescidas em meio CIRCLEGROW® (Qbiogene) contendo kanamicina (25mg/mL) sob agitação 200rpm até atingir uma densidade óptica (DO) entre 0,4 a 0,6 no comprimento de onda de 600nm. Nesta DO foi coletada 500µL da cultura não induzida (controle negativo). O meio CIRCLEGROW® é utilizado para obter rápido crescimento de *E. coli* e alto rendimento plasmidial. Realizou-se, então, a indução da expressão adicionando IPTG para concentração final de 0,4mM. As células foram induzidas durante 4 horas a 37°C, coletando-se 500µL da cultura nos intervalos de 1, 2, 3 e 4 horas ou após indução durante uma noite a 30°C.

3.8.11. ANÁLISE DAS PROTEÍNAS

Para a detecção das proteínas e identificação de suas mobilidades relativas foi confeccionado o gel de poliacrilamida 15% (pH 8,8) contendo 0,1% de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) e gel de empacotamento a 5% pH 6,8, segundo o método descrito por Laemmli et al. (1970). Após a indução, as alíquotas de 500µL foram centrifugadas, ressuspensas em 50µL de água, adicionados 25µL do tampão de amostra (625mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,001% e β-mercaptoetanol 5%) e fervidas durante 5 minutos. Quinze microlitros dessa preparação foram aplicados no gel de poliacrilamida.

A eletroforese foi realizada à temperatura ambiente em cuba de eletroforese Mini V8 (BRL – Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) em placas de mini-gel (10x8cm) aplicando-se 120V durante aproximadamente 2 horas. O tampão dos eletrodos foi constituído por Tris 0,125M, glicina 0,96M, SDS 0,1% pH 8,3. Após a corrida eletroforética,

o gel foi imerso em solução Coomassie Blue (coomassie blue R250 0,1%, metanol 50%, ácido acético 10%) para coloração das proteínas, e descorada em solução de ácido acético 7%.

3.8.12. TESTE DE SOLUBILIDADE

O teste de solubilidade foi realizado para determinar se a proteína recombinante foi expressa em forma solúvel ou insolúvel dentro da bactéria. Para isto, as células foram lisadas e as proteínas separadas por centrifugação em duas frações: sobrenadante (proteína solúvel) e precipitado (proteína insolúvel). A análise do conteúdo protéico das frações permitiu conhecer a solubilidade da proteína de interesse.

Para realizar o teste, as células foram induzidas conforme descrito no item 3.8.10 de Material e Métodos, e precipitadas por centrifugação a 10.000g durante 10 minutos a 4°C. O precipitado bacteriano foi então ressuspensão em tampão PBS (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄ pH 7,3) e as células foram lisadas por sonicação por 4 pulsos de 1 minuto cada. Após a sonicação, as frações solúvel e insolúvel foram separadas por centrifugação a 14.000g durante 10 minutos a 4°C e uma alíquota de cada uma das frações foi analisada em SDS-PAGE 15%.

3.9. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA EXPRESSA

3.9.1. CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM COLUNA DE NÍQUEL

Vários dos vetores da série pET codificam uma cauda de 6 histidinas (“His-Tag”), que é utilizada em fusão com a proteína recombinante e podem ser purificadas em coluna de níquel, o qual apresenta afinidade pelas histidinas. Na maioria dos casos, as histidinas não interferem com a estrutura ou função da proteína purificada.

Neste trabalho, foi utilizada uma coluna que contém o níquel-ácido nitrilotriacético adsorvido à resina (Ni-NTA Superflow, Qiagen). As bactérias foram induzidas, sonicadas em tampão de lise (100mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 50mM NaH₂PO₄ pH 8,0) e centrifugadas. A seguir, a fração solúvel foi aplicada coluna de Ni-NTA previamente equilibrada com 5 volumes de tampão de lise. As proteínas foram eluídas usando o mesmo tampão contendo concentrações crescentes de imidazol (10 a 250mM) e analisadas em SDS-PAGE 15%.

Devido ao fato de a fração solúvel não ter se ligado à coluna, condições desnaturantes também foram utilizadas: a fração insolúvel foi solubilizada em tampão de lise contendo 6 a 8M de uréia, deixada 2 horas em gelo e centrifugada. O sobrenadante foi, então, aplicado na coluna previamente equilibrada com 5 volumes de tampão de lise, eluídas com concentrações crescentes de imidazol e analisadas em SDS-PAGE 15%.

3.9.2. CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM COLUNA DE GLUTATIONA

O vetor pET-42a possui uma seqüência que codifica a proteína GST (Glutathione S-Transferase), a qual é utilizada como proteína de fusão. O gene de interesse é clonado em fusão com a GST e a proteína híbrida resultante pode ser purificada por cromatografia de afinidade.

Foi utilizada a coluna GSTrap FF (Amersham Biosciences) que contém o ligante glutathione acoplado a agarose 4% e pode ser operada em um sistema de cromatografia líquida como o ÄKTA (Amersham Biosciences).

Após a indução das células bacterianas, obteve-se a fração de proteínas solúveis através da lise por sonicação e centrifugação. Essa fração foi filtrada e aplicada pela coluna GSTrap previamente equilibrada com 5 volumes de tampão PBS (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄ pH7,3). Depois de passar o extrato protéico, a

coluna foi lavada com 5 volumes de PBS. Aplicou-se então um gradiente contínuo do tampão de eluição (50mM Tris-HCl, 10mM Glutathione Reduzida, pH8,0). Este procedimento foi realizado usando o sistema ÄKTA ou manualmente aplicando um fluxo constante de 1 – 5mL por minuto, e as frações eluídas foram analisadas em SDS-PAGE 15%.

3.10. IMUNODETECÇÃO

3.10.1. TRANSFERÊNCIA E REATIVIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Para o teste de reatividade, o extrato bacteriano foi lisado e aplicado em gel de poliacrilamida. Após eletroforese das amostras protéicas, o gel e a membrana de nitrocelulose Hybond ECL (Amersham Biosciences) são previamente equilibradas em tampão de transferência (Tris 200mM, glicina 50mM, metanol 15%). A transferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada em cuba de eletroforese Mini V8 Blot Module (BRL – Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), submetido à voltagem de 150V durante 1 hora e 30 minutos em tampão de transferência. Após esse período, a membrana foi corada com solução Ponceau (Ponceau 0,5%, ácido acético 0,1%) para visualização das bandas protéicas transferidas. O bloqueio dos sítios livres na membrana foi realizado com solução de bloqueio TBS (Tris 0,05M, NaCl 0,15M, pH 8,0 contendo 0,05% leite desnatado e 0,05% Tween-20) durante uma noite a 4°C. Após esse período, a membrana foi lavada com TBS/Tween-20 (0,05%) por 5 vezes de cinco minutos cada e incubada com soro de paciente HCV positivo diluído 1/200 em solução de bloqueio à temperatura ambiente sob agitação constante durante 1 hora e 30 minutos. Em seguida, a membrana foi lavada com TBS/Tween-20 0,05% por 5 vezes de cinco minutos cada e, então, incubada com anti-IgG humano conjugado com peroxidase (Sigma, St. Louis, USA), diluído 1:5.000 em solução de bloqueio, sob agitação constante durante 1 hora à temperatura ambiente, sendo lavada 5 vezes de 5 minutos cada com TBS/Tween-20 0,05%.

A revelação da reação foi obtida pela adição dos substratos da enzima: diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio (6mg de diaminobenzidina e 10 μ L de peróxido de hidrogênio 30% em 10 mL de Tris-HCl 0,05M, pH 8,0).

O procedimento foi utilizado para determinar o título do anticorpo sérico, utilizando as seguintes diluições: 1:100, 1:200, 1:400, 1:600 antes do uso. Para testar a especificidade da proteína recombinante foram usadas amostras positivas para o anticorpo do vírus da imunodeficiência humana (anti-HIV), positivas para a região do *core* do vírus da Hepatite B (anti-HBc) e *pool* de soros negativos para doenças infecciosas (submetidos à rotina sorológica para Chagas, Sífilis, Hepatites B e C, HIV-1/2 e HTLV (Vírus Linfotrófico de Células T Humana)). A membrana de nitrocelulose, contendo a proteína recombinante transferida, foi cortada em tiras e usada para reação com os diferentes genótipos e para titulação do anticorpo primário.

3.10.2. SLOT BLOT

Com a finalidade de obter a menor concentração de reatividade, aplicou-se concentrações crescentes da proteína recombinante produzida na membrana de nitrocelulose para posterior reação, como descrito a seguir. A membrana de nitrocelulose *Hybond ECL* - código RPN203D (Amersham Biosciences, Alemanha) foi previamente equilibrada em solução TBS (Tris 0,05M, NaCl 0,15M, pH 8,0) e montada no sistema *Hybri SlotTM Manitold* (Gibco BRL – Life Technologies). As amostras purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de glutationa, conforme descrito em Material e Métodos, item 3.9.2, expressando somente a GST e GST fusionada à proteína do *core* do VHC, foram aplicadas em concentrações crescentes (variando de 0,048 μ g a 38,4 μ g) neste sistema cassete a vácuo. O bloqueio dos sítios livres da membrana foi realizado em solução de bloqueio TBS/leite desnatado 5%/Tween-20 0,05% durante uma noite a 4°C. Após esse período, a membrana foi

lavada com TBS/Tween-20 0,05% 5 vezes de cinco minutos cada e incubada com soro de paciente HCV +, genótipo 1b, diluído 1/400 em solução de bloqueio à temperatura ambiente sob agitação constante durante 1 hora e 30 minutos. Em seguida, a membrana foi lavada com TBS/Tween-20 0,05% por 5 vezes de cinco minutos cada e, então, incubada com anti-IgG humano conjugado com peroxidase (Sigma, St. Louis, MO, USA), diluído 1:5.000 em solução de bloqueio, sob agitação constante durante 1 hora à temperatura ambiente, sendo lavada 5 vezes de 5 minutos cada com TBS/Tween-20 0,05%. A revelação da reação foi obtida pela adição dos substratos da enzima: diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio (6mg de diaminobenzidina e 10µL de peróxido de hidrogênio 30% em 10mL de Tris-HCl 0,05M, pH 8,0).

3.11. REAÇÃO IMUNOENZIMÁTICA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-VHC

Para otimizar a adsorção na placa, o antígeno foi titulado para fornecer melhor reatividade. Inicialmente, cem microlitros da amostra protéica diluída em tampão bicarbonato 0,05M pH 9,6 foram adicionados às cavidades da micro-placa fixando as diluições de 1:5 para o soro e 1:10.000 para o anticorpo secundário e variando a diluição da suspensão antigênica.

Definidas as condições ideais da suspensão antigênica, realizou-se o imunoensaio com amostras de soros positivos para VHC e soros de pacientes com doenças inflamatórias ou infecciosas crônicas para o estudo de reatividade cruzada, seguindo-se o procedimento descrito: 100µL da fração purificada da GST fusionada à proteína do *core* do VHC diluída em tampão carbonato 0,05M pH 9,6 foram adicionados às cavidades da micro-placa de poliestireno e incubada durante 15 a 18 horas a 4°C. Após esse período, as cavidades foram lavadas com PBS-T (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄

pH7,3) contendo 0,05% de Tween-20 por três vezes, e posteriormente cada poço recebeu 100µL de solução de bloqueio (PBS-T contendo 5% de leite desnatado) durante 2 horas a 37°C. Em seguida, cada poço foi lavado com PBS-T por 3 vezes de 30 segundos cada e incubado com 100µL de soro diluído 1/5 em solução de bloqueio à 37°C, durante 1 hora. O poço foi lavado com PBS-T por 3 vezes de 30 segundos cada e, então, incubada com anti-IgG humano conjugado com peroxidase (Sigma, St. Louis, MO, USA), diluído 1:10.000 em solução de bloqueio durante 1 hora à 37°C. Após a incubação da placa, o poço foi novamente lavado por 3 vezes de 30 segundos cada com TBS-T. A revelação da reação foi obtida pela adição de 100µL da mistura TMB (tetrametilbenzidina) e peróxido de uréia diluído na proporção 1:1 (bioMérieux, Boxtel, NL) e incubado durante 10 minutos na ausência de luz a temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 100µL de H₂SO₄. A leitura foi realizada em leitora de microplaca (Labsystems Multiscan Ascent - THERMOLABSYSTEMS) com filtro de 450nm e filtro de referência 620nm.

3.12. IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-CORE VHC

Com a finalidade de obter anticorpos contra a proteína recombinante GST fusionada ao *core* do VHC, seis camundongos machos foram imunizados por injeção subcutânea, utilizando adjuvante para ativar a resposta imune. A proteína foi utilizada de duas formas diferentes:

- 1) a proteína GST fusionada ao *core* purificada em coluna de afinidade a GST, conforme descrito em Material e Métodos, item 3.9.2.
- 2) a proteína recombinante GST fusionada ao *core* do VHC, purificada em coluna de afinidade a GST, foi concentrada e analisada em SDS-PAGE 15%. Após a corrida de 2 horas a 120V, uma tira do gel foi retirada e então corada com *Comassie Blue* (0,1%

Coomassie Blue, 50% de metanol, 10% de ácido acético) para observação da banda correspondente à proteína de interesse. A parte do gel não corada, e que continha a maior parte da proteína, foi alinhada à parte corada e, então, o gel onde estava presente a proteína de interesse foi recortado, macerado, ressuspensão em 1mL de PBS (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄, pH 7,3) e a solução foi deixada aproximadamente 16 horas a 4°C para permitir a eluição da proteína. Essa fração foi concentrada e a quantidade de proteína contida na solução foi estimada através do método de Bradford modificado (BRADFORD, 1976), utilizando o kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Life Science Research, USA).

Cinco camundongos foram imunizados via subcutânea com 50µg de proteína obtida segundo o método (1) e um com a proteína extraída do gel, conforme descrito em (2). A proteína foi emulsionada na proporção 1:1 em adjuvante completo de Freund (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Após 30 dias realizou-se uma segunda imunização usando 50µg de proteína emulsionada na proporção 1:1 em adjuvante incompleto de Freund (Sigma, St. Louis, MO, USA). Decorridos 11 dias da segunda imunização, uma pequena alíquota de cada camundongo foi testada para verificar a imunização. O protocolo utilizado para verificar a produção de anticorpos em camundongos seguiu as mesmas condições descritas no item 3.10.1, de Material e Métodos. As tiras foram incubadas com o soro de camundongo na diluição 1:100. O conjugado utilizado foi o anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma, St. Louis, MO, USA) na diluição 1:5.000. A revelação da reação foi obtida pela adição dos substratos da enzima: diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio (6mg de diaminobenzidina e 10µL de peróxido de hidrogênio 30% em 10mL de Tris-HCl 0,05M, pH 8,0).

3.13. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO IgG ANTI-CORE DE CAMUNDONGO

A purificação da fração IgG dos camundongos foi realizada utilizando a coluna *HiTrap affinity columns* (HiTrap protein G, Pharmacia Biotech). A proteína G, presente na superfície de estreptococos do grupo G, é um receptor para porção Fc de IgG. Após a verificação da reatividade dos anticorpos produzidos, os soros que apresentaram reatividade foram filtrados e aplicados na coluna (HiTrap protein G - Pharmacia Biotech), previamente equilibrada com 5 volumes de tampão fosfato (Na_2HPO_4 20mM pH 7,0) e, em seguida, lavada com 5 volumes deste mesmo tampão. A eluição do anticorpo foi realizada pela passagem do tampão glicina-HCl 0,1M pH 2,7 pela coluna. Este procedimento foi realizado manualmente aplicando um fluxo constante de 1mL por minuto. Após purificação, as amostras eluídas foram, novamente, testadas para reatividade contra a proteína recombinante GST-core VHC. Para eluir a IgG foi necessário aplicar um pH baixo, cerca de 2,5 a 3,0. A coleta foi realizada em tubos contendo 60 a 100 μL de Tris-HCl pH 9,0 por mL de fração a ser recolhida para que não houvesse perda da reatividade do anticorpo.

Após a eluição, as amostras coletadas foram testadas para a reatividade as mesmas condições descritas no item 3.10.1, de Material e Métodos. As tiras foram incubadas com as frações purificadas na diluição 1:100. O conjugado utilizado foi o anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma, St. Louis, MO, USA) na diluição 1:5.000. A revelação da reação foi obtida pela adição dos substratos da enzima diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio (6mg de diaminobenzidina e 10 μL de peróxido de hidrogênio 30% em 10mL de Tris-HCl 0,05M, pH 8,0).

3.14. IMUNIZAÇÃO DE COELHOS PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-CORE VHC

Com a finalidade de obter anticorpos contra a proteína recombinante GST fusionada à proteína do *core* do VHC, coelhas foram imunizadas utilizando adjuvante para a ativar a resposta imune, seguindo o protocolo descrito por DUNBAR e SCHWOEBEL, 1990. Duas coelhas adultas jovens de linhagem albina, pesando cerca de 3kg cada, foram imunizadas com 50µg da proteína recombinante GST fusionada à proteína do *core* do VHC, purificada em coluna de afinidade a glutaciona, conforme descrito em Material e Métodos, item 3.9.2, emulsionado em adjuvante completo de Freund (Sigma, St. Louis, MO, USA) na proporção 1:1. Esse mesmo procedimento foi repetido no 21º e 40º dias após a primeira inoculação das coelhas; as imunizações subseqüentes foram realizadas com 50µg de proteína emulsionada em adjuvante incompleto de Freund na proporção 1:1 (Sigma, St. Louis, MO, USA). No 46º dia, foi retirada uma pequena alíquota de sangue para testar a produção de anticorpos para a proteína de interesse. Ao término do protocolo de imunização no 47º dia, para obtenção do soro imune, as coelhas receberam injeção intramuscular de uma combinação de anestésico e relaxante muscular: Xilazina 2% (Dopazen solução injetável – Laboratório Calier do Brasil LTDA), 0,25mL/Kg, e Cetamina 10% (Ketamina Agener, União Química – Farmácia Nacional S/A) 0,35mL/Kg. Sob efeito anestésico e de relaxante muscular, o sangue das coelhas foi retirado por punção cardíaca. O soro foi incubado a 37°C por 1 hora para total desprendimento do coágulo, o qual foi retirado. O soro foi centrifugado a 2.500rpm durante 15 minutos e em seguida foi inativado para o sistema complemento a 56°C durante 30 minutos. As amostras de soro para purificação de IgG anti-*core* foram mantidas a -20°C até o momento do uso.

As mesmas condições descritas no item 3.10.2, de Material e Métodos foram seguidas para verificar a imunização. As membranas foram incubadas com o soro das coelhas

na diluição 1:100. O conjugado utilizado foi o anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina na diluição 1:5.000. A revelação foi realizada pela adição do substrato para a enzima fosfatase alcalina (Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit, Bio-Rad - cat. 170-6432).

3.15. PURIFICAÇÃO DE FRAÇÃO IgG ANTI-CORE VHC DE COELHO

3.15.1. PRECIPITAÇÃO DA FRAÇÃO IgG

Após a inativação dos soros imunes das coelhas, as amostras foram reunidas e a 60mL de soro foi adicionado, gota a gota, sob agitação, uma solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 6,0 de modo que a concentração no volume total fosse de 33%, ou seja, 29,4mL dessa solução. A adição da solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 33% promoveu a precipitação da fração rica em globulinas. Após incubação durante 1 hora a 4°C, a suspensão foi centrifugada a 3.000g durante 15 minutos a 4°C. Em seguida, o precipitado foi ressuspenso em $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40%, para a retirada de proteínas solúveis adsorvidas às globulinas e submetido à centrifugação a 3.000g durante 15 minutos a 4°C. O precipitado foi solubilizado em 30mL de PBS. Essa suspensão foi, então, dialisada em câmara fria durante 4 horas por 3 vezes em PBS e, posteriormente, em tampão fosfato NaH_2PO_4 0,02M pH 7,4 por mais 4 horas. Após a diálise, determinou-se a concentração da proteína na amostra e, em seguida, congelada até o momento da realização da purificação.

3.15.2. PURIFICAÇÃO EM COLUNA DEAE-CELULOSE

Realizada a etapa de precipitação e diálise, a fração de anti-soro de coelha, contendo IgG anti-core VHC, foi purificada por cromatografia em DEAE (dietilaminoetil) celulose (Whatman, Inglaterra), previamente equilibrada no tampão de eluição: tampão fosfato 0,02M pH 7,4. Este procedimento foi realizado aplicando um fluxo constante de 1mL por minuto da amostra, sendo coletada 5mL em cada tubo. A eluição da IgG foi realizada pelo

monitoramento das frações coletadas a 280nm. As frações do primeiro pico, correspondente à IgG, foram reunidas e concentradas em sistema Amicon (Millipore). As demais proteínas foram eluídas com solução NaCl 1M.

Para verificar a reatividade da IgG purificada, empregou-se as mesmas condições descritas no item 3.10.2, de Material e Métodos. A membrana foi incubada com a fração da amostra purificada e concentrada, na diluição 1:500. O conjugado utilizado foi o anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase peroxidase na diluição 1:5.000. A revelação da reação foi obtida pela adição dos substratos da enzima: diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio (6mg de diaminobenzidina e 10 μ L de peróxido de hidrogênio 30% em 10mL de Tris-HCl 0,05M, pH 8,0).

3.16. PREPARO DE ANTICORPOS ANTI-CORE VHC

Os anticorpos utilizados para o teste imunocromatográfico devem apresentar alta especificidade e sensibilidade para o antígeno, estar na forma purificada e ser dialisada no tampão apropriado. Dessa forma, os anticorpos policlonais purificados obtidos de camundongos e de coelhas passaram por uma etapa de diálise em tampão fosfato (Na₂HPO₄ 10mM pH 7,5) durante 4 horas em câmara fria a 4°C e ajustadas para a concentração de 450 μ g/mL e armazenadas a -20°C até o momento do uso.

3.17. TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO

3.17.1. CONJUGAÇÃO DA SOLUÇÃO COLOIDAL DE OURO COM ANTICORPO POLICLONAL ANTI-CORE VHC

O anticorpo policlonal anti-*core* VHC, produzido em camundongo ou coelho, purificado conforme procedimentos descritos, itens 3.13 e 3.15 de Material e

Métodos, respectivamente, foi conjugado por adsorção física a partículas de ouro coloidal (20nm colloidal gold - Sigma, St. Louis, MO, USA) sob variações de pH e concentração do anticorpo, a fim de se determinar a melhor condição para conjugação colóide ouro-anticorpo anti-core VHC.

3.17.1.1. ANTICORPOS PRODUZIDOS EM CAMUNDONGOS

O pH da solução coloidal de ouro foi ajustado para intervalo de pH entre 7 a 11 por adição de Na_2CO_3 0,1M e a solução de anticorpo, previamente dialisada em tampão fosfato 10mM pH 7,5, foi diluída para concentração de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em água Milli-Q. Em microplaca, dez microlitros dessa solução de anticorpo (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram combinados com 100 μL do ouro coloidal em diferente pH e a mistura deixada reagir durante 15 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, foram adicionados 10 μL de solução salina a 10% e a reação foi novamente incubada por mais 15 minutos a temperatura ambiente. A variação de coloração da solução final foi monitorada a 2 absorbâncias distintas de 540nm e 620nm em leitora de microplaca (Labsystems Multiscan Ascent - THERMOLABSYSTEMS).

Para determinar a concentração ideal do anticorpo, a solução coloidal de ouro foi ajustada para o pH ótimo, anteriormente determinado (pH 8,0), conjugada com concentrações variáveis do anticorpo (0 a 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e submetida à incubação a temperatura ambiente durante 15 minutos. Após esse período, foram adicionadas 10 μL de solução salina 10% e submetida a nova incubação durante 15 minutos. A variação de coloração da solução final foi monitorada a 2 absorbâncias distintas de 540nm e 620nm em leitora de microplaca (Labsystems Multiscan Ascent - THERMOLABSYSTEMS).

Sob condições ótimas, o conjugado solução coloidal de ouro-anticorpo foi preparado. Em tubo de microcentrífuga, adicionou-se 200 μL da solução coloidal de ouro e o

pH foi ajustado para 7,0 pela adição de Na_2CO_3 0,1M e misturado com 20 μL de anticorpo anti-*core* 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e deixado a temperatura ambiente por 1 hora. As superfícies residuais das partículas coloidais de ouro foram bloqueadas pela adição de 25 μL da solução Tris-HCl 0,1M pH 7,6 contendo 10% de BSA e novamente incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos. O conjugado foi centrifugado a 10.000g a 4°C durante 30 minutos e o sobrenadante descartado. Os anticorpos não ligados foram removidos pela lavagem desse precipitado com tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,6 contendo 0,5% de caseína. A solução foi novamente centrifugada a 10.000g durante 30 minutos a 4°C. Após remover o sobrenadante, o volume final foi ajustado para 12 μL com Tris-HCl 0,1M pH 7,6 contendo 0,5% de caseína e o conjugado estocado a 4°C até o momento do uso.

3.17.1.2. ANTICORPOS PRODUZIDOS EM COELHOS

Para produzir anticorpos anti-*core* em coelho, condições semelhantes foram empregadas. O pH da solução coloidal de ouro foi ajustado para intervalo de pH entre 7 a 11 por adição de Na_2CO_3 0,1M e a solução de anticorpo, previamente dialisada em tampão fosfato 10mM pH 7,4, foi diluída para concentração de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em água Milli-Q. Em microplaca, dez microlitros dessa solução de anticorpo (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram combinados com 100 μL do ouro coloidal em diferente pH e a mistura deixada reagir durante 15 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, foram adicionadas 10 μL de solução salina a 10%, e a reação foi novamente incubada por mais 15 minutos a temperatura ambiente. A variação de coloração da solução final foi monitorada a 2 absorvâncias distintas de 540 e 620nm em leitora de microplaca (Labsystems Multiscan Ascent - THERMOLABSYSTEMS).

Para determinar a concentração ideal do anticorpo, a solução coloidal de ouro foi ajustada para o pH ótimo, anteriormente determinado (pH 8,0), conjugada com

concentrações variáveis do anticorpo (10 a 800µg/mL) e submetida à incubação a temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse período, foram adicionadas 10µL de solução salina 10% e novamente incubada por 15 minutos. A variação de coloração da solução final foi monitorada a 2 absorvâncias distintas de 540nm e 620nm em leitora de microplaca (Labsystems Multiscan Ascent - THERMOLABSYSTEMS).

Sob condições ótimas, o conjugado solução coloidal de ouro-anticorpo foi preparado. Em tubo de microcentrífuga, adicionou-se 200µL da solução coloidal de ouro e o pH foi ajustado para 8,0 pela adição de Na₂CO₃ 0,1M e misturado com 20µL de anticorpo anti-*core* 300µg/mL e deixado a temperatura ambiente por 1 hora. As superfícies residuais das partículas coloidais de ouro foram bloqueadas pela adição de 25µL da solução Tris-HCl 0,1M pH 7,6 contendo 10% de BSA e novamente incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. O conjugado foi centrifugado a 10.000g a 4°C durante 30 minutos e o sobrenadante descartado. Os anticorpos não ligados foram removidos pela lavagem desse precipitado com tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,6 contendo 0,5% de caseína. A solução foi novamente centrifugada a 10.000g durante 30 minutos a 4°C. Após remover o sobrenadante, o volume final foi ajustado para 12µL com Tris-HCl 0,1M pH 7,6 contendo 0,5% de caseína e o conjugado estocado a 4°C até o momento do uso.

3.17.2. IMOBILIZAÇÃO DO ANTICORPO NA MEMBRANA DE NITROCELULOSE

As membranas destinadas à realização de testes imunocromatográficos é a de nitrocelulose, classificadas como de alto fluxo e encontram-se disponíveis no mercado como de alto fluxo (Hi-Flow), e variam entre 65 a 240, ou seja, possuem um fluxo de 65 a 240 segundos por 4 centímetro de membrana. Para melhor reatividade, os mais recomendados são de alto fluxo de 135, 180 e 240 (HF135, HF180 e HF240). A imobilização do anticorpo na

superfície da membrana de nitrocelulose foi realizada por meio de adsorção física em membranas HF135, HF180 e HF240. A membrana foi previamente tratada com solução Tris-HCl contendo 0,4% de glicerol durante 15 minutos para que, ao aplicar a amostra de anticorpo na membrana, houvesse controle do grau de absorção de solução aquosa. Após imersão, as membranas foram colocadas em estufa a 37°C durante 20 horas para secagem. A membrana foi cortada em tiras de 0,5cm e fixados os anticorpos de detecção: policlonal anti-*core* para VHC (2,5mg/mL) produzido em camundongo ou coelho; e de captura: anti-camundongo ou coelho (1mg/mL) dependendo do anticorpo de detecção utilizado, foram imobilizados a 25mm e 35mm, respectivamente, da extremidade inferior da fita. Para obter um padrão de imobilização homogêneo e delimitado, um microlitro da solução de anticorpo contendo 5% de etanol, tanto de captura quanto de detecção, foi transferida através de um suporte para *Dot-Blot* com orifícios de 3mm de diâmetro (Gibco BRL – Life Technologies) utilizando ponteira. A membrana com anticorpo foi incubada a 37°C em estufa para fixação do anticorpo durante 2 horas e posteriormente bloqueada pela imersão das tiras em solução Tris-HCl 0,1M pH 7,6 contendo 2% de caseína durante 15 minutos. Após esse período, efetuou-se a lavagem por 3 vezes com solução Na₂HPO₄ 10mM pH 7,5 e as fitas colocadas em estufa a 37°C durante 2 horas para secagem.

3.17.3. PREPARO DA MEMBRANA DE FIBRA DE VIDRO

A membrana de vidro foi bloqueada com Tris-HCl 0,1M pH 7,4 contendo 2% de caseína e 1% de Triton X-100 e seca durante 2 horas em estufa a 37°C. Cinco microlitros do conjugado ouro coloidal – IgG anti-*core* foram adicionados nesta membrana e deixados secar à temperatura ambiente por 4 horas e após esse período usado para montagem do teste imunocromatográfico ou guardado em geladeira em frasco fechado até o momento do uso.

3.17.4. CONSTRUÇÃO DA FITA PARA TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO

Os materiais necessários para a construção das tiras para o ensaio imunocromatográfico foram adquiridos através do kit Hi-Flow Plus Assembly (Millipore). Esse sistema consiste de 4 diferentes de membranas, conforme demonstrado nas Figuras 7 e 8: membrana de fibra de vidro, membrana de nitrocelulose, membrana de celulose e membrana absorvente (Whatman). Na membrana de vidro foi fixado o conjugado coloidal de ouro e anticorpo policlonal anti-*core* VHC, o qual terá a função de capturar o antígeno do *core* presente na amostra. A membrana de celulose tem a função de absorção e controle do fluxo da amostra. Na membrana de nitrocelulose foi realizada a fixação dos anticorpos: a 25mm da extremidade inferior da fita foi fixado o anticorpo de captura anti-*core* VHC e a 35mm, o anticorpo de detecção, que atua como o controle do teste. O anticorpo de captura utilizado foi o anti-camundongo ou anti-coelho, dependendo de qual anticorpo a ser utilizado na conjugação com a solução coloidal de ouro e na captura. Através da montagem e sobreposição destas membranas, como demonstra a Figura 7, um rápido ensaio imunocromatográfico foi desenvolvido para determinação qualitativa de antígenos contra o *core* do vírus da hepatite C em amostras contendo a proteína adicionada ou soro positivo para o VHC. A Figura 8 esquematiza a reação ocorrida no teste imunocromatográfico e interpretação do resultado.

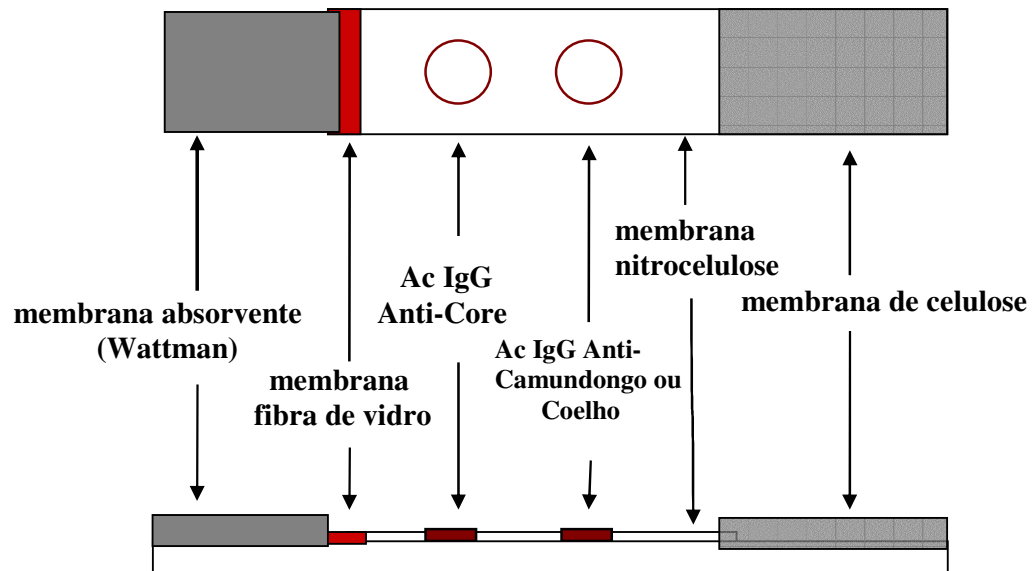


Figura 7: Representação esquemática demonstrando a montagem pela sobreposição das membranas e os principais componentes para construção da fita imunocromatográfica para detecção do antígeno do *core* do VHC. **C:** área controle - anti- IgG camundongo ou coelho (anticorpo de detecção); **T:** área teste - anticorpo contra o core do VHC (anticorpo de captura).

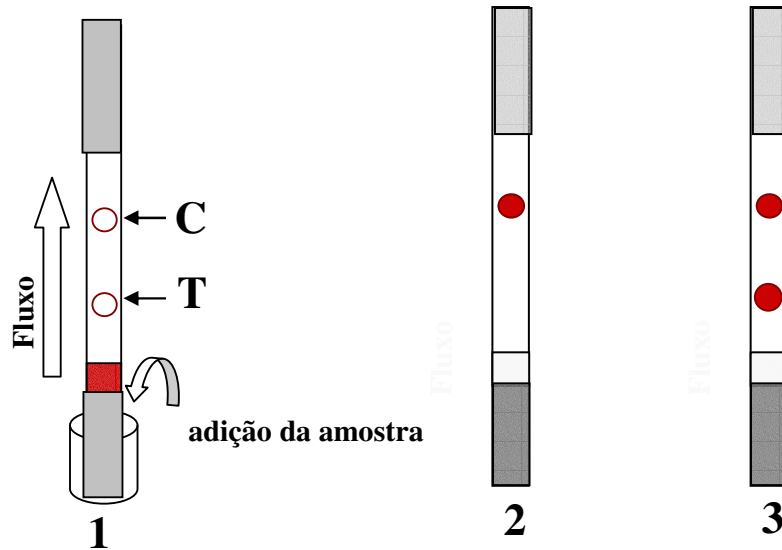


Figura 8: Interpretação do Resultado no Teste Imunocromatográfico: **1:** Ilustração do Teste Imunocromatográfico; **2: Teste Negativo** - Somente ocorre desenvolvimento de cor vermelho-violeta na região **C** na parte superior da fita, mostrando que o teste funcionou adequadamente, os reagentes estão ativos e na concentração ideal; **3: Teste Positivo** - o desenvolvimento da coloração vermelho-violeta aparece tanto na parte superior (**C**) quanto na inferior (**T**) da fita. O desenvolvimento da cor vermelho-violeta na área **T** indica resultado positivo para a presença do antígeno core do VHC. **C:** área controle - anti- IgG camundongo ou coelho (anticorpo de detecção); **T:** área teste - anticorpo contra o *core* do VHC (anticorpo de captura).

3.17.5. TESTE DE REATIVIDADE DO TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO

Os testes de reatividade do método desenvolvido foram realizados após padronizadas as principais variáveis que pudessem interferir na performance do ensaio imunocromatográfico, tais como pureza, pH e concentração do anticorpo utilizado, conjugação do anticorpo com a solução de ouro coloidal, temperatura e tempo de incubação e secagem da membrana de nitrocelulose e fixação do anticorpo na membrana.

O teste de reatividade foi realizado pelo uso de soro negativo para o VHC, adicionando-se a proteína recombinante e, também, soro positivo para o VHC. As concentrações de proteína recombinante *core* fusionada à GST adicionadas variaram de 0,20 a 800µg em soro negativo, diluído em PBS 1:5. O procedimento foi utilizado para determinar a concentração do antígeno detectável em soro com a proteína recombinante adicionada. Paralelamente, o mesmo processo foi realizado empregando soro positivo para o VHC nas seguintes diluições: 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:4 e 1:2 para a detecção do antígeno do *core* circulante.

Soros positivos para o anticorpo do vírus da imunodeficiência humana (anti-HIV), para a região do *core* do vírus da Hepatite B (anti-HBc) e *pool* de soros negativos para doenças infecciosas (submetidos à rotina sorológica para Chagas, Sífilis, Hepatites B e C, HIV-1/2 e HTLV (Vírus Linfotrópico de Células T Humana)) também foram utilizadas para testar a especificidade do teste.

4 – RESULTADOS

4.1. IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS VHC POSITIVAS

Para triagem, foi avaliada a presença do RNA-VHC pelo método qualitativo comercial para detecção do vírus. Posteriormente, se positivas, as amostras foram genotipadas pelo método comercial INNO – LiPA HCV II (Innogenetics, Bélgica), avaliando-se a região 5'UTR. Quatro dessas amostras genotipadas (genótipos 1a, 1b, 2b e 3) foram submetidas à análise comparativa pelo método imunocromatográfico desenvolvido neste trabalho.

4.2. EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL E RT-PCR PARA A REGIÃO DO CORE

A escolha da região para desenho dos oligonucleotídeos para a amplificação da região codificadora do *core* do VHC, correspondente a 408pb e 573pb, foi realizada a partir do estudo da sequência registrada no “Blastn GenBank” – NCBI - AF 333324, genótipo 1b. Para a extração do RNA viral não obtivemos um resultado satisfatório quando utilizamos o método preconizado por Boom et al. (1990). Este método adaptado para extração do RNA viral do VHC somente apresentou sucesso quando realizado para amplificação por RT-PCR da região 5'UTR (ABRÃO, 2003). Para a região do *core* VHC, boa amplificação e reprodutibilidade foram apenas obtidas quando utilizamos o QIAamp RNA Mini Kit Hand (QIAGEN) para extração do RNA viral. Na Figura 9, nas canaletas 1 e 2 são observados os produtos esperados de 408 e 573pb, respectivamente. Resultado satisfatório foi obtido quando utilizamos duas reações subsequentes de PCR para amplificação, inicialmente com os oligonucleotídeos externos, seguido pela amplificação com outro na região mais interna (Hemi-Nested PCR), aumentando a especificidade e a sensibilidade da reação.

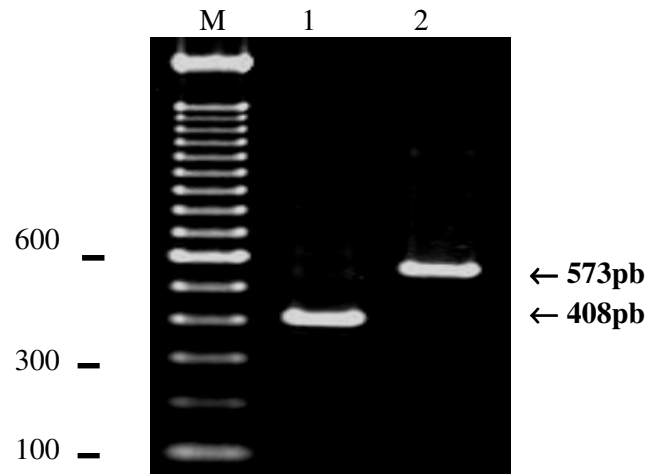


Figura 9: Amplificação por PCR da região codificadora do *core*. As bandas com mobilidades de 408 (canaleta 1) e 573pb (canaleta 2), apresentam-se indicadas pela seta à direita. O padrão de 100 pares de bases (M) está representado à esquerda. O gel de agarose 2% foi corado com brometo de etídio 0,5µg/mL.

4.3. CLONAGEM E SELEÇÃO DE CLONES RECOMBINANTES

O produto obtido na reação de *Hemi-Nested* PCR (408 e 573pb) foi utilizado como molde para adicionar sítios de restrição para as enzimas *Nco* I/*Nde* I e *Bam* HI para posterior clivagem. Os vetores de expressão pET28 ou pET42 também foram clivados com as mesmas enzimas utilizadas para o inserto, conforme descrito no item 3.6, de Material e Métodos. Esta estratégia possibilita que o fragmento seja inserido na orientação correta. Os produtos amplificados, de tamanhos esperados de 408 e 573pb, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, eluído, purificado e ligado aos vetores de expressão pET28a ou pET42a. A seleção dos clones recombinantes foi realizada por PCR de colônia utilizando os oligos do vetor, como descrito em Material e Métodos, item 3.8.7.

Após amplificação por PCR e visualização em gel de agarose, os clones contendo a região de 408pb do *core* clonado no vetor pET28a apresentaram produto na região de 670pb e de 262pb para o não recombinante. Os clones contendo a região de 573pb, clonado no pET28a, resultou em produto de 835pb e de 262pb para a colônia não recombinante (dados não mostrados).

Analogamente, após amplificação por PCR a seqüência de 408pb clonado no pET42a forneceu um produto esperado de 1.524pb e a de 573pb, uma amplificação de 1.689pb. O clone não recombinante contendo apenas o vetor pET42a resultou em produto na região de 1.116pb, como demonstrado nas Figuras 10 e 11.

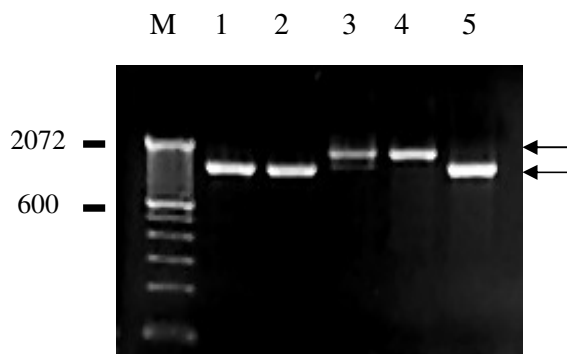


Figura 10: Seleção de colônias recombinantes pET42a-*core* 408pb através da técnica de “PCR de colônia”. O padrão de 100 pares de bases (M) está representado à esquerda. Em 3 e 4, colônias recombinantes e em 1, 2 e 5, colônias não recombinantes. O gel de agarose 2% foi corado com brometo de etídio 0,5µg/mL.

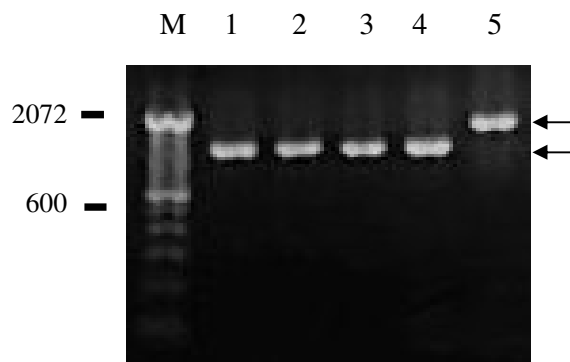


Figura 11: Seleção de colônias recombinantes pET42a-*core* 573pb através da técnica de “PCR de colônia”. O padrão de 100 pares de bases (M) está representado à esquerda. Em 5, colônia recombinante e em 1 – 4, colônias não recombinantes. O gel de agarose 2% foi corado com brometo de etídio 0,5µg/mL.

4.4. SEQUENCIAMENTO DO PRODUTO CLONADO

Após a transformação e seleção de colônias recombinantes, o DNA plasmidial foi purificado e sequenciado como descrito no item 3.8.9, em Material e Métodos. A seqüência obtida foi comparada com a disponível no “Blastn GenBank” – NCBI, AF 333324, confirmando a autenticidade e a orientação correta do inserto, como demonstra o alinhamento das Figuras 12 e 13.


```

AF 33324: 342 atgagcacaatcctaaacctcaaagaaaaacaaacgtaacaccaaccgcccacag 401
|
|
|
core 573: 1 atgagcacaatcctaaacctcaaagaaaaacaaacgtaacaccaaccgcccacag 60

AF 33324: 402 gacgttaagttcccgggcggtggtcagatcgttggaggagtttacctggtgccgcgag 461
|
|
|
core 573: 61 gacgtcaagttcccgggcggtggtcagatcgttggaggagtttacctggtgccgcgag 120

AF 33324: 462 ggccccaggttgggtgtgcgcgcgactaggaagacttccgagcggcgcaacctcgtgga 521
|
|
|
core 573: 121 ggccccaggttgggtgtgcgcgcgactaggaagacttccgagcggcgcaacctcgtgga 180

AF 33324: 522 agggcacaacctatccccaggctcgccggcccgaggtaggacctgggctcagcccggg 581
|
|
|
core 573: 181 cggcgacaacctatccccaggctcgtcggcccgaggtaggacctgggctcagcccggg 240

AF 33324: 582 tacccttgcccctctatggcaacgagggtatggggtgggcaggatggctcctgtcacc 641
|
|
|
core 573: 241 tacccttgcccctctatggcaatgagggtatggggtgggcaggatggctcctgtcacct 300

AF 33324: 642 cgtggctctcggcctagttggggccccacagaccocggcgtaggtcgcgtaatttgggt 701
|
|
|
core 573: 301 cgcggctctcggcctagttggggccccactgaccccggcgtaggtcgcgtaatttgggt 360

AF 33324: 702 aaggtcatcgatacccttacatgcccgttcgcccagacctcatggggtacattccgcttgtc 761
|
|
|
core 573: 361 aaagtcacgataccctcacatgcccgttcgcccagacctcatggggtacattccgctcgtc 420

AF 33324: 762 ggcgccccctaggaggcgctgccagggccctggcgcatggcgtccgggttctggaggac 821
|
|
|
core 573: 421 ggcgccccctagggggcgctgccagggccctggcgcatggcgtccgggttctggaggac 480

AF 33324: 822 ggcggaactatgcaacaggaatctgcccgggtgctctttctctatcttcctcttagct 881
|
|
|
core 573: 481 ggcggaactatgcaaca-ggaatttggcccgggtgctcttttctctatcttcctcttagct 539

AF 33324: 882 ttgctgtcttgtttgaccatcccagcttccgct 914
|
|
|
core 573: 540 ctgctgtcctgtttgaccatcccactttccgct 572

```

Figura 12: Alinhamento da sequência clonada correspondente à região completa do *core*

VHC de 573pb. Score = 960 bits (499), Expect = 0.0 Identities = 550/573 (95%), Gaps = 1/573 (0%).

```

AF 33324: 342 atgagcacaatcctaaacctcaaagaaaaaccaaacgtaacaccaaccgcccacag 401
|
|
|
core 408: 1 atgagcacaatcctaaacctcaaagaaaaaccaaacgtaacaccaaccgcccacag 60

AF 33324: 402 gacgttaagttcccgggcggtggtcagatcgttggaggagtttacctggtgccgcgag 461
|
|
|
core 408: 61 gacgtcaagttcccgggcggtggtcagatcgttggaggagtttacctggtgccgcgag 120

AF 33324: 462 ggccccaggttgggtgtgcgcgcgactaggaagacttccgagcggtcgcaacctcgtgga 521
|
|
|
core 408: 121 ggccccaggttgggtgtgcgcgcgactaagaagacttccgagcggtcgcaacctcgtgga 180

AF 33324: 522 agggcacaacctatccccaggctcgccggcccgaggtaggacctgggctcagcccggg 581
|
|
|
core 408: 181 cgggcacaacctatccccaggctcgtcggcccgaggtaggacctgggctcagcccggg 240

AF 33324: 582 tacccttggcccctctatggcaacgagggtatggggtgggcaggatggctcctgtcaccc 641
|
|
|
core 408: 241 tacccttggcccctctatggcaatgagggtatggggtgggcaggatggctcctgtcacct 300

AF 33324: 642 cg-tggctctcggcctagttggggcccccacagacccccggcgtaggtcgcgtaatttggg 700
|
|
|
core 408: 301 cgcggtctctcggcctagttngggcccccactgacccccggcgtangtcgcgtaatttggg 360

AF 33324: 701 taaggatcatcgatacccttacatgcggttcgcccacctcatgggta 748
|
|
|
core 408: 361 taaagtcatacgntaccctcacatgcggttcgcccacctcatgggta 408

```

Figura 13: Alinhamento da sequência clonada correspondente à região parcial do *core* VHC de 408pb. Score = 679 bits (353), Expect = 0.0 Identities = 391/408 (95%), Gaps = 1/408 (0%).

4.5. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS COMPLETA (191 aa) E PARCIAL (136aa) DO *CORE* VHC EM PLASMÍDEO pET28a

Os produtos amplificados, correspondentes ao gene do *core* do VHC (região completa de 573pb e parcial de 408pb), foram clonados no vetor pET28a. A indução resultou na expressão da proteína do *core* HCV fusionada a 6 resíduos de Histidina, correspondentes às sequências parcial de 136 aminoácidos e completa de 191, que serão designadas de His-C136 e His-C191, respectivamente, nesse trabalho para facilitar a sua citação. A expressão foi realizada em células *Escherichia coli* linhagem Rosetta (DE3) ou BL21 (DE3), como descrito em Material e Métodos, item 3.8.10.

O conteúdo protéico dos clones induzido e não induzido foram analisados em SDS-PAGE 15%. A expressão do gene *core* (408 e 573pb) no vetor pET28a forneceu proteínas na região esperada de 17kDa (His-C136) e 23kDa (His-C191) respectivamente, como mostra as Figuras 14 e 15.

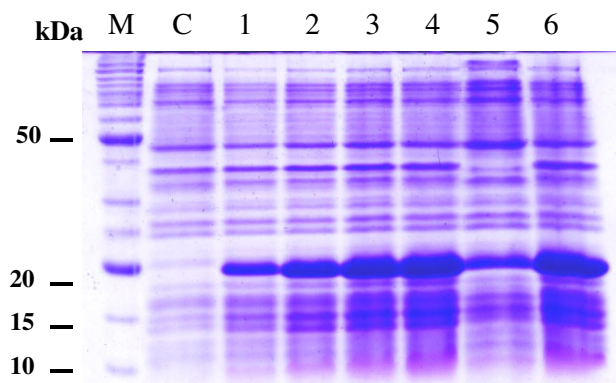


Figura 14: Análise em gel de poliacrilamida 15% da expressão da proteína His-C136 (17kDa). M: marcador de peso molecular (kDa)(Invitrogen), C: controle não induzido, 1-4: clone após 1, 2, 3 e 4 horas de indução com 0,4mM de IPTG, 5: fração solúvel da proteína, 6: fração insolúvel da proteína. A seta indica a proteína expressa na região de 17kDa.

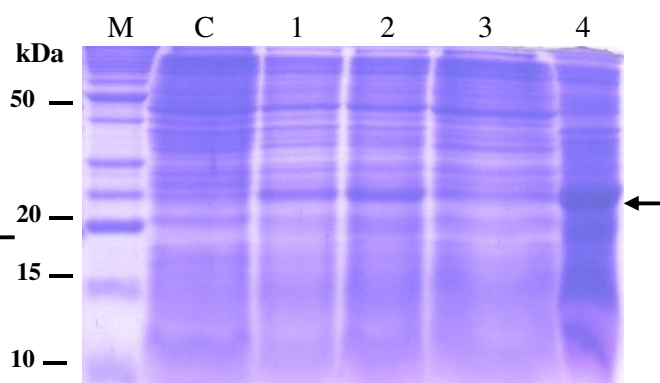


Figura 15: Análise em gel de poliacrilamida 15% da expressão da proteína His-C191 (23kDa). M: marcador de peso molecular (kDa) (Invitrogen), C: controle não induzido, 1-2: clones após 4 horas de indução com 0,4mM de IPTG, 3: fração solúvel da proteína, 4: fração insolúvel da proteína. A seta indica a proteína expressa na região de 23kDa.

4.6. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO CORE EXPRESSAS NO pET 28a

As frações protéicas solúveis, His-C136 e His-C191, obtidas após indução conforme item 3.8.10 de Material e Métodos, foram submetidas à purificação em coluna de afinidade ao níquel. Como descrito em Material e Métodos, item 3.9.1, após a eluição do extrato protéico, foi aplicado um gradiente de concentração do tampão de eluição contendo Imidazol (10 a 250mM). Observou-se que a proteína recombinante não se ligou à coluna e, portanto, não foi possível purificá-la, como evidenciam as Figuras 16 e 17. Resultado semelhante foi observado mesmo sob condições desnaturantes com o emprego de 6M a 8M de uréia (dados não demonstrados).

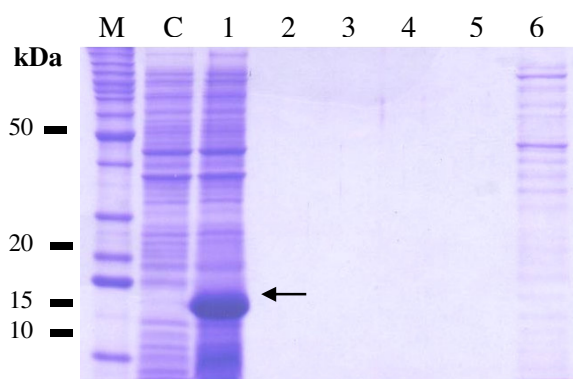


Figura 16: Análise da purificação da proteína His-C136 em gel de poliacrilamida 15%. M: marcador de peso molecular (kDa)(Invitrogen), C: controle - clone não induzido, 1: eluato, 2-6: concentrações crescentes de imidazol (25, 50, 75, 100 e 250mM), 7: lavagem da coluna. A seta indica a proteína expressa na região de 17kDa.

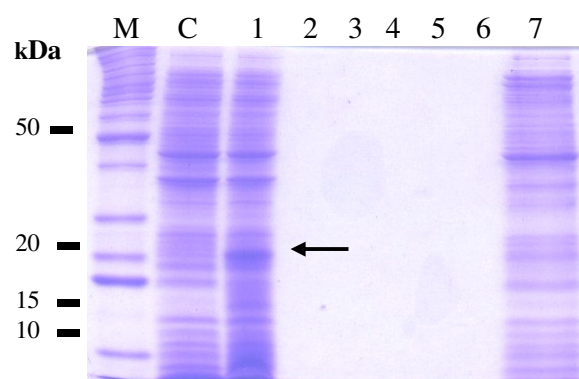


Figura 17: Análise da purificação da proteína His-C191 em gel de poliacrilamida 15%. M: marcador de peso molecular (kDa)(Invitrogen), C: controle - clone não induzido, 1: eluato, 2-6: concentrações crescentes de imidazol (25, 50, 75, 100 e 250mM), 7: lavagem da coluna. A seta indica a proteína expressa na região de 23kDa.

4.7. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS COMPLETA (191 aa) E PARCIAL (136aa) DO CORE VHC EM PLASMÍDEO pET42a

Em razão do insucesso na purificação da proteína de interesse fusionada à cauda de Histidina, uma nova tentativa com outro vetor de expressão realizada com o vetor pET-42a. Os produtos amplificados correspondente ao gene do core do VHC (região completa de 573pb e parcial de 408pb) foram clonados no vetor pET42a. A indução resultou na expressão da proteína do core VHC fusionada à GST (Glutathione S-Transferase); parcial de 136 aminoácidos e completa de 191, que serão designadas de GST-C136 e GST-C191, respectivamente, nesse trabalho para facilitar a sua citação. A expressão foi realizada em células *Escherichia coli* linhagem Rosetta (DE3) ou BL21 (DE3), como descrito em Material e Métodos, item 3.8.10. O conteúdo protéico dos clones induzido e não induzido foi analisado em SDS-PAGE 15%. A expressão do gene *core* (408 e 573pb) no vetor pET42a forneceu proteínas na região esperada de 44kDa (GST-C136) e 50kDa (GST-C191) respectivamente, conforme esperado e observado nas Figuras 18 e 19. Verificamos que a proteína completa do *core*, GST-C191, não foi expressa nas mesmas condições da GST-C136, ou seja, com 0,4mM de IPTG a 37°C durante 4 horas. O resultado observado na Figura 19, somente foi obtido pela modificação na temperatura, tempo e concentração de IPTG utilizada na indução. Nestas variações realizadas, foi encontrada uma expressão pequena da proteína de interesse, com níveis similares nas diferentes condições testadas. Como a expressão parcial de 136 aminoácidos (GST-C136) forneceu melhores resultados que a completa de 191 aminoácidos (GST-C191), a GST-C136 foi a proteína de escolha para a realização dos testes de reatividade e de purificação para os demais testes, objeto deste trabalho.

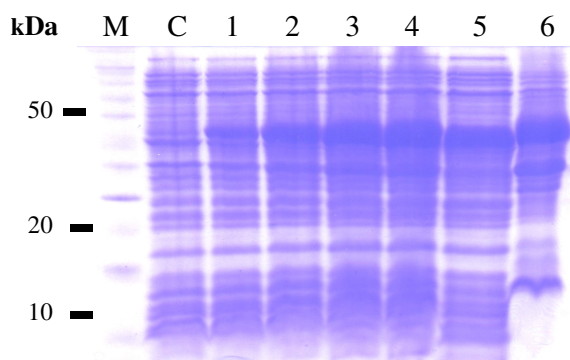


Figura 18: Análise em gel de poliacrilamida 15% da expressão da proteína GST-C136. M: marcador de peso molecular (kDa)(Sigma), C: controle - clone não induzido, 1-4: após 1, 2, 3 e 4 horas de indução com 0,4mM de IPTG a 37°C, 5: fração solúvel da proteína, 6: fração insolúvel da proteína. A seta indica a proteína expressa na região de 44kDa.

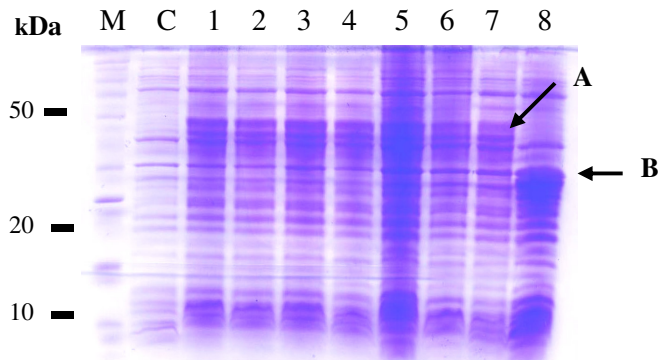


Figura 19: Análise em gel de poliacrilamida 15% da expressão da proteína GST-C191 (A) e da GST (B). M: marcador de peso molecular (kDa)(Sigma), C: controle - clone não induzido. Os clones foram induzidos nas seguintes condições: **1-2:** 6 horas com 0,8mM de IPTG a 37°C, **3-4:** 6 horas com 1,0mM de IPTG a 37°C, **5-6:** uma noite com 0,4mM de IPTG a 30°C, **7:** uma noite com 0,8mM de IPTG a 30°C, **8:** 6 horas com 0,4mM IPTG a 37°C. As setas indicam as proteínas expressas: (A) GST-C191 na região de 50kDa e (B) GST na região de 28kDa.

4.8. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GST-C136

A fração protéica solúvel foi aplicada em coluna de afinidade de GST, em sistema de purificação ÄKTA. Após a passagem do extrato protéico na coluna, foi aplicado um gradiente de concentração do tampão de eluição contendo glutatona reduzida. A proteína de fusão GST-C136 ligada à coluna foi eluída completamente com cerca de 14mL de tampão de eluição (50mM Tris contendo 10mM de glutatona reduzida). A Figura 20 mostra a análise das frações de proteínas eluídas.

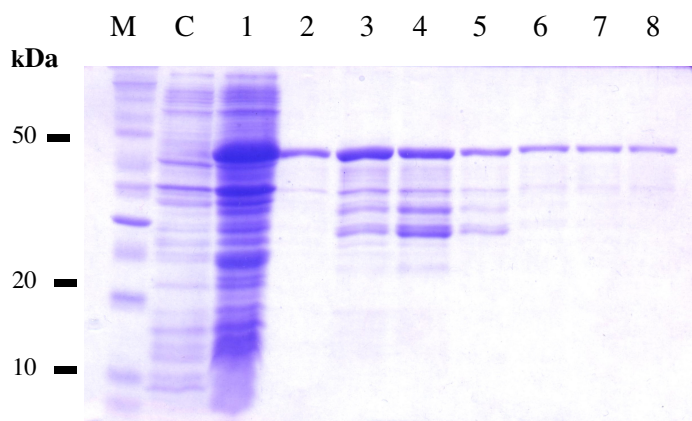


Figura 20: Análise em gel de poliacrilamida 15% da purificação da proteína GST-C136 (44kDa) em coluna de afinidade a glutatona. M: marcador de peso molecular (kDa)(Sigma), C: controle - clone não induzido, 1: clone após indução durante uma noite com 0,4mM de IPTG a 30°C, 2-8: eluição da proteína GST-C136.

4.9. IMUNODETECÇÃO

Para verificar se a proteína recombinante parcial e total da proteína do *core* fusionada a cauda de histidina ou à glutathione-S-transferase, His-C136 e GST-C136, respectivamente, reagem especificamente contra anticorpos anti-VHC, ensaio de imunodeteção foi conduzido, como descrito no item 3.10.1, de Material e Métodos.

A Figura 21A ilustra a análise em gel de poliacrilamida 15% da expressão das proteínas His-C136 após 1, 2, 3 e 4 horas de indução e a 21B mostra a reatividade específica destes clones induzidos na região esperada para soro positivo para anticorpos anti-VHC (genótipo 1b).

A Figura 22A exhibe a análise em gel de poliacrilamida 15% da expressão da proteína a GST-C136 após 1, 2, 3 e 4 horas de indução e a 22B mostra a reatividade específica destes clones induzidos na região esperada para soro positivo para anticorpos anti-VHC (genótipo 1b).

Este resultado demonstra que as proteínas recombinantes, His-C136 e GST-C136, reagem especificamente contra soros contendo anticorpos anti-VHC. A presença de algumas bandas secundárias pode estar relacionada a uma possível degradação da proteína, observada principalmente após 2 horas de indução, conforme demonstram as Figuras 21B e 22B.

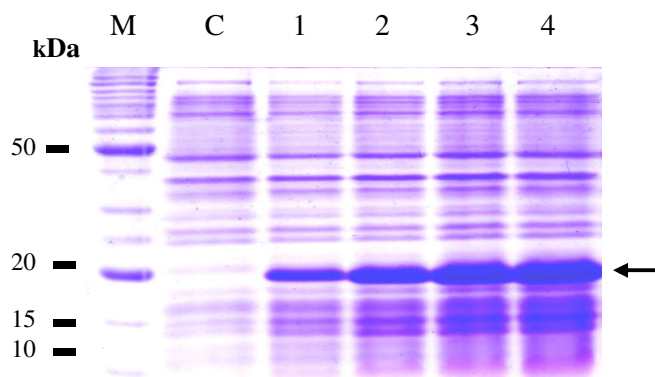


Figura 21A: Análise em gel de poliacrilamida 15% da expressão da proteína His-C136 (17kDa)(Invitrogen). M: marcador de peso molecular (kDa), C: controle - clone não induzido, 1-4: clone após 1, 2, 3 e 4 horas de indução com 0,4mM de IPTG a 37°C. A seta indica a proteína na região de 17kDa.

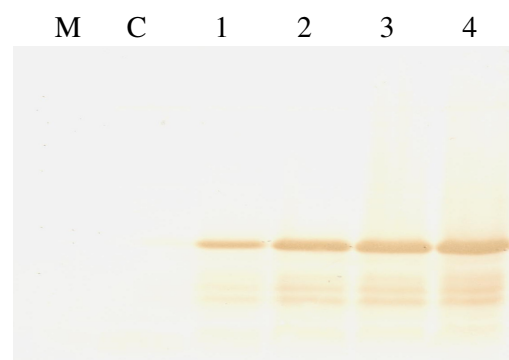


Figura 21B: Reação de imunodeteção da proteína recombinante His-C136. M: marcador de peso molecular (kDa)(Invitrogen), C: controle - clone não induzido, 1-4: extrato bacteriano: após 1, 2, 3 e 4 horas de indução com 0,4mM de IPTG a 37°C.

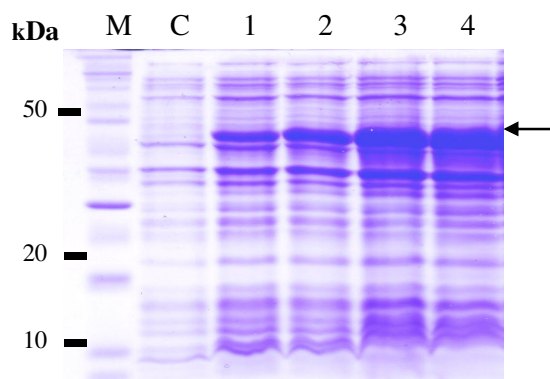


Figura 22A: Análise em gel de poliacrilamida 15% da expressão da proteína GST-C136. M: marcador de peso molecular (kDa)(Sigma), C: controle não induzido, 1-4: após 1, 2, 3 e 4 horas de indução com 0,4mM de IPTG a 37°C. A seta indica a proteína expressa na região de 44kDa.

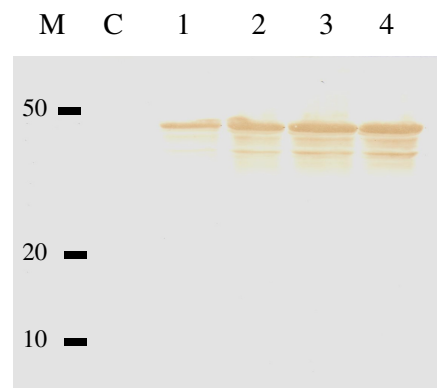


Figura 22B: Reação de imunodeteccção da proteína recombinante GST-C136. M: marcador de peso molecular (kDa)(Sigma), C: controle não induzido, 1-4: extrato bacteriano: após 1, 2, 3 e 4 horas de indução com 0,4mM de IPTG a 37°C.

Na tentativa de esclarecer se as bandas secundárias seriam provenientes de uma possível degradação ocorrida nas fases de lise celular por sonicação ou na etapa de purificação, a seguinte estratégia foi utilizada: após a indução da proteína GST-C136 foi adicionado um coquetel de inibidor de protease (Sigma, St. Louis, USA) contendo 4-(2-aminomethyl)benzene sulfonyl fluoride (AEBSF), pepstatin A, E64, bestatin e EDTA sódico, o qual apresenta ampla especificidade para inibição de serina, cisteína, aspártico e metalo proteases e aminopeptidasas. Este procedimento, no entanto, revelou que não houve diferenças na presença destas bandas secundárias na etapa de purificação. A Figura 23A demonstra que mesmo quando a expressão foi realizada em tempo reduzido, com uma hora de indução para, posteriormente, ser purificada pela cromatografia de afinidade a glutatona. O resultado verificado foi semelhante, com as bandas secundárias em menor quantidade, mas evidente, conforme observado na reação de imunodeteção na Figura 23B.

Para que a proteína pudesse ser armazenada e não sofresse degradação, influenciando os testes posteriores, realizamos a liofilização da amostra. Observamos que a liofilização da proteína e sua posterior reconstituição, após alguns meses de estocagem, manteve a reatividade da proteína, conforme observado na reação, posição 7 e 8 da Figura 23B.

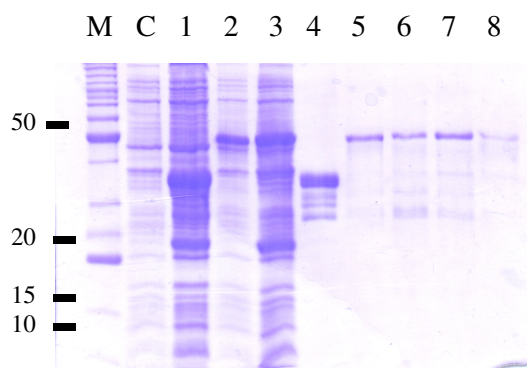


Figura 23A: Análise em gel de poliacrilamida 15% da expressão GST-C136. M: marcador de peso molecular (kDa)(Invitrogen), C: controle - clone não induzido, 1: indução GST, 2: GST-C136 com 1 hora de indução a 30°C, 3: GST-C136 indução durante uma noite a 30°C, 4: purificação GST, 5: purificação GST-C136 - indução 1 hora, 6: purificação GST-C136 indução durante uma noite, 7-8: fração GST-C136 com indução durante uma noite, purificada e reconstituída após liofilização.

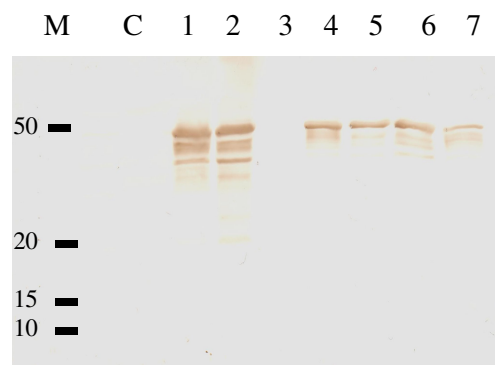


Figura 23B: Reação de imunodeteccção da proteína recombinante GST-C136. M: marcador de peso molecular (kDa)(Invitrogen), C: controle - clone não induzido, 1: indução GST, 2: GST-C136 com 1 hora de indução a 30°C, 3: GST-C136 indução durante uma noite a 30°C, 4: purificação GST, 5: purificação GST-C136 - indução 1 hora, 6: purificação GST-C136 indução durante uma noite, 7-8: fração GST-C136 com indução durante uma noite, purificada e reconstituída após liofilização.

A Figura 24A mostra a reatividade da proteína GST-C136 obtida a partir do extrato protéico do clone induzido com IPTG, contra anticorpo anti-*core* presente em soro positivo para o anti-VHC, cujas diluições foram 1:100, 1:200, 1:400 e 1:600. O melhor resultado foi encontrado na diluição de 1:600.

A Figura 24B demonstra a reação do extrato celular bacteriano induzido contra soros anti-VHC positivos de indivíduos infectados pelo VHC. Esta reatividade foi testada contra os soros de pacientes apresentando os principais genótipos e subtipos vírus presentes no Brasil (1a, 1b, 2b e 3). Utilizando os mesmos soros não foi observada nenhuma reatividade para a proteína recombinante expressando somente a GST, demonstrando que o soro anti-VHC positivo não reage cruzadamente a proteína GST (Figura 24B, tiras 8 e 9). Dessa forma, pode-se verificar que a reação encontrada é atribuída exclusivamente à reação contra a proteína do *core*.

Não se observou qualquer reatividade desse extrato bacteriano contendo a GST-C136 expressa contra soros contendo anticorpos do *core* do Vírus da Hepatite B (anti-HBc), do HIV (anti-HIV) e *pool* de soros negativos.



Figura 24A: Reatividade dos anticorpos anti-VHC nas concentrações: **1:** 1:100; **2:** 1:200; **3:** 1:400 e **4:** 1:600 dos anticorpos, contra proteínas obtidas a partir do extrato protéico de clone recombinante induzido com IPTG.

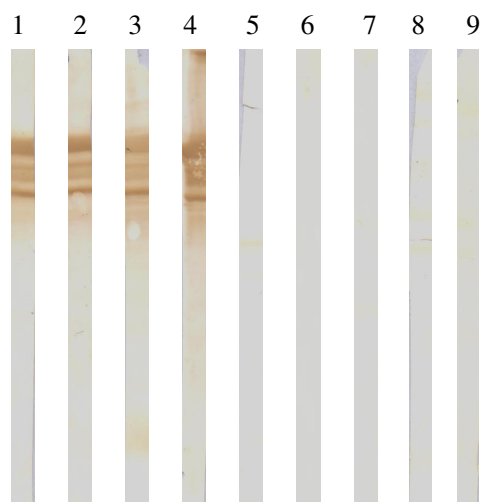


Figura 24B: Teste de especificidade da proteína recombinante; reação com: **GST-C136** - **1:** genótipo 1a; **2:** genótipo 1b; **3:** genótipo 2b; **4:** genótipo 3; **5:** soro HBV +; **6:** soro HIV+; **7:** soro negativo; **GST** - **8:** amostra HCV+ (genótipo 1b); **9:** amostra negativa

A Figura 25(A) demonstra que a proteína GST purificada não apresentou reatividade com soro positivo para o VHC, mesmo quando utilizado em altas concentrações, ou seja, de 38,40 μ g. Além disso, observamos que a proteína GST-C136 purificada apresentou elevada reatividade, mesmo em baixa concentração de 0,048 μ g contra soro positivo para o VHC, Figura 25(B).

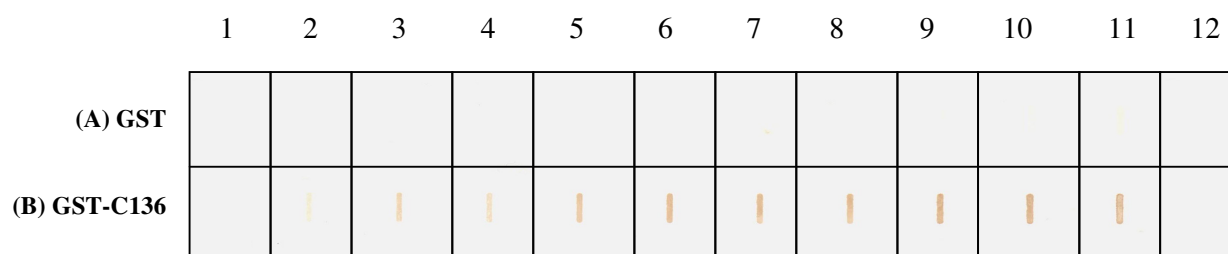


Figura 25: Slot Blot realizado com 0,048 μ g a 38,40 μ g da proteína recombinante: (A) GST e (B) GST-C136; utilizando-se concentrações de: **1:** 0,048 μ g, **2:** 0,096 μ g, **3:** 0,19 μ g, **4:** 0,38 μ g, **5:** 0,79 μ g, **6:** 1,58 μ g, **7:** 2,40 μ g, **8:** 4,80 μ g, **9:** 9,60 μ g, **10:** 19,20 μ g, **11:** 38,40 μ g, **12:** controle negativo: 100 μ L de TBS.

Conforme demonstram nossos resultados, a proteína de fusão purificada GST-C136 reagiu especificamente com soro de pacientes com anticorpos anti-VHC e não apresentou qualquer reatividade com soro de indivíduos não portadores de hepatite C e soros positivos para HIV e HBV (Figura 24B). Soros de pacientes com doenças inflamatórias ou infecciosas crônicas: ASO (anti estreptolisina O), PCR (proteína C reativa), Fator Reumatóide, Chagas, Sífilis, HTLV-I e II (vírus T-linfotrópicos humanos I e II) e auto anticorpos contra antígenos intracelulares (FAN) também foram testados e nenhuma reatividade cruzada foi encontrada (dados não mostrados). A proteína GST purificada não reage com soro de paciente infectado pelo VHC e nem com soro VHC negativo, demonstrando que a proteína de fusão GST não influencia as reações sorológicas (Figuras 24B e 25(A)).

4.10. DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-CORE PELO MÉTODO ELISA

A finalidade da execução do teste ELISA foi para comparação da reatividade apresentada em relação ao *immunoblot*. Deste modo, realizou-se o imunoensaio com soros positivos para o VHC de indivíduos infectados pelos genótipos 1a, 1b, 2b e 3 e soros de pacientes com doenças inflamatórias ou infecciosas crônicas: ASO (anti estreptolisina O), PCR (proteína C reativa), Fator Reumatóide, Chagas, Sífilis, HTLV-I e II (vírus T-linfotrópicos humanos I e II) e auto anticorpos contra antígenos intracelulares (FAN).

Os resultados positivos foram determinados quando a absorbância da amostra apresentou acima valor de corte (*cut off*). O *cut off* foi obtido pela média aritmética das densidades ópticas de amostras negativas (n=20), acrescida de 2 desvios padrão, sendo igual a 0,219.

Observamos que os soros de portadores da infecção pelo HTLV-I/II apresentaram reatividade cruzada com a proteína recombinante GST-C136. Os soros de pacientes infectados pelo VHC apresentaram positividade, como demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6: Valores de absorvância empregando a proteína GST-C136 realizada em soros positivos para o VHC e para as principais doenças inflamatórias ou infecciosas crônicas

Amostras Sorológicas	Absorvância a 450nm
genótipo 1a	1,175
genótipo 1b	0,832
genótipo 2b	0,660
genótipo 3	0,440
ASO	0,139
PCR	0,213
Fator Reumatóide	0,065
Chagas	0,095
Sífilis	0,168
FAN	0,138
HTLV-I e II	0,302

Valor de corte (*cut off*) = 0,219

4.11. PRODUÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL ANTI-GST-C136 EM CAMUNDONGOS

Após as etapas de investigação da reatividade da proteína recombinante GST-C136, optamos por produzir anticorpos contra esta proteína em camundongos. Para isso, seis camundongos machos foram imunizados por injeção subcutânea, utilizando adjuvante completo de Freund para ativar a resposta imune, conforme descrito em Material e Métodos, item 3.12. Antes de se proceder à coleta total do sangue de cada animal, estes foram analisados quanto à resposta imune, conforme observado na Figura 26. No 10º dia após a segunda imunização, obtivemos resultados mais satisfatórios. Nesse intervalo, dois camundongos morreram antes de completar a fase de imunização.

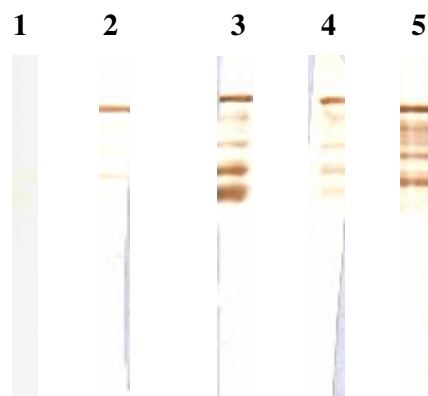


Figura 26: Reatividade dos anticorpos anti-GST-C136 produzidos em camundongo. Diluição do soro: 1:100. **1:** controle - camundongo não imune; **2-4:** camundongos imunizados com 50 μ g de proteína purificada conforme descrito em Material e Métodos, item 3.9.2; **5:** camundongo imunizado com 50 μ g de proteína obtida a partir do gel conforme descrito em Material e Métodos, item 3.12.

4.12. PRODUÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL ANTI-GST-C136 EM COELHO

Como a quantidade de soro proveniente de cada camundongo é muito pequena e seria necessário uma quantidade maior para o desenvolvimento dos testes posteriores, e ainda alguns camundongos adoeceram e morreram antes do término do protocolo de imunização em virtude da proteína inoculada, optamos pela imunização de coelhas. Para isso, duas coelhas adultas jovens de linhagem albina foram imunizadas com 50 μ g da proteína GST-C136 purificada conforme descrito em Material e Métodos, item 3.9.2. No 46 $^{\circ}$ dia, foi retirada uma pequena alíquota de sangue para testar a resposta imune para a proteína de interesse. Os resultados da imunização no 46 $^{\circ}$ dia foram resultados satisfatórios conforme verificado na Figura 27.

O soro pré-imune das duas coelhas foi testado antes de se realizar o protocolo de imunização e não se observou qualquer reatividade, demonstrando que a reatividade encontrada, após protocolo de imunização, foi direcionada à proteína de interesse.

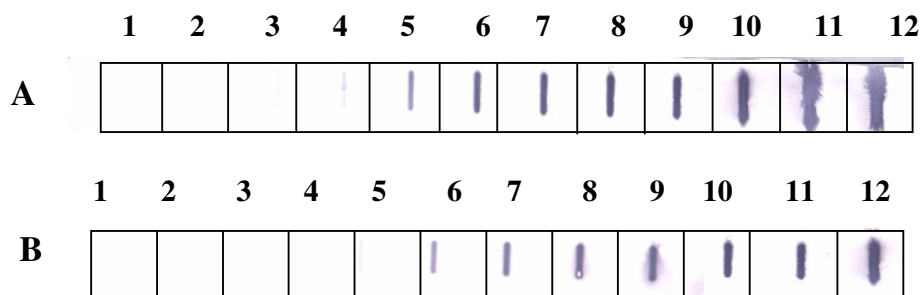
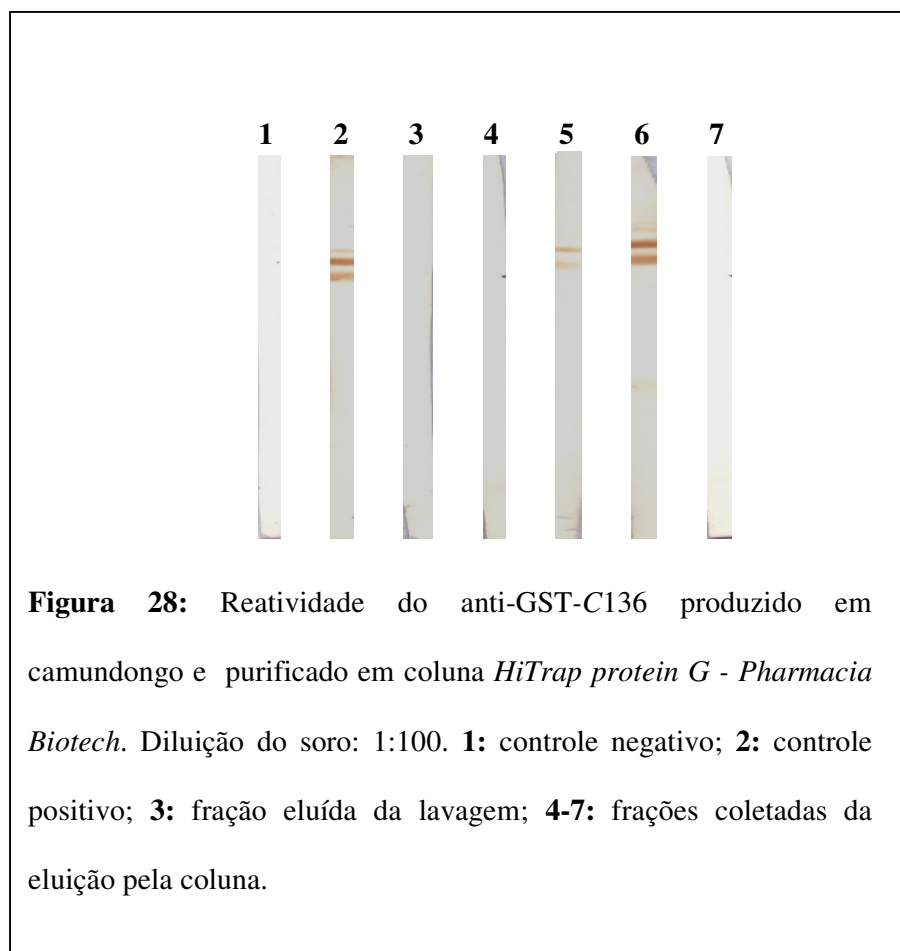


Figura 27: Reatividade dos anticorpos anti-GST-C136 produzidos em coelho. *Slot Blot* realizado com 0,048 μ g a 38,40 μ g da proteína recombinante GST-C136: as concentrações utilizadas em cada *slot* - **1:** controle negativo: 100 μ L de TBS, **2:** 0,048 μ g, **3:** 0,096 μ g, **4:** 0,19 μ g, **5:** 0,38 μ g, **6:** 0,79 μ g, **7:** 1,58 μ g, **8:** 2,40 μ g, **9:** 4,80 μ g, **10:** 9,60 μ g, **11:** 19,20 μ g, **12:** 38,40 μ g. **(A)** Soro de coelha 1 diluído 1:100 e **(B)** soro de coelha 2 diluído 1:100.

4.13. PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS

4.13.1. ANTICORPOS PRODUZIDOS EM CAMUNDONGOS

Verificada a imunização dos camundongos, as amostras reativas foram reunidas, filtradas e purificadas em coluna *HiTrap protein G* (Pharmacia Biotech). Após purificação, as frações foram testadas para verificar reatividade. Observamos que os anticorpos IgG anti-GST-C136 VHC foram eluídos nas frações 5 e 6, Figura 28. Para eluir a IgG foi necessário aplicar um pH baixo (tampão glicina-HCl 0,1M pH2,7) e coletando-se em tubos contendo 60 a 100 μ L de Tris-HCl pH 9,0 por mL de fração a ser recolhida para que não houvesse perda da reatividade do anticorpo. Dessa forma, as frações reativas, 5 e 6, foram reunidas e concentradas para, posteriormente, serem utilizadas no teste imunocromatográfico.



4.13.2. ANTICORPOS PRODUZIDOS EM COELHOS

A fração de anti-soro, contendo IgG anti-GST-C136 produzido em coelha, foi purificado por cromatografia em DEAE (dietilaminoetil) celulose (Whatman, Inglaterra). A eluição da IgG foi realizada pelo monitoramento a 280nm das frações coletadas. As frações do primeiro pico, coletadas nos tubos 29 a 97, correspondem à IgG e foram reunidas e concentradas em sistema Amicon (Millipore) e demais proteínas foram eluídas com solução NaCl 1M, como demonstra a Figura 29. Depois de concentrada, a amostra foi quantificada e submetida à reação de *immunoblot* para testar a reatividade da IgG purificada, Figura 30.

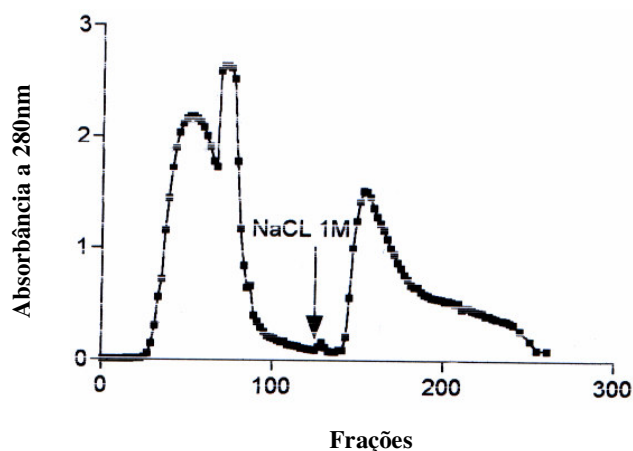


Figura 29: Purificação do anticorpo anti-GST-C136 produzido em coelho utilizando cromatografia DEAE (dietilaminoetil) celulose (Whatman, Inglaterra). A eluição da IgG foi realizada pelo monitoramento a 280nm e as frações correspondentes à IgG, foram recuperadas no primeiro pico: tubos 29-97. As demais proteínas foram eluídas com solução NaCl 1M.

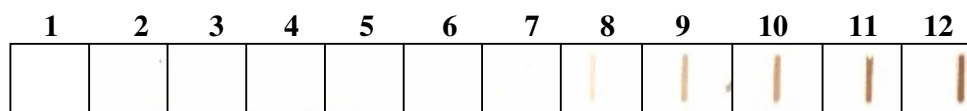


Figura 30: Reatividade dos anticorpos anti-GST-C136 produzidos em coelho e purificados em coluna DEAE-celulose. *Slot Blot* realizado com 0,048 μ g a 38,40 μ g da proteína recombinante para testar a purificação : Soro de coelha purificada em coluna DEAE-celulose. Diluição utilizada: 1:500. As concentrações da proteína: **1:** controle negativo: 100 μ L de TBS, **2:** 0,048 μ g, **3:** 0,096 μ g, **4:** 0,19 μ g, **5:** 0,38 μ g, **6:** 0,79 μ g, **7:** 1,58 μ g, **8:** 2,40 μ g, **9:** 4,80 μ g, **10:** 9,60 μ g, **11:** 19,20 μ g, **12:** 38,40 μ g.

4.14. CONDIÇÕES DE pH E CONCENTRAÇÃO DO ANTICORPO ANTI-GST-C136 VHC PRODUZIDO EM CAMUNDONGO

O desenvolvimento de um ensaio de imunocromatográfico é complexo em virtude de inúmeros componentes críticos agrupados, que são utilizados para se produzir um teste funcional. As imunoglobulinas são diretamente adsorvidas na superfície das partículas do colóide de ouro, mediada por forças *London-van der Waals*. Para otimizar as condições ideais, o anticorpo policlonal anti-GST-C136 foi conjugado às partículas de ouro coloidal sob condições variáveis de pH e concentração de anticorpo, a fim de ser testada a condição de agregação ou conjugação. Essa ocorrência pode ser monitorada pela mudança de cor ocorrida na solução.

As variações testadas para o pH e para a concentração do anticorpo anti-GST-C136 para conjugação com a solução de ouro coloidal, produzido em camundongo, foram monitoradas pela absorbância a 540nm e 620nm (Figura 31(A)).

O valor máximo de conjugação foi obtido em pH 7, e pequeno aumento do grau de agregação foi observado à medida que as condições tornavam-se mais alcalinas.

A estabilidade das partículas de ouro coloidal foi observada a partir da adição de 100µg da proteína recombinante GST-C136 (Figura 31(B)).

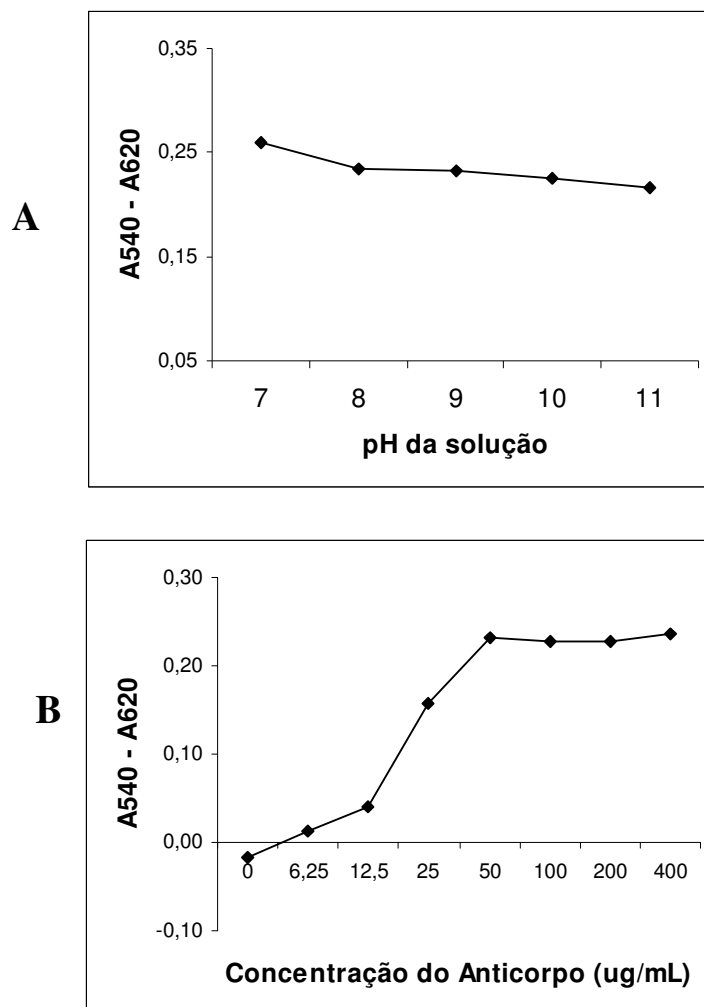


Figura 31: Determinação das condições ótimas para conjugação do anticorpo anti-GST-C136 produzido em camundongo com a solução de ouro coloidal. O pH da solução aquosa para a reação foi variado, sendo monitorado através da diferença de sinal na absorvância da reação a 540nm e 620nm. Sob condição de pH ideal, a concentração do anticorpo foi avaliada para obtenção do melhor rendimento da conjugação. **(A):** diferença da absorvância a 540nm e 620nm, variando-se o pH da solução (7,0 a 11,0). **(B):** diferença da absorvância a 540nm e 620nm, variando-se a concentração do anticorpo (0 a 400 μ g/mL).

4.15. CONDIÇÕES DE pH E CONCENTRAÇÃO DO ANTICORPO ANTI-GST-C136 PRODUZIDO EM COELHO

Analogamente ao realizado para a determinação das condições ideais de conjugação do anticorpo anti- GST-C136 produzido em camundongo, realizamos o estudo referente às variações testadas para o pH e para a concentração do anticorpo anti-*core* produzido em coelho para conjugação com a solução de ouro coloidal. A condição de agregação ou conjugação das partículas de ouro coloidal, ocorrida em função dessas modificações testadas, foi monitorada pela diferença de sinal na absorbância da reação a 540nm e 620nm, resultante da mudança de cor ocorrida na solução.

O valor máximo de conjugação foi obtido entre pH 7,0 e 8,0 e pequeno aumento do grau de agregação foi observado à medida que as condições tornavam-se mais alcalinas, conforme observado na Figura 32(A).

A estabilidade das partículas de ouro coloidal foi observada a partir da adição de 200µg da proteína recombinante GST-C136 (Figura 32(B)).

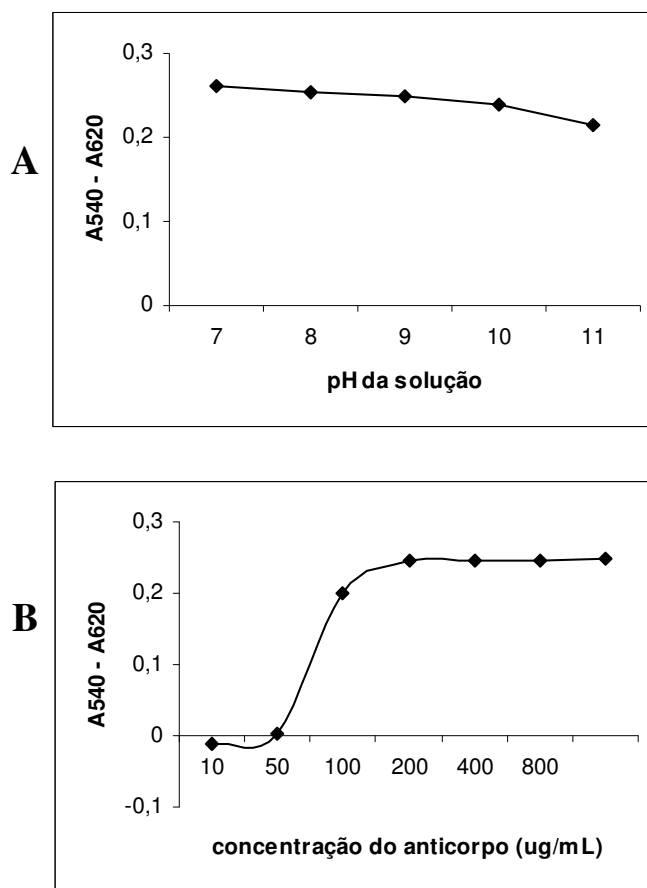


Figura 32: Determinação das condições ótimas para conjugação do anticorpo anti-GST-C136 produzido em coelho com a solução de ouro coloidal. O pH da solução aquosa para a reação foi variado, sendo monitorado através da diferença de sinal na absorbância da reação a 540nm e 620nm. Sob condição de pH ideal, a concentração do anticorpo foi avaliada para obtenção do melhor rendimento da conjugação. **(A):** diferença da absorbância a 540nm e 620nm, variando-se o pH da solução (7,0 a 11,0). **(B):** diferença da absorbância a 540nm e 620nm, variando-se a concentração do anticorpo (10 a 800µg/mL).

4.16. TESTE COM A MEMBRANA DE NITROCELULOSE

Em nosso trabalho analisamos as membranas de fluxo 135, 180 e 240, onde a absorção é de 135, 180 e 240 segundos a cada 4 centímetros de membrana (HF135, HF180 e HF240 - Millipore), para determinar qual destas apresentaria melhor reatividade: tiras 1, 2 e 3, respectivamente (Figura 33).

Após a montagem e sobreposição das membranas, conforme apresentado na Figura 7 de Material e Métodos, item 3.17.4, o ensaio imunocromatográfico foi desenvolvido para determinação semi-quantitativa do antígeno do *core* do VHC pela adição de 8µg de proteína recombinante em 150µL de PBS. O antígeno do *core* do VHC, quando presente na amostra, liga-se ao conjugado de ouro coloidal-anticorpo anti-*core* VHC que flui para membrana da fita, indo se acoplar aos anticorpos anti-*core* VHC imobilizados na área teste (**T**), determinando o surgimento de uma banda púrpura. Na ausência do antígeno não houve o aparecimento de sinal na área teste (**T**) e a mistura da reação flui pela membrana atingindo a área controle (**C**). O conjugado não ligado ao antígeno ligou-se aos reagentes na área **C** produzindo uma banda púrpura, demonstrando que os reagentes estão funcionando corretamente. Observamos que o melhor resultado foi obtido em 1 e 2, HF135 e HF180, respectivamente, por apresentarem boa reatividade tanto com o anticorpo de captura quanto com o anticorpo de detecção. No teste 3, pelo fluxo ser mais lento (240 segundos por 4 cm de membrana), observamos uma intensa reação com o anticorpo de detecção e fraca com o de captura (área controle).

O tempo médio para a reação do teste imunocromatográfico, do momento do contato da fita com a amostra até a absorção do excesso pela membrana de celulose, foi de 4, 5 e 6 minutos para a HF135, HF180 e HF240, respectivamente.

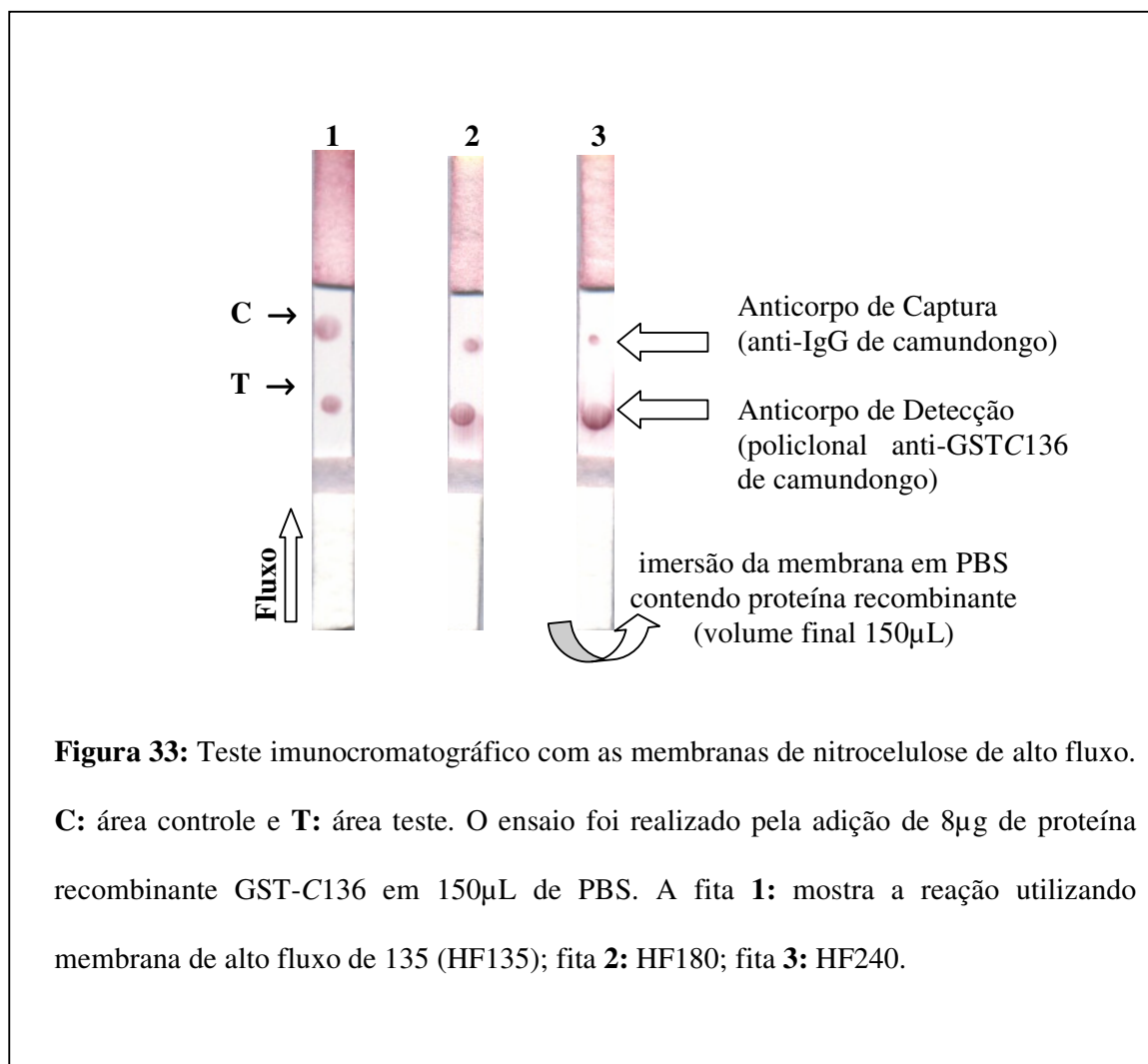


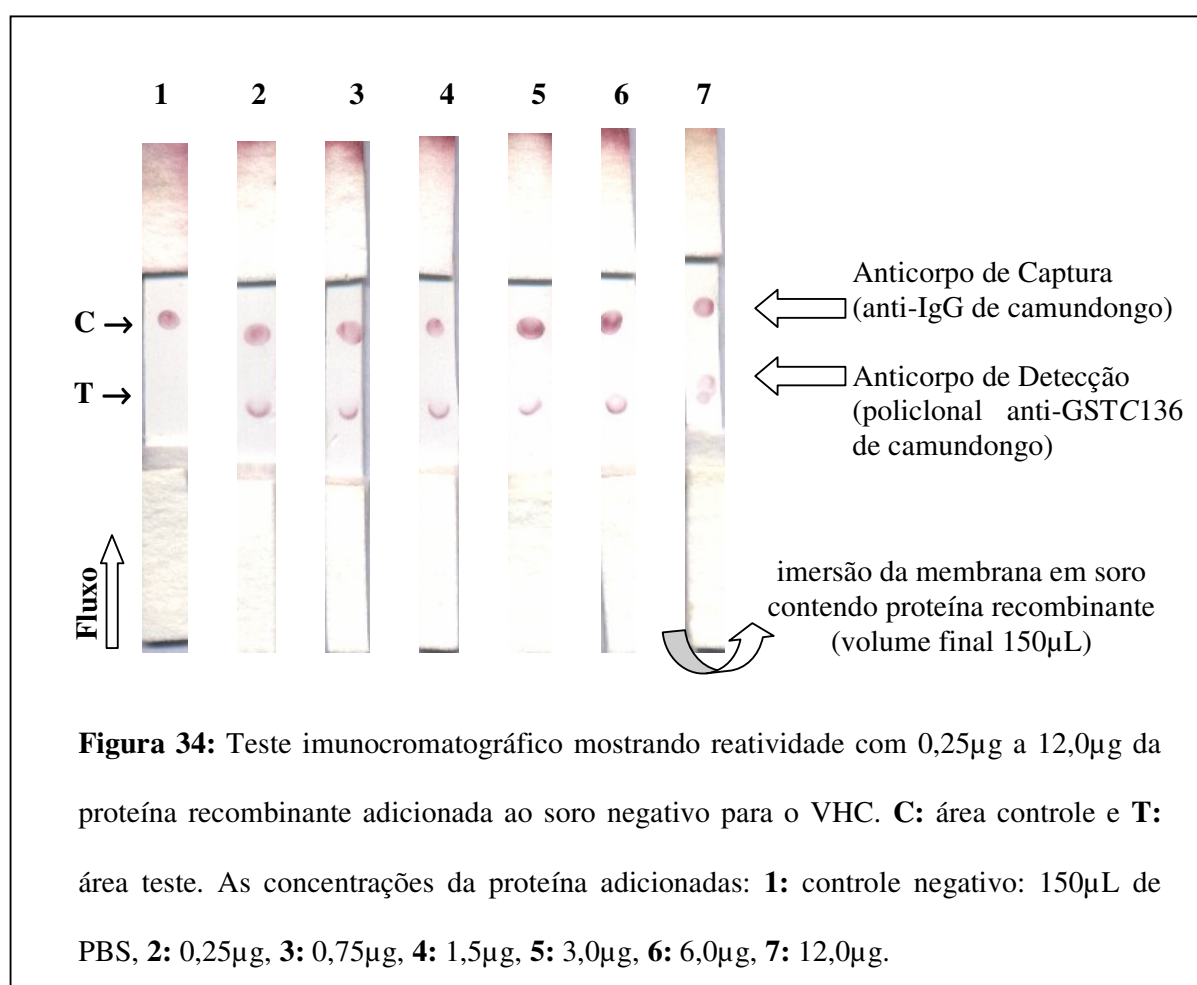
Figura 33: Teste imunocromatográfico com as membranas de nitrocelulose de alto fluxo.

C: área controle e **T:** área teste. O ensaio foi realizado pela adição de 8µg de proteína recombinante GST-C136 em 150µL de PBS. A fita **1:** mostra a reação utilizando membrana de alto fluxo de 135 (HF135); fita **2:** HF180; fita **3:** HF240.

4.17. TESTE IMUNOCROMATOGRAFICO COM PROTEÍNA ADICIONADA: ANTICORPO DE DETECÇÃO ANTI-GSTC136 DE CAMUNDONGO

O teste de reatividade foi realizado utilizando soro negativo para o VHC e adicionando-se a proteína recombinante GST-C136. As concentrações de proteína GST-C136 adicionadas variaram de 0,20 a 800 μ g.

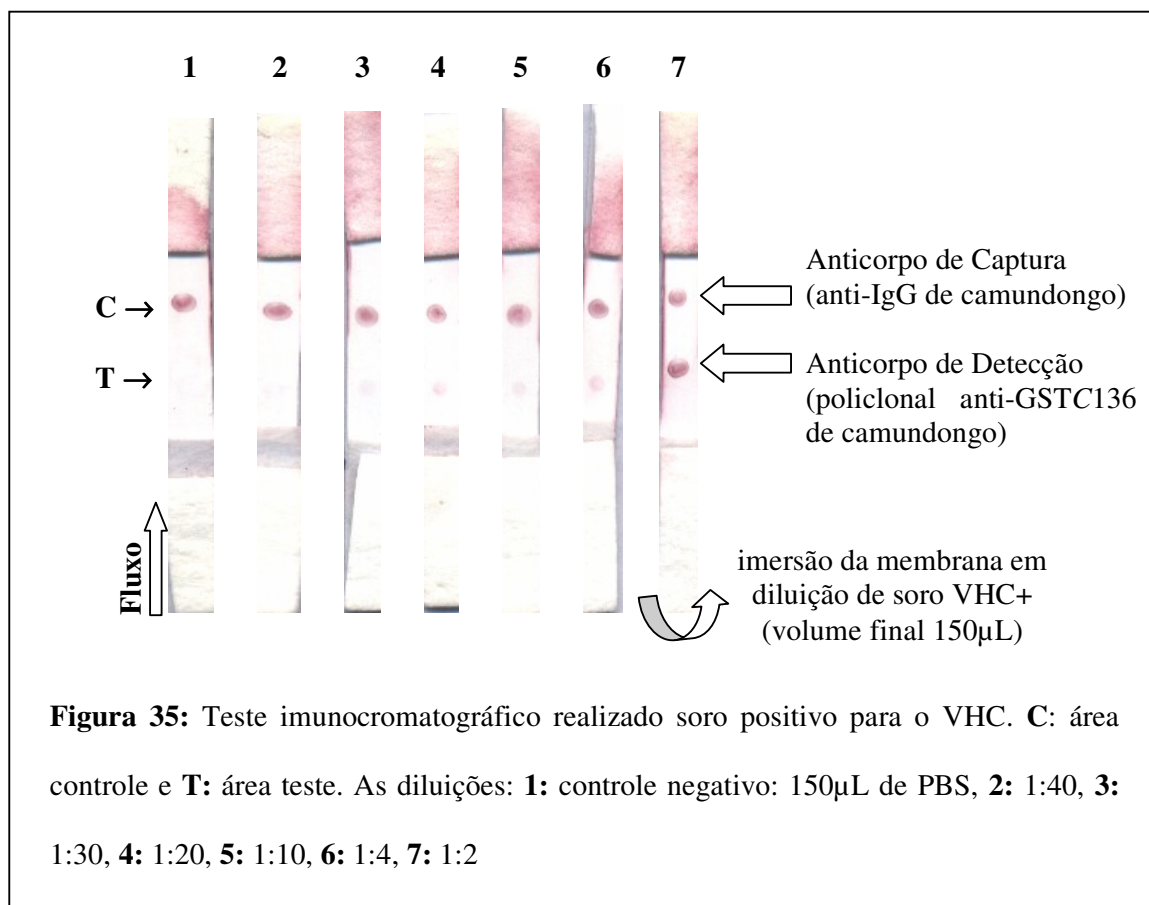
Observou-se resultado positivo somente com adição de proteína recombinante em concentrações variando da 0,25 μ g a 12,0 μ g (Figura 34). Nenhuma reatividade foi observada em concentrações inferiores e superiores a este intervalo (dados não demonstrados).



4.18. TESTE IMUNOCROMATOGRAFICO COM SORO POSITIVO PARA VHC: ANTICORPO DE DETECÇÃO ANTI-GSTC136 DE CAMUNDONGO

O procedimento foi utilizado para determinar a concentração do antígeno detectável na amostra VHC positiva, utilizando as seguintes diluições em PBS: 1:40, 1:30; 1:20, 1:10, 1:4 e 1:2. Conforme observado, a positividade estava presente, fracamente, na diluição 1:30 do soro e com maior intensidade em 1:20, 1:10, 1:4 e 1:2 (Figura 35). Amostra positiva quando utilizada sem diluição não apresentou reatividade (dado não demonstrado).

Amostras positivas para o anticorpo do vírus da imunodeficiência humana (anti-HIV), positivas para a região do *core* do vírus da Hepatite B (anti-HBc) e *pool* de soros negativos foram utilizadas para testar a especificidade do método, mas não apresentaram reatividade mesmo em diversas diluições testadas (dados não demonstrados).

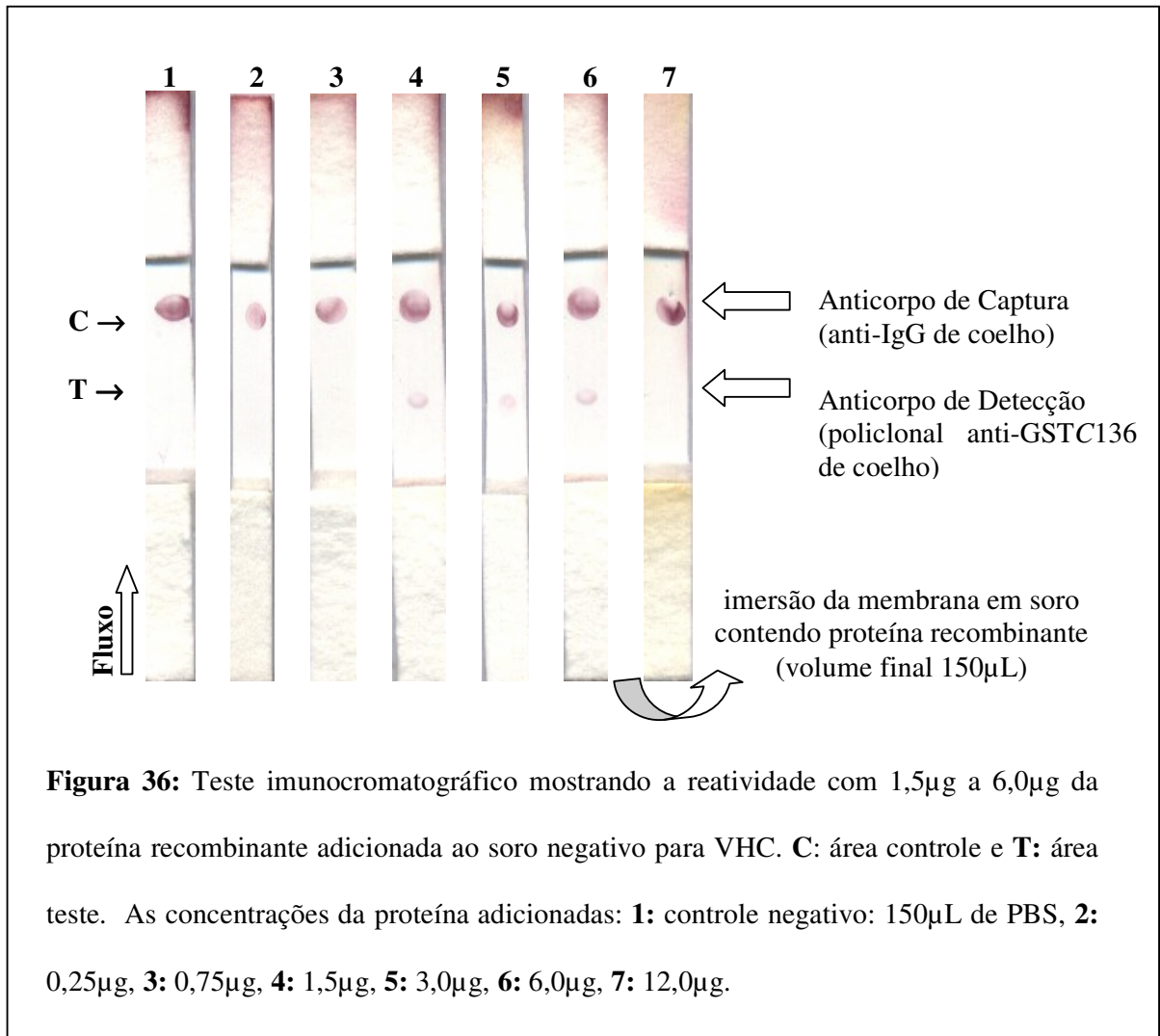


4.19. TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO COM PROTEÍNA ADICIONADA: ANTICORPO DE DETECÇÃO ANTI-GSTC136 DE COELHO

Todo procedimento que foi empregado no teste imunocromatográfico utilizando anticorpo anti-GST-C136 produzido em camundongo foi estendido para o produzido em coelho a fim de comparação da eficiência.

Deste modo, o teste de reatividade foi realizado adicionando-se a proteína recombinante GST-C136 ao soro negativo para o VHC, cujas concentrações acrescentadas variaram de 0,20 a 800 μ g.

Observou-se resultado positivo somente com adição da proteína recombinante GST-C136 em concentrações que variaram de 1,5 μ g a 6,0 μ g. Não foram observadas reatividades em concentrações inferiores e superiores a esta. Além disso, notamos que a intensidade do sinal gerado foi menor quando comparada à obtida com anticorpo produzido em camundongo, conforme observamos na Figura 36.



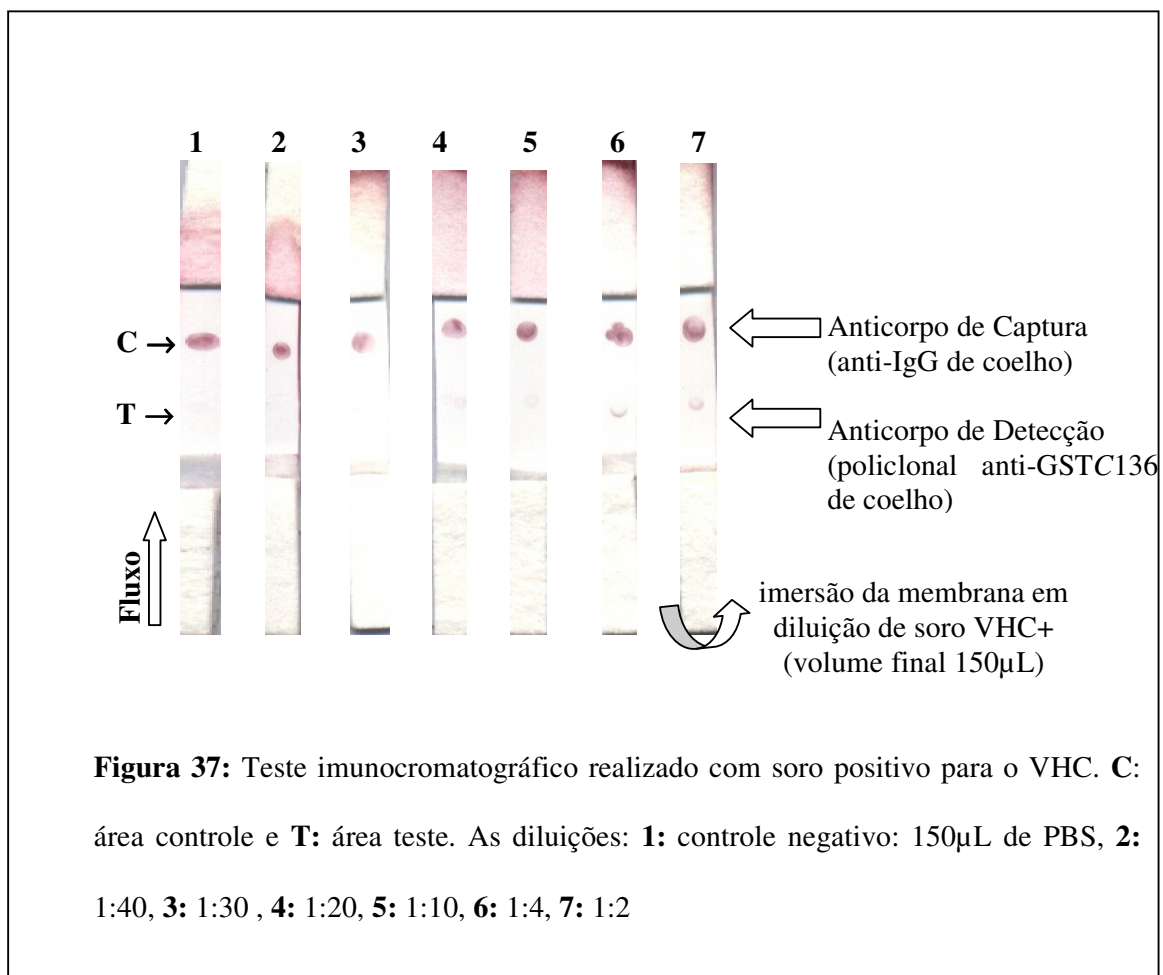
4.20. TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO COM SORO POSITIVO PARA VHC: ANTICORPO DE DETECÇÃO ANTI-GSTC136 DE COELHO

O procedimento foi empregado para determinar a concentração do antígeno detectável em soro positivo para o VHC, utilizando as seguintes diluições em PBS: 1:40, 1:30; 1:20, 1:10, 1:4 e 1:2.

Neste teste, observou-se resultado positivo visível somente nas diluições 1:4 e 1:2 e fracamente na 1:10, conforme Figura 37.

Amostras positivas para o anticorpo do vírus da imunodeficiência humana (anti-HIV), positivas para a região do *core* do vírus da Hepatite B (anti-HBc) e *pool* de soros negativos foram utilizadas para testar a especificidade do método, mas não apresentaram reatividade mesmo em diversas diluições testadas (dados não demonstrados).

Ao se utilizar o anticorpo de coelho para o teste imunocromatográfico, tanto no teste com proteína recombinante adicionada ao soro negativo para o VHC quanto pela utilização de soro positivo para o VHC, o teste apresentou menor reatividade que o produzido em camundongo.



5 - Discussão

Na população mundial, estudos revelam uma distribuição geográfica diferenciada quanto aos subtipos do VHC, predominando os subtipos 1a e 1b nos Estados Unidos, Japão, Europa e América Latina, enquanto os subtipos 2a e 2b têm uma distribuição universal. Os subtipos 3a e 5 são observados com maior predomínio em países da América do Sul, e em menor grau na Europa e Estados Unidos. O subtipo 4 é endêmico no Egito, Gabão e em países do Oriente Médio, e o subtipo 6 predomina em doadores de sangue nativos de Hong Kong (McOMISH et al., 1994). Numerosos estudos sugerem que a elevada heterogeneidade do VHC tenha implicação patogênica e terapêutica (FARCI et al., 1991; KANAI et al., 1992; PRESCOTT et al., 1996; SIMMONDS et al., 1996; MONDELLI e SILINI, 1999). No Brasil, em recente estudo realizado em 1688 indivíduos infectados pelo VHC foi verificada a seguinte frequência: 64,9% para o genótipo 1, 4,6% para genótipo 2, 30,2% para genótipo 3, 0,2% para genótipo 4 e 0,1% para genótipo 5, encontrando-se diferenças regionais para esta distribuição (CAMPIOTTO et al., 2005). No Estado de São Paulo, o genótipo 1 foi o mais comum, com 62,5%, seguido pelo 3, com 32,3%, pelo 2, com 4,6% e pelos 4 e 5 com 0,4 e 0,2%, respectivamente (CAMPIOTTO et al., 2005). Desse modo, a escolha da região para síntese dos oligonucleotídeos para amplificação e clonagem da porção codificadora do *core* do VHC foi realizada a partir do estudo da sequência registrada no *Blastn GenBank* – NCBI - AF 333324, genótipo 1 - subtipo 1b; escolha baseada na maior frequência encontrada na região no momento do início deste trabalho. Entretanto, esse fato não interferiu com nosso objetivo e forneceu resultados satisfatórios em relação à detecção de todas as amostras VHC-positivas, independente do genótipo presente.

O sucesso na amplificação da região do *core* foi somente obtido utilizando o QIAamp RNA Mini Kit Hand, Qiagen para extração do RNA. Isso pode ser explicado pela diferença de sensibilidade para a amplificação das regiões do vírus já descrita na literatura: a região 5' UTR *nested-PCR* apresenta maior sensibilidade que o *core* ou NS5 *nested-PCR*

para os genótipos 1 a 3 (ANDONOV e CHAUDHARY, 1995). Conseqüentemente, resultados satisfatórios foram somente alcançados quando utilizamos duas reações consecutivas de PCR para, posteriormente, realizarmos a adição do sítio de restrição no produto de PCR e a clonagem em vetor de expressão.

A expressão de proteínas heterólogas, geralmente, é realizada utilizando-se cepas de *Escherichia coli* como célula hospedeira. Este emprego é amplamente difundido por causa da facilidade e baixo custo de se cultivar *E. coli*, e pela reprodutibilidade e abundância de proteína que se produz. O procedimento de clonagem de um fragmento de DNA para expressão deve respeitar o sinal de tradução de genes procarióticos (sinal de Shine-Dalgarno) para obter a proteína correta. O DNA deve ser clonado de maneira que sua fase de leitura (*ORF*) fique em orientação com o códon de iniciação ATG. Além disso, um vetor para expressão em *E. coli* deve apresentar as seguintes características: origem de replicação, marcador para seleção, um promotor forte e regulável para transcrição, sinal de terminação da transcrição, seqüências para controle da tradução e um ATG iniciador. Um sinal de terminação da tradução (códon de terminação) também deve estar presente no vetor ou ser adicionado no inserto. Uma vez construído, o vetor de expressão contendo a seqüência codificadora da proteína de interesse é utilizado para a transformação bacteriana.

O primeiro sistema utilizado foi o vetor pET28a, realizando-se a clonagem dos produtos amplificados de 408 e 573pb do gene do *core* do VHC. Estes, quando induzidos à expressão pela adição de IPTG, resultaram na síntese de proteínas do *core* do VHC fusionadas a uma seqüência de 6 Histidinas, His-C136 e His-C191, respectivamente. Esse procedimento utilizado para expressar a região do *core* na sua forma parcial foi executado para eliminar o domínio hidrofóbico da porção carboxi-terminal e promover aumento da expressão e conseqüente acréscimo de sua solubilidade, conforme foi observado quando comparamos as Figuras 14 e 15 em Resultados, item 4.5. A forma completa do *core* (His-

C191) apresenta-se menos solúvel em comparação à proteína parcial (His-C136), cuja explicação fundamenta-se na natureza hidrofóbica da região completa do *core*, que poderia ocasionar problemas de solubilização (SEONG et al., 1996). Para estabelecer se a proteína de fusão His-C136 expressa, conservava-se imunoreativa conforme descrita para a proteína recombinante do *core* em diversos trabalhos, foi realizado teste de reatividade com soro de paciente infectado pelo VHC. A análise demonstrou que o anticorpo anti-*core* presente no soro do indivíduo infectado pelo VHC reage com a proteína de fusão His-C136, observando-se algumas bandas secundárias, as quais poderiam ser decorrente de uma possível degradação do produto expresso. A proteína recombinante foi reativa contra as amostras anti-VHC positivas, subtipos 1a, 1b, 2b e 3. Isso pode ser explicado pela proteína do *core* exibir seqüências de aminoácidos altamente conservadas entre os diferentes isolados do VHC (KATO et al., 1990; OKAMOTO et al., 1990; CHOO et al., 1991). Na etapa de purificação, embora ambas as proteínas estivessem presente tanto na fração solúvel quanto na insolúvel, não foi possível purificá-las por cromatografia de afinidade ao níquel (Figuras 16 e 17, item 4.6 de Resultados). Este fato poderia ser devido a uma provável degradação da proteína expressa e/ou a possível mudança no códon iniciador da tradução para posição posterior à cauda de Histidina, o que acarretaria a ausência de expressão da proteína de fusão. Geralmente, o códon iniciador utilizado é o ATG; no entanto, em algumas ocasiões, o GTG, o TTG e o ATT podem ser utilizados (DAS, 1990). O códon GTG foi observado na posição após a seqüência codificadora dos 6 aminoácidos de Histidina, conforme esquematizado na Figura 39 (Anexos). Adicionalmente, quando tentamos purificar sob condições desnaturantes para eliminar provável interferência da estrutura da proteína, constatamos que não foi possível obter a proteína na sua forma pura. Embora esta mudança de códon seja uma hipótese difícil de ocorrer, isso reforça a hipótese de que a cauda de histidina poderia estar ausente. Ainda que não houvesse condição para a purificação da proteína recombinante His-C136, a

expressão apresentou-se satisfatória e em grande quantidade e altamente imunogênica. Este resultado revelou-se como um aspecto positivo, pois a expressão dessa região de 136 aminoácidos do *core* VHC ainda não se encontra descrita na literatura.

Diversos outros estudos têm buscado a expressão dessa importante proteína do VHC, em diferentes vetores de expressão, e diversos tamanhos. Embora a proteína do *core* tenha sido expressa em células de inseto (HSU et al., 1993) e em células de mamíferos (SELBY et al., 1993; RAVAGGI et al., 1994); o sistema bacteriano é o mais empregado para expressão dessa proteína tanto na sua forma completa quanto na truncada. A expressão do *core* do VHC fusionada a 6 resíduos de Histina tem sido obtida em diversos trabalhos (HANDSCHUH e CASELMANN et al., 1995; SEKI et al., 1995; JOLIVET-REYNAUD et al., 1998) e obtido sucesso na purificação por cromatografia de afinidade. A proteína do *core* (aminoácidos 1-162) fusionada à maltose (MBP) também foi expressa com sucesso (KHANNA e RAY, 1995). A proteína de fusão GST também foi utilizada para expressão da proteína do *core*, obtendo-se bons resultados de expressão e purificação (SEONG et al, 1996; JOLIVET-REYNAUD et al., 1998). Em razão do insucesso na purificação da proteína de interesse fusionada à cauda de Histidina e necessitávamos obter a proteína recombinante na sua forma purificada para dar prosseguimento aos testes propostos neste trabalho, outro sistema de expressão foi constituído. Como muitos trabalhos na literatura obtiveram boa expressão e purificação da proteína do *core* utilizando a proteína de fusão GST, optamos por realizar a expressão empregando esse sistema. Seong et al. (1996) foi um dos primeiros a obter a expressão da proteína do *core* (aminoácidos 1-123) na forma solúvel com elevada reatividade para anticorpos VHC. Em nosso estudo, utilizamos o vetor pET42a para clonagem dos produtos de 408pb e 573pb do gene do *core* do VHC, e transformação em cepas *E. coli*. A expressão foi induzida pela adição de IPTG e resultaram nas proteínas GST-C136 e GST-C191. A expressão da GST-C191 foi menor em relação a GST-C136. Uma provável

explicação seria a existência de alguma substituição de aminoácidos na região hidrofóbica da proteína GST-C191 que implicaria na menor expressão desta (KATO et al., 2004). Com a finalidade de se verificar a imunorreatividade da proteína de fusão GST-C136 foi realizado o teste *immunoblot* com soros positivos para o VHC dos principais genótipos encontrados no Brasil. Ainda que o grau de similaridade entre os genótipos do VHC fosse cerca de 65% a 75%, e entre os subtipos em torno de 80% a 90% (MORI et al., 1992), e a amostra utilizada para isolamento do gene pertencesse ao genótipo 1b, observamos elevada reatividade para a proteína recombinante GST-C136, de forma semelhante à His-C136. Dessa forma, pela maior expressão e imunogenicidade encontrada para a proteína GST-C136, resolvemos utilizá-la para as etapas subseqüentes do trabalho, realizando a sua purificação e estudo de antigenicidade e especificidade da fração purificada. A presença de bandas adicionais ou secundárias ocorre possivelmente devido a uma degradação da proteína na fase de indução por proteases bacterianas. Ainda, um segundo processamento da porção hidrofóbica C-terminal do *core* poderia ocorrer durante seu processo de maturação, resultando em proteínas de pesos moleculares menores (LO et al., 1994; LIU et al., 1997; YASUI et al., 1998). Na purificação, algumas bandas de menor peso molecular também foram purificadas, sugerindo que elas pudessem ser provenientes de produto de degradação, resultado semelhante encontrado por Seong et al. (1996) na expressão da proteína do *core* fusionada a GST. A proteína GST isoladamente não apresentou reação com soro de paciente infectado ou de não portadores da infecção pelo VHC, mesmo em altas concentrações, indicando que qualquer reatividade entre a GST-C136 seja devido à proteína do *core*.

A proteína do *core* do VHC é bastante imunogênica e induz a produção de anticorpos rapidamente após a infecção (JOLIVET-REYNAUD et al., 1998), característica importante para que a proteína recombinante GST-C136 obtida pudesse ser utilizada para produção de anticorpos em camundongos e coelhos. Os anticorpos usados em teste

imunocromatográficos necessitam apresentar sensibilidade, especificidade, pureza e estabilidade, a fim de suprir as exigências necessárias para a adequada performance do método (MILLIPORE, 2002). Dessa forma, após seguir o protocolo de imunização, verificamos que tanto em camundongos como em coelhos a concentração do anticorpo gerado foi satisfatória e, ainda, apresentou excelente reatividade contra a proteína GST-C136, característica esta muito importante para utilização em testes imunocromatográficos.

Em nosso trabalho, utilizamos o ouro coloidal como gerador de sinal para a construção do teste imunocromatográfico, fato justificado melhor mobilidade nos poros da membrana de nitrocelulose em comparação às partículas de látex, por ser menos susceptível à agregação durante a preparação do teste e por fornecer elementos para melhorar sensibilidade de ensaio (SHYU et al., 2002). Uma característica desse sistema é a dependência do pH no processo de conjugação, para isso, realizamos a leitura a 540 e 620nm a fim de determinar o melhor pH e concentração do anticorpo para obter as condições ideais da estabilização do conjugado. Nas reações de conjugação, empregamos concentrações 50% maiores que a crítica para termos uma margem de segurança, ou seja, 150 μ g e 300 μ g para camundongo e coelho, respectivamente. Outro fator importante na conjugação foi o bloqueio das superfícies residuais após o período de incubação do anticorpo com o colóide de ouro. Em nosso trabalho, testamos o BSA e a caseína, os quais funcionaram de maneira aparentemente idênticas. A lavagem do conjugado e a etapa de bloqueio são igualmente importantes para eliminação de anticorpos não ligados para que não venha a interferir na interação entre o conjugado e os anticorpos de detecção e captura durante o ensaio. O prévio tratamento da membrana de nitrocelulose com Tris-HCl contendo 0,4% de glicerol possibilitou um maior controle do grau de absorção de solução aquosa. Isso proporciona uma delimitação dos anticorpos de captura e detecção no momento de sua aplicação. O bloqueio da membrana com caseína e a posterior lavagem foram procedimentos que contribuíram para a

reprodutibilidade do ensaio. Esta fase de lavagem é crítica para remoção de agentes bloqueadores não adsorvidos e deve ser utilizada solução tampão fraca para evitar um fluxo irregular pelo excesso de agentes bloqueadores deixados na membrana e cristais que obstruem os poros da membrana (MILLIPORE, 2002). A membrana de vidro deve igualmente ser bloqueada antes de o conjugado ser aplicado. Após esse tratamento, a adição de 5 μ L do conjugado-anticorpo anti-*core* e a incubação a temperatura ambiente para que ocorresse melhor absorção à membrana foi o que demonstrou melhor resultado.

Após a montagem da fita imunocromatográfica pela sobreposição das membranas, a tira absorvente (Whatman) é colocada em contato com a solução contendo a amostra que dissolve o conjugado (colóide de ouro-anticorpo anti-*core*) e a reação imune entre o analito (antígeno *core*, adicionado ou presente no soro de pacientes positivos para o VHC) e o conjugado ocorre. Para obter a curva dose-resposta, a proteína recombinante GST-C136 foi diluída em concentrações que variaram de 0,20 a 800 μ g. Para o sistema de detecção utilizando anticorpo anti-*core* VHC produzido em camundongo o limite foi de 0,25 μ g a 12,0 μ g (Figura 34 de Resultados, item 4.17) e com emprego do anticorpo produzido em coelho, 1,5 μ g a 6,0 μ g (Figura 36 de Resultados, item 4.19). Em altas concentrações não observamos resultado positivo, apesar de o antígeno estar presente, provavelmente, pela saturação do anticorpo de detecção fixado à membrana. Na presença do antígeno em altas concentrações, este migraria primeiro e se ligaria ao anticorpo anti-GST-C136 fixado na membrana antes do conjugado colóide-anticorpo-*core*. Semelhante resultado foi encontrado quando trabalhamos com soro positivo para o VHC. Através da comparação dos resultados, verificamos que o anticorpo policlonal produzido em camundongo funcionou melhor que o produzido em coelho para o teste imunocromatográfico. Uma possível explicação seria a etapa de purificação em que o sistema *HiTrap protein G* (Pharmacia Biotech) apresentou eficiência maior que o realizado em coluna DEAE-celulose ou, ainda, que o anticorpo

policlonal produzido em coelho seria ineficaz para uso em teste imunocromatográfico comparado ao obtido em camundongo. A produção de anticorpos monoclonais para esta região do *core* do VHC de 136 aminoácidos para utilização no teste imunocromatográfico poderia aumentar a sensibilidade do ensaio.

O desenvolvimento de ensaios para detecção de anticorpos ou antígenos do *core* do VHC deve ser intensamente considerada pois representa a primeira proteína circulante a aparecer no organismo e é diretamente proporcional ao aparecimento do RNA; podendo, deste modo, ser uma alternativa para triagem em doadores de sangue em países em que haja dificuldade de implementação do NAT (amplificação do ácido nucléico) para o VHC. A utilização do antígeno do *core* do VHC como método de detecção e quantificação tem se revelado bastante próspera, principalmente pelos testes descritos na literatura onde apresentam alta sensibilidade e especificidade e, ainda, possuem potencial para ser aplicado como um marcador direto da replicação viral (JOLIVET-REYNAUD et al., 1998; LOPES et al., 2000; PETERSON et al., 2000; BOUVIER-ALIAS et al., 2002). A detecção do *core* do VHC tem sido extremamente útil em prever e monitorar a eficácia do tratamento com interferon associado a ribavirina (BOUVIER-ALIAS et al., 2002).

O teste ELISA para detecção de anticorpos do *core* foi desenvolvido neste trabalho com a finalidade de comparação com os resultados encontrados no teste de *immunoblot* em que obtivemos boa reatividade. Observamos que o ELISA desenvolvido para detecção do anti-*core* revelou positividade entre os infetados pelos diferentes genótipos. A detecção dos diferentes subtipos empregando o ELISA para detecção de anti-*core* também foi encontrada por Trowbridge et al. (1996). Apenas uma amostra de paciente infectado pelo HTLV-I/II mostrou reatividade cruzada, mas próxima ao valor do *cut off*. Testes com número maior de amostras seriam necessários para se estabelecer a sensibilidade e especificidade do ensaio. Alguns estudos são relatados na literatura em que se emprega somente uma proteína

recombinante da região estrutural do vírus para detecção da infecção pelo VHC. Trowbridge et al. (1996) utilizaram a proteína recombinante do core (C22) e obtiveram correlação significativa em comparação com o ELISA de terceira geração (Ortho-Clinical Diagnostics, Chiron Corporation). Outro estudo utilizando somente uma proteína para o ELISA resultou em dados similares em relação ao teste comercial de segunda geração (Abbott Laboratories, North Chicago, IL) (LOPES et al., 2000). Uma possível explicação para isto consiste na hipótese de que os anticorpos para a região estrutural seriam os primeiros a surgir, comparados a anticorpos da região não estrutural. De acordo com nossos resultados e os descritos na literatura, o ELISA *in house* para detecção de anticorpos anti-core abre boas perspectivas para sua utilização. É um teste de fácil execução e mais barato do que os disponíveis comercialmente para diagnóstico da infecção pelo vírus da hepatite C (PETTERSON et al., 2000; BOUVIER-ALIAS et al., 2002).

Embora o ensaio para detecção RNA-VHC seja o “padrão ouro” para a confirmação diagnóstica da hepatite C e avaliação da resposta terapêutica, devemos nos atentar para os estudos que apontam alternativas diagnósticas de fácil aplicabilidade e com maior acessibilidade em relação aos testes moleculares. No Brasil, um levantamento para Avaliação da Assistência as Hepatites Virais, publicado em 2002 pelo Ministério da Saúde, expõe a pequena oferta de exames de biologia molecular para identificar o VHC em algumas regiões do país (BRASIL, 2002).

A proteína do core tem sido apontada como promissora na utilização laboratorial e sua quantificação apresenta correlação direta com a viremia RNA-VHC (PETTERSON et al., 2000; BOUVIER-ALIAS et al., 2002). Os resultados que encontramos no desenvolvimento do teste rápido igualmente mostram-se promissores. Embora o teste obtenha um resultado qualitativo, é um procedimento simples e que requer poucos minutos para sua realização, em passo único. Deste modo, a partir dos resultados observados, o

desenvolvimento do ensaio imunocromatográfico para detecção de antígeno do *core* em amostra VHC positiva proposto alcançou com sucesso o objetivo esperado. Através de uma série de critérios seguidos para se determinar as condições ideais e ajustes para obtenção de melhores resultados, o sistema de investigação mostrou-se confiável e reprodutível. O custo envolvido para a confecção deste teste imunocromatográfico (membranas e solução de ouro coloidal) situa em torno de US\$ 1.00 (um dólar) por teste. Embora o princípio da imunocromatografia seja empregado já há muitos anos, o teste imunocromatográfico para detecção de antígeno do *core* do VHC é inovador e representa o primeiro trabalho a desenvolver o diagnóstico para detecção de antígeno do VHC sob forma de teste rápido. Deste modo, os resultados encontrados possibilitam o aperfeiçoamento do teste desenvolvido, com enorme potencialidade para tornar-se um teste de baixo custo, reprodutível e empregado no diagnóstico clínico.

Este trabalho, em suma, apresenta diversas ferramentas que permitem abrir perspectivas para potenciais testes de uso na rotina laboratorial:

- 1) o desenvolvimento do ELISA para detecção de antígeno do *core* e anticorpos anti-*core* para triagem em doadores de sangue em um mesmo ensaio o que representa uma hipótese bastante promissora para a área diagnóstica. Seria de fácil emprego, automatizado e representaria melhor teste para triagem inicial, permite diminuir a fase de janela imunológica e poderia também ser utilizado em indivíduos imunossuprimidos e em hemodialisados;

- 2) a utilização do teste imunocromatográfico para detecção do antígeno circulante do *core* para diagnóstico da hepatite C em fase de pré-soroconversão diminui a possibilidade de resultados falso-negativos em casos de infecção recente; monitoramento da terapêutica a ser empregada como uma alternativa rápida para uma triagem em pacientes imunocomprometidos ou mesmo em locais onde não há uma infra-estrutura laboratorial e em acidentes ocupacionais.

6 – CONCLUSÕES

I. Quanto à obtenção da proteína recombinante

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que a proteína GST-C136 revelou-se altamente reativa contra soro de paciente infectado e sua expressão, fusionada à cauda de GST (Glutathione-S-Transferase), possibilitou a obtenção na sua forma purificada.

II. Quanto ao teste imunocromatográfico produzido

Podemos concluir que o anticorpo policlonal produzido em camundongo ofereceu melhor resultado que o produzido em coelho para a realização do teste imunocromatográfico. O teste desenvolvido apresenta a vantagem de ser rápido, simples e realizado em um único passo.

O desenvolvimento do ensaio imunocromatográfico para detecção de antígeno circulante do VHC alcançou o sucesso esperado e apresenta potencial para ser um novo método diagnóstico na rotina laboratorial.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRÃO, E.P. Padronização de técnicas moleculares para detecção e genotipagem do vírus da hepatite C usando a 5'UTR. 78f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP, 2003.

AGNELLO, V.; ABEL, G.; ELFAHAL, M.; KNIGHT, G.B.; ZHANG, Q.X. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 12766-12771, 1999.

AHLQUIST, P.; NOUEIRY, A.O.; LEE, W.M.; KUSHNER, D.B.; DYE, B.T. Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. **J. Virol.**, v. 77, p. 8181-8186, 2003.

ALAM, S.S.; NAKAMURA, T.; NAGANUMA, A.; NOZAKI, A.; NOUSO, K.; SHIMOMURA, H.; KATO, N. Hepatitis C quasispecies in cancerous and noncancerous hepatic lesions: the core protein-encoding region. **Acta Med. Okayama**, v. 56, p. 141-147, 2002.

ALBRECHT, R.M., SIMMONS, S.R.; PAWLEY, J.B. In: BEESLEY, J.E., (Ed.) **Immunochemistry: a practical approach**. Oxford: Oxford Univ. Press, 1993. p. 151-176.

ALTER, H. Discovery of non-A, non-B hepatitis and identification of its etiology. **Am. J. Med.**, v. 107, 16S-20S, 1999.

ANDONOV, A.; CHAUDHARY, R.K. Subtyping of hepatitis C virus isolates by a line probe assay using hybridization. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 254-256, 1995.

ASABE, S.I.; TANJI, Y.; SATOH, S.; KANEKO, T.; KIMURA, K.; SHIMOTOHNO, K. The N-terminal region of hepatitis C virus-encoded NS5A is important for NS4A-dependent phosphorylation. **J. Virol.**, v. 71, p. 790-796, 1997.

BARTENSCHLAGER, R.; AHLBORN-LAAKE, L.; MOUS, J.; JACOBSEN, H. Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. **J Virol**, v. 68, p. 5045-5055, 1994.

BARTENSCHLAGER, R.; LOHMANN, V. Replication of hepatitis C virus. **J. Gen. Virol.**, v. 81, p. 1631-1648, 2000.

BARTOSCH, B.; DUBUISSON, J.; COSSET, F.L. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. **J. Exp. Med.**, v. 197, p. 633-642, 2003.

BARTOSCH, B.; VERNEY, G.; DREUX, M.; DONOT, P.; MORICE, Y.; PENIN, F.; PAWLOTSKY, J.M.; LAVILLETTE, D.; COSSET, F.L. An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies. **J. Virol.**, v. 79, p. 8217-8229, 2005.

BAUDHUIN, P.; VAN DER SMISSEN, P. BEAUVOIS, S.; COURTOY, P.J. In: HAYAT, M.A., (Ed.) **Coloidal gold**. San Diego: Academic Press, 1989. p. 13-32.

BENVEGNO, L.; GIOS, M.; BOCCATO, S.; ALBERTI, A. Natural history of compensated viral cirrhosis: a prospective study on the incidence and hierarchy of major complications. **Gut**, v. 53, p. 744-749, 2004.

BIRNBAUM, S.; UDEN, C.; MAGNUSON, C.G.M. Latex-based thin-layer immunoaffinity chromatography for quantitation of protein analytes. **Anal. Biochem.**, v. 206, p. 168-171, 1992.

BLIGHT, K.J.; KOLYKHALOV, A.A.; RICE, C.M. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. **Science**, v. 290, p. 1972-1974, 2000.

BLUMBERG, B.S.; GERSTLEY, B.J.; HUNGERFORD, D.A.; LONDON, W.T.; SUTNICK, A.I. A serum antigen (Australia Antigen) in Down's Syndrome, leukemia, and hepatitis. **Ann. Intern. Med.**, v. 66, p. 924-931, 1967.

BONKOVSKY, H.L.; MEHTA, S. Hepatitis C: a review and update. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 44, p. 159-182, 2001.

BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.E.; VAN DER NOORDA A.J. Rapid and simple method for purification of acid nucleic. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, p. 495-503, 1990.

BOUVIER-ALIAS, M.; PATEL, K.; DAHARI, H.; BEAUCOURT, S.; LARDERIE, P.; BLATT, L.; HEZODE, C.; PICCHIO, G.; DHUMEAUX, D.; NEUMANN, A.U.; MCHUTCHISON, J.G.; PAWLOTSKY, J.M. Clinical utility of total HCV core antigen quantification: a new indirect marker of HCV replication. **Hepatology**, v. 36, p. 211-218, 2002.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANDÃO, A.B.M.; FUCHS, S.C.; SILVA, M.A.A.; EMER, L.F. Diagnosing hepatitis C in clinical practice: a literature review. **Rev. Panam. Salud Publica**, v. 9, p. 161-168, 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE - Programa Nacional de Hepatites Virais. **Avaliação da Assistência as Hepatites Virais no Brasil**. Brasília, 2002. p. 1-65.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Portaria nº 1.376 de 19 de novembro de 1993. Aprova as alterações da Portaria nº 721/GM, de 09/08/89, que aprova as Normas Técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados, e dá outras providências.

Diário Oficial da União, Brasília, DF, p. 18.404, 2 de dezembro de 1993.

BRUNO, S.; SILINI, E.; CROSIGNANI, A.; BORZIO, F.; LEANDRO, G.; BONO, F.; ASTI, M.; ROSSI, S.; LARGHI, A.; CERINO, A.; PODDA, M.; MONDELLI, M.U. Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a prospective study.

Hepatology, v. 25, p. 754-758, 1997.

BUKH, J.; MILLER, R.H.; PURCELL, R.H. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. **Semin. Liver Dis.**, v. 15, p. 41-63, 1995a.

BUKH, J.; MILLER, R.H.; PURCELL, R.H. Genetic heterogeneity of the hepatitis C virus. **Princess Takamatsu Symp.**, v. 25, p. 75-91, 1995b.

CAMPIOTTO, S.; PINHO, J.R.R.; CARRILHO, F.J.; DA SILVA, L.C.; SOUTO, F.J.D.; SPINELLI, V.; PEREIRA, L.M.M.B.; COELHO, H.S.M.; SILVA, A.O.; FONSECA, J.C.; ROSA, H.; LACET, C.M.C.; BERNARDINI, A.P. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, p. 41-49, 2005.

CAVALHEIRO, N.P. Hepatite C: transmissão entre casais. 2004. 121f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - USP, 2004.

CAVALHEIRO, N.P.; BARONE, A.A.; TENGAN, F.M. HCV serotypes in Brazilian patients. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 6, p. 228-232, 2002.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Recommendations for prevention and control of hepatitis C infection (HCV) and HCV-related chronic disease, **MMWR Mob. Mortl. Weekly Rep.**, v. 47, p. 1-40, 1998.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA (CVE). **Guia de orientações técnicas hepatites B e C**. São Paulo, 2002.

CHOO, Q.L.; RICHMAN, K.H.; HAN, J.H.; BERGER, K.; LEE, C.; DONG, C.; GALLEGOS, C.; COIT, D.; MEDINA-SELBY, R.; BARR, P.J. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 2451-2455, 1991.

CHOO, Q-L; KOU, G.; WEINER, A.J.; OVERBY, L.R.; HOUGHTON, M. Isolation of small cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, p. 359-361, 1989.

DAMEN, M.; ZAAIJER, H.L.; CUYPERS, H.T.; VRIELINK, H.; VAN DER POEL, C.L.; REESINK, H.W.; LELIE, P.N. Reliability of the third-generation recombinant immunoblot assay for hepatitis C virus. **Transfusion**, v. 35, p. 745-749, 1995.

DAS, A. Overproduction of proteins in *Escherichia coli*: vectors, host, and strategies. **Methods Enzymol.**, v. 182, p. 93-112, 1990.

Di BISCEGLIE, A.M. Hepatitis C virology and future antiviral targets. **Am. J. Med.**, v. 107, p. 45-48, 1999.

DISCIPIO, R.G. Preparation of colloidal gold particles of various sizes using sodium borohydride and sodium cyanoborohydride. **Anal. Biochem.**, v. 236, p. 168-170, 1996.

DOW, B.C.; MUNRO, H.; BUCHANAN, I.; FOLLETT, E.A.; DAVIDSON, F.; YAP, P.L.; SIMMONDS, P. Third-generation recombinant immunoblot assay: comparison of reactivities according to hepatitis C virus genotype. **Transfusion**, v. 36, p. 547-551, 1996.

DUNBAR, B.S.; SCHWOEBEL, E.D. Preparation of polyclonal antibodies. **Methods Enzymol.**, v. 182, p. 663-670, 1990.

ELSAWY, E.M.; SOBH, M.A.; EL-CHENAWI, F.A.; HASSAN, I.M.; SHEHAB, EL-DIN, A.B.; GHONEIM, M.A. Serotyping of hepatitis C virus in hemodialysis patients: comparison with a standardized genotyping assay. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 51, p. 91-94, 2005.

ENCKE, J.; PULTLITZ J.Z.; HEINTGES, T.; WANDS, J.R. Total chemical synthesis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus with long oligodeoxynucleotides. **J. Virol. Methods**, v. 74, p. 117-121, 1998.

ENOMOTO, N.; SAKUMA, I.; ASAHINA, Y.; KUROSAKI, M.; MURAKAMI, T.; YAMAMOTO, C.; OGURA, Y.; IZUMI, N.; MARUMO, F.; SATO, C. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. **N. Engl. J. Med.**, v. 334, p. 77-81, 1996.

ENOMOTO, M.; NISHIGUCHI, S.; SHIOMI, S.; TANAKA, M.; FUKUDA, K.; UEDA, T.; TAMORI, A.; HABU, D.; TAKEDA, T.; YANO, Y.; OTANI, S. Comparison of real-time quantitative polymerase chain reaction with three other assays for quantitation of hepatitis C virus. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 16, p. 904-909, 2001.

ERENSOY, S. Diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection and laboratory monitoring of its therapy. **J. Clin. Virol.**, v. 21, p. 271-281, 2001.

FARCI, P.; ALTER, H.J.; WONG, D.; MILLER, R.H.; SHIH, J.W.; JETT, B.; PURCELL, R.H. A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. **N. Engl. J. Med.**, v. 325, p. 98-104, 1991.

FARCI, P.; SHIMODA, A.; WONG, D.; CABEZON, T.; DE GIOANNIS, D.; STRAZZERA, A.; SHIMIZU, Y.; SHAPIRO, M.; ALTER, H.J.; PURCELL, R.H. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 15394-15399, 1996.

FARCI, P.; SHIMODA, A.; COIANA, A.; DIAZ, G.; PEDDIS, G.; MELPOLDER, J.C.; STRAZZERA, A.; CHIEN, D.Y.; MUNOZ, S.J.; BALESTRIERI, A.; PURCELL, R.H.; ALTER, H.J. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. **Science**, v. 288, p. 339-344, 2000.

FERRERO, S.; LUNGARO, P.; BRUZZONE, B.M.; GOTTA, C.; BENTIVOGLIO, G.; RAGNI, N. Prospective study of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus: a 10-year survey (1990-2000). **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, v.82, p. 229-234, 2003.

FIGUEIREDO, E.Q.G.; COTRIM, H.P.; TAVARES-NETO, J. Frequência do Vírus da Hepatite C em profissionais da saúde: revisão sistemática da literatura. **Gastroenterol. Endosc. Dig.**, v. 22, p. 53-60, 2003.

FOCCACIA, R.; CONCEIÇÃO, O.; OLIVEIRA, U.B. Epimiologia. In: I CONSENSO DA SOCIEDADE PAULISTA DE INFECTOLOGIA PARA MANUSEIO E TERAPIA DA HEPATITE C. 2002, p. 7-13.

FREEMAN, A.J.; DORE, G.J.; LAW, M.G.; THORPE, M.; VON OVERBECK, J.; LLOYD, A.R.; MARINOS, G.; KALDOR, J.M. Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. **Hepatology**, v. 34, p. 809-816, 2001.

GIANNINI, C; BRECHOT, C. Hepatitis C virus biology. **Cell Death Differ.**, v. 10, p. S27-S38, 2003.

GONÇALES, N.S.L.; GONÇALES Jr, F.L. Diagnóstico laboratorial. In: II CONSENSO DA SOCIEDADE PAULISTA DE INFECTOLOGIA PARA MANUSEIO E TERAPIA DA HEPATITE C. 2004, p. 25-27.

GRETCH, D.R. Diagnostic tests for hepatitis C. **Hepatology**, v. 26, p. 43S-47S, 1997.

GRIFFIN, S.D.; BEALES, L.P.; CLARKE, D.S.; WORSFOLD, O.; EVANS, S.D.; JAEGER, J.; HARRIS, M.P.; ROWLANDS, D.J. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. **FEBS Lett.**, v. 535, p. 34-38, 2003.

HAGAN, H.; THIEDE, H.; DES JARLAIS, D.C. HIV/hepatitis C virus co-infection in drug users: risk behavior and prevention. **AIDS**, v. 19, p. S199-S207, 2005.

HANDLEY D.A. In: Hayat, M.A., Ed. **Coloidal Gold**. San Diego, Academic Press: 1989, p. 13-32.

HERRERO, C.; VICENTE, A.; BRUGUERA, M.; ERCILLA, M.G.; BARRERA, J.M.; VIDAL, J.; TERES, J.; MASCARO, J.M.; RODES, J. Is hepatitis C virus infection a trigger of porphyria cutanea tarda? **Lancet**, v. 341, p. 788-789, 1993.

HIJIKATA, M.; KATO, N.; OOTSUYAMA, Y.; NAKAGAWA, M.; SHIMOTOHNO, K. Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 5547-5551, 1991.

HOOFNAGLE, J.H. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. **Hepatology**, v. 26, p. 15S-20S, 1997.

HOUGHTON, M.; WEINER, A.; HAN, J.; KUO, G.; CHOO, Q-L. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease.

Hepatology, v. 14, p. 381-388, 1991.

HSU, H.H.; DONETS, M.; GREENBERG, H.B.; FEINSTONE, S.M. Characterization of hepatitis C virus structural proteins with a recombinant baculovirus expression system.

Hepatology, v. 17, p. 763-771, 1993.

INNOGENETICS N.V. **Biotechnology for healthcare**. Inno-Lipa HCV II: product manual. Belgium, Zwijndrecht: 1998.

JOLIVET-REYNAUD, C.; DALBON, P.; VIOLA, F.; YVON, S.; PARANHOS-BACCALA, G.; PIGA, N.; BRIDON, L.; TRABAUD, M.A.; BATTAIL, N.; SIBAI, G.; JOLIVET, M. HCV core immunodominant region analysis using mouse monoclonal antibodies and human sera: characterization of major epitopes useful for antigen detection. **J. Med. Virol.**, v.56, p. 300-309, 1998.

KANAI, K.; KAKO, M.; OKAMOTO, H. HCV genotypes in chronic hepatitis and response to interferon. **Lancet**, v. 339, p. 1543, 1992.

KATO, N.; HIJIKATA, M.; OOTSUYAMA, Y.; NAKAGAWA, M.; OHKOSHI, S.; SUGIMURA, T.; SHIMOTOHNO, K. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 9524-9528, 1990.

KATO, N. Genome of human hepatitis C virus (HCV): gene organization, sequence diversity, and variation. **Microb. Comp. Genomics**, v. 5, p. 129-151, 2000.

KATO, N. Molecular virology of hepatitis C virus. **Acta Med. Okayama**, v. 55, p. 133-159, 2001.

KATO, T.; DATE, T.; MIYAMOTO, M.; FURUSAKA, A.; TOKUSHIGE, K.; MIZOKAMI, M.; WAKITA, T. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. **Gastroenterology**, v. 125, p. 1808-1817, 2003.

KATO, T.; MIYAMOTO, M.; DATE, T.; FURUSAKA, A.; HIRAMOTO, J.; NAGAYAMA, K.; TSAI, N.; MIZOKAMI, M; WAKITA, T. Differences in hepatitis C virus core protein processing among genotypes 1 and 2. **Hepatol. Res.**, v. 30, p. 204-209, 2004.

KENNY-WALSH E. Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. **N. Engl. J. Med.**, v. 340, p. 1228-1233, 1999.

KHANNA, A.; RAY, R. Hepatitis C virus core protein: synthesis, affinity purification and immunoreactivity with infected human sera. **Gene**, v. 153, p. 185-189, 1995.

HANDSCHUH, G.; CASELMANN, W.H. Bacterial expression and purification of hepatitis C virus capsid proteins of different size. **J. Hepatol.**, v. 22, p. 143-150, 1995.

KITTLESEN, D.J.; CHIANESE-BULLOCK, K.A.; YAO, Z.Q.; BRACIALE, T.J.; HAHN, Y.S. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. **J. Clin. Invest.**, v. 106, p. 1239-1249, 2000.

KOBAYASHI, M.; TANAKA, E.; SODEYAMA, T.; URUSHIHARA, A.; MATSUMOTO, A.; KIYOSAWA, K. The natural course of chronic hepatitis C: a comparison between patients with genotypes 1 and 2 hepatitis C viruses. **Hepatology**, v. 23, p. 695-699, 1996.

KRUGMAN, S.; GILES, J.P.; HAMMONDS, J. Infections hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological and immunological types of infection. **JAMA**, v. 200, p. 365-373, 1967.

KUO, G.; CHOO, Q.L.; ALTER, H.J.; GITNICK, G.L.; REDEKER, A.G.; PURCELL, R.H.; MIYAMURA, T.; DIENSTAG, J.L.; ALTER, M.J.; STEVENS, C.E.; TEGTMEIER, G.E.; BONINO, F.; COLOMBO, M.; LEE, W-S.; KUO, C.; BERGER, K.; SHUSTER, J.R.; OVERBY, L.R.; BRADLEY, D.W.; HOUGHTON, M. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. **Science**, v. 244, p.362-364, 1989.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structure protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAI, M.M.; WARE, C.F. Hepatitis C virus core protein: possible roles in viral pathogenesis. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 242, p. 117-134, 2000.

LAITINEN, M.P.A.; VUENTO, M. Affinity immunosensor for milk progesterone: identification of critical parameters. **Biosens. Bioelectron.**, V. 11, p. 1207-14, 1996.

LANDRO, J.A.; RAYBUCK, S.A.; LUONG, Y.P.; O'MALLEY, E.T.; HARBESON, S.L.; MORGENSTERN, K.A.; RAO, G.; LIVINGSTON, D.J. Mechanistic role of an NS4A peptide cofactor with the truncated NS3 protease of hepatitis C virus: elucidation of the NS4A stimulatory effect via kinetic analysis and inhibitor mapping. **Biochemistry**, v. 36, p. 9340-9348, 1997.

LAVILLETTE, D.; MORICE, Y.; GERMANIDIS, G.; DONOT, P.; SOULIER, A.; PAGKALOS, E.; SAKELLARIOU, G.; INTRATOR, L.; BARTOSCH, B.; PAWLOTSKY, J.M.; COSSET, F.L. Human serum facilitates hepatitis C virus infection, and neutralizing

responses inversely correlate with viral replication kinetics at the acute phase of hepatitis C virus infection. **J. Virol.**, v. 79, p. 6023-6034, 2005.

LIANG, T.J.; REHERMAN, B.; SEEF, L.B.; HOOFNAGLE, J.H. Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. **Ann. Intern. Med.**, v. 132, p. 296-304, 2000.

LINDENBACH, B.D.; EVANS, M.J.; SYDER, A.J.; WOLK, B.; TELLINGHUISEN, T.L.; LIU, C.C.; MARUYAMA, T.; HYNES, R.O.; BURTON, D.R.; MCKEATING, J.A.; RICE, C.M. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. **Science**, v. 309, p. 623-626, 2005.

LINDENBACH, B.D.; MEULEMAN, P.; PLOSS, A.; VANWOLLEGHEM, T.; SYDER, A.J.; MCKEATING, J.A.; LANFORD, R.E.; FEINSTONE, S.M.; MAJOR, M.E.; LEROUX-ROELS, G.; RICE, C.M. Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, p. 3805-3809, 2006.

LIU Q, TACKNEY C, BHAT RA, PRINCE AM, ZHANG P. Regulated processing of hepatitis C virus core protein is linked to subcellular localization. **J. Virol.**, v. 71, p. 657-662, 1997.

LO, S.Y.; SELBY, M.; TONG, M.; OU, J.H. Comparative studies of the core gene products of two different hepatitis C virus isolates: two alternative forms determined by a single amino acid substitution. **Virology**, v. 199, p. 124-131, 1994.

LOHMANN, V.; KORNER, F.; HERIAN, U.; BARTENSCHLAGER, R. Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. **J. Virol.**, v. 71, p. 8416-8428, 1997.

LOHMANN, V.; KORNER, F.; KOCH, J.; HERIAN, U.; THEILMANN, L.; BARTENSCHLAGER, R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. **Science**, v. 285, p. 110-113, 1999.

LOK, A.S.; GUNARATNAM, N.T. Diagnosis of hepatitis C. **Hepatology**, v. 26, p. 48S-56S, 1997.

LOPES, E.P.; GRANATO, C.H.; LANZONI, V.; GRANERO, L.; PARANHOS-BACCALA, G.; TOMIYAMA, H.; SILVA, A.E.; FERRAZ, M.L. Evaluation of an enzyme immunoassay for hepatitis C virus antibody detection using a recombinant protein derived from the core region of hepatitis C virus genome. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 717-720, 2000.

LUNEL, F.; CACOUB, P. Treatment of autoimmune and extra hepatic manifestations of hepatitis C virus infection. **J. Hepatol.**, v. 31, p. 210-216, 1999.

MAILLARD, P.; KRAWCZYNSKI, K.; NITKIEWICZ, J.; BRONNERT, C.; SIDORKIEWICZ, M.; GOUNON, P.; DUBUISSON, J.; FAURE, G.; CRAINIC, R.; BUDKOWSKA, A. Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients. **J. Virol.**, v. 75, p. 8240-8250, 2001.

MAYNARD, M.; PRADAT, P.; BERTHILLON, P.; PICCHIO, G.; VOIRIN, N.; MARTINOT, M.; MARCELLIN, P.; TREPO C. Clinical relevance of total HCV core antigen testing for hepatitis C monitoring and for predicting patients' response to therapy. **J. Viral. Hepat.**, v. 10, p. 318-323, 2003.

McHUTCHISON, J.G.; GORDON, S.C.; SCHIFF, E.R.; SHIFFMAN, M.L.; LEE, W.M.; RUSTGI, V.K.; GOODMAN, Z.D.; LING, M.H.; CORT, S.; ALBRECHT, J.K. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. **N. Engl. J. Med.**, v. 339, p. 1485-1492, 1998.

MCLAUCHLAN, J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. **J. Viral. Hepat.**, v. 7, p. 2-14, 2000.

McOMISH, F.; YAP, P.L.; DOW, B.C.; FOLLETT, E.A.; SEED, C.; KELLER, A.J.; COBAIN, T.J.; KRUSIUS, T.; KOLHO, E.; NAUKKARINEN, R.; LIN, C.; LAI, C.; LEONG, S.; MEDGYESI, G.A.; HEJJAS, M.; KIYOKAWA, H.; FUKADA K.; CUYPERS T.; SAEED, A.A.; AL-RASHEED A.M.; LIN, M.; SIMMONDSI, P. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 884-892, 1994.

MEDINA, M.; SCHIFF, E.R. Hepatitis C: diagnostic assays. **Semin. Liver Dis.**, v. 15, p. 33-40, 1995.

MEUNIER, J.C.; ENGLE, R.E.; FAULK, K.; ZHAO, M.; BARTOSCH, B.; ALTER, H.; EMERSON, S.U.; COSSET, F.L.; PURCELL, R.H.; BUKH, J. Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 102, p. 4560-4565, 2005.

MILLIPORE CORPORATION. **Rapid lateral flow test strips**. Considerations for product development. Bedford, USA, 2002. 38p. (Lit. nº TB500EN00 - Rev. 06/2002).

MITSUI, T.; IWANO, K.; MASUKO, K.; YAMAZAKI, C.; OKAMOTO, H.; TSUDA, F.; TANAKA, T.; MISHIRO, S. Hepatitis C virus infection in medical personnel after needlestick accident. **Hepatology**, v. 16, p. 1109-1114, 1992.

MOGHADDAM, A.; REINTON, N.; DALGARD, O. A rapid real-time PCR assay for determination of hepatitis C virus genotypes 1, 2 and 3a. **J. Viral Hepat.**, v. 13, p. 222-229, 2006.

MOK, J.; PEMBREY, L.; TOVO, P.A.; NEWELL, M.L. When does mother to child transmission of hepatitis C virus occur? **Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.**, v. 90, p. F156-60, 2005.

MOLDAY, R.S.; DREYER, W.J.; REMBAUM A.; YEN, S.P. New immunolatex spheres: visual markers of antigens on lymphocytes for scanning electron microscopy. **J. Cell. Biol.**, 1975.

MONDELLI, M.U.; SILINI, E. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. **J. Hepatol.**, v. 31, p. 65-70, 1999.

MORI, S.; SATO, N.; YAGYU, A.; TANAKA, T.; IKEDA, Y. PETCHCLAI, B.; CHIEWSILP, P.; KURIMURA, T.; SHIMOTOHNO, K. A new type of hepatitis C virus in patients in Thailand. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 183, p. 334 –342, 1992.

MORTON, T.A.; KELEN, G.D. Hepatitis C. **Ann. Emerg. Med.**, v. 31, p. 381-390, 1998.

NILSSON, S.; LAGER, C, LAURELL, T.; BIRNBAUN, S. Thin-layer immunoaffinity chromatography with bar code quantitation of C-reactive protein. **Anal. Chem.**, v. 67, p. 3051-3056, 1995.

NOCENTE R, CECCANTI M, BERTAZZONI G, CAMMAROTA G, SILVERI NG, GASBARRINI G. HCV infection and extrahepatic manifestations. **Hepatogastroenterology**, v. 50, p. 1149-1154, 2003.

OKAMOTO, H.; MUNEKATA, E.; TSUDA, F.; TAKAHASHI, K.; YOTSUMOTO, S.; TANAKA, T.; TACHIBANA, K.; AKAHANE, Y.; SUGAI, Y.; MIYAKAWA, Y. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies against the capsid protein of hepatitis C virus with a synthetic oligopeptide. **Jpn. J. Exp. Med.**, v. 60, p. 223-233, 1990.

PAEK, S.H.; LEE, C.W.; YOOK, S.H.; KWON, O.H.; PARK, Y.N. Performance control strategies of one step immunochromatographic assay system for *Salmonella typhimurium*. **Anal. Lett.**, v.32, p. 335-360, 1999.

PAVLOVIC D, NEVILLE DC, ARGAUD O, BLUMBERG B, DWEK RA, FISCHER WB, ZITZMANN N. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, p. 6104-6108, 2003.

pET SYSTEM MANUAL. Novagen, TB055 10th ed., 2002. Disponível em: <<http://www.emdbiosciences.com/docs/NDIS/C183-000.pdf#search='pet%20manual%20system'>>. Acesso em 07 mar. 2006.

PETERSON, J.; GREEN, G.; IIDA, K.; CALDWELL, B.; KERRISON, P.; BERNICH, S.; AOYAGI, K.; LEE, S.R. Detection of hepatitis C core antigen in the antibody negative 'window' phase of hepatitis C infection. **Vox Sang**, v. 78, p. 80-85, 2000.

PILERI, P.; UEMATSU, Y.; CAMPAGNOLI, S.; GALLI, G.; FALUGI, F.; PETRACCA, R.; WEINER, A. J.; HOUGHTON, M.; ROSA, D.; GRANDI, G.; ABRIGNANI, S. Binding of hepatitis C virus to CD81. **Science**, v. 282, p. 938-941, 1998.

POYNARD, T.; MARCELLIN, P.; LEE, S.S.; NIEDERAU, C.; MINUK, G.S.; IDEO, G.; BAIN, V.; HEATHCOTE, J.; ZEUZEM, S.; TREPO, C.; ALBRECHT, J. Randomized trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. **Lancet**, v. 352, p. 1426-1432, 1998.

PRESCOTT, L.E.; SIMMONDS, P.; LAI, C.L.; CHAN, N.K.; PIKE, I.; YAP, P.L.; LIN, C.K. Detection and clinical features of hepatitis C virus type 6 infections in blood donors from Hong Kong. **J Med Virol**, v. 50, p. 168-175, 1996.

PRINCE, A. M.; BROTMAN, B.; GRADY, G. F.; KUHNS, W. J., HAZZI, C.; LEVINE, R. W.; MILLIAN, S. J. Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. **Lancet**, v. 2, p. 241-246, 1974.

QUASH, G.; ROCH, A.M.; NIVELEAU, A.; GRANGE, J.; KEOLOUANGKHOT, T.; HUPPERT, J. The preparation of latex particles with covalently bound polyamines, IgG and measles agglutinins and their use in visual agglutination tests. **J. Immunol. Methods**, v. 22, p. 165-172, 1978.

RAVAGGI, A.; NATOLI, G.; PRIMI, D.; ALBERTINI, A.; LEVRERO, M.; CARIANI, E. Intracellular localization of full-length and truncated hepatitis C virus core protein expressed in mammalian cells. **J. Hepatol.**, v. 20, p. 833-836, 1994.

RODGER, A.J.; ROBERTS, S.; LANIGAN, A.; BOWDEN, S.; BROWN, T.; CROFTS, N. Assessment of long-term outcomes of community-acquired hepatitis C infection in a cohort with sera stored from 1971 to 1975. **Hepatology**, v. 32, p. 582-587, 2000.

ROINGEARD, P.; HOURIOUX, C.; BLANCHARD, E.; BRAND, D; AIT-GOUGHOULTE, M. Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. **Biol. Cell.**, v. 96, p. 103-108, 2004.

ROSEMBERG, S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C. **J. Mol. Biol.**, v. 313, p. 451-464, 2001.

SANGER F.; NICKLEN S.; COULSON A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SARACCO, G.; OLIVERO, A.; CIANCIO, A.; CARENZI, S.; RIZZETTO, M. Therapy of chronic hepatitis C: a critical review. **Curr. Drug Targets Infect. Disord.**, v. 3, p. 25-32, 2003.

SCARSELLI, E.; ANSUINI, H.; CERINO, R.; ROCCASECCA, R.M.; ACALI, S.; FILOCAMO, G.; TRABONI, C.; NICOSIA, A.; CORTESE, R.; VITELLI, A. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. **EMBO J.**, v. 21, p. 5017-5025, 2002.

SCHIFF, E.R.; MEDINA, M.; KAHN, R.S. New perspectives in the diagnosis of hepatitis C. **Semin. Liver Dis.**, v. 19, p. 3-15, 1999.

SCOTT, C.A.; AVELLINI, C.; DESINAN, L.; PIRISI, M.; FERRACCIOLI, G.F.; BARDUS, P.; FABRIS, C.; CASATTA, L.; BARTOLI, E.; BELTRAMI, C.A. Chronic lymphocytic sialoadenitis in HCV-related chronic liver disease: comparison of Sjogren's syndrome. **Histopathology**, v. 30, p. 41-48, 1997.

SEKI, M.; HONDA, Y.; KONDO, J.; FUKUDA, K.; OHTA, K.; SUGIMOTO, J.; YAMADA, E. Effective production of the hepatitis C virus core antigen having high purity in *Escherichia coli*. **J. Biotechnol.**, v. 38, p. 229-241, 1995.

SELBY, M.J.; CHOO, Q.L.; BERGER, K.; KUO, G.; GLAZER, E.; ECKART, M.; LEE, C.; CHIEN, D.; KUO, C.; HOUGHTON, M. Expression, identification and subcellular localization of the proteins encoded by the hepatitis C viral genome. **J. Gen. Virol.**, v. 74, p. 1103-1113, 1993.

SEONG, Y.R.; LEE, E.K.; CHOI, S.; CHON, S.K.; IM, D.S. Overexpression and simple purification of a truncated, immunologically reactive GST-HCV core (1-123) fusion protein. **J. Virol. Methods**, v. 59, p. 13-21, 1996.

SERFATY, L.; AUMAITRE, H.; CHAZOILLERES, O.; BONNAND, A.M.; ROSMORDUC, O.; POUPON, R.E.; POUPON, R. Determinants of outcome of compensated hepatitis C virus-related cirrhosis. **Hepatology**, v. 27, p. 1435-1340, 1998.

SHYU, R.H.; SHYU, H.F.; LIU, H.W.; TANG, S.S. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of ricin. **Toxicon**, v. 40, p. 255-258, 2002.

SIMMONDS, P.; ALBERTI, A.; ALTER, H.J.; BONINO, F.; BRADLEY, D.W.; BRECHOT, C.; BROUWER, J.T.; CHAN, S.W.; CHAYAMA, K.; CHEN, D.S. proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. **Hepatology**, v. 19, p. 1321-1324, 1994.

SIMMONDS, P.; MELLOR, J.; SAKULDAMRONGPANICH, T.; NUCHAPRAYOON, C.; TANPRASERT, S.; HOLMES, E.C.; SMITH, D.B. Evolutionary analysis of variants of hepatitis C virus found in South-East Asia: comparison with classifications based upon sequence similarity. **J Gen Virol**, v. 77, p. 3013-3024, 1996.

SMITH, D.B.; PATHIRANA, S.; DAVIDSON, F.; LAWLOR, E.; POWER, J.; YAP, P.L.; SIMMONDS, P. The origin of hepatitis C virus genotypes. **J. Gen. Virol.**, v. 78, p. 321-328, 1997.

STADHOUDERS, P.H.; COOREMAN, M.P. Chronic hepatitis C virus disease: an evaluation of procedures for diagnosis and treatment. **Neth. J. Med.**, v. 51, p. 213-224, 1997.

STUMPF, M.P.H.; PYBUS, O.G. Genetic diversity and models of viral evolution for the hepatitis C virus. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 214, p. 143-152, 2002.

STUYVER, L.; ROSSEAU, R.; WYSEUR, A.; DUHAMEL, M.; VANDERBORGHT, B.; VAN HEUVERSWYN, H.; MAERTENS, G. Typing of hepatitis C virus isolates and

characterization of new subtypes using a line probe assay. **J. Gen. Virol.**, v. 74, p. 1093-1102, 1993.

SUGIMOTO, K.; STADANLICK, J.; IKEDA, F.; BRENSINGER, C.; FURTH, E.E.; ALTER, H.J.; CHANG, K.M. Influence of ethnicity in the outcome of hepatitis C virus infection and cellular immune response. **Hepatology**, v. 37, p. 590-599, 2003.

TAKAHAMA, A.J.; TATSCH, F.; TANNUS, G.; LOPES, M.A. Hepatitis C: incidence and knowledge among Brazilian dentists. **Community Dent Health**, v. 22, p. 184-187, 2005.

TAKEUCHI, T.; KATSUME, A.; TANAKA, T.; ABE, A.; INOUE, K.; TSUKIYAMA-KOHARA, K.; KAWAGUCHI, R.; TANAKA, S.; KOHARA, M. Real-time detection system for quantification of hepatitis C virus genome. **Gastroenterology**, v. 116, p. 636-642, 1999.

TANAKA, H.; TSUKUMA, H.; YAMANO, H.; OKUBO, Y.; INOUE, A.; KASAHARA, A.; HAYASHI, N. Hepatitis C virus 1b (II) infection and development of chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma: a case-control study in Japan. **J. Epidemiol.**, v. 8, p. 244-249, 1998.

TANJI Y, KANEKO T, SATOH S, SHIMOTOHNO K. Phosphorylation of hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS5A. **J. Virol.**, v. 69, p. 3980-3986, 1995.

TAYLOR, D.R.; SHI, S.T.; LAI, M.M. Hepatitis C virus and interferon resistance. **Microbes Infect.**, v. 2, p. 1743-1756, 2000.

TORRES, M.; CAMPINS, M.; ESTEBAN, J.I.; COSTA, J.; BATISDA, M.T.; BRUG, M. Is it useful to perform the RNA test for hepatitis C in health care workers after an accidental needlestick? **J. Hepatol.**, v. 33, p. 686, 2000.

TROWBRIDGE, R.; SLOOTS, T.P.; BUDA, P.; FAOAGALI, J.; HYLAND, C.; YOUNG, I.; GOWANS, E.J. An ELISA for the detection of antibody to the core antigen of hepatitis C virus: use in diagnosis and analysis of indeterminate samples. **J. Hepatol.**, v. 24, p. 532-538, 1996.

VIGANI, A.G. Monitoramento laboratorial durante o tratamento da hepatite C. In: II CONSENSO DA SOCIEDADE PAULISTA DE INFECTOLOGIA PARA MANUSEIO E TERAPIA DA HEPATITE C. 2004, p. 23-24.

VOGT, M.; LANG, T.; FROSNER, G.; KLINGLER, C.; SENDL, A.F.; ZELLER, A.; WIEBECKE, B.; LANGER, B.; MEISNER, H.; HESS, J. Prevalence and clinical outcome of hepatitis C infection in children who underwent cardiac surgery before the implementation of blood-donor screening. **N. Engl. J. Med.**, v. 341, p. 866-870, 1999.

WAKITA, T.; PIETSCHMANN, T.; KATO, T.; DATE, T.; MIYAMOTO, M.; ZHAO, Z.; MURTHY, K.; HABERMANN, A.; KRAUSSLICH, H.G.; MIZOKAMI, M.; BARTENSCHLAGER, R.; LIANG, T.J. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. **Nat. Med.**, v. 11, p. 791-796, 2005.

WAWRZYNOWICZ-SYCZEWSKA, M.; KUBICKA, J.; LEWANDOWSKI, Z.; BORONKACZMARSKA, A.; RADKOWSKI, M. Natural history of acute symptomatic hepatitis type C. **Infection**, v. 32, p. 138-143, 2004.

WHO. World Health Organization. **Hepatitis C**. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdcsrlyo2003/en/>>. Acesso em 15 fev. 2006.

WONG, W.; TERRAULT, N. Update on chronic hepatitis C. **Clin. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 3, p. 507-520, 2005.

YAMABE, H.; JOHNSON, R.J.; GRETCH, D.R.; FUKUSHI, K.; OSAWA, H.; MIYATA, M.; INUMA, H.; SASAKI, T.; KAIZUKA, M.; TAMURA, N. Hepatitis C virus infection and membranoproliferative glomerulonephritis in Japan. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 6, p. 220-223, 1995.

YAMASHITA, T.; KANEKO, S.; SHIROTA, Y.; QIN, W.; NOMURA, T.; KOBAYASHI, K.; MURAKAMI, S. RNA-dependent RNA polymerase activity of the soluble recombinant hepatitis C virus NS5B protein truncated at the C-terminal region. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 15479-15486, 1998.

YASUI, K.; WAKITA, T.; TSUKIYAMA-KOHARA, K.; FUNAHASHI, S.I.; ICHIKAWA, M.; KAJITA, T.; MORADPOUR, D.; WANDS, J.R.; KOHARA, M. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. **J. Virol.**, v. 72, p. 6048-6055, 1998.

ZHONG, J.; GASTAMINZA, P.; CHENG, G.; KAPADIA, S.; KATO, T.; BURTON, D.R.; WIELAND, S.F.; UPRICHARD, S.L.; WAKITA, T.; CHISARI, F.V. Robust hepatitis C virus infection in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 102, p. 9294-9299, 2005.

ZYLBERBERG, H.; THIERS, V.; LAGORCE, D.; SQUADRITO, G.; LEONE, F.; BERTHELOT, P.; BRECHOT, C.; POL, S. Epidemiological and virological analysis of couples infected with hepatitis C virus. **Gut**, v. 45, p. 112-116, 1999.

8- Anexos

A

atgagcaca ¹ **aatcctaaac** ctcaaagaaa aaccaaactg aacaccaacc gccgccaca
 ggacgttaag ttcccgggcg gtggtcagat cgttggtgga gtttacctgt tgccgcgag
 gggccccagg ttgggtgtgc gcgcgactag gaagacttcc gagcggtcgc aacctcgtgg
 aaggcgacaa cctatcccca aggctcgccg gcccgagggg aggacctggg ctgagcccgg
 gtacccttgg cccctctatg gcaacgaggg tatgggggtgg gcaggatggc tcctgtcacc
 ccgtggctct cggcctagtt ggggccccac agacccccgg cgtaggtcgc gtaatttggg
 taaggtcatc gataccctta catgcggtt **cgccgacctc** ² **atggggtaca** ttccgcttgt
 cggcgcccc ctaggaggcg ctgccagggc cctggcgcat ggcgtccggg ttctggagga
 cggcgtgaac tatgcaacag ggaatctgcc cggttgctct ttctctatct tcctcttagc
³
 tttgctgtct tg**tttgacca** **tcccagcttc** **cgct**

B

MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVRATRKTSEERSQPRG
 RRQP IPKARRPEGRTWAQPGYPWPLYGNEGMGWAGWLLSPRGSRP SWGPTDPRRRSRNLG
 KVIDTLTCGFADLMGY

C

MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVRATRKTSEERSQPRG
 RRQP IPKARRPEGRTWAQPGYPWPLYGNEGMGWAGWLLSPRGSRP SWGPTDPRRRSRNLG
 KVIDTLTCGFADLMGY **IPLVGAPLGGAARALAHGVRVLEDGVNYATGNLPGCSFSIFLLA**
LLSCLTIPASA

Figura 38: Sequência codificadora do *core* VHC. **(A):** região de amplificação 408pb, a localização dos oligo-iniciadores em negrito (1) e (2), região de amplificação 573pb, a localização dos oligo-iniciadores em negrito: (1) e (3); **(B):** sequência parcial do *core* do VHC de 136 aminoácidos; **(C):** sequência completa do *core* do VHC de 191 aminoácidos, a região em destaque representa os aminoácidos hidrofóbicos presentes na porção C-terminal.

A

```

AGCGGATACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAACCATGGGCAG
CAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGTGTGCCGCGGCAGGCCATATGAGCACAAATC
CTAAACCTCAAAGAAAAACCAAACGTAACACCAACCGCCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCAGGGC
GGTGGTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACCTGTTGCCGCGCAGGGGCCCCAGGTTGGGTGTGCGCGCG
ACTAAGAAGACTTCCGAGCGGTCGCAACCTCGTGGACGGCGACAACCTATCCCCAAGGCTCGTCGG
CCCGAGGGCAGGGCCTGGGCTCAGCCCGGGTACCCTTGCCCCCTCTATGGCAATGAGGGCATGGG
GTGGGCAGGATGGCTCCTGTACCTCGCGGGCTCTCGGCCTAGTTGGGGCCCCACTGACCCCCGGC
GTAGGTCGCGTAATTTGGGTAAAGTCATCGATACCCTCACATGCGGCTTCGCCGACCTCATGGGGT
AC

```

B

```

AGCGGATACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAACCATGGGCAG
CAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGTGTGCCGCGGCAGGCCATATGAGCACAAAT
CCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAACGTAACACCAACCGCCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCAGGG
CGGTGGTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACCTGTTGCCGCGCAGGGGCCCCAGGTTGGGTGTGCGCGC
GACTAGGAAGACTTCCGAGCGGTCGCAACCTCGTGGACGGCGACAACCTATCCCCAAGGCTCGTCG
GCCCCAGGGCAGGGCCTGGGCTCAGCCCGGGTACCCTTGCCCCCTCTATGGCAATGAGGGCATGG
GGTGGGCAGGATGGCTCCTGTACCTCGCGGGCTCTCGGCCTAGTTGGGGCCCCACTGACCCCCGGC
GTAGGTCGCGTAATTTGGGTAAAGTCATCGATACCCTCACATGCGGCTTCGCCGACCTCATGGGGT
ACATTCCGCTCGTCGCGCCCCCTAGGGGGCGCTGCCAGGGCCCTGGCGCATGGCGTTCCGGGTTTC
TGGAGGACGGCGTGAACCTATGCAACAGGAATTTGCCCGGTTGCTCTTTTTCTATCTTCTCTTGGCT
CTGCTGTCCTGTTTGACCATCCCACTTTCGGCTTAAGGAT

```

Figura 39: Sequenciamento do gene do *core* do VHC clonado no pET28a. (A): gene *core* VHC de 408pb; (B): gene do *core* VHC de 573pb. As regiões em destaque correspondem: (1): ATG iniciador, (2): sequência codificadora de 6 resíduos de Histidina, (3): GTG, provável códon iniciador que poderia estar sendo utilizado após a sequência de Histidina, (4): oligonucleotídeo senso, (5): oligonucleotídeo anti-senso.

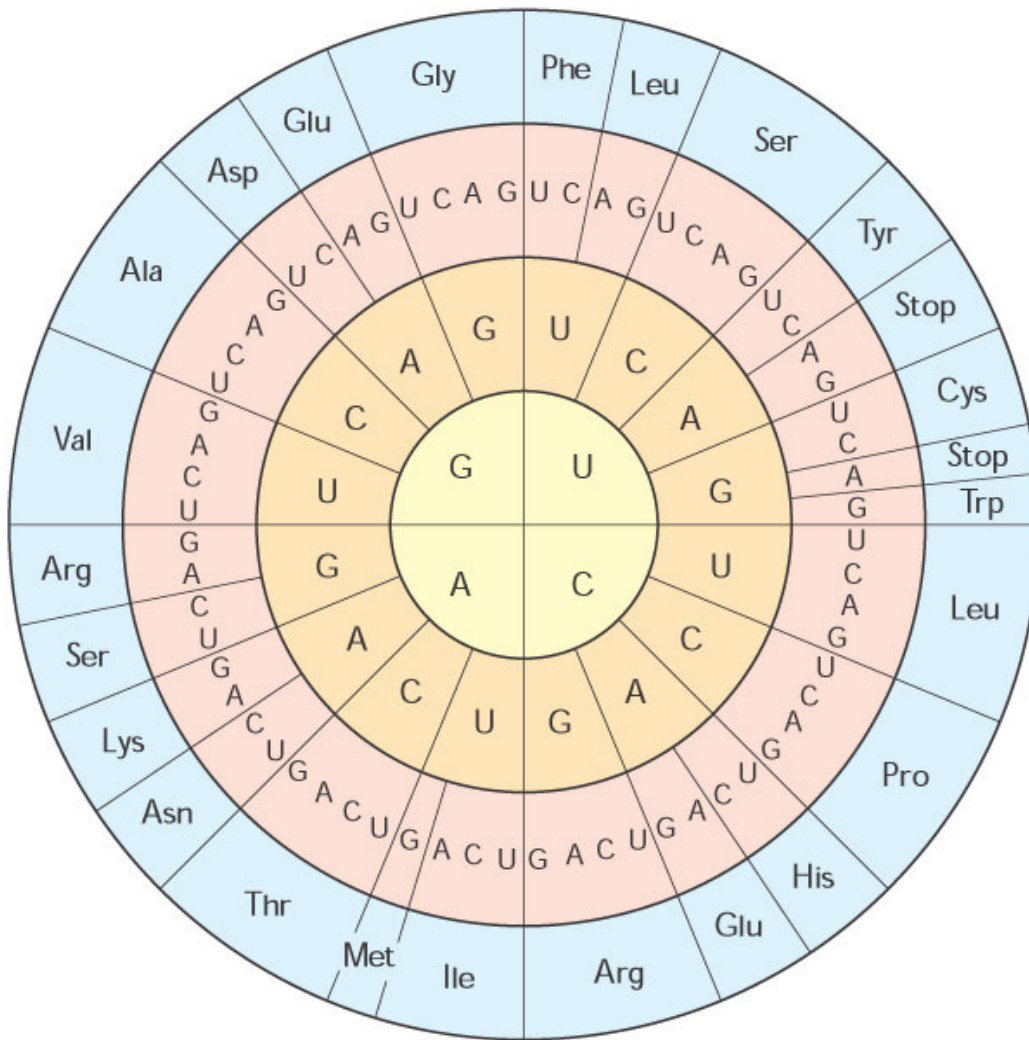


Figura 40: representação esquemática código genético e os aminoácidos codificados.
 Extraído de <http://www.nicksnowden.net/>

Tabela 7: Abreviação dos aminoácidos

Aminoácido	Peso Molecular g/mol	Abreviação de Três Letras	Abreviação de Uma Letra
Ácido Aspártico	133	Asp	D
Ácido Glutâmico	147	Glu	E
Alanina	89	Ala	A
Arginina	174	Arg	R
Asparagina	132	Asn	N
Cisteína	121	Cys	C
Fenilalanina	165	Phe	F
Glicina	75	Gly	G
Glutamina	146	Gln	Q
Histidina	155	His	H
Isoleucina	131	Ile	I
Leucina	131	Leu	L
Lisina	146	Lys	K
Metionina	149	Met	M
Prolina	115	Pro	P
Serina	105	Ser	S
Tirosina	181	Tyr	Y
Treonina	119	Thr	T
Triptofano	204	Trp	W
Valina	117	Val	V

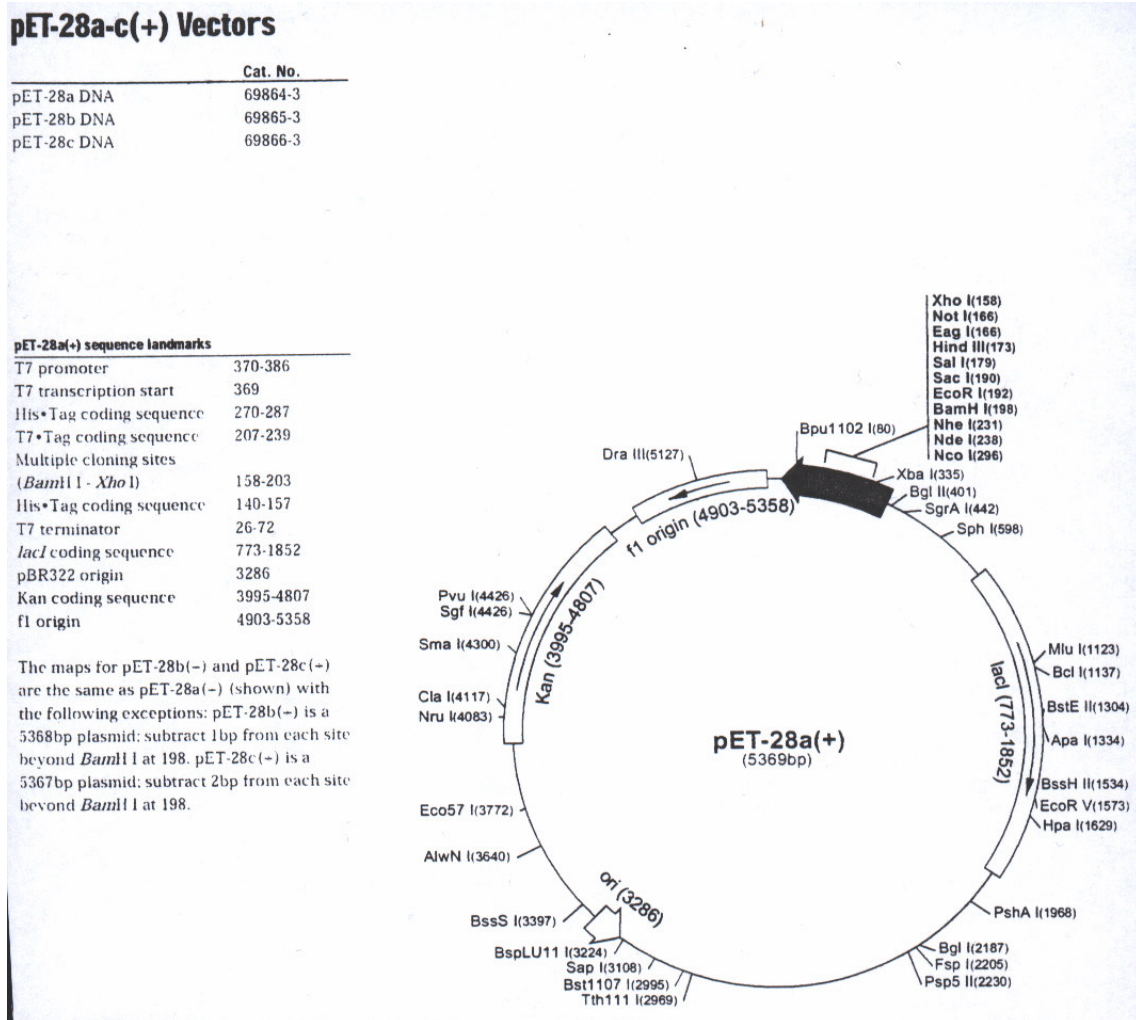


Figura 41: Representação esquemática do vetor pET28a.

pET-42a-c(+) Vector

	Cat. No.
pET-42a(+) DNA	70561-3
pET-42b(+) DNA	70562-3
pET-42c(+) DNA	70563-3

pET-42a(+) sequence landmarks	
T7 promoter	1164-1180
T7 transcription start	1163
GST*Tag coding sequence	433-1092
His*Tag coding sequence	394-411
S*Tag coding sequence	307-351
Multiple cloning sites (PshAI-XhoI)	174-264
His*Tag coding sequence	150-173
T7 terminator	26-72
lacI coding sequence	1571-2653
pBR322 origin	3847
Kan coding sequence	4556-5371
F1 origin	5471-5918

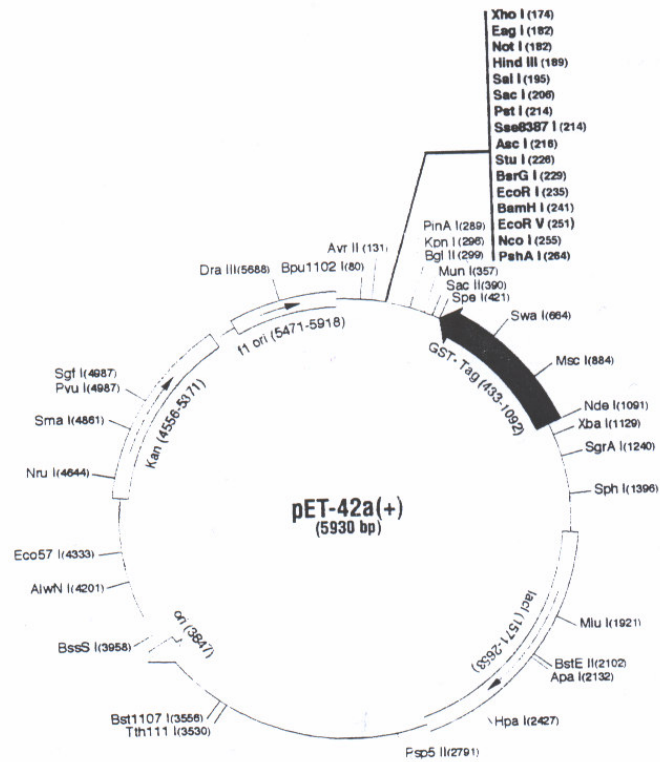
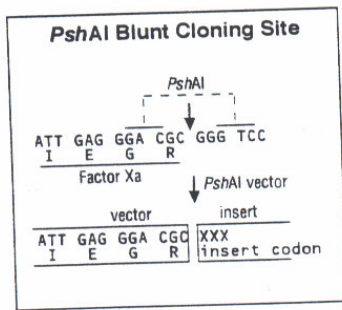


Figura 42: Representação esquemática do vetor pET42a.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)