

SANDRA ANTONIA TAGLIAVINI SANTOS

**Clonagem e expressão da proteína do *core* do vírus da
hepatite C para o desenvolvimento de métodos aplicados
ao diagnóstico viral**

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Hideko Yamanaka

Araraquara

2006

DEDICO ESTE TRABALHO...

À **DEUS**, pela paz, conforto e determinação que me concedeu nos momentos de dificuldades e indecisões e pelo maravilhoso DOM DA VIDA.

Aos meus pais **Francisco** (em memória) e **Benedita**, que sempre estiveram e estarão presentes em minha vida, através de seus ensinamentos, que sempre serão a base de tudo.

Ao **Everton**, pelo amor e pelo incentivo em todos os momentos desta minha caminhada.

Aos **meus irmãos e a toda minha família**, que sempre acreditaram em mim e me apoiaram em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista-UNESP (Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Instituto de Química), pela estrutura física e operacional que permitiu a realização dessa dissertação.

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, pelo apoio, amizade, orientação e incentivo no decorrer deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva, pela receptividade em seu laboratório na Universidade Federal de São Carlos e pela orientação que muito contribuiu para este trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Hideko Yamanaka, pela co-orientação e discussão dos resultados que contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao grupo da eletroanalítica, pela troca de experiências e pelo convívio agradável, em especial, a Carla, Carolina, Marcela e Paulo.

Aos alunos do Laboratório de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos Viviane, Andréa, César e em especial Luis Reyes pela amizade e auxílio em algumas fases do trabalho.

Às minhas amigas Ângela Yumico Mikawa e Fátima Aparecida Iagama pela amizade e estímulo nos momentos difíceis.

Aos amigos, colegas e funcionários do laboratório e a todas as pessoas que em tantas e significativas formas contribuíram para a realização deste trabalho.

DADOS CURRICULARES
Sandra Antonia Tagliavini Santos

1. DADOS PESSOAIS

1.1. Data de Nascimento: 07/04/1973

1.2. Nacionalidade: Brasileira

1.3. Naturalidade: Matão

1.4. Filiação: Francisco de Assis Tagliavini

Benedita Ricci

1.5. Profissão: Farmacêutica-Bioquímica

1.6. Endereço Residencial : Rua Pastor Lester Stoner Ebersole, 779, CEP 15991-272 - Matão
– SP; Jardim Imperador

1.7. e-mail: tagliavinisa@yahoo.com.br

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

2.1. 2002 –2006: Doutorado em Biotecnologia: Universidade Estadual Paulista-UNESP- Instituto de Química de Araraquara-SP. Título: Clonagem e expressão de proteínas do *core* do vírus da hepatite C para o desenvolvimento de métodos aplicados ao diagnóstico viral. Orientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa. Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Hideko Yamanaka.

2.2. 1999 – 2001: Mestrado em Biotecnologia: Universidade Estadual Paulista-UNESP- Instituto de Química de Araraquara-SP. Título: Identificação de polipeptídios relacionados com nível de expressão gênica diferencial entre estirpes de *Xylella fastidiosa* isoladas de plantas de citros e café. Orientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa.

2.3. 1994 – 1998: Graduação em Farmácia-Bioquímica. Universidade Estadual Paulista-UNESP- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Campus de Araraquara-SP.

3. ESTÁGIOS

3.1. 1996 – 1998: Iniciação Científica (PIBIC/CNPQ) no Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara-SP. Pesquisa: "Interação da *Yersinia enterocolitica* com Macrófagos Peritoneais", sob orientação de Prof. Dra. Iracilda Carlos Zeppone.

3.2. Agosto/98 a Janeiro/99: No Departamento Científico do Fundecitrus, Araraquara, SP, em um total de 1.130 horas. Atividades desenvolvidas: Trabalhos em campo e laboratório, relacionados aos temas pesquisados pelo Departamento Científico: Diagnóstico de *Xylella fastidiosa* (isolamento, microscopia, ELISA e PCR).

3.3. 01/02 a 30/06 de 2005: Estágio Docência: Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara-SP.

3.4. 01/08 a 30/11 de 2005: Estágio Docência: Laboratório de Epidemiologia e Saúde Pública da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara-SP.

4. SEMINÁRIOS, PALESTRAS E CURSOS PROFERIDOS

4.1. Aulas de Biologia Molecular e Imunologia ministradas no curso de Especialização em Análises Clínicas da Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente-SP, no período de fevereiro de 2002 a abril de 2003.

4.2. Apresentação de seminário geral intitulado: “Aplicação de proteínas recombinantes no diagnóstico de infecções virais”, como pré-requisito para defesa de tese dentro do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

5. TRABALHOS PUBLICADOS EM CONGRESSOS

- 5.1. TAGLIAVINI, S.A.; MIKAWA, A.Y.; COSTA, P.I.; BATISTA, G.M.; HIGA, E.; NAGANO, M.H. "Expressão Gênica Diferencial em *Xylella fastidiosa*". 46ª Jornada Farmacêutica da UNESP, Araraquara, 1999.
- 5.2. NAGANO, M.H.; COSTA, P.I.; BATISTA, G.M.; HIGA, E.; MIKAWA; A.Y.; TAGLIAVINI, S.A.; FRANCO, C.F.; TROTTI, K.V. "Análise e Seqüenciamento de um Produto Específico de Amplificação do DNA Genômico da Bactéria *Xylella fastidiosa*". 46ª Jornada Farmacêutica da UNESP, Araraquara, 1999.
- 5.3. MIKAWA, A.Y.; TAGLIAVINI, S.A.; COSTA, P.I.; BATISTA, G.M.; HIGA, E.; NAGANO, M.H. "Frequência de Heterozigose para Gene *ccr5* entre Doadores de Sangue/Hemoderivados". 46ª Jornada Farmacêutica da UNESP, Araraquara, 1999.
- 5.4. HIGA, E.; BATISTA, G.M.; COSTA, P.I.; CÉSAR, T.B.; KITAMURA, M.; NAGANO, M.H.; MIKAWA; A.Y.; TAGLIAVINI, S.A.; FRANCO, C.F.; TROTTI, K.V. "Estudo das Medidas Antropométricas entre Doadores de Sangue/Hemoderivados". 46ª Jornada Farmacêutica da UNESP, Araraquara, 1999.
- 5.5. HIGA, E.; BATISTA, G.M.; CÉSAR, T.B.; COSTA, P.I.; NAGANO, M.H.; FRANCO, C.F.; MIKAWA; A.Y.; TAGLIAVINI, S.A.; LIMA, O.L. "Avaliação Antropométrica em Portadores da Infecção pelo HIV-1". 46ª Jornada Farmacêutica da UNESP, Araraquara, 1999.
- 5.6. BATISTA, G.M.; HIGA, E.; COSTA, P.I.; CÉSAR, T.B.; NAGANO, M.H.; FRANCO, C.F.; MIKAWA; A.Y.; TAGLIAVINI, S.A.; LIMA, O.L. "Avaliação Nutricional Qualitativa de Portadores da Infecção pelo HIV-1". 46ª Jornada Farmacêutica da UNESP, Araraquara, 1999.
- 5.7. TAGLIAVINI, S.A.; MIKAWA, A.Y.; COSTA, P.I. "Variabilidade de Expressão Gênica entre Isolados de *Xylella fastidiosa* de citros e café". XV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, Caxambu, 2000.

- 5.8. MIKAWA, A.Y.; TAGLIAVINI, S.A.; COSTA, P.I. "Análise do Polimorfismo do Gene *ccr5* em Portadores do Vírus HIV-1 e Doadores de Sangue". XV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, Caxambu, 2000.
- 5.9. MIKAWA, A.Y.; COSTA, P.I.; TAGLIAVINI, S.A. "*ccr5* heterozygosity doesn't confer advantage over the HIV-1 plasma viremia". 3º Congresso de Ciências Farmacêuticas, Águas de Lindóia, 2001. (publicação do resumo na revista *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, páginas 27-28, volume 13 Suppl. 1, Abril 2001).
- 5.10. MIKAWA, A.Y.; TAGLIAVINI, S.A.; COSTA, P.I. "Aumento dos níveis de RANTES em portadores do vírus HIV-1". XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, Caxambu, 2001.
- 5.11. TAGLIAVINI, S.A. "Antinuclear antibodies in Presidente Prudente patients suspected of connective tissue diseases". XXVII Meeting of the Brazilian Society of Immunology, Salvador, 2002.
- 5.12. TAGLIAVINI, S.A.; MIKAWA, A.Y.; ABRÃO, E.P; MALAVAZI, I. "Frequência e implicações dos fatores reumatóides em Hepatites virais". XII Congresso Brasileiro de Infectologia, Goiânia, 2003.
- 5.13. MIKAWA, A.Y.; MALAVAZI, I; ABRÃO, E.P; TAGLIAVINI, S.A.; COSTA, P.I. "Correlação entre APO E, quimiocinas e perfil imunológico e virológico em indivíduos infectados pelo HIV-1". XII Congresso Brasileiro de Infectologia, Goiânia, 2003.
- 5.14. MALAVAZI, I; MIKAWA, A.Y.; ABRÃO, E.P; TAGLIAVINI, S.A.; COSTA, P.I. "Polimorfismo no gene da MTHFR influencia concentração de vitamina B12 em indivíduos infectados pelo HIV-1". XII Congresso Brasileiro de Infectologia, Goiânia, 2003.
- 5.15. MIKAWA, A.Y.; TAGLIAVINI, S.A.; REYES, L. F.; HENRIQUE-SILVA, F.; COSTA, P.I. "Frequência dos Genótipos do Vírus da Hepatite C. ". XII Congresso Brasileiro de Infectologia, Goiânia, 2005.

- 5.16. TAGLIAVINI, S.A.; MIKAWA, A.Y.; REYES, L. F.; HENRIQUE-SILVA, F.; COSTA, P.I. “Expression, purification and immunological studies of GST-HCV core protein”. 5th. International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2005.

6. TRABALHOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

- 6.1. NOGAROTO, V. ; TAGLIAVINI, S. A. ; GIANOTTI, A. ; MIKAWA, A. Y. ; BARROS, N. ; PUZZER, L. ; CARMONA, A. ; COSTA, Paulo Inacio da ; HENRIQUE-SILVA, F. Recombinant expression and characterization of a *Xylella fastidiosa* cysteine protease differentially expressed in a non-pathogenic strain. *Fems Microbiology Letters*, 2006.
- 6.2. MIKAWA, A. Y. ; MALAVAZI, Iran ; TAGLIAVINI, Sandra Antonia ; ABRÃO, Emiliana Pereira ; COSTA, Paulo Inacio da . b-Chemokines MIP-1a, RANTES, lipoprotein metabolism in HIV-infected Brazilian patients. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, Salvador, v. 9, n. 3, p. 315-323, 2005.
- 6.3. MIKAWA, A. Y. ; TAGLIAVINI, S. A. ; COSTA, Paulo Inacio da . CCR5 Genotype and Plasma Beta-Chemokine Concentration of Brazilian HIV-1- Infected Individuals. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Brasil, v. 35, n. 11, p. 1333-1337, 2002.

7. ORIENTAÇÃO EM TRABALHOS CIENTÍFICOS

- 7.1. Trabalho de Iniciação Científica no curso de Farmácia e Bioquímica: “Análise de imunorreatividade diferencial entre cepas de *Streptococcus pyogenes*”:, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, UNOESTE- Presidente Prudente, de fevereiro de 2002 a abril de 2003.
- 7.2. Monografia do Curso de Especialização em Análises Clínicas: “Estudo Comparativo de métodos de detecção de anticorpos antinucleares em soros de pacientes com suspeita de doenças auto-imunes”, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, UNOESTE- Presidente Prudente, de outubro de 2002 a abril de 2003.

- 7.3. Monografia de conclusão do curso de Farmácia e Bioquímica: “Caracterização de proteínas imunorreativas do *Streptococcus pyogenes* através de Western blot”, de fevereiro de 2002 a abril de 2003.
- 7.4. Monografia de conclusão do curso de Farmácia e Bioquímica: “Análise do perfil protéico do *Streptococcus pyogenes* em gel de poliacrilamida SDS-PAGE”, de fevereiro de 2002 a abril de 2003

RESUMO

O presente trabalho refere-se ao desenvolvimento de duas metodologias: imobilização da proteína do *core* do vírus da Hepatite C (VHC) em matriz híbrida siloxano-poli (propileno óxido) como suporte sólido para ELISA e um imunossensor amperométrico para detecção de anticorpos anti-VHC. Para atingir este objetivo, o RNA-VHC extraído de amostras de soro (genótipo 1b) foi submetido à técnica de RT-PCR e posterior amplificação da seqüência de 408pb do *core* do VHC. Este produto foi clonado em vetor pET42a. O vetor recombinante foi introduzido em bactérias da linhagem BL21 (DES). Após o cultivo das colônias, a indução foi realizada em concentração final de 0,4mM de IPTG. As bactérias foram lisadas e as frações solúvel e insolúvel, analisadas em gel de poli-acrilamida 15%, mostrando uma banda aparente de 44kDa, tamanho esperado da proteína recombinante fusionada a GST. A proteína recombinante do *core* foi purificada e confirmada por imunodeteção utilizando soro positivo para VHC e apresentou ausência de reatividade cruzada com amostras positivas para outras doenças infecciosas. Na primeira metodologia, a proteína do *core* foi imobilizada em matriz híbrida siloxano-poli (propileno óxido) preparada por sol-gel como suporte sólido em teste de ELISA para a detecção de anticorpos anti-VHC. As condições adequadas para o estabelecimento desta técnica envolveram 1,25ng da proteína/disco, conjugado com peroxidase na diluição 1:10000 e diluição do soro de 1:40. Este procedimento foi comparado ao ELISA convencional. O desenvolvimento desta matriz híbrida para imunodeteção mostrou bom desempenho, reprodutibilidade e simplicidade durante a síntese, sendo vantajoso para aplicação comercial. A segunda metodologia envolveu a imobilização da proteína do *core* em matriz híbrida siloxano-poli (propileno óxido) preparada por sol-gel e depositada na superfície de eletrodos de grafite por “dip-coating” para o desenvolvimento de um imunossensor amperométrico. A reação de afinidade entre o antígeno imobilizado e o anticorpo anti-VHC, presente em soros positivos, foi monitorada com soro anti-IgG humana conjugado com peroxidase. A enzima, na presença de peróxido de hidrogênio e iodeto de potássio, catalisa a formação de I₂ cuja intensidade de corrente de redução foi monitorada a -450 mV. Os melhores resultados foram obtidos nas seguintes condições: diluições de 1:1600, 1:40, 1:10000 para antígeno, anticorpos primário e secundário, respectivamente; concentrações de 1×10^{-4} e 3×10^{-4} mol L⁻¹ para H₂O₂ e KI respectivamente. O limiar de reatividade foi de -0.126 μ A. O imunossensor mostrou alto potencial de aplicação em diagnóstico sorológico pela ausência de reatividade cruzada em amostras positivas para outras doenças infecciosas.

Palavras-Chave: vírus da hepatite C, proteína do *core*, matriz híbrida siloxano-poli (propileno óxido), fase sólida, imunossensor.

ABSTRACT

The present work reports the development of two methodologies: hepatitis C virus core protein immobilization into hybrid matrix siloxane-polypropyleneglycol prepared by sol-gel process used as solid phase in ELISA and an amperometric immunosensor for detection of antibodies anti-VHC. Toward to achieve this aim, the HCV RNA from serum (genotype 1b) was submitted to RT-PCR technique and subsequent amplification of the HCV core 408pb. This product was cloned into pET42a vector. The recombinant plasmid was transformed into BL21 (DES) cell line strain. Cell cultures were grown and induced with final concentration of 0,4mM of IPTG. 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 recombinant protein. The recombinant protein was purified and confirmed by immunological detection using HCV positive serum and showed absence of cross reactivity with positive samples for others infectious diseases. In the first methodology, the core protein immobilization into hybrid matrix siloxane-polypropyleneglycol prepared by sol-gel process was used as solid phase in ELISA for detection of antibodies anti-VHC antibody. 1,25ng protein per disc, a peroxidase conjugate dilution of 1:10000 and a serum dilution of 1:40 were adequate for the establishment of the procedure. This procedure performance of the siloxane-polypropyleneglycol discs as a matrix for immunodetection, showed easy synthesis, good performance and reproducibility for commercial application. The second consisted on the immobilization of core protein into hybrid matrix siloxane-polypropyleneglycol prepared by sol-gel process and deposited on the pencil graphite electrode surface by dip-coating process for development of an amperometric immunosensor. The affinity reaction between immobilized antigen and antibody anti-HCV, present in positive serum, was monitored by anti-IgG peroxidase conjugate. This enzyme, in the presence of hydrogen peroxide and potassium iodide, catalyses the formation of I_2 which reduction current intensity measurement was carried out at -450 mV. The best results were obtained with the following conditions: dilutions of 1:1600, 1:40, 1:10000 for antigen, primary antibody and secondary antibody, respectively; 1×10^{-4} e 3×10^{-4} mol L⁻¹ for H₂O₂ and KI concentrations, respectively. The threshold of reactivity was -0.126 μ A. The immunosensor showed high application in serological diagnosis because of the absence of cross reactivity with positive samples for others infectious diseases.

Keywords: hepatitis C virus, core protein, hybrid matrix siloxane-polypropyleneglycol, solid phase, immunosensor.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO	16
I. 1. HEPATITE C	17
I. 1. 1. Histórico	17
I. 1. 2. Epidemiologia	17
I. 1. 3. Organização do genoma viral	18
I. 1. 4. Variabilidade genética	20
I. 1. 5. História natural	21
I. 1. 6. Diagnóstico	21
I. 1. 6. 1. Testes sorológicos	22
I. 1. 6. 2. Testes moleculares	23
I. 2. BIOSSENSORES	24
CAPÍTULO II: OBJETIVOS	27
CAPÍTULO III: MATERIAIS E MÉTODOS	29
III.1. FLUXOGRAMA DE TRABALHO	30
III. 2. AMOSTRAS	31
III. 3. TESTE QUALITATIVO PARA DETECÇÃO DO RNA-VHC	31
III. 3. 1. Preparação da amostra	31
III. 3. 2. Transcrição reversa e amplificação por PCR	32
III. 3. 2. 1. Seleção do alvo	32
III. 3. 2. 2. Transcrição reversa	32
III. 3. 2. 3. Amplificação do alvo	32
III. 3. 2. 4. Processo de hibridização	34
III. 3. 3. Detecção espectrofotométrica	34
III. 3. 4. Interpretação dos resultados	35
III. 4. GENOTIPAGEM DO VHC	36
III. 4. 1. Transcrição reversa e amplificação por PCR	36
III. 4. 2. Desnaturação e hibridização	36
III. 4. 3. Revelação colorimétrica da reação	37
III. 5. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DO CORE VIRAL	38

III. 5. 1. Síntese dos oligonucleotídeos iniciadores	39
III. 5. 2. Reação de extração do RNA viral	40
III. 5. 3. Reação de transcrição reversa do RNA-VHC	40
III. 5. 4. Amplificação do fragmento de 408pb da proteína do <i>core</i> viral	41
III. 5. 4.1. Reação de polimerização em cadeia (PCR) utilizando cDNA	41
III. 5. 4. 2. Reação de Hemi- Nested PCR	42
III. 5. 4. 3. Reação de amplificação do fragmento de 408pb contendo sítios de restrição	42
III. 5. 5. Reação de ligação do produto amplificado aos vetores pET28a e pET42a	43
III. 5. 6. Transformação das bactérias	44
III. 5. 7. Seleção dos clones recombinantes	44
III. 5. 8. Sequenciamento	44
III. 5. 9. Expressão gênica	45
III. 5. 9. 1. Indução da expressão gênica	48
III. 5. 9. 2. Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes	48
III. 5. 9. 3. Teste de solubilidade da proteína recombinante	49
III. 6. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA DO <i>CORE</i> VIRAL	49
III. 6 . 1. Purificação da proteína HIS- <i>core</i>	49
III. 6 . 2. Purificação da proteína HIS- <i>core</i> em condições desnaturantes	50
III. 6. 3. Purificação da proteína GST- <i>core</i>	50
III. 6. 4 . Dosagem de proteínas	51
III. 7. ANÁLISE DA IMUNORREATIVIDADE DA PROTEÍNA DO <i>CORE</i>	51
III. 7. 1. <i>Western blot</i>	51
III. 7. 2. <i>Slot blot</i>	52
III. 8. APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	53
III. 8. 1. Produção e purificação de anticorpos anti- <i>core</i> VHC	53
III. 8. 2. Método de ELISA com imobilização em placa de poliestireno	54
III. 8. 3. Desenvolvimento de um teste de ELISA utilizando discos de siloxano-poli (propileno óxido) como suporte sólido	55
III. 8. 3. 1. Síntese do precursor siloxano-poli (propileno óxido- PPO 300	55
III. 8. 3. 2. Preparação dos discos poliméricos	56

III. 8. 3. 3. Imobilização da proteína recombinante do <i>core</i> do vírus da hepatite C nos discos híbridos siloxano-poli (propileno óxido)	56
III. 8. 3. 4. Reação de ELISA	57
III. 8. 4. Construção do imunossensor	
III. 8. 4. 1. Monitoramento amperométrico da enzima peroxidase	58
III. 8. 4. 2 . Síntese dos precursores PPO 300	58
III. 8. 4. 3. Preparação e deposição dos filmes poliméricos sobre a superfície dos eletrodos de grafite	58
III. 8. 4. 4. Imobilização da proteína GST- <i>core</i> no filme polimérico por adsorção	59
III. 8. 4. 5. Verificação da reação imunoenzimática na superfície do eletrodo de grafite contendo filme PPO 300 através de técnicas amperométricas	59
III. 8. 4. 6. Otimização do imunossensor amperométrico	60
III. 8. 4. 6.1. Estudo das diluições da proteína recombinante e do anticorpo primário na resposta do imunossensor	60
III. 8. 4. 6.2. Estudo do tempo de incubação dos anticorpos primários e secundários	62
III. 8. 4. 7. Determinação do limiar de reatividade (“cut off”) no imunossensor amperométrico	62
III. 8. 4. 8. Aplicação do imunossensor amperométrico em soros de pacientes com infecção pelo VHC e com doenças inflamatórias e infecciosas	62
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
IV. 1. Extração do RNA viral e obtenção do cDNA	64
IV. 2. Amplificação	
IV. 3. Clonagem do fragmento de 408pb no vetor pET28a e indução da expressão gênica	65
IV. 4. Teste de solubilidade da proteína HIS- <i>core</i>	66
IV. 5. Purificação de proteína HIS- <i>core</i> em condições não desnaturantes	66
IV. 6. Purificação de proteína HIS- <i>core</i> em condições desnaturantes	67
IV. 7. Clonagem do fragmento de 408pb no vetor pET42a e indução da expressão	68

IV. 8. Teste de solubilidade da proteína GST- <i>core</i>	69
IV. 9. Purificação de proteína GST- <i>core</i> por cromatografia de afinidade a glutathiona	69
IV. 10. Análise da imunorreatividade da proteína do <i>core</i>	71
IV. 10. 1. <i>Western blot</i>	71
IV. 10. 2. <i>Slot blot</i>	71
IV. 11. Aplicação biotecnológica da proteína recombinante	74
IV. 11. 1. Análise de imunorreatividade entre os anticorpos policlonais produzidos e purificados e a proteína recombinante GST- <i>core</i>	74
IV. 11. 2. Método de ELISA com imobilização em placa de poliestireno	75
IV. 11. 3. Desenvolvimento de um teste de ELISA utilizando discos de siloxano-poli(propileno óxido) como suporte sólido	77
IV. 11. 4. Construção do imunossensor amperométrico	79
IV. 11. 4. 1. Estudos prévios do monitoramento da enzima peroxidase por técnicas eletroanalíticas	79
IV. 11. 4. 2. Verificação da reação imunoenzimática na superfície do eletrodo de grafite contendo filme PPO 300 através de técnicas amperométricas	80
IV. 11. 4. 3. Estudo das diluições da proteína recombinante e do anticorpo primário na resposta do imunossensor	81
IV. 11. 4. 4. Estudo do tempo de incubação dos anticorpos primários e secundários	82
III. 11. 4. 5. Aplicação do imunossensor amperométrico em soros de pacientes com infecção pelo VHC e com doenças inflamatórias e infecciosas	84
CAPÍTULO V: CONCLUSÕES	86
CAPÍTULO VI: REFERÊNCIAS	88

Capítulo I

Introdução

I. 1. HEPATITE C

I. 1. 1. HISTÓRICO

Os agentes etiológicos da hepatite A e B foram descobertos nas décadas de 60 e 70, porém um outro agente de transmissão parenteral e responsável pela maioria das hepatites não-A e não-B permanecia indeterminado (BARTENSCHLAGER et al., 2000).

No ano de 1967, Blumberg e et al demonstraram que os anticorpos presentes no soro de pacientes submetidos a múltiplas transfusões sanguíneas reagem com antígenos presentes no soro de aborígenes australianos. Esse antígeno foi denominado de Austrália (AgAu), sendo que em 1968 os mesmos pesquisadores descobriram a relação desse antígeno com as hepatites virais. Posteriormente, o AgAu foi utilizado em testes de triagem de doadores em bancos de sangue (ALTER, 1999). Neste mesmo ano de 1967 Krugman et al., comprovaram a existência de dois agentes etiológicos distintos que causavam hepatite denominados de MS1 (“agente infeccioso”) e MS2 (“presente no soro”), sendo posteriormente denominados de vírus da hepatite A e B, respectivamente.

Após esses estudos iniciais, aproximadamente nenhum caso de hepatite associada às transfusões sanguíneas foi relacionado à hepatite A, uma vez que a transmissão do VHA se dá por via fecal-oral, 25% foram atribuídas ao vírus da hepatite B (VHB) e 75 % permaneciam sem um agente etiológico definido. Portanto, o termo hepatite não-A e não-B (HNANB) foi introduzido por Prince et al. (1974) para classificar esses casos (ALTER, 1999).

Choo et al. (1989) juntamente com pesquisadores da empresa *Chiron Corporation* e do CDC (*Center for Disease Control*) realizaram a clonagem e expressão de proteínas do genoma viral do agente causador da HNANB, cujo RNA foi extraído de chimpanzés infectados. O agente etiológico foi denominado de vírus da hepatite C (VHC). Desde então, vários testes sorológicos foram desenvolvidos utilizando várias regiões estruturais e não-estruturais do genoma do VHC concluindo-se que a maioria dos casos de HNANB era causada pelo VHC (ALTER, 1999).

I. 1. 2. EPIDEMIOLOGIA

A infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) é considerada um grave problema de saúde pública da atualidade, devido a sua elevada taxa de 80% para evolução crônica e alta prevalência de 0,5 a 15% entre doadores de sangue (CVE, 2000). No mundo, são cerca de

170 milhões de portadores crônicos da hepatite C, constituindo a principal causa de transplante de fígado. No Brasil, existem 5 milhões de portadores do VHC, cerca de 90 % não sabem que estão infectados e/ou não estão em tratamento e muitos evoluirão para cirrose e/ou câncer de fígado. Um estudo de base populacional realizado na cidade de São Paulo encontrou incidência de 1,4%, estimando a existência de 136.000 pessoas infectadas, o que colocaria São Paulo no grupo dos municípios de endemicidade intermediária, semelhante à média norte americana (CVE, 2000).

A transmissão do vírus se dá parenteralmente através de exposições ao sangue e hemoderivados contaminados. Portanto, os grupos que representam maior risco de contaminação pelo vírus são os indivíduos que são submetidos à transfusão sanguínea e transplante de órgãos, principalmente os que sofreram transfusão antes de Junho de 1992, profissionais da área da saúde expostos a materiais contaminados, principalmente pérfuro-cortantes e usuários de drogas intravenosas ilícitas que compartilham seringas e agulhas contaminadas (STRAUSS, 2001; BONKOVSKY e MEHTA, 2001). Algumas evidências indicam que a hepatite C também apresenta transmissão sexual correspondendo a uma baixa porcentagem de 5%, mas ainda existem indivíduos infectados sem causa conhecida (aproximadamente 10%), incluídos em outras formas de infecção ainda não conhecidas (TAYLOR et al., 2000). A transmissão vertical com gestantes soropositivas é baixa e o fator de risco parece estar relacionado com a quantidade de RNA-VHC (BONKOVSKY, 2001). Ainda não foi comprovada a transmissão do VHC pelo leite materno, porém um consenso estabelecido pelo CDC não recomenda a amamentação por mães portadoras (BONKOVSKY, 2001).

Devido à grande diversidade genética do VHC, ainda não existe uma vacina eficaz contra este vírus (KRAHN et al., 2005). Portanto, as formas mais eficientes de prevenção são as adotadas por campanhas que orientam sobre as fontes de contaminação e triagem adequada em bancos de sangue. Atualmente, o Ministério da Saúde implantou o Programa Nacional para a Prevenção e o Controle das Hepatites Virais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

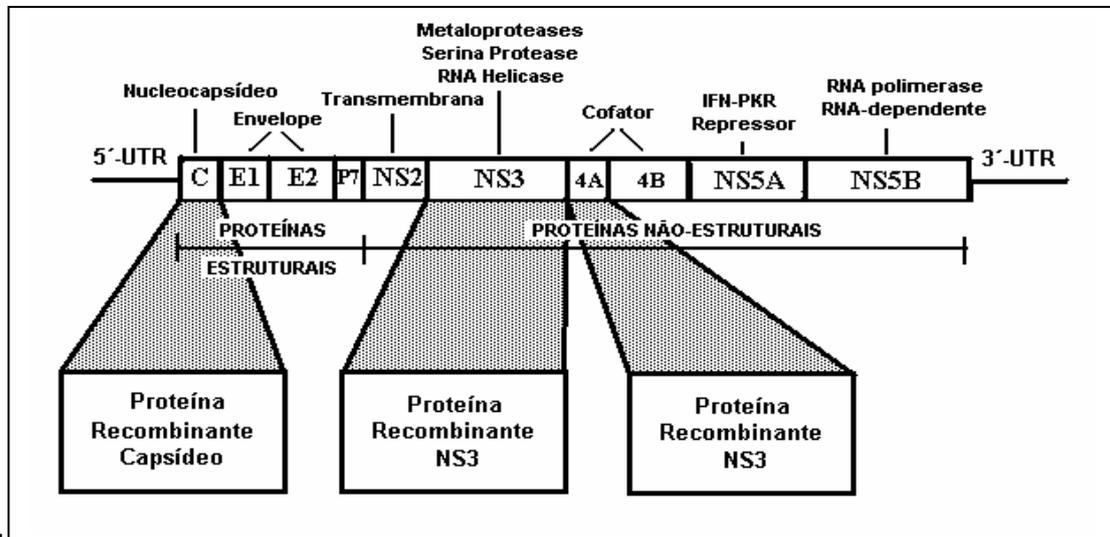
I. 1. 3. ORGANIZAÇÃO DO GENOMA VIRAL

O vírus da hepatite C (VHC) é um vírus envelopado e esférico com 40 a 60 nanômetros de diâmetro e foi classificado como o único membro do gênero *hepacivírus* da família *Flaviviridae*, que inclui as flaviviroses e as pestiviroses patogênicas (TAYLOR,

2000). Seu genoma consiste de RNA de fita simples positiva de aproximadamente 9500 nucleotídeos apresentando regiões curtas não traduzidas em ambos terminais 5' e 3'-UTR ("untranslated regions"), flanqueando uma única seqüência codificadora (ORF: "Open Reading Frame") (TAYLOR, 2000). Esta *orf* codifica uma poliproteína precursora de aproximadamente 3010 aminoácidos que é clivada por um sinal do hospedeiro e pelas proteases virais, gerando pelo menos 10 diferentes proteínas estruturais e não estruturais (BARTENSCHLAGER, 2000) (Figura 1). Proteínas estruturais virais são derivadas da região 5' do RNA genômico, e as proteínas não estruturais da região 3'. A região estrutural consiste de 3 genes: o C (codifica proteínas do nucleocapsídeo - *core*), E1 e E2 (que codificam proteínas do envelope). A região não estrutural consiste de pelo menos quatro domínios (NS2-NS5) que codificam as proteínas funcionais, como as enzimas transcriptase reversa, replicase/helicase, serina protease e metaloproteinase (STADHOUDERS *et al.*, 1997).

A proteína do *core* possui seqüência de aminoácidos altamente conservada entre os diferentes isolados de VHC (KATO *et al.*, 1990), e estimula a produção de anticorpos pelo hospedeiro por ser uma proteína altamente imunogênica e, portanto, é utilizada no diagnóstico laboratorial para detecção de anticorpos anti-VHC. É uma proteína altamente 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 (KATO, 1990).

A região 5' UTR é altamente conservada e possui 341 nucleotídeos de extensão 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, nas proximidades do códon de iniciação da ORF, permitindo a tradução de proteínas virais (ROSENBERG, 2001). A 3'-UTR foi descoberta mais recentemente sendo dividida em três regiões: um segmento hipervariável de 416 nucleotídeos seguida do códon de terminação da ORF, uma seqüência de extensão variável rica em poli-U e uma região de 98 nucleotídeos altamente conservada e essencial para a replicação viral. Assim, a 3'-UTR possui uma estrutura secundária estável aparentemente relacionada à iniciação da replicação da fita negativa do RNA viral (ROSENBERG, 2001).



Erro:

Figura 1 - Representação esquemática da organização genômica do VHC.

(www-micro.msb.le.ac.uk).

I. 1. 4. VARIABILIDADE GENÉTICA

O genoma do VHC exibe variabilidade genética, como resultado de mutações espontâneas que ocorrem durante a replicação viral. Devido a essa variabilidade, um consenso de nomenclatura foi proposto por Simmonds e colaboradores em 1994. Os grupos genéticos principais foram designados como genótipos e numerados com numerais arábicos e os subtipos, dentro de um mesmo genótipo, foram designados por letras minúsculas por ordem de descoberta (SIMMONDS et al., 1994). Existem 6 genótipos e mais de 50 subtipos descritos (LIANG et al., 2000; STUMPF e PYBUS, 2002). Esta terminologia utilizada para descrever a complexidade, tipo e subtipo viral, envolve o grau de variabilidade nucleotídica: genótipos do VHC- RNA diferem, aproximadamente, 30 a 35 % em sua seqüência nucleotídica completa, 20 a 25 % para os subtipos (pertencentes a um mesmo genótipo), 5 a 10 % para isolados e menos de 2 % para quasispécies (STUMPF; PYBUS, 2002).

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 global. O subtipo 3a e o genótipo 5 são observados com maior prevalência em países da América do Sul, e, em menor prevalência, na

Europa e Estados Unidos. O genótipo 4 é endêmico no Egito, Gabão e em países do Oriente Médio e o genótipo 6 predomina em doadores de sangue nativos de Hong Kong (www.sbhepatologia.org.br). No Brasil, os mais frequentes são os genótipos 1, 2 e 3 (ALVARIZ, 2004).

A variabilidade genética do VHC pode influenciar em sua patogenicidade e na ação terapêutica e preventiva. Em particular, o subtipo 1b tem sido associado a maior severidade das doenças hepáticas, incluindo o carcinoma hepatocelular (STUMPF; PYBUS, 2002). Além disso, pacientes infectados com o VHC contendo o genótipo 1 podem ser mais resistentes ao tratamento com interferon comparado com os tipos 2 e 3 (ERENSOY, 2001).

I. 1. 5. HISTÓRIA NATURAL

Entre as pessoas infectadas pelo VHC, apenas 15% a 20% eliminam o vírus do organismo, os 80% a 85% restantes evoluem para infecção crônica, sob diferentes formas. Vários estudos demonstraram que 20% dos portadores crônicos evoluem para cirrose e entre 1,0% a 5,0% desenvolvem carcinoma hepatocelular (CVE, 2000). A hepatite crônica pode ser definida quando há uma persistência da elevação da enzima alanina-aminotransferase (ALT) ou persistência do RNA viral pelo menos por 6 meses (BONKOVSKY, 2001).

Diversos fatores podem influenciar na evolução da infecção da fase aguda para a crônica. Estes fatores incluem o tempo de infecção, subtipo viral, uso do álcool, carga viral, modo de infecção, co-infecção com outros vírus hepatotrópicos e associação com HIV (ALTER, 1999; WAWRZYNOWICZ-SYCZEWSKA et al., 2004).

A persistência da viremia favorece um dano hepático que pode progredir para cirrose. Aproximadamente 20% a 30% dos portadores de hepatite C crônica evoluem para cirrose após 10 a 20 anos de infecção (RODGER et al., 2000; BENVENU et al., 2004). Há maior risco de desenvolvimento de doença hepática progressiva em populações imunocomprometidas, incluindo pacientes transplantados. A raça também é um fator adicional que influencia a progressão para fibrose. Recentes estudos sugerem que americanos descendentes de africanos podem apresentar doença mais branda comparada aos caucasianos, mas possuem uma maior probabilidade de evolução para o carcinoma hepatocelular (SUGIMOTO et al., 2003).

I. 1. 6. DIAGNÓSTICO

Atualmente, o diagnóstico laboratorial da infecção pelo VHC consiste em testes sorológicos para a detecção de anticorpos anti-VHC e testes moleculares, que detectam e quantificam o RNA do vírus da hepatite C (RNA-VHC).

I. 1. 6. 1. TESTES SOROLÓGICOS

I. 1. 6. 1. 1. ELISA

O teste sorológico mais utilizado para a detecção dos anticorpos anti-VHC é o imunoenensaio enzimático (ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Este método consiste na interação dos anticorpos presentes no soro do paciente com os antígenos virais específicos fixados em uma microplaca de poliestireno. Após a adição de uma anti-imunoglobulina marcada enzimaticamente, a detecção é feita por técnica espectrofotométrica.

Após o desenvolvimento de métodos que detectam anticorpos anti-VHC utilizando antígenos recombinantes (KUO, *et al.*, 1989), tornou-se possível a identificação de pessoas infectadas com este vírus, inclusive doadores de sangue potencialmente infectados, e portanto, capazes de transmitir hepatite C através de hemocomponentes.

Os primeiros testes de ELISA, ditos de primeira geração, possuíam a fração antigênica c100-3, da região não-estrutural NS4 do genoma viral. Esses métodos foram rapidamente abandonados devido à falta de sensibilidade e especificidade, surgindo os de segunda geração, que incorporavam as frações c33c (NS3) e c22-3 (*core*) (ÁVILA e FERREIRA, 2001). A utilização destes testes de segunda geração favoreceu uma redução no risco de transmissão pós-transfusional do VHC e de reações falso-positivas nos doadores de sangue (GRETCH, 1997).

A partir do início de 1993 surgiram os métodos de terceira geração, contendo coesões antigênicas das regiões não-estruturais NS3, NS4 e NS5 e da região estrutural (*core*). Além disso, a maioria dos testes de terceira geração substituíram algumas frações antigênicas, tais como a c100-3 e c33c, por meio de peptídios sintéticos correspondendo aos epítomos imunodominantes dessas frações, melhorando tanto sua sensibilidade quanto sua especificidade (ÁVILA e FERREIRA, 2001).

Atualmente, já existe o ELISA de quarta geração que incorpora o antígeno NS3 recombinante e peptídeos sintéticos do *core*, NS4 e NS5.

O período de janela imunológica (janela entre o início da viremia e a detecção inicial dos anticorpos anti-VHC) foi reduzido com o desenvolvimento destas novas gerações de testes imunoenzimáticos. O ELISA de segunda geração permitiu detectar os anticorpos anti-VHC 10 semanas após a infecção e o ELISA de terceira geração entre 7-8 semanas, comparando-se com uma média de 16 semanas com o uso do ELISA de primeira geração (GRETCH, 1997). Ainda não consta na literatura os dados sobre a comparação da sensibilidade e especificidade do teste de ELISA de quarta geração com os demais.

I. 1. 6. 1. 2. RIBA

Como teste complementar para detecção de anticorpos anti-VHC e até certo ponto confirmatório do ELISA, foi desenvolvido o ensaio recombinante imunoblot (RIBA: *Recombinant Immunoblot Assays* – Ensaio Imunoblot Recombinante) produzido pela *Chiron Corporation* (Emeryville, CA, Estados Unidos). Este método incorpora antígenos provenientes de diferentes regiões do genoma viral em uma tira de nitrocelulose (ERENSOY, 2001) e a detecção colorimétrica ocorre após a adição de anticorpos anti-IgG marcados com a enzima peroxidase. No entanto, este método é pouco utilizado na rotina laboratorial devido ao seu custo elevado e se apresentar menos sensível que os testes moleculares.

I. 1. 6. 2. TESTES MOLECULARES

A detecção qualitativa do RNA-VHC é um teste molecular utilizado para identificação de uma infecção viral recente devido sua alta sensibilidade. A presença do RNA viral no plasma indica uma infecção ativa pelo vírus e pode ser detectado 1 a 3 semanas após a exposição (HOOFNAGLE, 1997). Os métodos laboratoriais para esta detecção são baseados na amplificação por PCR do DNA complementar (cDNA) obtido por transcrição reversa (RT-PCR) ou através da amplificação mediada por transcrição (TMA), podendo detectar o RNA-VHC no soro do paciente abaixo do limite inferior de detecção de 50-100 cópias/mL.

Além da detecção qualitativa do RNA-VHC, pode ser realizada a análise quantitativa deste RNA no plasma ou soro (carga viral). Esta quantificação tem sido considerada na avaliação da progressão da doença hepática e, também, como índice prognóstico de resposta ao tratamento. Duas técnicas foram desenvolvidas para esta análise: reação de PCR (detecção

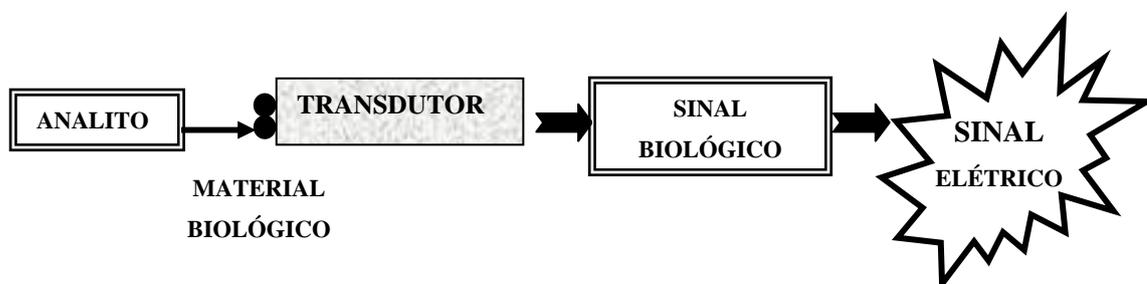
espectrofotométrica) e a outra através da técnica do DNA ramificado (detecção quimiluminescente).

A genotipagem viral apresenta importância clínica, principalmente em relação ao tempo e resposta à terapêutica antiviral e pode ser realizada através de diferentes metodologias: análise do seqüenciamento direto da região 5' UTR (TruGene, Visible Genetics, Canadá), hibridização reversa com sondas de oligonucleotídeos genótipo-específico (INNO-LiPA, Innogenetics, Bélgica) e técnica de RFLP (*restriction fragment length polymorphism*). A determinação dos genótipos deve ser realizada quando houver indicação de tratamento clínico com interferon ou do transplante hepático.

I. 2 . BIOSSENSORES

Com o progresso tecnológico, a combinação da Imunologia à biotecnologia possibilitou o desenvolvimento de novas metodologias analíticas para a detecção de biomoléculas e diagnóstico de doenças com maior simplicidade, sensibilidade e especificidade. A imobilização de biomoléculas na superfície de suportes sólidos tem sido usada na detecção de analitos pela interação de afinidade com essas biomoléculas, tais como enzima-inibidor, antígeno-anticorpo, ligante-receptor, proteína-DNA.

Os biossensores são dispositivos analíticos envolvidos na detecção de analitos, que apresentam componentes de origem biológica (enzimas, células, tecidos de animais e vegetais, ácidos nucleicos, antígenos ou anticorpos, etc.) imobilizados na superfície de um transdutor, envolvendo a conversão do sinal do sistema biológico imobilizado em sinal elétrico (Figura 2). Quando os antígenos ou anticorpos são imobilizados nesta superfície sólida, os biossensores são denominados imunossensores, nos quais são detectadas as concentrações destas biomoléculas que podem estar presentes em soros de pacientes, tanto por alterações físicas durante a formação do imunocomplexo, quanto por geração de sinal por marcadores incorporados ao imunocomplexo antígeno-anticorpo, o qual permite maior sensibilidade ao método (LUPPA *et al.*, 2001). Esta metodologia, que envolve uma integração entre a química analítica e imunologia, tem sido intensamente aplicada na área de análises clínicas e apresenta algumas vantagens, tais como: menor tempo de análise, alta sensibilidade



e especificidade, e menor custo quando comparado aos métodos diagnósticos convencionais.

Figura 2 – Esquema representativo de um biossensor.

De acordo com o tipo de transdutor empregado, os imunossensores podem ser classificados em 4 tipos: eletroquímicos (potenciométrico, amperométrico ou condutimétrico), ópticos (medida luminescência, fluorescência, etc.), detectores de massa (relacionados com a oscilação da frequência dos cristais piezelétricos e termométricos (LUPPA *et al.*, 2001).

No caso de um imunossensor amperométrico, a reação entre antígeno e anticorpo ocorre na superfície do transdutor, e o monitoramento desta reação de afinidade é realizado após a ligação de um anticorpo marcado com uma enzima, cuja atividade enzimática frente a um determinado substrato é detectada por medida amperométrica (Figura 3).

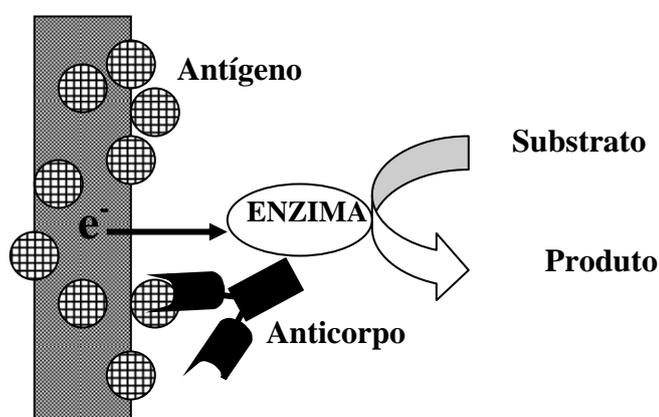


Figura 3 - Princípio de ação de um imunossensor amperométrico baseado na atividade enzimática frente a um determinado substrato.

Várias enzimas têm sido utilizadas como marcadores da reação imunoquímica com detecção eletroanalítica. Dentre as principais encontram-se as peroxidases (HRP), glicose oxidase (GOD), acetilcolinesterase (AChE), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), galactosidase (GAL) e fosfatase alcalina (ALP) (RICCARD, 2002).

Vários mediadores de elétrons podem ser utilizados na reação catalítica da enzima peroxidase, dentre eles, os fenóis, as aminas aromáticas, ácido ascórbico, hexacianoferrato (II

) (SCHUBERT, 1991), iodeto (KRISHNAN, 1995), entre outros.

A literatura tem registrado o desenvolvimento de poucos biossensores para VHC. KINTZIOS e col. (2001) desenvolveram um biossensor para determinação de componentes biológicos e químicos com base em interações com células e seus componentes celulares. Este biossensor, denominado BERA (*Bioelectric Recognition Assay*), foi construído através da imobilização de células epiteliais e hepáticas humanas que apresentavam uma resposta elevada contra o VHC na superfície de um gel que preservou as funções fisiológicas destas células. Com este sistema de análise, obteve-se alta correlação quando comparado aos métodos de ELISA e RT-PCR utilizados no diagnóstico de VHC.

Mais recentemente, foi desenvolvido um genossensor amperométrico para detecção do RNA do vírus da hepatite C baseado na hibridização DNA-cDNA marcado com uma sonda enzimática (RICCARDI, 2006) e outro trabalho também envolveu a construção de um genossensor piezoelétrico (SKLÁDAL, 2004).

Outro recente trabalho científico desenvolveu um imunossensor para detecção de anticorpos contra a proteína E2 do VHC utilizando fibra ópticas (KONRY *et al*, 2005).

Do nosso conhecimento, nenhum trabalho sobre o desenvolvimento de imunossensores envolvendo antígeno recombinante do *core* viral, para a detecção de anticorpos em amostras de pacientes infectados pelo VHC está relatado na literatura.

Capítulo II

Objetivos

Considerando a importância da utilização de métodos diagnósticos na triagem de doadores de sangue e monitoramento de pacientes infectados, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de metodologias de imobilização da proteína recombinante do *core* do vírus da hepatite C para a construção de métodos diagnósticos para detecção de anticorpos durante a infecção viral. Para atingir esse objetivo, as seguintes etapas foram estabelecidas:

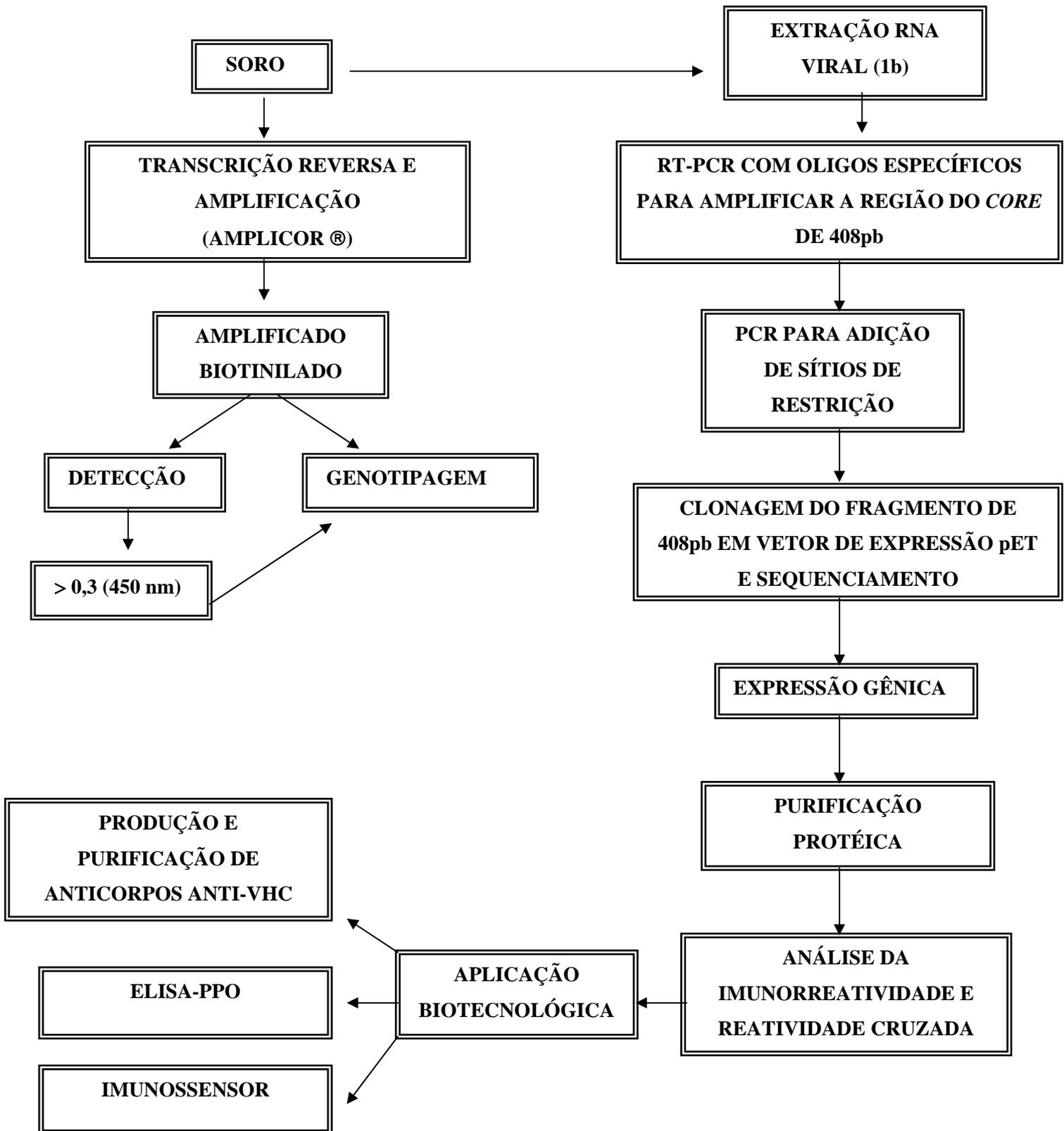
- ❑ Clonagem e expressão em *E. coli* da proteína do *core* do vírus da hepatite C;
- ❑ Análise da imunorreatividade e especificidade protéica frente aos soros humanos infectados pelo VHC pertencentes a vários genótipos e soros com outras patologias;
- ❑ Construção de um método de ELISA utilizando a proteína recombinante imobilizada em discos de siloxano-poli (propileno óxido) preparados por método sol-gel;
- ❑ Construção de um imunossensor amperométrico utilizando a proteína recombinante imobilizada em filmes híbridos siloxano-poli (propileno óxido) preparado por método sol-gel e depositado na superfície de eletrodos de grafite pelo processo “dip-coating”;

Capítulo III

Materiais e

Métodos

III . 1. FLUXOGRAMA DE TRABALHO



III . 2 . AMOSTRAS

As amostras de pacientes infectados com o vírus da hepatite C (VHC) foram submetidas a genotipagem para o reconhecimento dos diferentes genótipos (1a, 1b, 2b e 3). Estas amostras foram obtidas através do material enviado ao Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular do Departamento de Análises Clínicas e Núcleo de Atendimento à Comunidade – NAC - da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, integrante dos programas Estadual de Hepatites Virais e Nacional de DST/AIDS. Os soros de pacientes não infectados 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.

III . 3 . TESTE QUALITATIVO PARA DETECÇÃO DO RNA-VHC

A detecção do RNA viral foi realizada através do Teste Qualitativo AMPLICOR[®] Hepatitis C Vírus Test, version 2.0 (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA). Este teste baseia-se em cinco processos principais: preparação da amostra; transcrição reversa do RNA alvo produzindo cDNA; amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) do cDNA (DNA complementar) alvo utilizando oligonucleotídeos complementares específicos para o VHC; hibridização dos produtos amplificados com sondas oligonucleotídicas específicas imobilizadas em placas de poliestireno e detecção destes produtos amplificados e fixos à sonda, por determinação colorimétrica.

O procedimento utilizado seguiu as especificações do fabricante e está apresentado abaixo resumidamente.

III. 3. 1. Preparação da amostra

O RNA-VHC foi isolado a partir do soro dos pacientes por lise das partículas virais com solução tampão tris/HCl contendo 68% de tiocianato de guanidina, 3% de ditiotretitol e 1% de glicogênio e, em seguida, precipitado com etanol 95%. Um controle interno foi adicionado em todas as amostras com o reagente de lise e atua como um controle dos processos de extração e de amplificação.

III. 3. 2. Transcrição reversa e amplificação por PCR

III. 3. 2. 1. Seleção do alvo

Foi escolhida a região 5' não traduzida do genoma do VHC por apresentar uma conservação máxima da sequência de RNA entre os genótipos conhecidos. O teste Amplicor® versão 2.0 utiliza os iniciadores KY78 e KY80 para definir uma sequência de 244 nucleotídeos dentro da 5'UTR. A sequência de captura da sonda e as sequências do iniciador encontram-se localizadas nos domínios mais conservados, dentro da 5'UTR.

III. 3. 2. 2. Transcrição reversa

As reações de transcrição reversa e de amplificação são efetuadas utilizando a enzima recombinante termoestável DNA polimerase do *Thermus thermophilus* (*rTth* pol). Na presença de manganês e nas condições adequadas de solução tampão, a *rTth* pol apresenta atividades de transcriptase reversa e de DNA polimerase, permitindo que tanto a transcrição reversa como a amplificação por PCR ocorram na mesma mistura de reação das amostras processadas. O iniciador “antisense” (KY78: 5'-biotina-CTC **GCA** AGC **ACC** CTA **TCA** GGC **AGT**) (<http://pascal.def.chez.tiscali.fr/techniqu.htm>) encontra-se biotinizado na extremidade 5' e o iniciador “sense” (KY80: 5'-GCA **GAA** AGC **GTC** TAG **CAT** GGG **GT**) (<http://pascal.def.chez.tiscali.fr/techniqu.htm>) não se encontra biotinizado. A mistura de reação é aquecida para permitir que o iniciador “antisense” se ligue especificamente ao RNA-VHC. Na presença de trifosfatos de desoxinucleosídeos em excesso (dNTPs), tais como os trifosfatos de desoxiadenosina (dATP), desoxiguanosina (dGTP), desoxicitidina (dCTP) e desoxiuridina (dAUP), a *rTth* pol alonga o iniciador ligado dando origem a uma cadeia de DNA complementar (cDNA) ao RNA alvo.

III. 3. 2. 3. Amplificação do alvo

Após a transcrição reversa do RNA-VHC, a mistura de reação foi aquecida para desnaturar o híbrido RNA-cDNA e expor as sequências alvo do iniciador. À medida que a mistura é aquecida, o iniciador “sense” (KY80) liga-se especificamente ao cDNA, a *rTth* pol alonga o iniciador, e uma segunda cadeia de DNA é sintetizada, completando o primeiro ciclo de PCR. A mistura de reação foi novamente aquecida para separar as

duplas cadeias de DNA produzidas e expor as sequências alvo do iniciador. À medida que a mistura é aquecida, os iniciadores KY78 e KY80 ligam-se ao DNA alvo. A *rTth* pol, na presença de dNTPs em excesso, alonga os iniciadores ligados ao longo dos moldes alvo, dando origem a uma molécula de DNA de dupla cadeia com 244 pares de base; somente a região do genoma do VHC situada entre os iniciadores é amplificada. Este processo foi repetido durante 37 ciclos, cada um duplicando eficazmente a quantidade de DNA amplificado.

A preparação das amostras e controles positivo e negativo seguiu o procedimento descrito na Tabela 1.

Tabela 1: Preparação das amostras e controles para amplificação por PCR.

	Tubo Controle Positivo	Tubo Controle Negativo	Tubo Amostras
Solução do Reagente de Lise	400 µL	400 µL	400 µL
Plasma humano negativo	200 µL	200 µL	200 µL
Soro Homogeneizado			200 µL
Controle (+) ou (-)	20 µL	20µL	—
Homogeneização durante 3 a 5 segundos Aquecimento em bloco de calor seco a 60°C ± 2°C; 10 min.			
Isopropanol 100%	600 µL	600 µL	600 µL
Homogeneização durante 3 a 5 segundos Incubação a temperatura ambiente por 2 minutos Centrifugação a velocidade máxima de 12500 a 16000g durante 15 minutos a temperatura ambiente Aspirar o sobrenadante e descartar			
Ethanol 70%	1 mL	1 mL	1 mL
Homogeneização durante 3 a 5 segundos Centrifugação a velocidade máxima de 12500 a 16000g durante 5 minutos a temperatura ambiente Aspiração do sobrenadante e posterior descarte			
Solução Diluente de Amostras	200 µL	200 µL	200 µL
Homogeneização durante 10 segundos As amostras e controles devem ser amplificados nas 3 horas subsequentes a preparação ou armazenados a -70 °C durante um período máximo de 1 mês, não efetuando mais de duas operações de congelamento/descongelamento.			

Adicionou-se 50 µL do produto de extração obtido de cada amostra como descrito acima e igual volume dos controles aos tubos contendo 50 µL da mistura principal de trabalho.

Os tubos contendo as amostras e controles organizados em um suporte foram colocados no bloco do termociclador, e este, programado da seguinte forma:

Programa HOLD	5 minutos a 50°C
Programa HOLD	30 minutos a 62°C
Programa CYCLE (37 ciclos)	10 segundos a 90°C; 25 segundos a 58°C
Programa HOLD	90°C, não ultrapassar 3 horas

III. 3. 2. 4. Processo de hibridização

Após a amplificação por PCR, os produtos de amplificação provenientes do RNA alvo do VHC, foram desnaturados quimicamente para formar um DNA de cadeia simples. Assim, adicionou-se 100 µL de solução de desnaturação a cada tubo e incubou-se durante 10 minutos a temperatura ambiente para permitir uma desnaturação completa. Os produtos amplificados desnaturados podem ser mantidos a temperatura ambiente durante 2 horas no máximo, antes de proceder-se a reação de detecção, ou então, deve-se armazenar a 2-8 °C durante uma semana no máximo.

Em seguida, alíquotas do produto desnaturado foram adicionadas a micropoços individuais da placa de poliestireno contendo sequências oligonucleotídicas específicas para o VHC (KY150). Os produtos amplificados do VHC, marcados com biotina, foram hibridizados com as sequências de oligonucleotídeos específicas para o alvo imobilizadas na microplaca. Após o reconhecimento molecular DNA-cDNA, a microplaca foi lavada para remover o material não fixado.

III. 3. 3. Detecção espectrofotométrica

O conjugado avidina-peroxidase foi adicionado a cada poço da microplaca, interagindo com a molécula de cDNA (marcada com biotina) capturada pela sequência de oligonucleotídeo específica para o VHC, que se encontra fixa a microplaca. O monitoramento da enzima peroxidase (conjugado AV-HRP) foi realizado na microplaca de poliestireno, segundo o procedimento para cada poço a ser testado descrito na Tabela 2.

Tabela 2: Procedimento para a detecção qualitativa pelo teste Amplicor[®].

	Controle Positivo	Controle Negativo	Amostras
Solução de Hibridização	100 µL	100 µL	100 µL
Produto Amplificado desnaturado	25 µL	25 µL	25 µL
Homogeneização			
Incubação durante 1 hora a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$			
Lavagem da placa com solução de trabalho de lavagem			
Conjugado AV-HRP	100 µL	100 µL	100 µL
Incubação durante 15 minutos a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$			
Lavagem da placa com solução de trabalho de lavagem			
Solução de substratos	100 µL	100 µL	100 µL
Incubação durante 10 minutos entre 20 a 25°C na ausência de luz.			
Solução de Bloqueio	100 µL	100 µL	100 µL
Determinar a absorbância a 450 nm nos 30 minutos subsequentes a adição da solução de bloqueio.			

III. 3. 4. Interpretação dos resultados

Após avaliação de que as leituras do controle positivo e negativo do teste foram válidas, os resultados das amostras foram interpretados da seguinte forma (Tabela 3):

Tabela 3: Avaliação da leituras de absorbância obtidas a 450 nm.

A₄₅₀	Interpretação
< 0,3	RNA-VHC não detectado. A amostra deve ser considerada negativa para o RNA-VHC. Um resultado negativo não garante a ausência de uma infecção pelo VHC porque os resultados dependem de um método adequado de coleta da amostra, da ausência de inibidores e de uma quantidade de RNA suficiente para poder ser detectada.
≥ 1,0	RNA-VHC detectado.
≥ 0,3, < 1,0	Duvidoso. Os resultados não são conclusivos para o RNA-VHC. Repetir todo o procedimento em duplicata utilizando uma nova alíquota da amostra do paciente. Se a amostra apresentar ambos resultados da duplicata superiores ou iguais a 0,3 A ₄₅₀ deve ser considerada positiva para o RNA-VHC. Se a amostra apresentar um ou ambos os resultados da repetição inferiores a 0,3 A ₄₅₀ deve ser considerada negativa para o RNA-VHC.

III. 4. GENOTIPAGEM DO VHC

Alíquotas dos amplificadores biotinilados referentes às amostras consideradas positivas ($\geq 0,3$ A450nm) para presença de RNA do VHC (carga viral), foram utilizadas para realização da genotipagem viral. O método comercial utilizado foi o INNO-LiPA HCV II (Innogenetics, Bélgica) que permite a determinação de 6 genótipos do VHC e de seus subtipos através da técnica de hibridação reversa denominada *Line Probe Assay* (Figura 4). Os procedimentos envolvidos nesta técnica são:

- Transcrição reversa e amplificação por PCR
- Desnaturação e hibridização
- Revelação colorimétrica da reação

III. 4. 1. Transcrição reversa e amplificação por PCR

Os procedimentos da transcrição reversa e amplificação por PCR foram realizados de acordo com o AMPLICOR[®] Hepatitis C Vírus Test, version 2.0. Durante este processo de amplificação, o grupo biotina foi incorporado pelo uso de um iniciador 5'-biotinilado durante o processo de amplificação.

III. 4. 2. Desnaturação e hibridização

Os cDNAs biotinilados foram hibridizados com seqüências de oligonucleotídeos específicas para regiões variáveis da região 5'UTR, imobilizada como linhas paralelas nas tiras da membrana de nitrocelulose. Foram adicionados 10 μ L do produto amplificado biotinilado juntamente com igual volume de solução de desnaturação na parte superior de uma canaleta. Após homogeneização, esta mistura foi incubada a temperatura ambiente durante 5 minutos para completa desnaturação do produto amplificado. As fitas de nitrocelulose contendo sondas do VHC imobilizadas foram completamente emergidas nesta solução e incubadas a 50°C durante 60 minutos a 80 rpm.

III. 4. 3. Revelação colorimétrica da reação

Após a hibridização, as fitas de nitrocelulose foram lavadas 2 vezes com 2mL de solução de estringência durante 20 segundos a temperatura ambiente e incubadas com 2mL da mesma solução a 50°C durante 30 minutos sob agitação.

As fitas foram lavadas 2 vezes com 2mL de solução de rinse, e posteriormete, incubadas com 2mL do conjugado (estreptavidina marcada com fosfatase alcalina) durante 30 minutos a temperatura ambiente, sob agitação. Após a ligação do conjugado ao híbrido biotilado neste período de 30 minutos, as fitas foram lavadas 2 vezes durante 1 minuto com 2mL de solução de rinse, e 1 vez com 2mL de tampão substrato. A revelação da reação foi obtida após incubação das fitas com 2mL de solução substrato enzimático bromocloroindolilfosfato e azul de nitro tetrazolim (NBT/BCIP) durante 30 minutos a temperatura ambiente sob agitação. O desenvolvimento da cor foi bloqueado através da lavagem das tiras 2 vezes com 2mL de água destilada durante 3 minutos a temperatura ambiente, sob agitação. As fitas foram removidas das canaletas e colocadas em papel absorvente para secagem completa para posterior leitura dos genótipos.

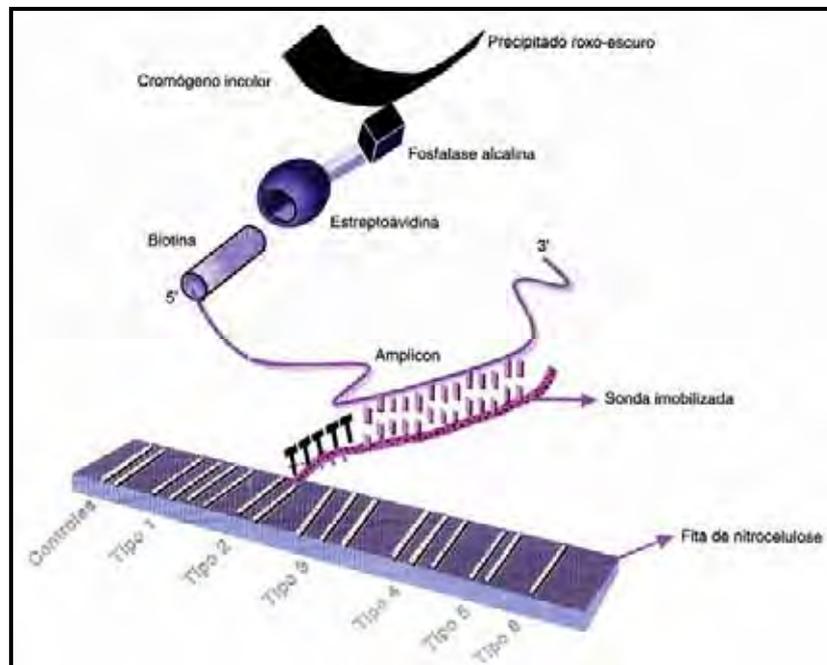


Figura 4 - Esquema da técnica de genotipagem do VHC por hibridização reversa (INNO-LiPA HCV II®).

III. 5. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DO CORE VIRAL

III. 5. 1. Síntese dos oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores foram especificamente desenhados para amplificar uma região de 408pb referente ao *core* do VHC obtida a partir de um estudo da seqüência completa do RNA viral, genótipo 1b, AF 333324, registrada no banco de dados NCBI (*Blastn Gen Bank*), para posterior clonagem em vetores de expressão. Esta região de 408pb refere-se à seqüência codificadora parcial de 136 aminoácidos. A Tabela 4 resume estes iniciadores utilizados neste trabalho.

Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do fragmento de 408pb.

OLIGONUCLEOTÍDEOS	SEQÜÊNCIA	POSIÇÃO
Antisenso 968R	5'GTTGGAGCAGTCGTTTCGTGAC 3'	968-947
Antisenso HCVC-AI	5'GTACCCCATGAGGTCGGCGAAG 3'	749-728
Senso HCVC-S	5'ATGAGCACAAATCCTAAACCTC 3'	342-364
Senso HCVCS-S SR	5' CCATGG CAC CATATG AGCACAAATCCTAAAC3'	342-364
Antisenso HCVC-AI SR	5'TT GGATCC TTAGTACCCCATGAGGTCGGGC3'	749-728

* As seqüências grifadas correspondem aos respectivos sítios de restrição: **CCATGG** (sítio de restrição para enzima *Nco* I); **CATATG** (sítio de restrição para enzima *Nde* I) e **GGATCC** (sítio de restrição para enzima *Bam* HI)

O oligonucleotídeo 968R, sintetizado conforme descrito por Shahjalal et al. (2002), foi utilizado na reação de transcrição reversa e na primeira reação de PCR juntamente com o HCVC-S. Na reação subsequente foram empregados os iniciadores HCVC-AI e HCVC-S para amplificar o fragmento de 408pb (Figura 5). Estes mesmos oligonucleotídeos foram construídos com sítios de restrição para clonagem em pET28a e pET42a.

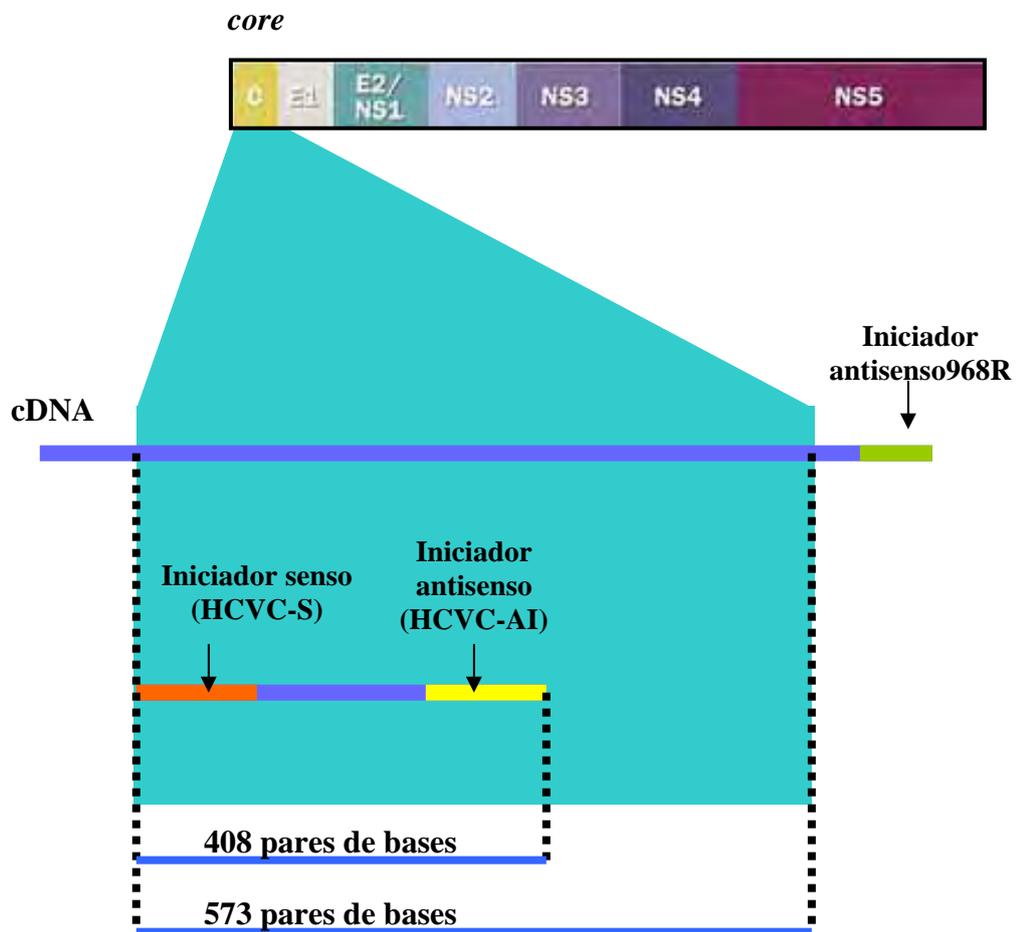


Figura 5 – Região de 408pb do *core* do VHC amplificada e localização dos oligonucleotídeos utilizados nas reações.

A seqüência completa da seqüência codificadora da proteína do *core* do VHC assim como os posicionamentos dos oligonucleotídeos ao longo da região delimitando o fragmento de 408 pb estão representados na Figura 6:

```
.....actgcctgataggggtgcttgccaatgagcacaatcctaacctcaaagaaaaaccaaac  
gtaacaccaaccgcccacaggatgttaagttccgggcggtggtcagatcgttggtgga  
gtttacctgttgccgcgcaggggcccctaggttgggtgtgcgcgaccaggaagacttctgag  
cggtcgcaacctcgtggaaggcgacaacctatccccaaggctcgccggcccagggtagg  
acctgggctcagcccgggtacccttgcccctctatggcaacgagggtatgggggtgggcag  
gatggctcctgtcaccgcgggctctcggcctagttggggcccacggacccccggcgtag  
gtcgcgcaatttggggaaggatcgacacctcacgtgcggcttcgcccagctcatggggta  
cattccgcttgtcggcgcccccttaggaggcgctgccagggccttggcgcatggcgtccgggtcctgg  
aggacggcgtgaattatgcaacaggaattgcctggtgctcttctctatcttctcttggctctgctgtc  
ctgttgaccatcccagcttccgcttacgaggtgcgcaacgtgtccgggataaccatgtcacgaacg  
actgctccaactcaa.....
```

Figura 6 - Seqüência completa da região codificadora do *core* do VHC, que contém 573 pb (itálico). Na figura, as seqüências dos oligonucleotídeos 968R, HCVC-S, HCVC-AI utilizados se encontram identificadas com cores diferentes: 968R (amarelo), HCVC-S (azul), HCVC-AI (vermelho). O fragmento de 408pb encontra-se destacado em negrito.

III. 5. 2. Reação de extração do RNA viral

A reação de extração do RNA viral foi realizada de acordo com protocolo descrito no kit QIAGEN (RNA Mini Kit Hand).

III. 5. 3. Reação de transcrição reversa do RNA-VHC

A síntese do DNA complementar (cDNA) do VHC foi realizada seguindo as especificações do fabricante (SuperScript™ II RNase H Reverse Transcriptase (INVITROGEN - Life Technologies) e executada em termociclador Gene Amp 2400 Perkin Elmer.

Em um microtubo tipo eppendorf, livre de DNAses e RNAses, foram adicionados 5,0µL de RNA isolado, 1,0µL do oligonucleotídeo 968R 50pM (*Applied Biosystem*), 1,0µL de dNTP 10mM, 5,0µL água Milli-Q. Os tubos foram aquecidos a 65°C durante 5 minutos e resfriados no gelo. Foram adicionados 4,0µL de 5X “first strand buffer” (Tris – HCl pH 8,3 250 mM; KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM), 2,0µl de DTT (Dithiothreitol) 0,1M e 1,0µ L de Inibidor de Ribonuclease (RNAsin – INVITROGEN - Life technologies) 40U/µL, homogeneizados e incubados a 42°C durante 2 minutos. Transcorrido esse tempo, adicionou-se 1,0µ L da enzima transcriptase reversa 200U. A reação foi incubada a 42°C durante 50 minutos e em seguida aquecida a 70°C por 15 minutos para inativação da enzima. O cDNA foi armazenado a –20°C até a realização da PCR.

III. 5. 4. Amplificação do fragmento de 408pb da proteína do *core* viral

O fragmento de 408pb pertencente à seqüência codificadora do *core* viral foi amplificada através da reação em cadeia da polimerase, em termociclador Gene Amp 2400 Perkin Elmer.

III. 5. 4.1. Reação de polimerização em cadeia (PCR) utilizando cDNA

As reações foram realizadas no aparelho termociclador Gene Amp Perkin Elmer 2400.

Esta primeira etapa de amplificação foi executada a partir de modificações realizadas no protocolo de amplificação descrito por Shahjalal et al, 2002.

Componentes	Concentração Final	VOLUME
Produto da reação de RT	–	2,0µl
Tampão 10X PCR s/ Mg ⁺⁺	1X	5.0µl
50mM MgCl ₂	2.5Mm	2.5µl
Mistura de 10mM dNTP	0.2mM	1.0µl
50pM 968R	1.0pM/µl	1.0µl
50pM HCVC-S	1.0pM/µl	1.0µl
Taq DNA polimerase (5U/µl)	2.0U	0.4µl
Água Milli-Q	–	38.1µl
		50.0 µl

Após a adição de todos os componentes, a mistura de reação foi submetida a 1 ciclo inicial de:

- 94°C/5 minutos

Após este ciclo, seguiram-se 35 ciclos de:

- 94°C/30 segundos; 55°C/45 segundos; 72°C/1 minuto

III. 5. 4. 2. Reação de Hemi- Nested PCR

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

Componentes	Concentração Final	Volume
Produto da reação de PCR	–	2.0µl
Tampão 10X PCR s/ Mg ⁺⁺	1X	5.0µl
50mM MgCl ₂	2.5mM	2.5µl
Mistura de 10mM dNTP	0.2mM	1.0µl
50pM HCVC-S	1.0pM/µl	1.0µl
50pM HCVC-A1	1.0pM/µl	1.0µl
Taq DNA polimerase (5U/µl)	2.0U	0.4µl
Água Milli-Q	–	34.6µl
		50.0µl

A reação foi submetida às mesmas condições térmicas utilizadas no item anterior. Ao final dos ciclos, as amostras foram analisadas em gel de agarose a 1%, coradas com brometo de etídeo 0,5 µg/mL e visualizadas sob transluminador de luz ultravioleta.

III. 5. 4. 3. Reação de amplificação do fragmento de 408pb contendo sítios de restrição

Com o objetivo de obter o fragmento de 408pb com sítios de restrição para clonagem nos vetores pET28a e pET42a, foi realizada a amplificação do fragmento obtido na reação

anterior (item III. 5. 4. 2), utilizando os pares de oligonucleotídeos descritos na Tabela 4, com seus respectivos sítios de restrição grifados.

A mistura de reação para amplificação continha:

Componentes	Concentração Final	Volume
Produto da reação de PCR	–	2.0µl
Tampão 10X PCR s/ Mg ⁺⁺	1X	5.0µl
50mM MgCl ₂	2.5mM	2.5µl
Mistura de 10mM dNTP	0.2mM	1.0µl
50pM HCVC-S SR	1.0pM/µl	1.0µl
50pM HCVC-A1 SR	1.0pM/µl	1.0µl
Taq DNA polimerase (5U/µl)	2.0U	0.4µl
Água Milli-Q	–	34.6µl
		50.0µl

A reação foi submetida às mesmas condições térmicas utilizadas no item III. 5. 4. 1.

III. 5. 5. Reação de ligação do produto amplificado aos vetores pET28a e pET42a

O produto amplificado correspondente ao fragmento do *core* (408pb) com sítios de restrição *NdeI* e *BamHI* foi analisado em gel de agarose 1% para estimar sua concentração e posteriormente digerido com as respectivas enzimas e analisado em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X (solução estoque 10X – Tris 1M/ácido bórico 0,9M/EDTA 10 mM pH 8,3).

O fragmento de tamanho esperado foi isolado do gel e purificado segundo *kit Wizard*[®] *SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison, WI, USA). Em seguida, este fragmento purificado foi ligado ao vetor pET28a, previamente clivado com as enzimas *NdeI* e *BamHI*. A quantidade do inserto utilizada na reação de ligação foi calculada segundo a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{ng vetor} \times \text{Kb de inserto}}{\text{Kb vetor}} \times \frac{\text{relação molar inserto (3)}}{\text{relação molar vetor (1)}} = \text{ng de inserto}$$

A reação de ligação foi realizada com a enzima T4 DNA ligase a 4°C durante 16 horas utilizando 50ng de vetor em um volume final de 10µL.

A reação de ligação do fragmento de 408pb ao vetor pET42a foi realizada da mesma forma descrita anteriormente, utilizando as enzimas *NcoI* e *BamHI*.

III. 5. 6. Transformação das bactérias

Uma alíquota da reação de ligação foi usada para transformar bactérias competentes da cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3) pelo método de choque térmico. A preparação das células competentes para transformação através do tratamento com cloreto de cálcio (CaCl₂), foi realizada segundo o protocolo de SAMBROOK et al, 1989.

Para realizar a transformação 200µL da suspensão de células hospedeiras BL21 competentes foram mantidas no gelo até o descongelamento e adicionou-se 10µL do produto de ligação. Após o choque térmico a 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, sob agitação, e plaqueou-se quantidades que variam de 50 a 200µL em meio LB sólido contendo antibiótico kanamicina (25 mg/mL). As placas foram incubadas a 37°C durante 16 horas.

III. 5. 7. Seleção dos clones recombinantes

A seleção dos clones recombinantes foi efetuada utilizando uma reação de PCR (“PCR de colônias”), utilizando o programa de amplificação descrito no item III. 5. 4. 1. Como molde de reação foi usada uma alíquota da colônia a ser confirmada. Após a análise em gel de agarose 1% foram selecionados os clones recombinantes. O DNA plasmidial desses clones foi purificado pelo método de lise alcalina usando o *kit In Concert-Rapid Plasmid Mini-Prep* (Gibco-BRL) e posteriormente seqüenciado.

III. 5. 8. Seqüenciamento

Para confirmação da seqüência e orientação dos fragmentos inseridos nos vetores, estes foram seqüenciados através do método enzimático de seqüenciamento de DNA

(SANGER et al, 1977), em seqüenciamento automático *ABI-Prism 377-DNA Sequencer* (Perkin Elmer).

III. 5. 9. Expressão gênica

Para a expressão gênica referente à proteína do *core* de 408pb foram utilizados os plasmídeos pET28a (fusão com *His-Tag*) e pET42a (fusão com GST), pertencentes à série pET (plasmid for expression by T7 RNA polymerase) do fabricante Novagen. A expressão dos genes clonados nos vetores pET está sob controle do promotor do bacteriófago T7. O gene que codifica a RNA polimerase do fago T7 está inserido no genoma da cepa de *E. coli* BL21(DE3) e sua expressão está sob controle do promotor *lacUV5*, induzível por IPTG. A adição de IPTG a uma cultura de bactérias da cepa BL21 contendo o plasmídeo pET recombinante induz a expressão da RNA polimerase do fago a qual reconhece o promotor T7 e transcreve o gene clonado no vetor pET (pET System Manual, 2002).

O vetor pET28a (Figura 7) possui uma seqüência acima do sítio de múltipla clonagem que codifica seis histidinas. Esta “cauda” de histidinas (*His-Tag*) facilita a purificação da proteína expressa. A cauda pode ser removida após clivagem da proteína híbrida com Fator Xa e a seleção pode ser realizada com kanamicina. O vetor pET42a (Figura 8) permite a clonagem e expressão do gene de interesse em fusão com a GST (“Glutathione S-Transferase”) na porção N-terminal da proteína e seleção com kanamicina. A proteína híbrida pode ser purificada por cromatografia de afinidade em coluna de glutathiona e a proteína de fusão pode ser retirada através da clivagem com Fator Xa.

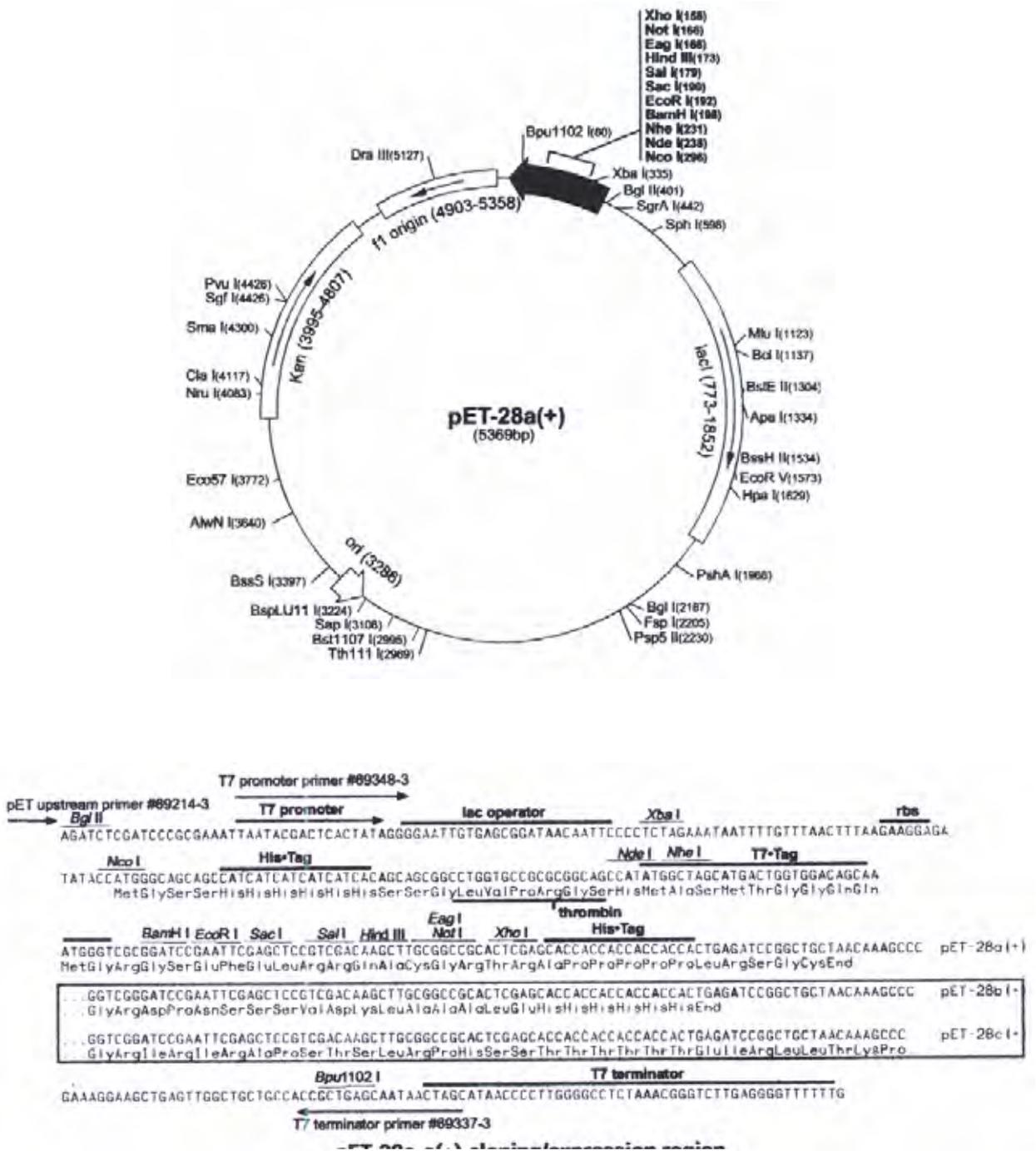


Figura 7 – Sítio de múltipla clonagem e expressão do vetor pET28a (Novagen).

III. 5. 9. 1. Indução da expressão gênica

Após seleção dos clones recombinantes, os vetores pET28a-*core* e pET42a-*core* foram utilizados para transformar bactérias da cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3) pelo método de choque térmico, da forma descrita em III. 5. 6. Uma das colônias transformadas foi cultivada em 5 mL de meio LB líquido contendo antibiótico kanamicina (25 mg/mL) incubada a 37°C por uma noite, sob agitação constante de 200 rpm. 100 µL dessa cultura foram transferidos para um erlemeyer contendo 10 mL de meio CIRCLEGROW® , com os devidos antibióticos, e incubados a 37°C, 250 rpm até atingir a densidade óptica (DO) de 0,4 a 0,6 no comprimento de onda de 600 nm. Atingida a densidade desejada, foram então coletadas amostras da cultura como controle negativo (cultura não induzida). Ao restante do crescimento bacteriano, foram adicionados volumes de IPTG numa concentração final de 0,4 mM. Após 4 horas de indução a 30°C ou 37°C e 250 rpm, 500 µL do crescimento bacteriano foram centrifugados, e as células precipitadas fervidas em tampão contendo β-mercaptoetanol (Tris HCl 0,187M, pH 6,8, 27,6% glicerol, 6% SDS, EDTA 6 mM, 17% 2-mercaptoetanol, 0,001% corante azul de bromofenol) e analisadas em gel SDS-PAGE para verificação da expressão das proteínas recombinantes.

III. 5. 9. 2. Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes

Para a detecção da proteína recombinante e identificação de suas mobilidades relativas, foi confeccionado gel de poliacrilamida 15% (pH8,8) contendo 0,1% de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) e gel de empacotamento a 5% (pH6,8), segundo LAEMMLI et al. (1973). Volumes de 500 µL de cultura antes e após indução com IPTG, foram centrifugados. O precipitado bacteriano obtido de cada amostra foi ressuspenso em 40 µL de água milli-Q, e fervidas em tampão de amostra (625mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,001% e β-mercaptoetanol 5%) durante 5 minutos, e posteriormente analisadas em gel SDS-PAGE 15%. Posteriormente, a eletroforese foi realizada a temperatura ambiente, aplicando 100 volts, durante aproximadamente 2 horas. O tampão dos eletrodos foi constituído por Tris 0,1 M, EDTA 7,8 mM, glicina 0,77 M, SDS 0,3%; pH 8,3. Após a corrida eletroforética o gel foi imerso em corante *coomassie blue* R-250 0,1% , preparado em metanol 50% e ácido acético 10% e posteriormente submetido à revelação com ácido acético 7%.

III. 5. 9. 3. Teste de solubilidade da proteína recombinante

O teste de solubilidade é realizado para verificar se a proteína recombinante de interesse é expressa em forma solúvel ou insolúvel dentro da bactéria. Para esta finalidade analisamos o conteúdo protéico nas frações do sobrenadante (proteína solúvel) e precipitado (proteína insolúvel) em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%. Após centrifugação do crescimento bacteriano submetido à indução com IPTG.

Primeiramente, as cepas bacterianas foram induzidas como descrito no item III. 5. 9.1, e posteriormente, precipitadas por centrifugação durante 5 minutos a 10.000 rpm e 4 °C. O precipitado bacteriano foi então ressuscitado em tampão de lise (Tris HCl 10 mM, pH 8, NaCl 100 mM, NaH₂PO₄ 50 mM) e as células foram lisadas por sonicação (4 pulsos de 1 minuto cada) em gelo. Em seguida, as frações solúvel e insolúvel foram separadas por centrifugação a 4°C e 13.000 rpm durante 15 minutos e uma alíquota de cada uma das frações foi analisada em gel SDS-PAGE 15%.

Foram realizadas tentativas de melhorar a solubilidade aplicando temperaturas mais baixas, diferentes concentrações de IPTG e cepa *E. coli* Rosetta. Assim a indução foi realizada a 37 °C e 0,4 mM de IPTG e 30 °C.

III. 6. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA DO CORE VIRAL

III. 6 . 1. Purificação da proteína His-core

A proteína cujo gene está clonado no vetor pET28a, é expressa em fusão a uma “cauda” de 6 histidinas (“His-Tag”), o que possibilita a purificação em coluna de afinidade por níquel. O protocolo de purificação foi realizado conforme instruções do fabricante utilizando-se a coluna de Ni-NTA Superflow (níquel- ácido nitrilotriacético – QUIAGEN).

Após o equilíbrio da coluna com 2 volumes de tampão de lise (Tris HCl 10 mM, pH 8, NaCl 100 mM, NaH₂PO₄ 50 mM), foram aplicados 5 mL do lisado bacteriano filtrado em 0.45µ correspondente ao sobrenadante (fração solúvel) e concomitantemente, recolheu-se a amostra que passou através da coluna, obtendo-se a fração denominada “flow-through”. Em seguida, a coluna foi lavada com 3 volumes de tampão de lise, recolhendo-se também a amostra. Aplicou-se então o mesmo tampão contendo concentrações crescentes de imidazol (10-250 mM). A coluna foi lavada com 3 volumes de água milli-Q e armazenada a 4°C em

etanol 20% e as frações coletadas durante a purificação foram analisadas em gel SDS-PAGE 15%.

III. 6 . 2. Purificação da proteína *His-core* em condições desnaturantes

Para os testes de purificação da proteína *His-core* na forma desnaturada, o precipitado (fração insolúvel) de 500 mL de cultura induzida, foi ressuspensionado em tampão de lise (Tris HCl 10 mM, pH 8, NaCl 100 mM, NaH₂PO₄ 50 mM) na proporção de 3 mL para cada grama de células e sonificado 6 vezes com duração de 1 minuto cada pulso e intervalo de 1 minuto em gelo. Após a sonificação a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C. A seguir, o precipitado foi solubilizado em tampão de lise contendo uréia 6M, e incubado 2 horas em gelo e centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante foi aplicado na coluna de Ni-NTA previamente equilibrada com 5 volumes de tampão de lise com uréia 6M. As proteínas foram eluídas usando o mesmo tampão contendo concentrações crescentes de imidazol (10-250 mM) e analisadas em gel SDS-PAGE 15%.

III. 6. 3. Purificação da proteína *GST-core*

O vetor pET42a permite que o gene de interesse seja clonado em fusão com uma sequência que codifica a proteína GST (Glutathione S-Transferase), o que possibilita a purificação da proteína híbrida resultante por cromatografia de afinidade.

Neste trabalho, foi utilizada a coluna GSTrap FF (Amersham Biosciences) de 5 mL que contém o ligante glutathione acoplado a agarose 4% , que manteve-se ligada a uma bomba de fluxo contínuo (Pharmacia – LKB) , sob fluxo mantido em 1 mL por minuto. Este sistema foi mantido em câmara fria a 4°C.

Após indução da expressão da proteína *GST-core* em 500 mL de meio “CIRCLE GROW” contendo antibiótico kanamicina, obtivemos a fração solúvel de proteínas através da lise por sonificação e centrifugação (III. 5. 9. 1). Essa fração foi submetida à filtração em membrana de nitrocelulose 0,45µ. e passada pela coluna GSTrap (Amersham Pharmacia) previamente lavada com água milli-Q e equilibrada com 5 volumes de tampão PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7.3) e, posteriormente, a proteína foi eluída com tampão de eluição glutathione reduzida (50 mM Tris HCl, 10 mM

glutathiona reduzida, pH 8.0). As frações coletadas foram analisadas em gel SDS-PAGE 15%. A coluna foi lavada com 3 volumes de água milli-Q e armazenada a 4°C em etanol 20%.

Todos os procedimentos utilizados para obtenção da proteína de fusão GST-*core*, foram aplicados para produção da proteína GST, que foi utilizada como um controle.

III. 6. 4 . Dosagem de proteínas

A dosagem protéica das amostras purificadas foi realizada pelo método de Bradford Modificado (BRADFORD, 1976) utilizando o Kit BIORAD Protein-Assay (BIORAD Laboratories).

III. 7. ANÁLISE DA IMUNORREATIVIDADE DA PROTEÍNA DO *CORE*

III. 7. 1. Western blot

Após a eletroforese das proteínas recombinantes expressas em *E. coli* (aproximadamente 25µg/canaleta) purificadas (GST-*core*, GST e extrato total), o gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% foi equilibrado em tampão de transferência contendo glicina 39 mM/L, Tris 48 mM/L, SDS 0,0375% (m/v) e 20% de metanol, e, em seguida, as proteínas foram eletroforeticamente transferidas para a membrana de nitrocelulose (Millipore) aplicando-se uma voltagem de 100V durante 1 hora e 30 minutos (Cuba de eletroforese Mini V8-GIBCO BRL – Life Technologies). Posteriormente, a membrana foi corada com solução de Ponceau (Ponceau 0,5%, ácido acético 0,1%) para visualização das bandas e o bloqueio dos sítios livres na membrana foi realizado com solução de 5% de leite desnatado em TBS/Tween-20 (Tris 0,05 M, NaCl 0,15 M; pH 8.0, 0,05% Tween 20), por uma noite, a 4°C. Em seguida a membrana foi lavada com TBS/Tween-20 e incubada com diluições de 1:400 dos soros de pacientes infectados com VHC de diferentes genótipos (1a, 1b, 2b, 3) e pacientes não infectados com VHC (controle negativo) em solução de bloqueio. Também foi avaliada a reatividade cruzada da proteína do *core* contra soros positivos para Hepatite B, HIV, HTLV (Vírus Linfotrópico de Células T Humana), doença de Chagas, Fator Reumatóide e FAN (Fator Anti-Núcleo). Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, a membrana foi lavada com TBS/Tween-20 por 5 vezes durante 5 minutos cada, e então incubada com o anticorpo anti-IgG humana conjugado com peroxidase, diluído 1:10000 em solução de bloqueio, durante 1 hora à temperatura ambiente e, posteriormente lavada com TBS/Tween-

20 por 5 vezes durante 10 minutos cada. 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 0,05 M; pH 8.0).

A mesma metodologia anterior foi utilizada para verificação da imunorreatividade dos anticorpos produzidos em coelhos (III. 8. 1).

III. 7. 2. Slot Blot

Com a finalidade de obter a menor concentração de reatividade das proteínas GST-*core* e GST em diferentes concentrações, realizamos a técnica de *Slot Blot*.

Primeiramente, a membrana de nitrocelulose (Millipore) foi cortada em um tamanho apropriado e equilibrada em tampão TBS (Tris 0,05 M, NaCl 0,15 M; pH 8.0). A seguir, a membrana foi aplicada em um sistema *Hybri Slot™ Manifold* (Gibco BRL – Life Technologies) e concentrações crescentes das proteínas (ng: 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 2,5; 5,0; 10,0) purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de glutationa e diluídas em PBS, foram aplicadas num volume de 100 µL por cavidade, sendo então transferidas para a membrana com o auxílio de uma bomba de vácuo acoplada ao sistema. Após a transferência, a membrana foi lavada com TBS/Tween-20 (Tris 0,05 M, NaCl 0,15 M; pH 8.0, 0,05% Tween 20) e bloqueada com esta mesma solução contendo 5% de leite desnatado, por uma noite, a 4°C. Em seguida a membrana foi lavada com TBS/Tween-20 e incubada com diluição 1/200 do soro de paciente infectado com VHC (genótipo 1b) em solução de bloqueio. Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, sob agitação a membrana foi lavada com TBS/Tween-20 0,05% por 5 vezes durante 5 minutos cada, e então incubada com o anticorpo anti-IgG humana conjugado com peroxidase (Sigma), diluído 1:10000 em solução de bloqueio, durante 1 hora à temperatura ambiente e, posteriormente lavada com TBS/Tween-20 0,05% por 5 vezes durante 10 minutos cada. 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 0,05 M; pH 8.0).

III. 8. APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

III. 8. 1. Produção e purificação de anticorpos anti-*core* VHC

Amostras contendo as proteínas de fusão GST-*core* e GST foram descongeladas e quantificadas pelo método de Bradford Modificado (Kit BIORAD) para obtenção de anticorpos policlonais em coelhos.

Cada animal foi imunizado por injeções subcutâneas em quatro diferentes locais com 50 µg da proteína recombinante preparada com igual volume de adjuvante de Freund (completo na primeira inoculação e incompleto nas subseqüentes). A imunização foi realizada 1 vez por semana durante 4 semanas. Após a sangria de prova, o sangue total foi obtido por punção cardíaca e mantido a 37°C durante 5 minutos, para retração do coágulo, posteriormente centrifugado a 2000 X g/10 minutos, para obtenção do soro imune policlonal. A produção dos anticorpos pelo coelho foi verificada pela técnica de *Western Blot* (item III. 7. 1).

A purificação da fração IgG anti-*core* VHC de coelho procedeu-se após precipitação da fração IgG com solução saturada de (NH₄)₂SO₄ pH 6,0, seguida de purificação por cromatografia em coluna DEAE (dietilaminoetil) celulose: uma solução saturada de (NH₄)₂SO₄ pH 6,0 foi adicionada em 60 mL do soro de modo que a concentração no volume total fosse de 33% (29,4mL de solução). 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 ressuspense em (NH₄)₂SO₄ 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 dialisada em câmara fria durante 4 horas por 3 vezes em PBS e, posteriormente, em tampão fosfato NaH₂PO₄ 0,02M pH 7,4 por mais 4 horas. Após a diálise, determinou-se a concentração da proteína na amostra e, em seguida, a mesma foi congelada até o momento da purificação por cromatografia em coluna DEAE (dietilaminoetil) celulose. Este procedimento foi realizado aplicando um fluxo constante de 1mL por minuto de amostra na coluna previamente equilibrada no tampão de eluição (tampão fosfato NaH₂PO₄ 0,02M pH 7,4), sendo coletados 5 mL 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 imunorreatividade da IgG purificada, empregou-se a técnica de *Western Blot* (item III. 7. 1).

III. 8. 2. Método de ELISA com imobilização em placa de poliestireno

A reatividade das proteínas recombinantes GST-*core* e GST com anticorpos presentes no soro humano foi verificada em microplacas de poliestireno através do teste imunoenzimático (ELISA) pelo método indireto (Figura 9). Para otimização desta técnica, as proteínas recombinantes foram diluídas em solução tampão bicarbonato 0,05 mol L⁻¹ pH 9,6 de modo a apresentar as seguintes concentrações (ng) / poço em duplicata: 2,5; 1,25; 0,62; 0,31; 0,16. Cada cavidade dessa placa, previamente adsorvida com estas concentrações crescentes durante 18 horas a 4°C, foi lavada com tampão PBS pH 7,5 /Tween 20 0,05% por três vezes durante 30 segundos e posteriormente receberam 100µL de solução de bloqueio (solução tampão PBS pH 7,5 /Tween 20 0,05%/ 0,1% BSA). Após incubação de 1 hora, foram adicionados 100µL de soro diluído 1:20 em solução de bloqueio em cada cavidade (soros positivos e negativos). O soro foi desprezado e, novamente, se repetiu o processo de lavagem. Cada cavidade foi incubada durante 1 hora com 100µL de anticorpos monoclonais anti-IgG humana marcados com peroxidase na diluição 1:10000. Ao final desse tempo, os poços foram lavados e incubados com solução substrato peróxido de uréia/TMB (tetrametilbenzidina), homogeneização rápida e incubação durante 10 minutos à temperatura ambiente, protegido da luminosidade. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1 mol L⁻¹ e procedeu-se a leitura espectrofotométrica a 450nm/540nm. A intensidade da coloração é proporcional à concentração de anticorpos da classe IgG anti-*core* na amostra de soro. O limiar de reatividade (*cut off*) foi calculado através da média dos valores de absorvância de 20 soros negativos somando-se com duas vezes o desvio padrão. Definidas as condições ideais da solução antigênica e estabelecido o *cut off*, realizou-se este imunoensaio com amostras de soros positivos para VHC e soros positivos para Hepatite B, HIV, HTLV, doença de Chagas, fator reumatóide, anti-estreptolisina O, PCR (Proteína C Reativa) e FAN (Fator Anti-Núcleo) para verificação de uma possível reatividade cruzada destes soros com a proteína recombinante.

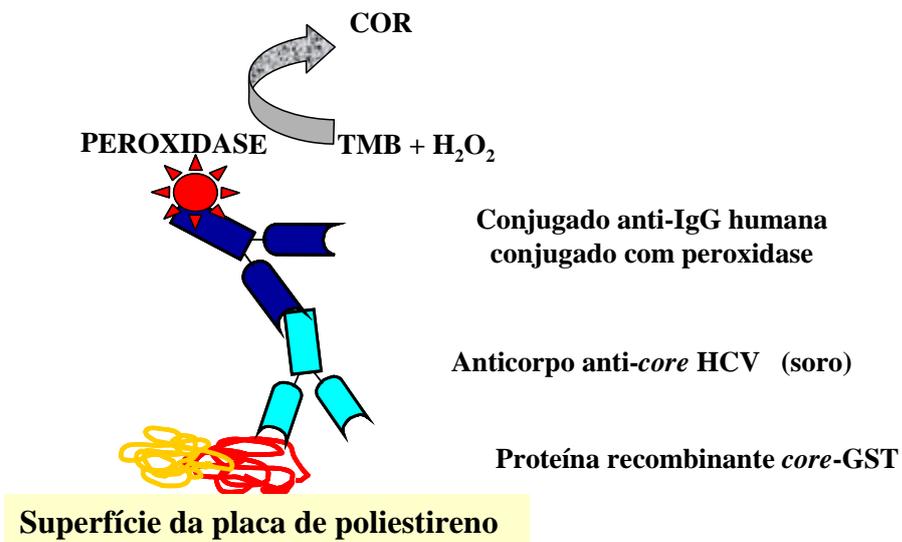


Figura 9 - Esquema das etapas envolvidas no método ELISA indireto para determinação de anticorpos anti-VHC utilizando a proteína recombinante GST-*core*.

III. 8. 3. Desenvolvimento de um teste de ELISA utilizando discos de siloxano-poli (propileno óxido) como suporte sólido

Para a construção de uma nova técnica de imobilização protéica para reação de ELISA, a proteína recombinante do VHC foi imobilizada em discos de siloxano-poli (propileno óxido) preparados por método sol-gel para detecção de anticorpos anti-VHC em soros de pacientes infectados.

III. 8. 3. 1. Síntese do precursor híbrido siloxano-poli(propileno óxido) -PPO 300

A síntese do precursor híbrido orgânico (polímero)-inorgânico (sílica) foi realizada junto ao Departamento de Físico-Química do IQ/Unesp sob colaboração do Prof. Dr. Celso V. Santilli e Dr. Karim Dahmouche.

O precursor foi obtido a partir da reação do alcoóxido de silício modificado 3-isocianatopropiltrietoxissilano (IsoTrEOS) e um polímero modificado (NH₂-(PPO)_n-NH₂) de acordo com Dahmouche *et al.*, 1999. Quantidades equimolares de IsoTrEOS e O,O' Bis((2-aminopropil)-polipropilenoglicol) (MM=300) foram misturadas adequadamente em tetrahidrofurano (THF) e mantidas sob agitação e refluxo à 80°C por aproximadamente 20

horas. Em seguida o solvente foi eliminado com o auxílio de um evaporador rotatório acoplado a uma bomba de vácuo, obtendo-se o híbrido siloxano-polipropilenoglicol puro. A solução do precursor híbrido foi armazenada em frascos de vidro hermeticamente fechados.

III. 8. 3. 2. Preparação dos discos poliméricos

A formação do disco sol-gel envolve a hidrólise e condensação do precursor obtido, na presença de um catalisador ácido. As etapas de síntese e policondensação das cadeias poliméricas seguem o esquema de reações da Figura 10. No processo sol-gel, uma molécula do precursor metal alcóxido de baixo peso molecular, usualmente o tetrametoxisilano (TMOS; $\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$) ou tetraetoxisilano (TEOS; $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$) é primeiro hidrolisada na presença de água, catalisador e solvente, geralmente etanol. A hidrólise resulta na formação de grupos silanol ($\text{Si} - \text{OH}$), que reagem para a formação do polímero siloxano ($\text{Si} - \text{O} - \text{Si}$) na reação de condensação, a qual conduz à formação de uma suspensão coloidal (sol) e, eventualmente, a um gel. Finalmente, os solventes são removidos a fim de interconectar a rede de poros submicrométrica e as cadeias poliméricas durante o processo de secagem do material para formar o xerogel. Para o desenvolvimento destas etapas foram adicionados 2,0 mL de etanol contendo o catalisador da reação de condensação NH_4F $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ e 0,4 mL de água milli-Q em 1g do precursor. Após agitação, obteve-se um sol homogêneo e transparente, que foi aplicado em moldes. Após 5 dias estes discos de 3mm de diâmetro foram retirados dos moldes e conservados a 4°C até sua utilização.

III. 8. 3. 3. Imobilização da proteína recombinante do core do vírus da hepatite C nos discos de siloxano-poli(propileno óxido)

Cada disco contendo siloxano-poli (oxipropileno) foi introduzido em cavidades de microplacas de cultura de tecido e incubado com concentrações crescentes da proteína recombinante do *core* (ng /cavidade: 0,16, 0,31, 0,62, 1,25, 2,5) diluída em solução tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 e incubado por 18 horas a 4°C . Posteriormente os discos contendo a proteína foram lavados na mesma solução tampão, por agitação, 2 vezes de 5 segundos, para retirar o excesso da proteína que não foi imobilizada.

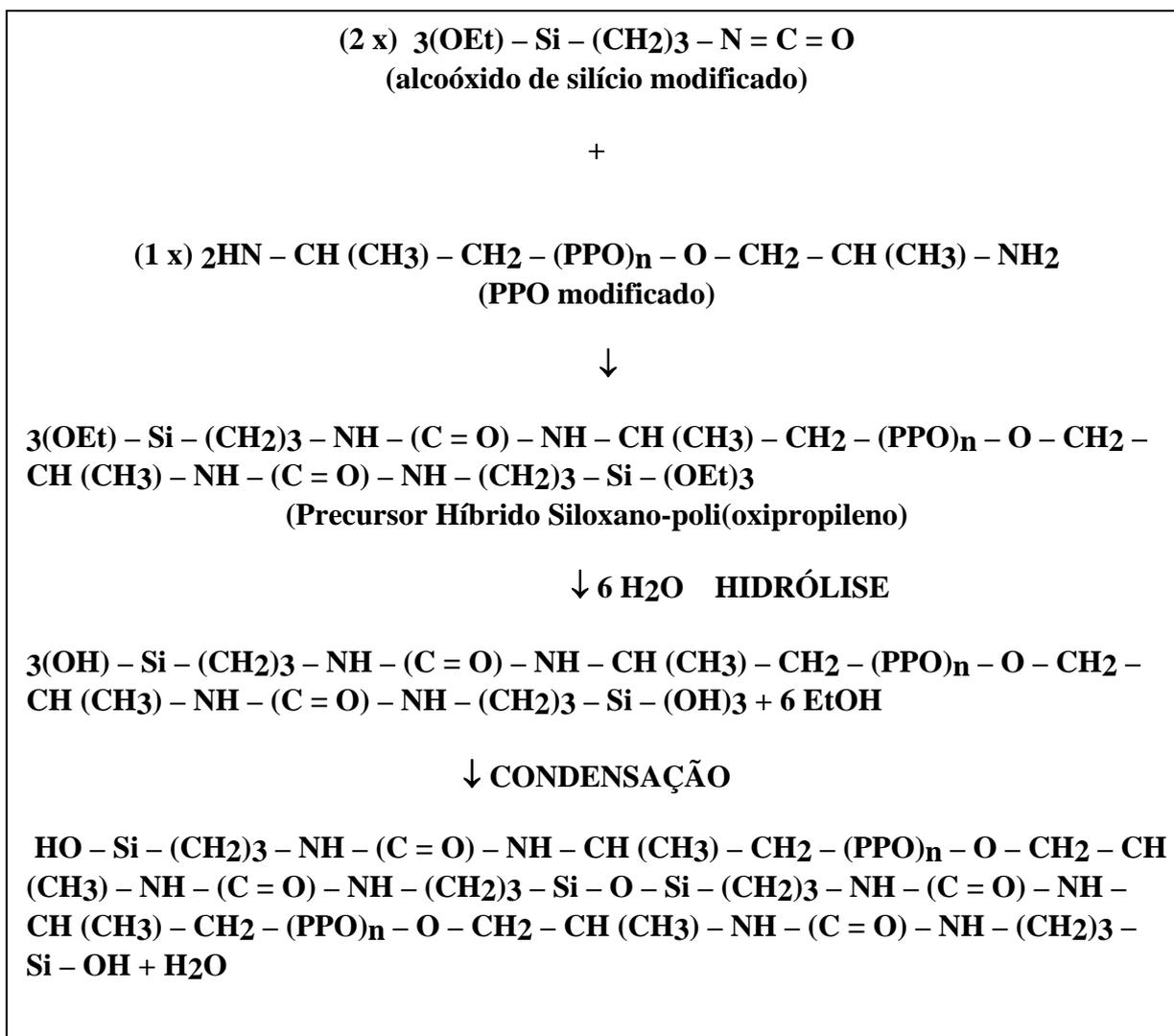


Figura 10 - Esquema de reações da síntese e policondensação dos precursores híbridos siloxano-poli(propileno óxido).

III. 8. 3. 4. Reação de ELISA

Após o bloqueio dos discos contendo a proteína do *core*, toda a reação imunoenzimática foi realizada de acordo com o item III. 8. 2, para posterior comparação destas duas metodologias.

III. 8. 4. CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR

Para a construção do imunossensor amperométrico, a proteína recombinante viral foi imobilizada em filmes de siloxano-poli (propileno óxido) preparados por método sol-gel e depositados na superfície de eletrodos de grafite pelo processo “dip-coating”.

III. 8. 4. 1. Monitoramento amperométrico da enzima peroxidase

A determinação do potencial de – 450 mV aplicado na padronização do imunossensor foi previamente estudada por voltametria cíclica para o intervalo de potencial de + 800 mV a –500 mV (RICCARDI, 2001).

III. 8. 4. 2. Síntese do precursor PPO 300

A síntese do precursor híbrido siloxano-poli (propileno óxido) está descrita no item III. 8. 3. 1 .

III. 8. 4. 3. Preparação e deposição dos filmes poliméricos sobre a superfície dos eletrodos de grafite

As matrizes híbridas orgânicas-inorgânicas foram preparadas após adição de 2,0 mL de etanol contendo o catalisador da reação de condensação NH_4F $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ e 0,4 mL de água milli-Q em 1g do precursor. Após agitação, a deposição destas matrizes foi realizada pelo método “dip-coating”, abrangendo as seguintes etapas (Figura 11): imersão, emersão, deposição e escoamento/evaporação [GALASSO, 1969]. Este procedimento resulta na formação de uma camada de filme polimérico contendo poros na superfície do eletrodo de grafite. Cada eletrodo foi submerso no filme polimérico PPO300 numa velocidade de 300 mm s^{-1} , mantendo-se cada eletrodo submerso durante 1 minuto. Estas condições experimentais envolvidas na deposição do filme polimérico foram estabelecidas através de estudos realizados previamente na padronização de um genossensor para VHC (RICCARDI, 2006). Os eletrodos apresentando o filme polimérico (área geométrica de $9,12 \text{ mm}^2$) foram deixados 5 dias à temperatura ambiente para completa evaporação do solvente e posteriormente armazenados sob refrigeração.

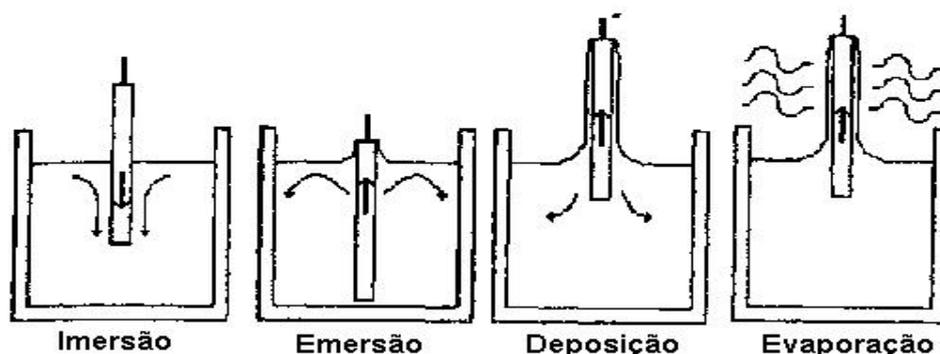


Figura 11 - Esquema da deposição de filmes poliméricos pelo método *dip coating*.

III. 8. 4. 4. Imobilização da proteína GST-core no filme polimérico por adsorção

Cada eletrodo contendo o filme de siloxano-poli (oxipropileno) foi imerso em 100 μ L de suspensão antigênica contendo 0,6ng de proteína recombinante, diluída em solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 e incubado por 18 horas a 4°C. Posteriormente os eletrodos foram lavados na mesma solução tampão, por agitação, 2 vezes durante 5 segundos, para retirar o excesso da proteína que não foi imobilizada.

III. 8. 4. 5. Verificação da reação imunoenzimática na superfície do eletrodo de grafite contendo filmes PPO 300 e 4000 através de técnicas amperométricas

A reatividade da proteína recombinante imobilizada na superfície do filme PPO 300 com anticorpos presentes no soro humano foi verificada através de técnicas imunoenzimáticas associadas às técnicas amperométricas, envolvendo as seguintes etapas:

- A) Após a lavagem (item III.8. 4. 4), cada eletrodo foi imerso em 100 μ L de solução de bloqueio (solução tampão PBS pH 7,5 /Tween 20 0,05%/ 0,1% BSA) durante 30 minutos, para bloquear os sítios livres do filme polimérico;
- B) Lavagem dos eletrodos em solução tampão PBS 0,05 mol L⁻¹ pH 7,5/Tween 20 0,05%, por agitação, 2 vezes durante 5 segundos;
- C) Para cada filme com a proteína adsorvida, adicionou-se 100 μ L de soro positivo para VHC e controles negativos, em triplicat,a na diluição 1/40 em solução de bloqueio e posterior incubação de 20 minutos. O branco da reação correspondeu ao antígeno viral imobilizado e bloqueio com solução tampão PBS +Tween-20, pH

7,5. Nesta etapa, ocorre uma reação de afinidade entre os anticorpos anti-*core* VHC presentes no soro de pacientes e a proteína recombinante imobilizada;

D) Lavagem segundo item B;

E) Cada eletrodo contendo o imunocomplexo recebeu 100 μ L de solução contendo anticorpos monoclonais anti-IgG humana conjugado com peroxidase (Sigma) na diluição 1:10000 em solução de bloqueio e incubado durante 20 minutos. Este conjugado se liga aos anticorpos ligados à proteína recombinante;

F) Lavagem segundo item B;

G) A atividade enzimática da peroxidase foi monitorada por técnicas amperométricas a potencial constante – 450 mV, utilizando soluções de peróxido de hidrogênio (substrato) e iodeto de potássio na proporção 1:3 respectivamente, preparadas em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7.0 em Potenciostato-Galvanostato Eco Chemie modelo PGSTAT 10 (Programas GPES).

Todas as etapas foram realizadas a (25 \pm 1)°C.

O esquema apresentado na Figura 12 mostra as etapas envolvidas na construção do imunossensor para VHC.

III. 8. 4. 6. Otimização do imunossensor amperométrico

A otimização do imunossensor para VHC envolve vários parâmetros a serem analisados. Neste trabalho foram apresentados os estudos das diluições da proteína recombinante e o efeito do tempo de incubação dos anticorpos primários e secundários.

As melhores condições experimentais para o monitoramento da reação enzimática, tais como pH, potencial aplicado na técnica amperométrica e tempo de incubação dos substratos H₂O₂/KI, foram delineadas previamente (RICCARDI et al., 2002).

III. 8. 4. 6. 1. Estudo das diluições da proteína recombinante e do anticorpo primário na resposta do imunossensor

Cada eletrodo contendo o filme PPO 300 foi imerso em concentrações crescentes da proteína (ng: 0,16, 0,31, 0,62, 1,25, 2,5) diluída em solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 e incubado por 18 horas a 4°C. Posteriormente, estes eletrodos foram lavados por agitação em solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 por 2 vezes, durante 5 segundos e incubados com correspondentes diluições decrescentes do anticorpo primário presente no

soro de pacientes infectados com VHC (1:160, 1:80, 1:40, 1:10). A etapa de monitoramento da reação amperométrica também foi realizada com eletrodos contendo apenas o filme PPO300 e eletrodos com filmes adsorvidos com as mesmas diluições da proteína. Os outros parâmetros (diluição do anticorpo secundário, solução substrato e mediador, etc.) foram fixados de acordo com item III. 8. 4. 5.

Eletrodo de grafite com filme polimérico PPO 300

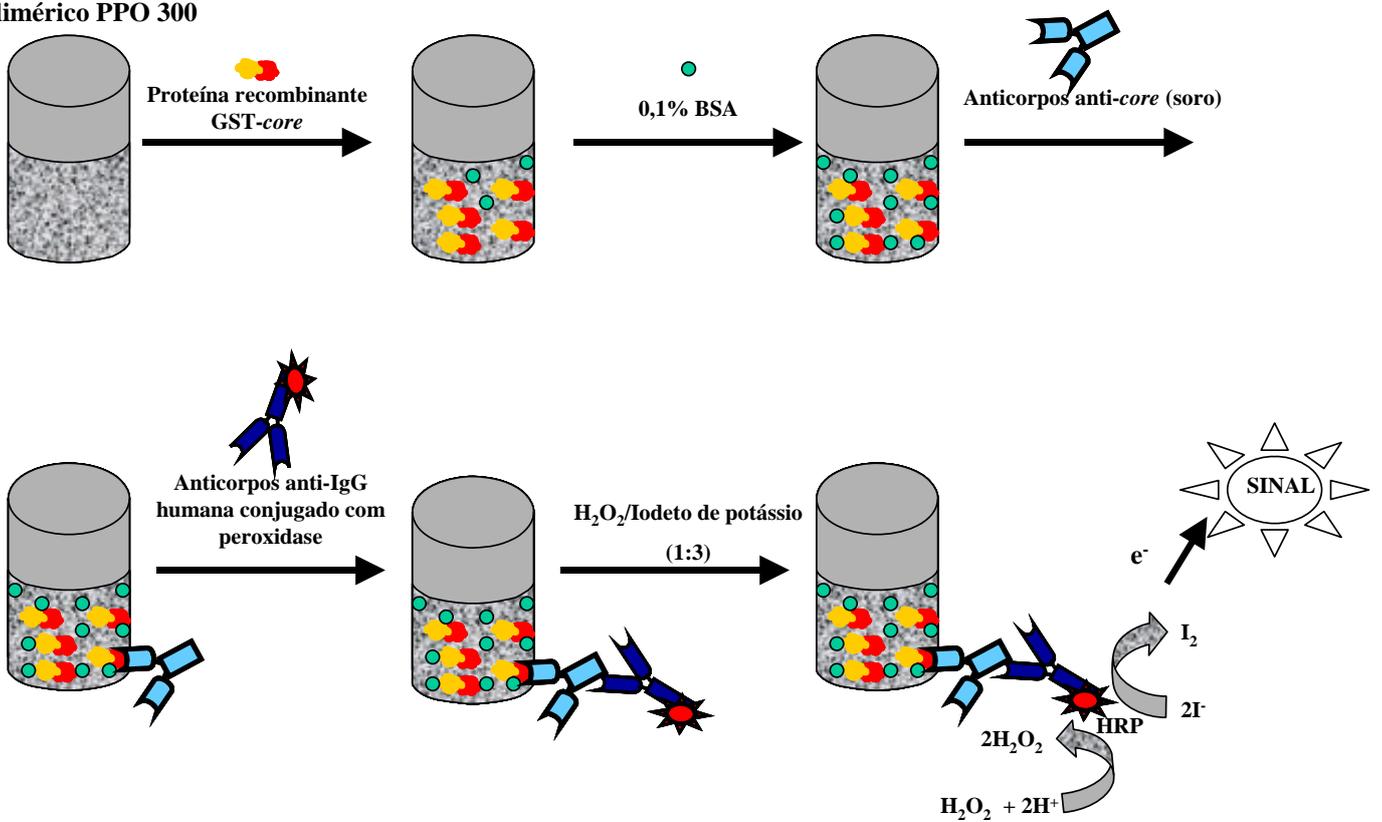


Figura 12 - Esquema das etapas envolvidas no imunossensor amperométrico para determinação de anticorpos anti-VHC utilizando a proteína recombinante GST- core.

III. 8. 4. 6.2. Estudo do tempo de incubação dos anticorpos primários e secundários

Eletrodos de grafite contendo filme PPO 300 foram imersos em soluções da proteína recombinante diluída em solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0, numa concentração final de 0,31ng, incubados durante 24 horas a 4°C. Posteriormente, estes eletrodos foram lavados por agitação em solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0, 2 vezes de 5 segundos, para retirada do material que não foi imobilizado. As outras etapas desenvolvidas foram realizadas conforme descritas no item III. 8. 4. 5, alterando-se apenas os tempos de incubação dos eletrodos na presença de anticorpos primários e secundários, que foram de 10, 20, 30 e 45 minutos.

III. 8. 4. 7. Determinação do limiar de reatividade (cut off) no imunossensor amperométrico

O limiar de reatividade (*cut off*) foi calculado através da média dos valores de intensidade de corrente de 10 soros negativos somando-se com duas vezes o desvio padrão.

III. 8. 4. 8. Aplicação do imunossensor amperométrico em soros de pacientes com infecção pelo VHC e com doenças inflamatórias e infecciosas

Após a otimização das condições ideais e determinação do *cut off*, realizou-se o procedimento do imunossensor com amostras de soros positivos para VHC e soros positivos para Hepatite B, HIV, HTLV, doença de Chagas, fator reumatóide, anti-estreptolisina O, PCR (Proteína C Reativa) e FAN (Fator Anti-Núcleo) para verificação de reatividade cruzada destes soros com a proteína recombinante imobilizada na superfície do eletrodo.

Capítulo IV

Resultados e

Discussão

IV. 1. EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL E OBTENÇÃO DO cDNA

Usando-se o Teste Qualitativo AMPLICOR[®] Hepatitis C Vírus (HCV), Version 2.0 obtivemos um amplificado biotilado de 244 pb da região 5' não traduzida do genoma do VHC, que posteriormente foi analisado no teste de genotipagem viral.

A técnica de genotipagem do VHC por hibridação reversa (LIPA – *Line Probe Assay*) permitiu o reconhecimento dos subtipos 1b e 1a e do genótipo 3.

As amostras referentes ao subtipo 1b foram submetidas à extração do RNA viral e as alíquotas foram devidamente identificadas e armazenadas em freezer –80°C para serem utilizadas posteriormente para obtenção do cDNA da proteína do *core* viral. A escolha deste genótipo foi baseada em sua maior frequência encontrada na região de Araraquara no início deste trabalho.

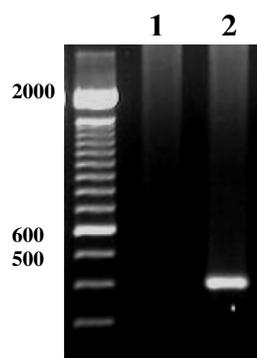
IV. 2. AMPLIFICAÇÃO

O fragmento de 408pb foi amplificado após duas reações de PCR a partir de cDNAs obtidos de RNA virais isolados de soros de pacientes infectados com vírus da hepatite C referente ao genótipo 1b. O resultado desta amplificação só apresentou-se satisfatório quando se utilizou duas reações subseqüentes de PCR para amplificação (com oligonucleotídeos externos seguida de *Hemi-Nested PCR*), o que favoreceu o aumento da especificidade e sensibilidade da reação.

O produto amplificado apresentou o tamanho esperado (408pb) quando analisado em gel de agarose 1% (Figura 13).

Uma alíquota deste fragmento foi submetida à amplificação utilizando oligonucleotídeos com sítios de restrição.

Figura 13 - Amplificação por PCR do fragmento de 408pb pertencente ao gene do *core* viral. (1) controle negativo; (2) Fragmento de 408pb. À esquerda está representado o marcador de 100pb. O gel de agarose foi corado com brometo de etídio 0,5µg/mL.



IV. 3. CLONAGEM DO FRAGMENTO DE 408pb NO VETOR pET28a E INDUÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

O fragmento obtido na reação de *Hemi-Nested PCR* (408pb) foi eluído do gel de agarose purificado, clivado com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* e ligado ao vetor pET28a previamente clivado com as mesmas enzimas. A seguir, uma alíquota desta reação de ligação foi utilizada para transformar células de *E. coli* BL21. Após a seleção de colônias recombinantes, o DNA plasmidial foi purificado e seqüenciado como descrito em Materiais e Métodos (item III 5.8). A seqüência obtida foi comparada com a seqüência do gene inserida no Banco de Dados NCBI (*Blastn Gen Bank* – AF 333324), confirmando a autenticidade e orientação correta do inserto.

Após a transformação do plasmídeo recombinante à cepa *E. coli* BL21 (DE3), realizou-se a indução da expressão de acordo com o item III. 5. 9. 1 descrito em Materiais e Métodos. A indução foi realizada nas seguintes condições: 37°C, 250 rpm, na presença do indutor IPTG em concentração final de 0,4mM. O extrato protéico das culturas induzida e não induzida foi analisado em gel SDS-PAGE 15%.

A proteína recombinante *His-core* foi produzida no tamanho esperado de aproximadamente 17kDa (Figura 14). Um resultado similar foi observado quando a indução foi realizada a 30°C ou na presença do IPTG 1mM.

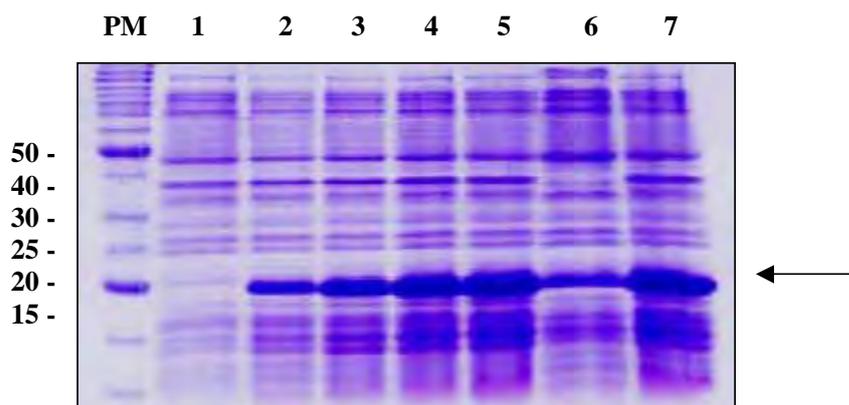


Figura 14 - Análise da indução da expressão gênica em gel de poliacrilamida 15% utilizando vetor pET28a com 0,4 mM de IPTG a 30°C. PM, padrão de peso molecular (kDa); 1, controle não induzido; 2, 1 hora de indução; 3, 2 horas de indução; 4, 3 horas de indução; 5, 4 horas de indução; 6, sobrenadante (fração solúvel); 7, precipitado (fração insolúvel). A seta indica a proteína recombinante na região de 17 kDa.

IV. 4. TESTE DE SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA *His-core*

O protocolo utilizado para verificar a solubilidade da proteína do *core* está descrito em Materiais e Métodos (item III. 5. 9. 3.). Após a sonicação e centrifugação das culturas induzidas à 30°C e 37°C, uma alíquota das respectivas frações solúveis (sobrenadante) e insolúvel (“pellet”) foram analisadas em SDS-PAGE. Uma fração considerável da proteína *His-core* é expressa em forma solúvel em *E. coli* quando a indução é realizada a 30°C durante 4 horas (Figura 14).

A solubilidade da proteína *His-core* apresentou-se menor quando a expressão foi realizada a 37°C.

A tentativa utilizada para expressar a região do *core* na sua forma parcial (408pb) foi executada para eliminar o domínio hidrofóbico da porção carboxi-terminal da região completa de 573pb (SEONG et al., 1996) e promover aumento da expressão e conseqüente aumento de sua solubilidade, o que favoreceu este resultado satisfatório.

IV. 5. PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA *His-core* EM CONDIÇÕES NÃO DESNATURANTES

A purificação da proteína *His-core* foi realizada conforme descrito em Materiais e Métodos (item III. 6). Após sonicação e centrifugação de 500 mL das culturas induzidas a 30°C, a fração insolúvel no precipitado foi armazenada a -20°C e a fração solúvel no sobrenadante foi utilizada para passagem da proteína na coluna de resina de níquel (NI-NTA Superflow Qiagen) para purificação por afinidade.

Não houve a ligação da proteína *His-core* à coluna durante os testes com a proteína recombinante nestas condições. Além disso, a proteína é eluída totalmente na fração correspondente ao “flow-through”, e apenas algumas proteínas bacterianas (contaminantes) eluem juntamente com o imidazol (Figura 15).

Com base nestes resultados, deduzimos que, provavelmente o *His-Tag* estaria oculto na estrutura da proteína ou ocorreu uma provável degradação da proteína expressa, e então optou-se por utilizar um protocolo desnaturante de purificação.

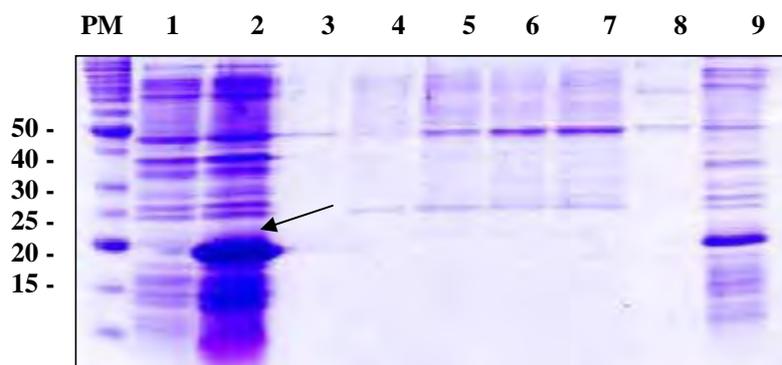


Figura 15 - Análise da purificação da proteína *His-core* em gel de poliacrilamida 15% utilizando-se coluna de níquel em condições não desnaturantes. PM, padrão de peso molecular (kDa); 1, controle não induzido; 2, 4 horas de indução; 3, 10 mM imidazol; 4, 25 mM imidazol; 5, 50 mM imidazol; 6, 75 mM imidazol; 7, 100 mM imidazol; 8; 250 mM imidazol; 9, lavagem da coluna (“flow-through”). A seta indica a proteína expressa na região de 17kDa.

IV.6. PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA *His-core* EM CONDIÇÕES DESNATURANTES

Para os testes de purificação da proteína na forma desnaturada foram utilizadas sugestões do fabricante da resina (item III. 6. 2).

Como pode ser verificado na Figura 16, a constância da não ligação na coluna foi observada em todos os testes sob condições desnaturantes, sendo que a proteína de interesse permaneceu na fração correspondente ao “flow-through”. Apesar de não haver uma condição ideal para purificação da proteína *His-core*, sua expressão apresentou-se satisfatória, mostrando um resultado de grande importância, pois a expressão dessa região de 408pb do *core* viral ainda não se encontra descrita na literatura. Baseando-se nestes resultados obtidos com a utilização do vetor pET28a, optou-se pela clonagem do fragmento de 408 pb no vetor pET42a, em fusão com o gene que codifica a proteína GST (Glutathione S-Transferase).

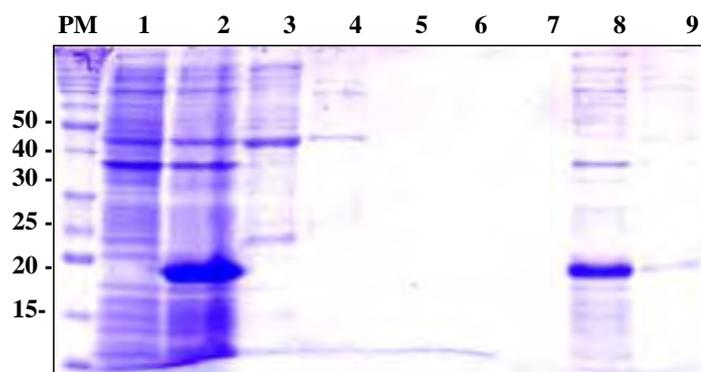


Figura 16 - Análise da purificação da proteína His-*core* em coluna de níquel em condições desnaturantes. PM, padrão de peso molecular (kDa); 1, controle não induzido; 2, indução por 4 horas; 3, 10 mM imidazol; 4, 25 mM imidazol; 5, 50 mM imidazol; 6, 75 mM imidazol; 7, 100 mM imidazol; 8; “flow-through”.; 9, fração solubilizada com uréia.

IV. 7. CLONAGEM DO FRAGMENTO DE 408pb NO VETOR pET42a E INDUÇÃO DA EXPRESSÃO

A escolha por este sistema deve-se à sua utilização em muitos trabalhos descritos na literatura que obtiveram sucesso na expressão e purificação da proteína do *core* utilizando a proteína de fusão GST. Seong et al. (1996) foi um dos primeiros pesquisadores a obter a expressão da proteína do *core* (aminoácidos 1-123) na forma solúvel com elevada reatividade para anticorpos VHC. Neste trabalho o pET42a foi utilizado para expressão de uma proteína de 136 aminoácidos que ainda não consta na literatura.

O fragmento de 408pb amplificado com sítios de restrição, foi inserido entre os sítios de clivagem das enzimas *NcoI* e *BamHI* no vetor pET42a. Após a transformação da cepa de *E. coli* BL21 (DE3), a seleção das colônias recombinantes foi realizada através da técnica de “PCR de colônias”. Os plasmídeos de três clones foram purificados e seqüenciados como descrito em Materiais e Métodos. A seqüência obtida foi comparada com a seqüência do gene inserida no Banco de Dados NCBI, confirmando a seqüência.

A cepa bacteriana *E. coli* BL21 (DE3) transformada foi submetida à indução da expressão utilizando 0,4 mM de IPTG e temperatura a 30°C , por uma noite. Como é possível observar na Figura 17, nessas condições houve expressão da proteína GST-*core* no tamanho

esperado de aproximadamente 44kDa (GST-*core*136). A indução a 30°C por 4 horas apresentou-se com menor rendimento.

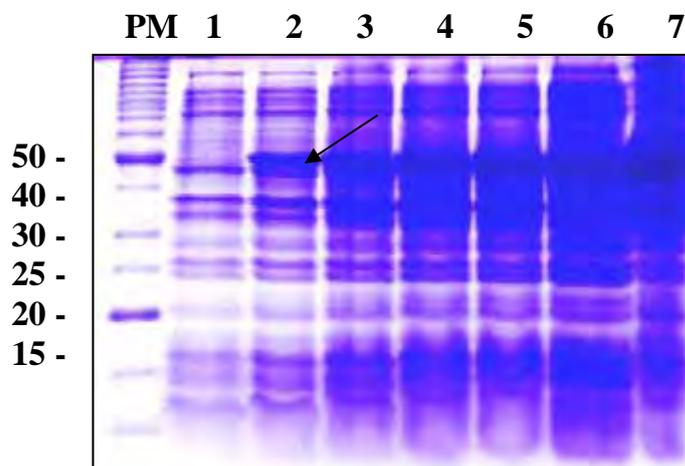


Figura 17 - Análise da indução da expressão da proteína GST-*core* em gel de poliacrilamida 15% utilizando o vetor pET42a com 0,4mM de IPTG a 30°C. PM, padrão de peso molecular (kDa); 1, controle não induzido; 2, 1 hora de indução; 3, 2 horas de indução; 4, 3 horas de indução; 5, 4 horas de indução; 6, fração solúvel; 7, fração insolúvel. A seta indica a proteína expressa de aproximadamente 44kDa.

IV. 8. TESTE DE SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA GST-*core*

Após estabelecermos as condições de expressão da proteína GST-*core* em fusão com GST, realizamos o teste de solubilidade descrito em Materiais e Métodos (item III. 5. 9. 3), da mesma forma que aplicamos para a proteína His-*core*.

Como mostra a Figura 17, obtivemos uma fração considerável da proteína de fusão em forma solúvel quando a expressão foi realizada a 30°C por uma noite.

IV. 9. PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA GST-*core* POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE A GLUTATIONA

A fração solúvel da proteína de interesse foi purificada utilizando a coluna de afinidade a GST, conforme descrito em materiais e métodos (III. 6. 3). A proteína GST-*core*, juntamente com algumas proteínas de menores PM, que inicialmente consideramos como

“contaminantes”, começou a ser eluída após a 1ª fração de eluição com tampão glutatona (Figura 18). A presença de outras proteínas de menores PM que eluem junto com a GST-*core*, poderia ser devido à presença de proteínas bacterianas que ligam à coluna juntamente com a proteína de interesse ou à degradação da proteína GST-*core* durante o processo de sonicação.

Optou-se então pela adição de um coquetel inibidor de protease, 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 aminopeptidases (“Protease inhibitor cocktail”- Sigma) e diminuição dos pulsos de ondas ultra-sônicas durante o processo de lise bacteriana. Esta alteração no procedimento não eliminou as proteínas de menores PM durante a purificação protéica, sendo que, o padrão de bandas continuou exatamente o mesmo, eliminando a possibilidade de ter ocorrido degradação protéica no processo de lise celular.

Na tentativa de eliminar possíveis proteínas contaminantes, aumentamos a concentração de sal no tampão de lise e durante o processo de purificação. Esta modificação também não melhorou a purificação da proteína no sentido de eliminar proteínas contaminantes.

Diante desses resultados, realizou-se uma reação de *western blot* com amostras purificadas e com extrato total da cultura induzida para verificar a imunorreatividade das proteínas de menores PM na presença de soros obtidos de pacientes infectados com o VHC pertencente ao genótipo 1b. Todas as proteínas obtidas após o processo de purificação, inclusive as de menores PM, apresentaram imunorreatividade frente ao soro de paciente infectado com VHC. Este mesmo perfil de reatividade foi observado com extratos protéicos totais obtidos após 1, 2, 3 e 4 horas de indução (Figura 19B). Estes resultados demonstram que as bandas de menores PM que são purificadas juntamente com a proteína de fusão GST-*core* de aproximadamente 44kDa, são decorrentes de um processo de degradação da proteína de interesse.

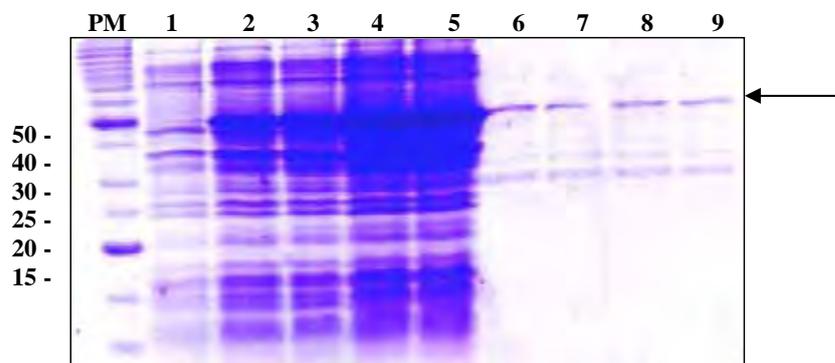


Figura 18 - Análise da purificação da proteína *GST-core* em gel de poliacrilamida 15% utilizando coluna de afinidade a glutationa. PM, padrão de peso molecular (kDa); 1, controle não induzido; 2, 3 horas de indução; 3, 4 horas de indução; 4, fração solúvel; 5, fração insolúvel; 6-9, Frações coletadas na eluição. A seta indica a proteína expressa de aproximadamente 44kDa.

IV. 10. ANÁLISE DA IMUNORREATIVIDADE DA PROTEÍNA *GST-CORE*

IV. 10. 1. Western blot

Com o objetivo de verificar a imunorreatividade das proteínas *GST-core* e *GST* diante de soros de pacientes com VHC com diferentes genótipos utilizamos um ensaio de “Western blot” descrito em Materiais e Métodos (item III. 7. 1). Além de soros de pacientes com VHC, também testamos a imunorreatividade destas proteínas diante de soros de pacientes positivos para Hepatite B, HIV, HTLV (Vírus Linfotrópico de Células T Humana), doença de Chagas, Fator Reumatóide e FAN (Fator Anti-Núcleo).

A Figura 19A mostra a análise em gel de poliacrilamida 15% da expressão da proteína *GST-core* após 1, 2, 3 e 4 horas de indução e a Figura 19B exhibe a reatividade destes clones induzidos na região esperada com soro positivo para anticorpos anti-VHC (genótipo 1b), não se observando nenhuma reatividade protéica do mesmo clone não induzido.

A proteína *GST-core* purificada apresentou imunorreatividade na presença de soros com VHC de diferentes genótipos (1a, 1b, 2b e 3), confirmando que a proteína do *core* apresenta seqüência de aminoácidos altamente conservada entre os isolados do VHC (KATO

et al., 1990) e fornece resultados satisfatórios em relação à detecção de todas as amostras positivas para anticorpos anti-VHC, independente do genótipo presente no paciente. Não houve reconhecimento de nenhuma proteína na presença de soros de pacientes não infectados com VHC, e, além disso, a proteína GST não foi reconhecida por nenhum dos soros relacionados anteriormente (Figura 20). Estes resultados indicam que esta proteína de fusão GST-*core*, pode ser utilizada como uma ferramenta no diagnóstico de infecção pelo vírus da hepatite C.

Para evitar a degradação protéica, foi realizada a liofilização de uma porção da amostra contendo a proteína GST-*core*, que depois de reconstituída após alguns meses de estocagem, manteve sua imunorreatividade, podendo ser utilizada com segurança na padronização das metodologias propostas neste trabalho (dados não mostrados).

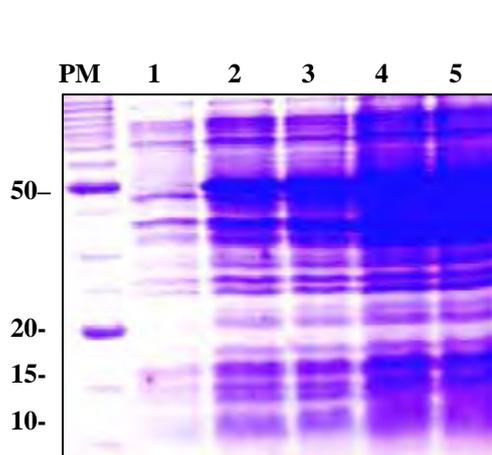


Figura 19A - Análise da indução da expressão da proteína GST-*core* em gel de poliacrilamida 15% utilizando o vetor pET42a com 0,4mM de IPTG a 30°C. PM, padrão de peso molecular (kDa); 1, controle não induzido; 2, 1 hora de indução; 3, 2 horas de indução; 4, 3 horas de indução; 5, 4 horas de indução.

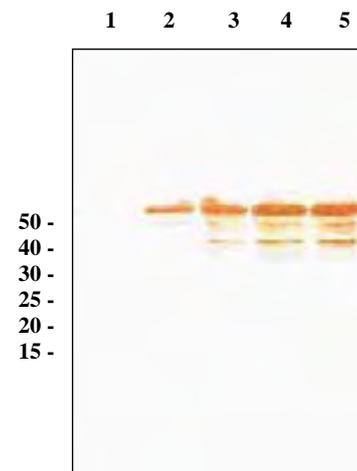


Figura 19B - Análise da imunorreatividade em ensaio “Western blot” da proteína GST-*core*, utilizando soro de paciente infectado com VHC genótipo 1b. 1: clone pET42a-*core* não induzido, 2: clone pET42a-*core* induzido (1 hora), 3: clone pET42a-*core* induzido (2 horas), 4: clone pET42a-*core* induzido (3 horas), 5: clone pET42a-*core* induzido (4 horas).

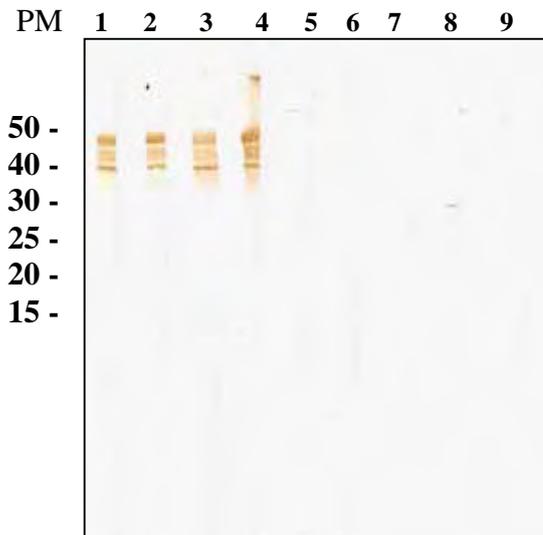


Figura 20 – Análise da imunorreatividade em ensaio “Western blot” da proteína recombinante GST-*core*. PM: marcador de peso molecular; 1: Reação do clone pET42a-*core* induzido 4 horas com soro de paciente com genótipo 1a , 2: Reação do clone pET42a-*core* induzido 4 horas com soro de paciente com genótipo 1b, 3: Reação do clone pET42a-*core* induzido 4 horas com soro de paciente com genótipo 2b, 4: Reação do clone pET42a-*core* induzido 4 horas com soro de paciente com genótipo 3, 5: Reação do clone pET42a-*core* induzido 4 horas com soro de paciente com HIV, 6: Reação do clone pET42a-*core* induzido 4 horas com soro de paciente com HBV, 7: Reação do clone pET42a-*core* induzido 4 horas com soro de paciente não infectado por VHC, 8: Reação do clone pET42a (só GST) induzido 4 horas com soro de paciente com genótipo 1b, 9: Reação do clone pET42a (GST) induzido 4 horas com soro de paciente não infectado com VHC.

IV. 10. 2. Slot blot

A fim de se estabelecer um padrão de imunorreatividade das proteínas GST e GST-*core*, em relação às concentrações, realizou-se a dosagem protéica pelo método de Bradford (item III. 6. 4.) destas respectivas proteínas, sendo aplicadas em concentrações crescentes no sistema *Hybri SlotTM Manifold* (Gibco BRL – Life Technologies).

As proteínas GST-*core* e GST foram aplicadas nas seguintes concentrações crescentes (ng): 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 2,5, 5,0, 10,0.

Como soro positivo foi utilizado um soro de paciente com VHC (genótipo 1b), cujos níveis de anticorpos e carga viral, foram anteriormente detectados por ELISA e Teste Qualitativo AMPLICOR[®] Hepatitis C Vírus (HCV), Version 2.0, respectivamente.

Como mostra a Figura 21, houve uma reatividade crescente em relação à proteína GST-*core*, não ocorrendo nenhuma reatividade contra a proteína GST, mesmo em altas concentrações, o que reforça a aplicação desta proteína GST-*core* em métodos diagnósticos para VHC.

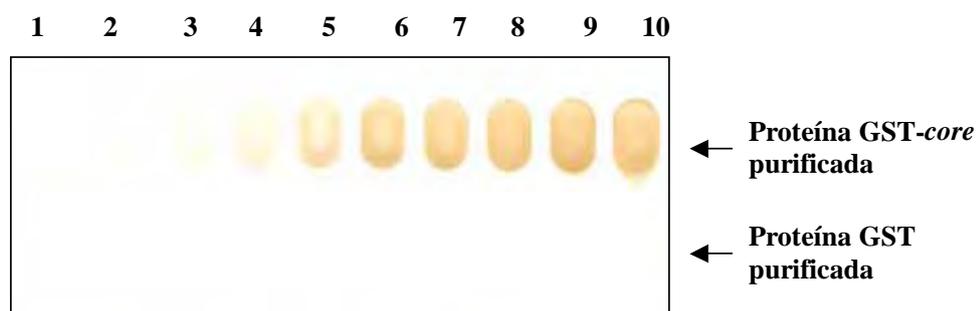


Figura 21 – Reconhecimento das proteínas GST-*core* e GST em ensaio *Slot Blot*, com crescentes concentrações de: **2:** 0,05ng, **3:** 0,1ng, **4:** 0,2ng, **5:** 0,4ng, **6:** 0,8ng, **7:** 1,6ng, **8:** 2,5ng, **9:** 5,0ng, **10:** 10,0ng. **1:** controle negativo: 100 μ L de TBS.

Com base nos resultados descritos anteriormente, e confirmada a reatividade da proteína expressa GST-*core* com soros de pacientes infectados com VHC, esta proteína foi utilizada para o desenvolvimento de técnicas imunológicas, como ELISA e imunossensor amperométrico com aplicação de um possível e novo teste diagnóstico para Hepatite C.

IV. 11. APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

IV. 11. 1. Análise de imunorreatividade entre os anticorpos policlonais produzidos e purificados e a proteína recombinante GST-*core*

A reatividade da proteína recombinante frente aos anticorpos policlonais produzidos pelos coelhos foi verificada através da técnica de *Western blot* de acordo com item III. 7. 1. Houve reconhecimento desta proteína pelos anticorpos policlonais, demonstrando sua imunogenicidade (dados não mostrados). Estes anticorpos poderão ser utilizados para estudos posteriores envolvendo a padronização de novos métodos para diagnóstico para VHC.

IV. 11. 2. Método de ELISA com imobilização em placa de poliestireno

Diluições crescentes da proteína recombinante foram adsorvidas em microplacas de poliestireno para verificação de sua reatividade com anticorpos presentes no soro humano pelo método de ELISA indireto (item III. 8. 2). Através da Tabela 5 podemos observar que houve um aumento da reatividade da proteína *GST-core* purificada quando se aplicou concentrações crescentes desta proteína na presença de soros positivos para VHC na diluição fixa de 1:40.

Considerando que as leituras de absorbância também foram realizadas com soros negativos para VHC, os resultados experimentais que favoreceram uma maior discriminação entre soro positivo e negativo foram: 1,25ng de proteína/cavidade, diluição de 1:40 e 1:10000 para anticorpos primários e secundários, respectivamente.

Com base no *cut off* calculado de 0,313 e na otimização descrita anteriormente, não ocorreu reatividade da proteína recombinante *GST-core* na presença de soros de portadores de algumas doenças infecciosas e inflamatórias (Tabela 6). Estes resultados revelaram ausência de reatividade cruzada destes soros com a proteína recombinante produzida *GST-core*, confirmando os resultados observados nas reações de *Slot blot* e *Western blot*. Além disso, não houve também reatividade da proteína GST (expressa como controle) na presença de soros negativos e este método revelou positividade entre os infectados pelos diferentes genótipos virais. Estes resultados reforçam ainda mais a utilização da proteína recombinante *GST-core* em novas metodologias envolvidas no diagnóstico viral, como proposto neste trabalho.

Tabela 5: Valores de absorvância obtidos na reação de ELISA após concentrações crescentes da proteína do *core* e fixação da concentração do soro positivo.

Concentrações/poço (ng)		Absorvância
Proteína <i>core</i>	Ac 1°	(450nm/540nm)
2,5	1: 40	3,32 ± 0,025
1,25	1: 40	1,77 ± 0,031
0,62	1: 40	1,53 ± 0,016
0,31	1: 40	1,16 ± 0,027
0,16	1: 40	0,88 ± 0,050

n= 3

Cut off = 0,313

Tabela 6: Valores de absorvância obtidos na reação de ELISA para soros com algumas doenças infecciosas e inflamatórias.

Soros positivos para doenças inflamatórias ou infecciosas	A(450nm/540nm)
Hepatite B	0,256 ± 0,064
HIV	0,204 ± 0,031
HTLV	0,300 ± 0,042
Doença de Chagas	0,150 ± 0,048
Fatores reumatóides	0,095 ± 0,072
Fatores anti-núcleo (FAN)	0,148 ± 0,032
Anti- estreptolisina O	0,169 ± 0,028
Proteína C reativa (PCR)	0,262 ± 0,039

n=2

Cut off = 0,313

IV. 11. 3. Desenvolvimento de um teste de ELISA utilizando discos de siloxano-poli(propileno óxido) como suporte sólido

De acordo com o procedimento do ELISA convencional baseado na ligação da proteína em microplacas de poliestireno (item III. 8. 2) e utilizando as mesmas condições pré-estabelecidas neste método (diluição de 1:40 e 1:10000 para anticorpos primários e secundários, respectivamente), 1,25ng da proteína recombinante diluída em PBS foi adsorvida em discos de siloxano-poli(propileno óxido) para verificação de sua reatividade com anticorpos anti-VHC presentes em 10 soros positivos de diferentes genótipos. O *cut off* desta metodologia apresentou-se igual a 0,386. A Tabela 7 demonstra uma comparação entre esta nova metodologia de imobilização e o ELISA convencional.

Tabela 7: Comparação dos valores de absorbância do ELISA utilizando o polímero sol-gel na forma de discos e ELISA convencional na presença de diferentes soros positivos.

	Absorbância (nm)	
	Poliestireno	Discos-PPO
Amostra 1 (genótipo 1b)	3,324	4,256
Amostra 2 (genótipo 1b)	2,578	3,219
Amostra 3 (genótipo 1b)	3,225	3,988
Amostra 4 (genótipo 1a)	1,722	2,154
Amostra 5 (genótipo 1a)	2,781	3,134
Amostra 6 (genótipo 1a)	1,322	1,897
Amostra 7 (genótipo 2b)	1,546	2,134
Amostra 8 (genótipo 2b)	2,578	3,531
Amostra 9 (genótipo 3)	3,191	3,876
Amostra 10 (genótipo 3)	1,616	2,324

Cut off ELISA-poliestireno= 0,313

Cut off ELISA-PPO= 0,386

Como podemos observar, esta nova tecnologia de imobilização envolvendo sol-gel aplicada à técnica de ELISA para detecção de anticorpos anti-*core* revelou positividade entre os infectados pelos diferentes genótipos e nenhuma amostra apresentou reatividade cruzada frente a soros de portadores de algumas doenças infecciosas e inflamatórias (Tabela 8).

Tabela 8: Valores de absorbância obtidos na reação de ELISA envolvendo sistema sol-gel para soros com algumas doenças infecciosas e inflamatórias.

Soros positivos para doenças inflamatórias ou infecciosas	A(450nm/540nm)
Hepatite B	0,356 ± 0,036
HIV	0,289 ± 0,052
HTLV	0,300 ± 0,078
Doença de Chagas	0,203 ± 0,057
Fatores reumatóides	0,365 ± 0,092
Fatores anti-núcleo (FAN)	0,248 ± 0,023
Anti- estreptolisina O	0,179 ± 0,082
Proteína C reativa (PCR)	0,252 ± 0,028

n=2

Cut off = 0,386

Estes resultados demonstram que o desenvolvimento desta nova metodologia de imobilização da proteína recombinante em polímero sol-gel para detecção de anticorpos anti-*core*, ainda não observada na literatura, pode ser aplicada para triagem em doadores de sangue e apresenta-se como uma ferramenta para imobilização de diversas proteínas (enzimas, hormônios e fármacos). Além disso, estes polímeros também possuem a vantagem de aderência em vários tipos de materiais, o que possibilita sua utilização em várias inovações tecnológicas onde há a necessidade de proteínas imobilizadas.

IV. 11. 4. Construção do imunossensor amperométrico

A construção do imunossensor amperométrico para o VHC constitui-se na imobilização da proteína recombinante GST-*core* em filmes híbridos de siloxano-poli(propileno óxido) preparados por método sol-gel e depositado na superfície de eletrodos de grafite pelo processo de “dip coating”. Os poros formados no polímero aumentam a área superficial permitindo a imobilização da proteína recombinante e o desenvolvimento de um novo imunossensor amperométrico para detecção de anticorpos anti-VHC aplicado ao diagnóstico viral ainda não descrito na literatura.

IV. 11. 4. 1. Estudos prévios do monitoramento da enzima peroxidase por técnicas eletroanalíticas

A determinação do potencial de -450 mV para a redução de iodo foi estabelecida previamente por voltametria cíclica (RICCARDI et al., 2001).

Foram traçados voltamogramas empregando o sistema eletroquímico composto por grafite modificado, Ag/AgCl e platina como eletrodo de trabalho, referência e auxiliar, respectivamente. A Figura 22 representa o voltamograma cíclico do sistema de monitoramento da reação catalítica sobre a superfície do eletrodo de grafite recoberta por filmes PPO na presença e ausência da enzima (conjugado estreptavidina-peroxidase, S-HRP) utilizando soluções de peróxido de hidrogênio e iodeto de potássio na proporção 1:3 respectivamente, preparadas em solução tampão fosfato mol L⁻¹ pH 7.0. Pode-se observar que a atividade do conjugado STA-HRP aumentou significativamente com o aumento do valor de potencial no intervalo de $-0,400$ a $-0,550$ V. Portanto, escolheu-se realizar o monitoramento da reação enzimática a $-0,450$ V para os experimentos posteriores.

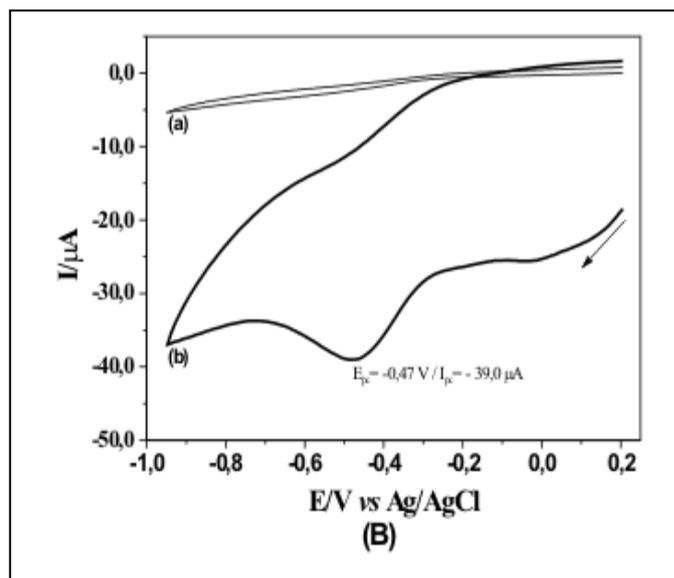


Figure 22 - Voltamograma cíclico do sistema de monitoramento da atividade enzimática ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{KI}$ 1:3) em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7.0. Os filmes foram depositados, a partir de uma solução da matriz híbrida orgânica-inorgânica (PPO 4000 ou 300) na ausência (a) ou presença (b) de $1,5 \text{ U mg}^{-1}$ do conjugado S-HRP, na superfície de eletrodos de grafite.

IV. 11. 4. 2. Verificação da reação imunoenzimática na superfície do eletrodo de grafite contendo filme PPO 300 através de técnicas amperométricas

Após a confirmação da imunorreatividade da proteína *GST-core* recombinante produzida em *E.coli* frente aos soros de pacientes infectados com VHC por *Western blot* e ELISA, e ausência de sua reatividade cruzada em relação a outros soros testados, foram iniciados procedimentos para a construção de um imunossensor para VHC. Estudos preliminares envolvendo esta técnica (item III. 8. 4. 5), demonstraram que o precursor PPO 300 foi ideal para imobilização da proteína e conseqüente monitoramento da reação imunoenzimática. Houve ausência de resposta do sistema amperométrico quando foi utilizado o precursor PPO 4000 como suporte para imobilização protéica. Portanto, todos os experimentos foram realizados com o precursor PPO 300.

IV. 11. 4. 3. Estudo das diluições da proteína recombinante e do anticorpo primário na resposta do imunossensor

Eletrodos de grafite contendo o filme depositado foram submetidos à adsorção com concentrações crescentes da proteína recombinante preparadas em solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 e, posterior incubação com diluições decrescentes do anticorpo primário, de acordo com item III. 8. 4. 6. 1. A Tabela 9 e Figura 23 mostram os resultados obtidos.

Tabela 9: Valores de intensidade de corrente obtidos após diluições crescentes da proteína do *core* e decrescentes dos anticorpos primários, e fixação dos outros parâmetros.

Diluições*		Corrente elétrica
Proteína <i>core</i>	Ac 1°	(μ A)
1: 400	1: 160	- 0,211 \pm 0,015
1: 800	1: 80	- 0,366 \pm 0,027
1: 1600	1: 40	- 0,582 \pm 0,025
1: 6400	1:10	- 0,659 \pm 0,022

n=2

* As diluições da proteína equivalem às seguintes concentrações: 1:400 (2,5ng); 1:800 (1,25ng); 1:1600 (0,62ng); 1:6400 (0,16ng).

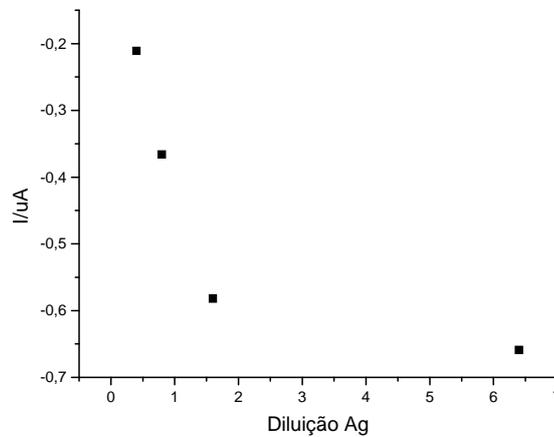


Figura 23 - Estudo das diluições da proteína recombinante na resposta do imunossensor. $E_{\text{Aplicado}} = -450\text{mV}$; Eletrodo de grafite modificado com polímero PPO 300 e contendo 1/40 e 1/10000 de anticorpo primário e secundário, respectivamente e concentração de 1×10^{-4} e 3×10^{-4} mol L⁻¹ para H₂O₂ e KI respectivamente.

Através da Tabela 9, pode-se observar que o eletrodo incubado com a maior diluição da biomolécula e menor diluição do anticorpo primário apresentou um valor maior de intensidade de corrente. Porém, observa-se que na Figura 23 há saturação do sistema para diluições menores do antígeno, prejudicando a sensibilidade do método.

IV. 11. 4. 4. Estudo do tempo de incubação dos anticorpos primários e secundários

Após a modificação do eletrodo de grafite usando-se o sistema sol-gel pelo método *dip-coating*, e imobilização da proteína recombinante *core* VHC na concentração de 0,62ng, diferentes tempos de incubação para anticorpos primários e secundários foram investigados na otimização do imunossensor. Os resultados revelaram um aumento dos valores de intensidade de corrente proporcional ao tempo de incubação com os anticorpos primários e secundários, atingindo valor máximo com 20 minutos de incubação (Tabela 10 e Figura 24). No entanto, obteve-se uma redução na intensidade de corrente acima de 30 minutos de incubação que pode estar relacionada com a alteração da enzima no complexo antígeno-anticorpo na superfície do polímero.

Tabela 10: Efeito do tempo de incubação dos anticorpos primários e secundários na resposta do imunossensor

Tempo de incubação (minutos)	Corrente elétrica (I/ μ A)
10	- 0,216 \pm 0,023
20	- 0,447 \pm 0,098
30	- 0,420 \pm 0,087
45	- 0,360 \pm 0,056

n=2

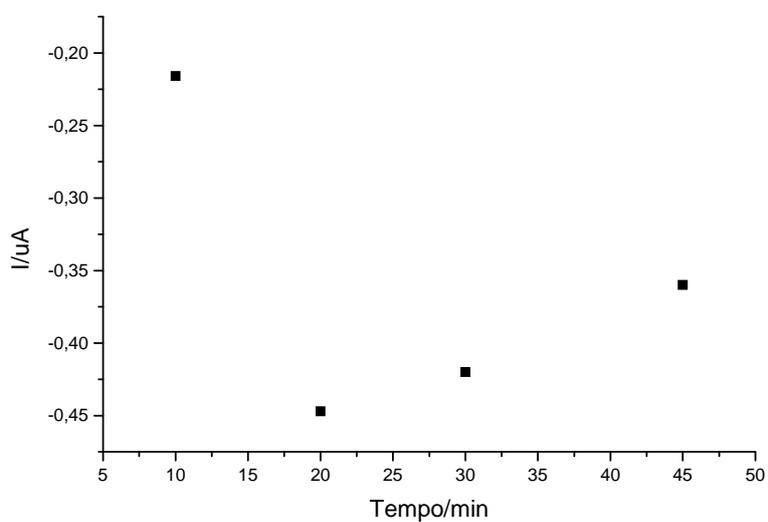


Figura 24 – Efeito do tempo de incubação na resposta do imunossensor. $E_{\text{Aplicado}} = -450\text{mV}$; Eletrodo de grafite modificado com polímero PPO 300 e contendo 0,62ng do antígeno, 1/40 e 1/10000 do anticorpo primário e secundário, respectivamente e concentração de 1×10^{-4} e 3×10^{-4} mol L⁻¹ para H₂O₂ e KI respectivamente.

Portanto, os melhores resultados para o desenvolvimento do imunossensor foram obtidos com: diluições de 1/1600 (0,62ng), 1/40 e 1/10000 para antígeno, anticorpo primário e secundário, respectivamente, tempo de incubação de 20 minutos, concentração de 1×10^{-4} e 3×10^{-4} mol L⁻¹ para H₂O₂ e KI respectivamente e a partir da média de intensidade de corrente elétrica dos controles negativos (10 amostras) somando-se com duas vezes o desvio padrão, determinou-se o limiar de reatividade (*cut off*) em $-0,126 \mu\text{A}$.

IV. 11. 4. 5. Aplicação do imunossensor amperométrico em soros de pacientes com infecção pelo VHC e com doenças inflamatórias e infecciosas

Utilizando as condições descritas anteriormente em relação às diluições do antígeno, anticorpos e tempo, 10 amostras positivas para anticorpos anti-VHC e amostras de soros de pacientes com doenças inflamatórias e infecciosas foram empregadas no estudo do comportamento do imunossensor amperométrico. As Tabelas 11 e 12 representam os resultados obtidos.

Tabela 11: Valores de intensidade de corrente obtidos na reação de imunossensor utilizando soros positivos para VHC.

Soros positivos	Intensidade de corrente (μA)
1	$- 0,316 \pm 0,049$
2	$- 0,456 \pm 0,078$
3	$- 0,234 \pm 0,097$
4	$- 0,289 \pm 0,086$
5	$- 0,679 \pm 0,059$
6	$- 0,496 \pm 0,079$
7	$- 0,543 \pm 0,065$
8	$- 0,511 \pm 0,043$

$$Cut\ off = 0,126\mu A$$

Tabela 12: Valores de intensidade de corrente obtidos na reação de imunossensor para soros com algumas doenças infecciosas e inflamatórias.

Soros positivos para doenças inflamatórias ou infecciosas	Intensidade de corrente (μA)
Hepatite B	- 0,098
HIV	- 0,054
HTLV	- 0,032
Doença de Chagas	- 0,067
Fatores reumatóides	- 0,095
Fatores anti-núcleo (FAN)	- 0,081
Anti- estreptolisina O	- 0,016
Proteína C reativa (PCR)	- 0,026

n=1

$$Cut\ off = 0,126\mu A$$

Como podemos observar nas tabelas acima, o imunossensor confirmou positividade para amostras de soros positivos para anticorpos anti-VHC e não detectou reatividade cruzada com outros soros testados, possibilitando sua utilização no diagnóstico viral.

Deste modo, os resultados encontrados possibilitam o aperfeiçoamento deste teste desenvolvido, com potencialidade para tornar-se um teste de baixo custo, reproduzível e empregado na rotina laboratorial.

Capítulo V

Conclusões

- A proteína de fusão GST-*core* de aproximadamente 44 kDa foi expressa e purificada em condições não desnaturantes em *E. coli*.
- A imunorreatividade da proteína recombinante produzida foi confirmada através do reconhecimento pelos anticorpos anti-VHC presentes em soros de pacientes infectados pelo vírus, através da técnica de *Western blot* e não houve reconhecimento da proteína recombinante na presença de soros de pacientes infectados com HIV, HBV e outras patologias e de soros de pacientes não infectados com VHC, e, além disso, a proteína GST não foi reconhecida por soros positivos para VHC, indicando sua utilização como uma ferramenta no diagnóstico viral.
- A obtenção da proteína recombinante GST-*core* purificada possibilitou a otimização de um novo método de ELISA envolvendo sistema sol-gel e a construção de um imunossensor amperométrico para detecção de anticorpos anti-VHC.
- O polímero PPO 300 foi proposto como novo suporte para imobilização da proteína para o sistema ELISA e mostrou-se eficiente e vantajoso quando comparado ao poliestireno empregado no ELISA tradicional.
- A reatividade da proteína recombinante frente aos anticorpos policlonais produzidos pelo coelho foi verificada através da técnica de *Western blot*, possibilitando a utilização destes anticorpos para o desenvolvimento de novas estratégias diagnósticas.
- Os métodos desenvolvidos neste trabalho apresentam potencial como ferramentas para um novo método diagnóstico na rotina laboratorial.

Capítulo VI

Referências

ALTER, H. Discovery of non-A, non-B hepatitis and identification of its etiology. **Am. J. Med.**, v. 107, n. 6, p. 16-20, Dec. 1999. Supplement 2.

ALVARIZ, F. G. Hepatite C crônica: aspectos clínicos e evolutivos. **Mod. Hepatol.**, v. 30, p. 20-32, 2004. Edição Especial.

ÁVILA, S. L. M.; FERREIRA, A. V. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-ímmunes**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

BARTENSCHLAGER, R.; LOHMANN, V. Replication of hepatitis C vírus. **J. Gen. Virol.**, v. 81, n. 7, p. 1631-1648, July 2000.

BENVEGNI, 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, n. 5, p. 744-749, 2004.

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, n. 5, p. 924-931, 1967.

BONKOVSKY, H. L.; MEHTA, S. Hepatitis C: a review and update. **DM Disease-A-Month**, v. 47, n. 12, p. 610-647, Dec. 2001.

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

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Hepatites virais: normas e instruções**. São Paulo: Imprensa Oficial, 2000. (Manual de Vigilância Epidemiológica).

CHOO, Q. L.; KUO, G.; WEINER, A. J.; OVERBY, L. R.; BRADLEY, D. W.; HOUGHTON, M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-BPRNE Non-A, Non-B viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, n. 4902, p. 359-362, Apr 1989.

DAHMOUCHE, K.; SANTILLI, C. V.; PULCINELLI, S. H.; CRAIEVICH, A. C. Small-angle X-ray scattering study of sol-gel-derived siloxane-PEG and siloxane-PPG hybrid materials. **J. Phys. Chem.** v. 24, p. 4937-4942, 1999.

ERENSOY, S. Diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection and laboratory monitoring of its therapy. **J. Clin. Virol.**, v. 21, n. 3, p. 271-281, June 2001. Special Issue.

GALASSO, F. S. **Structure, properties and preparation of perovskite:** type compounds. Oxford: Pergamon, v. 5, p. 207, 1969.

GRETCH, D. R. Diagnostic tests for hepatitis C. **Hepatology**, v. 26, n. 3, p. 43-47, Sept. 1997. Supplement 1.

HOOFNAGLE, J. H. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. **Hepatology**, v. 26, p. 15S-20S, 1997. Supplement 1.

KATO, N.; HIJIKATA, M.; OOTSUYAMA, Y.; NAKAGAWA, M.; OHKODHI, 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.

KINTZIOS, S.; PISTOLA, E.; KONSTAS, J.; BEM, F.; MATAKIADIS, T.; ALEXANDROPOULOS, N.; BISELIS, I.; LEVIN, R. The application of the bioelectric recognition assay for the detection of human and plant viruses: definition of operational parameters. **Biosens. Bioelectron.**, v. 16, n. 7/8, p. 467-480, Sept. 2001.

KONRY, T.; NOVOA A.; SHEMER-AVNI, Y.; HANUKA, N.; COSNIER, S.; LEPELLEC, A.; MARKS, R. S. Optical fiber immunosensor based on a poly(pyrrole-benzophenone) film for the detection of antibodies to viral antigen. **Anal. Chem.**, v. 77, n. 6, p. 1771-1779, Mar. 2005.

KRAHN, M. D.; JOHN-BAPTISTE, A.; YI, Q. L.; DORIA, A.; REMIS, R. S.; RITVO, P.; FRIEDMAN, S. Potential cost-effectiveness of a preventive hepatitis C vaccine in high risk and average risk populations in Canada. **Vaccine**, v. 23, n. 13, p. 1549-1558, Feb. 2005.

KRISHNAN, R.; GHINDILIS, A. L.; ATANASOV, P.; WILKINS, E. Fast amperometric immunoassay utilizing highly dispersed electrode material. **Anal. Lett.**, v. 28, n. 14, p. 2459-2474, 1995.

KRUGMAN, S.; GILES, J. P.; HAMMONDS, J. Infections hepatitis: evidence for two distinctive clinical, epidemiological and immunological types of infection. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 200, n. 5, p. 365-73, May 1967.

KUO, G.; CHOO, Q. L.; ALTER, H. J.; GITNICK, G. L. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. **Science**, v. 244, n. 4902, p. 362-364, 1989.

LAEMMLI, U. K.; FRAVRE, M.; STUDIER, F. W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. **J. Mol Biol.**, v. 79, n. 2, p. 237-248, 1973.

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, n. 4, p. 296-304, 2000.

LUPPA, P. B.; SOKOLL, L. J.; CHAN, D. W. Immunosensors – principles and applications to clinical chemistry. **Clin. Chim. Acta**, v. 314, n. 1/2, p. 1-26, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa nacional de hepatites virais. **Avaliação da assistência às hepatites virais no Brasil**. Brasília, 2002. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/sps/areastecnicas/hepatite.htm>>. Acesso em: 28 jul. 2005.

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, n. 7875, p. 241-246, 1974.

RICCARDI, C. S. **Estudos sobre imunossensor para atrazina**. 2001. 91 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

RICCARDI, C. S.; COSTA P. I.; YAMANAKA, H. Imunossensor amperométrico. **Quim. Nova**, v. 25, n. 2, p. 316-320, 2002.

RICCARDI, C. S. K.; DALMOUCHE, K.; SANTILLI, C. V.; COSTA, P. I.; YAMANAKA, H. Immobilization of streptavidin in sol-gel films: application on the diagnosis of hepatitis C virus. **Talanta**, v. 70, n. 3, p. 637-643, 2006.

ROSENBERG, S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. **J. Mol. Biol.**, v. 313, n. 3, p. 451-464, Oct. 2001.

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, n. 3, p. 582-587, 2000.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, 1989.

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

SCHUBERT, F.; SAINI, S.; TURNER, A. P. F. Mediated amperometric enzyme electrode incorporating peroxidase for the determination of hydrogen-peroxide in organic-solvents. **Anal. Chim. Acta**, v. 245, n. 2, p. 133-138, 1991.

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.

SHAHJALAL, S. A.; NAKAMURA, T.; NAGAMURA, A.; NOZAKI, A.; NOUSO, K.; SHIMOMURA, H.; KATO, N. Hepatitis C virus quasispecies in cancerous and noncancerous Hepatic lesions: the core protein-encoding region. **Acta Med. Okayama**, v. 56, p. 141-147, 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.; CHOO, Q. L.; COLOMBO, M.; CUYPERS, H. T. M.; DATE, T.; DUSHEIKO, G. M.; ESTEBAN, J. I.; FAY, O.; HADZIYANNIS, S. J.; HAN, J.; HATZAKIS, A.; HOLMES, E. C.; HOTTA, H.; HOUGHTON, M.; IRVINE, B.; KOHARA, M.; KOLBERG, J. A.; KUO, G.; LAU, J. Y. N.; LELIE, P. N.; MAERTENS, G.; MCOMISH, F.; MIYAMURA, T.; MIZOKAMI, M.; NOMOTO, A.; PRINCE, A. M.; REESINK, H. W.; RICE, C.; ROGGENDORF, M.; SCHALM, S. W.; SHIKATA, T.; SHIMOTOHNO, K.; STUYVER, L.; TREPO, C.; WEINER, A.; YAP, P. L.; URDEA, M. S. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C virus genomes. **Hepatology**, v. 19, n. 5, p. 1321-1324, May 1994.

SKLÁDAL, P.; RICCARDI, C. S.; YAMANAKA, H.; COSTA, P. I. Piezoelectric biosensors for real-time monitoring of hybridization and detection of hepatitis C virus. **J. Virol. Meth.**, v. 117, n. 2, p. 145-151, May 2004.

STADHOUDERS, P. H. G. M.; 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.

STRAUSS, E. Hepatitis C. **Ver. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, p. 1-23, 2001.

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.

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, n. 3, p. 590-599, 2003.

TAYLOR, D. R.; SHI, S. T.; LAI, M. M. C. Hepatitis C virus and interferon resistance. **Microbes Infect.**, v. 2, n. 14, p. 1743-1756, Nov. 2000.

WAWRZYNOWICZ-SYCZEWSKA, M.; KUBICKA, J.; LEWANDOWSKI, Z.; BORON-KACZMARSKA, A.; RADKOWSKI, M. Natural history of acute symptomatic hepatitis type C. **Infection**, v. 32, n. 3, p. 138-143, 2004.