



Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia
Aplicadas à Farmácia
Departamento de Análises Clínicas

***INTERAÇÃO DA PROTEINA E2 DO VÍRUS DA HEPATITE C
COM O RECEPTOR DE LDL E CD81 PRESENTES EM CÉLULAS
ENDOTELIAIS E ATIVAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA***

ANA CAROLINA URBACZEK

Orientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca

**Araraquara – SP
2012**



**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia
Aplicadas à Farmácia
Departamento de Análises Clínicas**

***INTERAÇÃO DA PROTEÍNA E2 DO VÍRUS DA HEPATITE C
COM O RECEPTOR DE LDL E CD81 PRESENTES EM CÉLULAS
ENDOTELIAIS E ATIVAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA***

Tese de doutorado apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

ANA CAROLINA URBACZEK

Orientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca

**Araraquara – SP
2012**

Ficha Catalográfica

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

U72i Urbaczek, Ana Carolina
Interação da proteína E2 do vírus da Hepatite C com o receptor de LDL e CD81 presentes em células endoteliais e ativação da resposta inflamatória / Ana Carolina Urbaczek. – Araraquara, 2012
148 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia
Orientador: Paulo Inácio da Costa
Coorientador: Luiz Marcos da Fonseca

1. Hepatite C . 2. Proteína E2. 3. , LDL . 4. Inflamação. I. Costa, Paulo Inácio da, orient.. II. Fonseca, Luiz Marcos da, coorient.. Título.

CAPES: 40300005

Este estudo é dedicado:

A Deus,

*... em primeiro lugar, pelo dom da vida, pela saúde, capacidade e força concedidas a mim
para que mais esta etapa pudesse ser concluída...
... por me orientar e me guiar nas horas mais difíceis...
... por me colocar à frente de novos desafios para me mostrar que eu era capaz de vencê-
los... e me fazer acreditar que sou mais forte do que pensava ser...
... por me ensinar a lutar pelos meus objetivos...
... e por fim por me fazer acreditar que a vida é feita de fases e ciclos...
Certamente tudo faz parte de um grande aprendizado...
Muito obrigada por estar sempre ao meu lado Pai...*

*"Concedei-me, Senhor
A **Serenidade** necessária para aceitar as coisas que eu não posso modificar;
Coragem para modificar aquelas que posso;
e **Sabedoria** para distinguir umas das outras:*

*Vivendo um dia de cada vez;
Aproveitando um momento de cada vez;
Aceitando as dificuldades como um caminho para a paz;
Tomando, como fez Jesus, este mundo tal como ele é,
e não como eu gostaria que fosse;*

*Confiando que o Senhor tornará tudo correto
Se eu me entregar à Sua vontade;
Para que eu seja razoavelmente feliz nesta vida
e extremamente feliz com o Senhor, para sempre no futuro."*

São Francisco de Assis

Agradecimentos

Agradeço,

... ao meu orientador, às vezes um pai, às vezes um amigo... muito obrigada por sempre compreender meus anseios, minhas chatices e minhas inúmeras lágrimas... Às vezes a sua ausência, por conta de vários outros compromissos, me fazia sentir muito só em meio a um turbilhão de coisas que aconteciam ao mesmo tempo, mas graças a estas situações pude aprender a resolver muita coisa sozinha, aprendi a pensar e a ver as coisas com outros olhos, aprendi a ser “política”, aprendi com os erros e também com os acertos, aprendi a ser mais independente, aprendi a escrever os complicados relatórios FAPESP, aprendi o valor das parcerias e das verdadeiras amizades, aprendi o que é verdadeiramente o sentido da palavra pesquisa, aprendi a ler centenas de papers, ler e ler e quando cansada ler mais um pouco, aprendi a ser crítica (mais do que eu já era rsrs) e “crítica” rs, aprendi coisas que jamais pensei que aprenderia, enfim você me ofereceu a oportunidade de aprender... Hoje eu sei que você deixou que eu conduzisse a minha pesquisa, “colocou o leme da embarcação nas minhas mãos”, porque sabia que eu era capaz, capaz de passar por tudo e vencer no final. Não foi nada fácil, mas conseguimos. Obrigada mestre! principalmente por ter confiado na minha capacidade para desenvolver este projeto...

... ao meu co-orientador, Prof. Fonseca, também um grande mestre e amigo, desde a época do mestrado... muito obrigada pelo apoio, pela paciência, pelas ajudas e pela amizade...

... ao Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva, por me receber em seu laboratório na UFSCAR para que eu pudesse expressar as proteínas recombinantes...

... à Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos, por ceder a linhagem de células SC, permitir a utilização de alguns equipamentos, reagentes, materiais e dependências do seu laboratório para que esta pesquisa pudesse ser desenvolvida e também pela amizade...

... ao Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi pela doação da linhagem de células ECV304...

... à Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla pela doação da linhagem de células HUVEC.

... aos membros da banca de qualificação Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi e Dra. Danielle Cardoso Geraldo Maia, pelas importantes contribuições...

... aos membros e suplentes da banca de defesa que foram muito solícitos quando no primeiro contato por e-mail e que hoje contribuem imensamente para este trabalho...

... aos meus amigos do laboratório de imunologia clínica, os de hoje e os de sempre, Livia, Dani, Aline, Djamilé, Lucas, Marcela, Flávia, Amanda, Pâmela, Cubano, Zé, Marisa, Flávia (Cleso), Michelão, Thaísinha, Thaisona, Thalita-gansa, Juliana... muito obrigada pelas maravilhosas horas que passamos juntos, cada um de vocês está guardado em um lugar muito especial no meu coração...

... um agradecimento especial à Livia e à Dani, grandes amigas que muito me ajudaram na condução da parte experimental deste trabalho... suas dicas foram valiosas...

... à Marisa, praticamente a mãe de todos no laboratório... muito obrigada pelos conselhos, risadas, paciência e por me ensinar a trabalhar na cultura de células...

... à minha amiga Camila Tita, muito obrigada por sempre me ajudar com o bendito Inglês, nos artigos e nos momentos de aflição sempre me dizendo que a gente ia dar um jeito, muito me aliviava saber que eu podia contar com você...

... aos amigos do laboratório de Biologia Molecular da UFSCAR, Wesley, Wilson, Fernando, Danielly, Adelita, Rafael, Kesser, Danilo, Darlan, Francine, Gabriel, Letícia e Priscila obrigada pelas inúmeras ajudas na expressão de proteínas...

... à Thais e à Thalita, amigas queridas que tornaram as longas horas de indução protéica muito mais animadas e engraçadas... saudade...

... à minha amiga Aline Tansini pela paciência com os ensaios de citometria de fluxo...

... ao Gustavo, à Paulinha e à Patrícia também pelo auxílio com a citometria de fluxo...

... às meninas da bioquímica, Tânia e Flávia, que me ajudaram com o soro rico em LDL...

... à Carol e à Luana que me auxiliaram nos ensaios de quimioluminescência...

... à minha amiga Mariana Santoro pela amizade e pelas horas conversando sobre os relatórios FAPESP rsrs...

... à Martina Rudinick pela ajuda com os ensaios de NO na USP-SP...

... às amigas de congresso Thaís, Ana Paula e Flávia pelas horas agradáveis e divertidas que passamos...

... às minhas amigas de ônibus, Julhiany, Adriana e Paula... obrigada pelas risadas logo às 6:30 da manhã...

... às minhas queridas amigas da USP de São Carlos, Juliana e Luciana, obrigada pelos longos almoços, risadas e dicas...

... à minha mestre Reiki, Ieda, por compreender minhas angústias nesta fase tão importante da minha vida, sempre me enviando boas energias e por ter me ensinado mais esta ciência...

... às meninas da pós, Cláudia, Márcia, Joyce e Daniela, por sempre me auxiliarem nos momentos de dúvida com a papelada rsrs...

... à Rosemira (minha pessoal colega rs) pelos alegres “bom dia!!!” e receitinhas de deliciosas comidas...

... aos meus pais, à toda minha família e às minhas queridas primas-irmãs Heloísa e Thaís... muito obrigada pelo apoio e compreensão...

... aos meus grandes e queridos amigos: Kelin, Aline, Lucimara e Silmara (o quarteto fantástico rsrs), Patrícia, Mariana, Fábio, Gisela, Rafael, Camila, Thaís, Thaís, Thalita... amigos para todas as horas.

... à FAPESP pela bolsa e reserva técnica concedidas (processo número 2008/58957-0), que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho...

... ao PROEX pelo auxílio nos congressos...

... à FUNDECIF pelo auxílio na compra de reagentes e tradução do artigo...

... e como não poderia faltar:

Deus quando nos fez humanos sabia que precisaríamos de guardiões materiais que nos tirassem do corpo as aflições dos sentidos. E nos permitissem sobreviver a cada dia com quase nada além do olhar e da lambida de um cão... Que bom seria se todos os humanos pudessem ver a humanidade perfeita de um cão! (Autor Desconhecido) - Aos meus queridos animais, Bubi, Bingo, Lattes, Lilly, Shaninho e Mel, que tornaram e tornam meus dias muito mais felizes...

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”

Charles Chaplin.

Quando não há nada mais a ser dito, silencia.

Quando não há mais nada a ser feito, permitas apenas ser, apenas estar e fica na companhia do teu coração e este indicará o momento apropriado para agires.

Quando a lentidão dos dias acomodar tua vontade, enlaçando-te com os nós da intranqüilidade, descansa e refaz tua energia.

Não há pressa, a prioridade é que tu encontres novamente a tua essência para que tenhas presente em ti a alegria de ser e estar.

Quando o vazio instalar-se em teu peito, dando-te a sensação de angústia e esgotamento, repara tua atenção e encontra em ti mesmo a compreensão para este estado.

É necessário descobrirmo-nos em tais estados, para que estes não se transformem no desconhecido, no incontrolável.

Tudo pode ser mudado, existe sempre uma nova escolha para qualquer opção errada que tenhas feito.

Quando ouvires do teu coração que não há nenhuma necessidade em te preocupares com a vida, saibas que ele apenas quer que compreendas que nada é tão sério a ponto de te perderes para sempre da tua divindade, ficando condenado a não ver mais a luz que é tua por natureza.

Não te preocupes, se estiveres atento a ti mesmo verás que a sabedoria milenar está contigo, conduzindo-te momento a momento àquilo que realmente necessitas viver.

Confia e vai em teu caminho de paz.

Nada é mais gratificante que ver alguém submergindo da escuridão apenas por haver acreditado na existência da luz.

Ela sempre esteve presente...

Era só abrir os olhos...

São Francisco de Assis

RESUMO

Aproximadamente 170 milhões de pessoas no mundo estão cronicamente infectadas pelo vírus da Hepatite C (HCV). No Brasil, os números já chegam a 3 milhões. A persistência da infecção pelo HCV no fígado leva à cronificação da doença, cirrose e hepatocarcinoma. A proteína de envelope 2 (E2) do HCV é a responsável pelo seu acoplamento à célula hospedeira através da interação com receptores de superfície celular, como o R-LDL e o CD81, entre outros. Como as alterações na micro e macrovasculatura hepática, têm sido apontadas como elementos fundamentais na histogênese e prognóstico da doença, o objetivo deste estudo foi avaliar a interação da proteína E2 recombinante com os R-LDL presentes na superfície de células endoteliais (ECV304 e HUVEC) sob influência de LDL e da glicosilação protéica. Também avaliar a resposta inflamatória das células endoteliais à interação com estas proteínas. A proteína E2 foi expressa em dois sistemas heterólogos, *E. coli* e *P. pastoris*, para avaliação da glicosilação e da interação com LDL na ligação aos R-LDL das células através de citometria de fluxo. As proteínas também foram avaliadas em testes biológicos quanto à indução celular de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs totais – QL e H₂O₂ - citometria de fluxo), NO (QL em fase gasosa e por método de Griess), arginase (espectrofotometria), IL-8 (ELISA), VEGF (ELISA) e morte celular (MTT - espectrofotometria e por anexina V e PI - citometria de fluxo). Os resultados obtidos revelaram que as proteínas E2 recombinantes podem interagir com os R-LDL das células endoteliais após a ligação ao LDL e que esta ligação pode ser melhorada pela glicosilação (E2L) ($p < 0,01$ em relação à E2B). O teste de NO indicou que as proteínas glicosiladas exibem maior potencial para o estímulo deste nas células HUVEC ($p < 0,01$ em relação ao controle negativo). As concentrações de proteínas testadas não foram suficientes para estimular um aumento ou redução notável da atividade da arginase em relação ao controle negativo. As proteínas recombinantes foram capazes de induzir a produção de H₂O₂ nas células HUVEC e SC ($p < 0,01$), além de IL-8 ($p < 0,001$) e VEGF ($p < 0,01$) nas HUVEC, em relação ao controle negativo. Também foi observada a indução de apoptose precoce principalmente nas células HUVEC após 24h de exposição às proteínas. Assim pode-se concluir que a proteína E2 do HCV é capaz de se ligar aos R-LDL através de LDL, e que esta interação com as células endoteliais leva à produção de mediadores inflamatórios que provavelmente estão relacionados aos danos hepáticos causados pela presença do vírus no tecido e que contribuem para as principais complicações da Hepatite C crônica, a cirrose e o hepatocarcinoma. Desta forma, este estudo pode contribuir para um maior entendimento da forma de infecção da célula hospedeira pelo HCV e os efeitos causados nas células endoteliais que levam à progressão da doença, bem como podem abrir perspectivas futuras para novas estratégias de intervenção terapêutica contra a interação das proteínas estruturais do HCV com o endotélio hepático, limitando a infecção e a inflamação, e assim também a patologia causada pela infecção do HCV.

Palavras-chave: HCV, Hepatite C, proteína E2, LDL, R-LDL e inflamação.

ABSTRACT

Approximately 170 million people worldwide are chronically infected with hepatitis C virus (HCV). In Brazil, the numbers have already reached 3 million. The persistence of HCV infection leads to chronic infection in liver disease, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The envelope protein 2 (E2) of HCV is responsible for its coupling to the host cell through interaction with cell surface receptors such as the R-LDL and CD81, among others. Because changes in micro and macrovasculature liver, have been identified as key elements in the histogenesis and prognosis of the disease, the aim of this study was to evaluate the interaction of the protein E2 recombinant with the R-LDL present on the surface of endothelial cells (HUVEC and ECV304) under the influence of LDL and protein glycosylation. And also evaluate the inflammatory response of endothelial cells to interact with these proteins. The E2 protein was expressed in two heterologous systems, *E. coli* and *P. pastoris* for evaluation of glycosylation and interaction with LDL binding to the R-LDL cells by flow cytometry. The proteins were also evaluated in biological tests for induction of cellular production of reactive oxygen species (EROs - QL and H₂O₂ - flow cytometry), NO (QL in doing gas and Griess Reagent), arginase (spectrophotometry), IL-8 (ELISA), VEGF (ELISA) and cell death (MTT – spectrophotometry and Annexin V and PI - flow cytometry). The results obtained showed that the recombinant E2 protein can interact with R-LDL endothelial cell after binding to LDL and that this binding can be enhanced by glycosylation (E2L) ($p < 0.01$ in relation to E2B). The NO test indicated that glycosylated proteins exhibit greater potential for the stimulation of the HUVEC cells ($p < 0.01$ compared with negative control). Protein concentrations tested were not sufficient to stimulate an increase or decrease in the activity of arginase remarkable compared to the negative control. The recombinant protein was capable of inducing the production of H₂O₂ in HUVEC cells and SC ($p < 0.01$), and IL-8 ($p < 0.001$) and VEGF ($p < 0.01$) on HUVEC, as compared to control negative. It was also observed induction of early apoptosis especially in HUVEC cells after 24 hours exposure to protein. Thus it can be concluded that the E2 protein of HCV is capable of binding to the R-LDL by LDL, and that this interaction with the endothelial cells leads to production of inflammatory mediators probably related to liver damage caused by the presence of the virus tissue and contribute to major complications of chronic hepatitis C, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Thus, this study may contribute to a greater understanding of how the host cell infection by HCV and the effects on endothelial cells that lead to disease progression, and may open new perspectives for future therapeutic intervention strategies against the interaction of HCV structural proteins with hepatic endothelium, limiting the infection and inflammation, and thus the pathology caused by infection with HCV.

Keywords: HCV, hepatitis C, E2 protein, LDL, R-LDL and inflammation.

SUMÁRIO

REVISÃO DA LITERATURA.....	20
1. INTRODUÇÃO.....	35
2. OBJETIVO GERAL.....	37
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1. OBTENÇÃO DOS POOLS DE AMOSTRAS POSITIVAS E NEGATIVAS PARA HCV.....	38
3.2. OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE RNA.....	38
3.2.1. PROCEDIMENTO PARA ISOLAMENTO VIRAL E EXTRAÇÃO DO RNA.....	38
3.3. AMPLIFICAÇÃO DO PRODUTO DE INTERESSE.....	38
3.3.1. DESENHO DOS PRIMERS.....	38
3.3.2. REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA.....	39
3.3.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) DA ORF CODIFICADORA DA PROTEÍNA E2.....	39
3.3.3.1. AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO A SER CLONADO EM <i>E. coli</i> LINHAGEM ROSETTA.....	40
3.3.3.2. AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO A SER CLONADO EM <i>P. pastoris</i>	40
3.4. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1%.....	40
3.5. PURIFICAÇÃO, ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DO PRODUTO PURIFICADO.....	41
3.6. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA E2 RECOMBINANTE DO HCV EM SISTEMA BACTERIANO.....	41
3.6.1. CLONAGEM DO PRODUTO DE PCR PURIFICADO NO VETOR pTZ57R/T.....	41
3.6.1.1. LIGAÇÃO.....	41
3.6.2. PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS COMPETENTES.....	42
3.6.3. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA.....	42
3.6.4. SCREENING DAS COLÔNIAS TRANSFORMANTES.....	42
3.6.4.1. PCR PARA SCREENING DAS COLÔNIAS TRANSFORMANTES.....	42
3.6.5. EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL DA BACTÉRIA (MINI-PREP).....	43
3.6.6. CLIVAGEM ENZIMÁTICA E PURIFICAÇÃO DO VETOR pTZ57R/T.....	43
3.6.7. CLONAGEM NO VETOR DE EXPRESSÃO.....	44
3.6.7.1. TRANSFORMAÇÃO DAS BACTÉRIAS COMPETENTES COM O VETOR pET-42a E MINI-PREP.....	44
3.6.7.2. CLIVAGEM ENZIMÁTICA DO VETOR pET-42a.....	44
3.6.7.3. LIGAÇÃO DO INSERTO AO VETOR pET-42a.....	45
3.6.8. TRANSFORMAÇÃO DO VETOR pET-42a RECOMBINANTE EM BACTÉRIAS DE PROPAGAÇÃO - LINHAGEM DH5 α	45
3.6.9. SELEÇÃO DOS CLONES TRANSFORMANTES E OBTENÇÃO DO VETOR RECOMBINANTE.....	45
3.6.10. SEQUENCIAMENTO DO VETOR pET-42a RECOMBINANTE.....	46
3.6.11. TRANSFORMAÇÃO DO VETOR pET-42a RECOMBINANTE EM BACTÉRIAS DE EXPRESSÃO – LINHAGEM ROSETTA.....	47
3.6.12. PREPARAÇÃO DO INÓCULO PARA INDUÇÃO.....	47
3.6.13. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA E2 RECOMBINANTE DO HCV EM BACTÉRIA (E2B).....	47
3.6.13.1. INDUÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	47
3.6.14. ANÁLISE DAS PROTEÍNAS E2B POR SDS-PAGE.....	48
3.6.15. PURIFICAÇÃO PROTÉICA POR AFINIDADE COM RESINA DE GLUTATIONA.....	48
3.6.16. WESTERN BLOT.....	49
3.6.17. QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS E2B.....	50
3.7. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA E2 RECOMBINANTE DO HCV EM LEVEDURA (<i>Pichia pastoris</i>).....	50
3.7.1. ESCOLHA DO SISTEMA DE EXPRESSÃO E DOS VETORES.....	50
3.7.2. PREPARAÇÃO DOS VETORES.....	50
3.7.3. CLIVAGEM ENZIMÁTICA DOS VETORES E DO PRODUTO DE PCR PURIFICADO.....	50
3.7.4. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS CLIVADOS E QUANTIFICAÇÃO.....	51
3.7.5. CLONAGEM DO INSERTO E2 NOS VETORES pGAPZ α A e pPICZ α A.....	51
3.7.5.1. LIGAÇÃO, TRANSFORMAÇÃO E PLAQUEAMENTO.....	51
3.7.6. SELEÇÃO DE COLÔNIAS TRANSFORMADAS.....	51
3.7.7. LINEARIZAÇÃO DOS VETORES RECOMBINANTES.....	52
3.7.8. PRECIPITAÇÃO DO DNA.....	52
3.7.9. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA E2 DO HCV EM LEVEDURA (E2L).....	52
3.7.9.1. PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS COMPETENTES DE <i>P. pastoris</i>	52
3.7.9.2. TRANSFORMAÇÃO DE <i>P. pastoris</i>	53
3.7.9.3. SCREENING DE CLONES RECOMBINANTES DE <i>P. pastoris</i>	53

3.7.9.4 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA E2 RECOMBINANTE (E2L) EM LARGA ESCALA.....	54
3.7.10. PURIFICAÇÃO PROTÉICA POR COLUNA DE NÍQUEL (Ni-NTA)	55
3.8. ENSAIOS BIOLÓGICOS COM AS PROTEÍNAS E2 RECOMBINANTES (E2B E E2L)	55
3.8.1. IMUNORREATIVIDADE DAS PROTEÍNAS E2 RECOMBINANTES.....	55
3.8.2. PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS PARA OS ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	56
3.8.3. ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DA LIGAÇÃO DAS PROTEÍNAS E2 RECOMBINANTES AOS RECEPTORES DE SUPERFÍCIE CELULAR.....	57
3.8.3.1. IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI)	57
3.8.3.2. ENSAIO DE IMUNOFENOTIPAGEM.....	58
3.8.3.3. ENSAIO DE LIGAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES AOS RECEPTORES CELULARES.....	59
3.8.3.4. ENSAIO DE INIBIÇÃO OU BLOQUEIO DA LIGAÇÃO AOS RECEPTORES CELULARES – CD81 e R-LDL.....	59
3.9. ENSAIOS DE RESPOSTA CELULAR	60
3.9.1. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR – MÉTODO MTT.....	60
3.9.2. AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR POR ANEXINA V E IODETO DE PROPÍDEO.....	61
3.9.3. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)	62
3.9.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ARGINASE EM CULTURA DE CÉLULAS.....	63
3.9.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CELULAR PARA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO ATRAVÉS DE QL.....	64
3.9.5.1. PREPARO DO CONTROLE DA REAÇÃO.....	64
3.9.5.2. ENSAIO DE QUIMIOLUMINESCÊNCIA DEPENDENTE DE LUMINOL.....	64
3.9.6. ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE H ₂ O ₂ POR CITOMETRIA DE FLUXO...	65
3.9.7. QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE IL-8.....	65
3.9.8. QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE VEGF.....	66
3.9.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	66
4. RESULTADOS.....	67
4.1. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA E2 RECOMBINANTE DO HCV EM BACTÉRIA.....	67
4.1.1. PERFIL ELETROFORÉTICO DO PRODUTO DE PCR DO FRAGMENTO E2 AMPLIFICADO A PARTIR DE cDNA.....	67
4.1.2. SCREENING DAS COLÔNIAS TRANSFORMANTES COM O VETOR pTZ57R/T RECOMBINANTE.....	67
4.1.3. SCREENING DAS COLÔNIAS TRANSFORMANTES COM O VETOR pET-42a RECOMBINANTE.....	68
4.1.4. SEQUENCIAMENTO DO PRODUTO CLONADO.....	69
4.1.5. ANÁLISE DO TEMPO DE INDUÇÃO.....	69
4.1.6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA E2 EM SISTEMA BACTERIANO E PURIFICAÇÃO ATRAVÉS DA PROTEÍNA DE FUSÃO.....	70
4.1.7. QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA EXPRESSA.....	74
4.2. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA E2 RECOMBINANTE DO HCV EM LEVEDURA (<i>Pichia pastoris</i>)	74
4.2.1. ANÁLISE DO FRAGMENTO A SER CLONADO EM <i>Pichia pastoris</i>	74
4.2.2. SCREENING PARA <i>P. pastoris</i> PORTADORAS DE pGAPZαA RECOMBINANTE.....	77
4.2.3. SCREENING PARA <i>P. pastoris</i> PORTADORAS DE pPICZαA RECOMBINANTE E PRODUÇÃO EM LARGA ESCALA.....	78
4.2.4. PURIFICAÇÃO PROTÉICA POR COLUNA DE NÍQUEL (Ni-NTA).....	79
4.3. IMUNORREATIVIDADE DA PROTEÍNA E2 RECOMBINANTE COM SORO HUMANO POSITIVO PARA HCV.....	79
4.4. ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DA LIGAÇÃO DAS PROTEÍNAS E2 RECOMBINANTES AOS RECEPTORES DE SUPERFÍCIE CELULAR	81
4.4.1. DEMONSTRAÇÃO DA LIGAÇÃO DA PROTEÍNA E2 RECOMBINANTE NA SUPERFÍCIE DE CÉLULAS ENDOTELIAIS-LIKE - ECV304 - ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.....	81
4.4.2. IMUNOFENOTIPAGEM CELULAR.....	83
4.4.3. ENSAIO DE LIGAÇÃO DAS PROTEÍNAS E2B E E2L AOS RECEPTORES CELULARES....	84
4.4.4. ENSAIO DE INIBIÇÃO OU BLOQUEIO DA LIGAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES AOS RECEPTORES DAS CÉLULAS ECV304 E HUVEC.....	90
4.5. ENSAIOS DE RESPOSTA CELULAR.....	92
4.5.1. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR – MÉTODO MTT.....	92
4.5.2. AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR POR ANEXINA V E IODETO DE PROPÍDEO.....	94
4.5.3. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	95
4.5.4. ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ARGINASE EM CULTURA DE CÉLULAS ECV304.....	97
4.5.5. DETERMINAÇÃO DO BURST OXIDATIVO CELULAR POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA	

DEPENDENTE DE LUMINOL	99
4.5.6 ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE H ₂ O ₂ POR CITOMETRIA DE FLUXO....	99
4.5.7. ENSAIO DE DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE IL-8.....	102
4.5.8. ENSAIO DE DETECÇÃO DE VEGF.....	102
5. DISCUSSÃO.....	104
6. CONCLUSÕES	123
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125
ANEXOS	143

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da organização do RNA genômico do HCV.....	22
Figura 2: Ciclo de vida do HCV.....	26
Figura 3: Modelo atual de entrada do HCV na célula hospedeira.....	27
Figura 4: Modelo representativo da associação HCV e LDL proposto por Favre e Muellhanpt (2005), hipótese mais provável para a infecção viral mediada por lipídios.....	29
Figura 5 Representação esquemática da glicoproteína E2 do HCV.....	39
Figura 6: Perfil eletroforético dos produtos de PCR para amplificação da seqüência correspondente à proteína E2.....	67
Figura 7: Perfil eletroforético do produto amplificado em gel de agarose 1%.....	68
Figura 8: Perfil eletroforético dos produtos de PCR das colônias transformantes.....	69
Figura 9: A: Gel SDS-PAGE 12% da expressão da proteína E2 em células bacterianas. B: Membrana de nitrocelulose PDVF resultante da reação de <i>Western Blot</i>	70
Figura 10: Gel SDS-PAGE 12%, corado com <i>Coomassie blue</i> , destacando (seta) a presença da proteína E2 (63,5kDa) no sobrenadante e no <i>pellet</i> da cultura induzida à 37°C – 250rpm, durante 3h.....	71
Figura 11: Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da purificação da proteína E2 recombinante, fusionada à his e à GST, por afinidade com resina de glutationa, em diferentes gradientes de purificação, após indução padronizada à 37°C – 250rpm por 3h.....	72
Figura 12: Membrana de nitrocelulose transferida com os gradientes de purificação da proteína E2, em resina de glutationa, resultante do ensaio de <i>Western Blot</i>	72
Figura 13: Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da re-purificação da proteína E2 recombinante, fusionada à histidina e à GST, após diálise em coluna de níquel.....	73
Figura 14: Membrana de PDVF, resultante da reação de <i>Western Blot</i> , transferida com a proteína E2 recombinante produzida em <i>E. coli</i> , após purificação.....	74
Figura 15: Perfil eletroforético dos produtos de PCR para amplificação da seqüência correspondente à proteína E2.....	74
Figura 16: Perfil eletroforético dos produtos de PCR de colônias de bactérias <i>E. coli</i> linhagem DH5 α CaCl ₂ competentes transformantes com os vetores pGAPZ α A (em A) e pPICZ α A (em B) recombinantes.	75
Figura 17: Perfil eletroforético dos vetores pPICZ α A e pGAPZ α A recombinantes clivados com as enzimas de restrição <i>EcoR I</i> e <i>Xba I</i> , em gel de agarose 1,5%.....	76
Figura 18: Perfil eletroforético dos vetores pGAPZ α A e pPICZ α A recombinantes linearizados respectivamente com as enzimas <i>Pme I</i> e <i>BspHI</i> (<i>Pag I</i>), em gel de agarose 1%.....	76
Figura 19: (A) Perfil eletroforético do gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado do <i>screening</i> para pGAPZ α A+E2, 96hs após o início do crescimento. (B) Membrana transferida com o sobrenadante do <i>screening</i> de 96hs das colônias que apresentaram banda nos géis anteriores.....	77
Figura 20: Perfil eletroforético do gel SDS-PAGE 12% mostrando a banda supostamente correspondente à proteína de interesse, glicosilada e fusionada a 6xHisTag, com 50kDa (6xHisTag = 1kDa, E2 = 49kDa), após a indução utilizando o vetor pPICZ α A+E2 em <i>Pichia pastoris</i> sob pH 4,0, 30°C nos diferentes tempo de indução.....	78
Figura 21: (A) Perfil eletroforético do gel SDS-PAGE 12% mostrando a proteína E2 recombinante produzida em <i>P. pastoris</i> após ser purificada em coluna de níquel. (B) Membrana resultante do ensaio de <i>western blot</i> transferida com a mesma proteína.....	79
Figura 22: Tiras de membrana de nitrocelulose transferidas com proteína E2 recombinante, produzida em <i>E. coli</i> linhagem Rosetta (E2B) através de ensaio de <i>western blot</i> e reagidas com diluições (1:20 e 1:100) de soro humano positivo para HCV.....	80
Figura 23: Tiras de membrana de nitrocelulose transferidas com proteína E2 recombinante, produzida em <i>P. pastoris</i> (E2L), através de ensaio de <i>western blot</i> e reagidas com diluições (1:20 e 1:100) de soro humano positivo para HCV.....	80
Figura 24: Células ECV304 (mantidas em meio RPMI com 10% de SFB) visualizadas em microscópio de fluorescência em várias condições de ligação das proteínas E2 recombinantes aos receptores de superfície e reação com anti-IgG humana conjugada com FITC.....	82
Figura 25: Ensaio de imunofenotipagem dos receptores de superfície, R-LDL e CD81 (TAPA-1), das células ECV304, através de citometria de fluxo.....	83
Figura 26: Ensaio de imunofenotipagem dos receptores de superfície, R-LDL e CD81 (TAPA-1), das células HUVEC, através de citometria de fluxo.	84
Figura 27: Ensaio de determinação da ligação das proteínas recombinantes E2B e E2L aos receptores de superfície, CD81 e R-LDL, das células ECV304, mantidas com e sem SFB, e na presença ou na ausência de LDL humano.	85

Figura 28: Distribuição percentual da ligação das proteínas E2 recombinantes, E2B e E2L, na presença ou não de LDL, às células ECV304 cultivadas ou não com SFB (10%).....	87
Figura 29: Ensaio de determinação da ligação das proteínas recombinantes E2B e E2L na presença ou ausência de LDL humano aos R-LDL das células HUVEC, mantidas com e sem SFB.	88
Figura 30: Distribuição percentual da ligação das proteínas E2 recombinantes, E2B e E2L, na presença ou não de LDL, às células HUVEC mantidas ou não com SFB (10%).....	90
Figura 31: Distribuição percentual da ligação das proteínas E2 recombinantes, E2B e E2L, na presença ou não de LDL, às células ECV304, mantidas com ou sem SFB, bloqueadas para R-LDL ou CD81.....	91
Figura 32: Ensaio de inibição da ligação das proteínas E2 recombinantes, glicosiladas ou não (E2L e E2B respectivamente), aos R-LDL das células HUVEC, na presença ou ausência LDL.....	92
Figura 33: Teste de MTT para avaliação da viabilidade das células ECV304 (A), HUVEC (B) e SC (C) após exposição à vários estímulos (proteínas E2B e E2L, LPS, PMA e PHA) e a diferentes concentrações de proteína E2 (250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81µg/mL).....	93
Figura 34: <i>Dot plot</i> representativo do ensaio de Anexina V para análise do tipo de morte celular....	94
Figura 35: Porcentagens de morte celular (HUVEC) caracterizada por marcação analisada por citometria de fluxo para cada concentração de cada proteína E2 recombinante (E2B e E2L) (250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81µg/mL) e estímulos-controle: PHA (fitohemaglutinina) [100µg/mL], LPS (Lipopolissacarídeo) [20µg/mL] e PMA (phorbol 12-myristato 13-acetato) [0,50µM].....	95
Figura 36: Teste de MTT para avaliação da viabilidade dos macrófagos peritoneais de camundongos após exposição à vários estímulos (proteínas E2B e E2L, e LPS) e a diferentes concentrações de proteína E2 (250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81µg).....	96
Figura 37: Teste para avaliação da produção de NO em macrófagos peritoneais murinos após exposição à várias concentrações da proteínas E2 recombinantes (E2B e E2L) 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81µg/mL.....	96
Figura 38: Teste para avaliação da produção de NO por células HUVEC após exposição à várias concentrações da proteínas E2 recombinantes (E2B e E2L) 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81µg/mL e estímulos controle: PHA (fitohemaglutinina) [100µg/mL], LPS (Lipopolissacarídeo) [20µg/mL] e PMA (phorbol 12-myristato 13-acetato) [0,50µM].....	97
Figura 39: Teste de determinação da atividade da arginase nas células ECV304 (A), HUVEC (B) e SC (C) após exposição à diferentes estímulos (proteínas E2B e E2L, LPS, PMA e PHA) e à diferentes concentrações de proteínas E2 recombinantes (250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81µg/mL).....	98
Figura 40: <i>Dot plots</i> representativos do ensaio de H ₂ O ₂ com as células ECV304 mediante estímulos-controle (PHA, LPS, PMA) e proteínas E2 recombinantes (E2L e E2B).....	99
Figura 41: <i>Dot plots</i> representativos do ensaio de H ₂ O ₂ com as células HUVEC mediante estímulos-controle (PHA, LPS, PMA) e proteínas E2 recombinantes (E2L e E2B).....	100
Figura 42: Ensaio de H ₂ O ₂ com as células HUVEC após exposição aos estímulos-controle (PHA, LPS, PMA) e à diferentes concentrações de proteínas E2 recombinantes (E2L e E2B) (250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81µg/mL).....	100
Figura 43: <i>Dot plots</i> representativos do ensaio de H ₂ O ₂ com as células SC mediante estímulos-controle (PHA, LPS, PMA) e proteínas E2 recombinantes (E2L e E2B).....	101
Figura 44: Ensaio de H ₂ O ₂ com as células HUVEC após exposição aos estímulos-controle (PHA, LPS, PMA) e à diferentes concentrações de proteínas E2 recombinantes (E2L e E2B) (250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81µg/mL).....	101
Figura 45: Ensaio de detecção da produção de IL-8 pelas células HUVEC em resposta à exposição aos estímulos-controle (PHA, LPS, PMA) e à concentração de 250µg/mL das proteínas E2 recombinantes (E2L e E2B).....	102
Figura 46: Ensaio de detecção da produção de VEGF pelas células HUVEC em resposta à exposição aos estímulos-controle (PHA, LPS, PMA) e à concentração de 250µg/mL das proteínas E2 recombinantes (E2L e E2B).....	103
Figura 47: Ensaio de detecção da produção de VEGF pelas células SC em resposta à exposição aos estímulos-controle (PHA, LPS, PMA) e à concentração de 250µg/mL das proteínas E2 recombinantes (E2L e E2B).....	103

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

am:	amostra
Ang-2:	angiopoietina-2
Apo E:	apolipoproteína E
ASGPR:	<i>asialoglycoprotein receptor</i>
ATCC:	<i>American Type Culture Collection</i>
BMGY:	<i>buffered glycerol-complex medium</i>
BMMY:	<i>buffered complex methanol medium</i>
°C:	graus celsius
C-:	controle negativo
C+:	controle positivo
CaCl ₂ :	cloreto de cálcio
cDNA:	DNA complementar
CHO:	células de ovário de Hamster Chinês (<i>Chinese Hamster Ovary</i>)
CLDN1:	claudina-1
cm:	centímetros
CO ₂ :	dióxido de carbono
CRD:	centro de referência diagnóstica
CTGF:	fator de crescimento de tecido conectivo (<i>Connective Tissue Growth Factor</i>)
CVE:	centro de vigilância epidemiológica
D.O.:	densidade óptica
DAF-2:	4,5-diaminofluoresceína-2
DC-SIGN:	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
DHR:	dihidrorodamina 123
DMSO:	<i>dimethyl sulfoxide</i>
DNA:	ácido desoxirribonucléico
dNTP:	desorribonucleotídeo trifosfatado
DTM:	domínio transmembrana
DTT:	ditiotreitol
E2.PP.AS:	<i>primer anti-sense</i> para amplificação da região E2, sistema de expressão <i>Pichia pastoris</i>
E2.PP.S:	<i>primer sense</i> para amplificação da região E2, sistema de expressão <i>Pichia pastoris</i>
E2.R.AS:	<i>primer anti-sense</i> para amplificação da região E2, sistema de expressão Rosetta
E2.R.S:	<i>primer sense</i> para amplificação da região E2, sistema de expressão Rosetta
E2B:	proteína de envelope 2 do HCV produzida em bactéria
E2L:	proteína de envelope 2 do HCV produzida em levedura
EDRF:	fator de relaxamento derivado de endotélio (<i>Endothelium-derived relaxing factor</i>)
EDTA-K ₂ :	ácido etilenodiamino tetra- acético dipotássico
ELISA:	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eNOS:	óxido nítrico sintase endotelial
ERNS:	espécies reativas de nitrogênio

EROs:	espécies reativas de oxigênio
ESP:	espontâneo
FITC:	isotiocianato de fluoresceína (<i>fluorescein isothiocyanate</i>)
g:	gramas
GAGs:	glicosaminoglicanas
GST:	glutathione transferase
h:	hora(s)
H ₂ O:	água
H ₂ O ₂ :	peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄ :	ácido sulfúrico
H ₃ PO ₄ :	ácido fosfórico
HCC:	Carcinoma Hepatocellular
HCl:	ácido clorídrico
HCV:	vírus da hepatite C
HDL:	lipoproteína de alta densidade (<i>high density lipoprotein</i>)
HEPES	ácido hidroxietil piperazineetanesulfônico
HIV:	vírus da imunodeficiência humana
HTLV:	vírus linfotrópico humano
HUVEC:	células endoteliais de veia umbilical humana
HVR:	regiões de hipervariabilidade
ICAM-1:	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
IFI :	Imunofluorescência indireta
IFN- γ :	interferon gama
IgG:	imunoglobulina G
IL:	interleucina
iNOS:	óxido nítrico sintase induzível
IPTG:	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
<i>IRES:</i>	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>
Kb:	kilobase
kDa:	kilodáltons
L:	litros
Lav.1:	lavagem 1
Lav.2:	lavagem 2
Lav.3:	lavagem 3
LB:	meio Lúria-Bertani broth
LDL:	lipoproteína de baixa densidade (<i>low density lipoprotein</i>)
LP:	lipoproteína(s)
LPS:	lipopolissacarídeo de <i>Escherichia coli</i>
L-SIGN:	<i>Liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin</i>
LVPs:	lipovírus
M:	molar
MCP-1:	<i>monocyte chemotactic protein-1</i>

mg:	miligrama(s)
MgCl ₂ :	cloreto de magnésio
MIF:	média de intensidade de fluorescência
min:	minuto(s)
mL:	mililitro(s)
mM:	milimolar
MnCl ₂ :	cloreto de manganês
mNOS:	óxido nítrico sintase mitocondrial
MOLT-4:	<i>Human acute lymphoblastic leukemia cell line</i>
mRNA:	RNA mensageiro
NAC:	Núcleo de Atendimento à Comunidade
NaCl:	cloreto de sódio
NADPH:	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NaH ₂ PO ₄ :	fosfato de sódio
NaNO ₂ :	nitrito de sódio
NF-κB:	<i>factor nuclear kappa B</i>
ng:	nano gramas
nm:	nano mols
nNOS:	óxido nítrico sintase neuronal
NO:	óxido nítrico (<i>Nitric Oxyde</i>)
NOSs:	óxido nítrico sintases
NS3:	proteína não-estrutural 3 (<i>Nonstructural 3 protein</i>)
NS4:	proteína não-estrutural 4 (<i>Nonstructural 4 protein</i>)
NS5:	proteína não-estrutural 5 (<i>Nonstructural 5 protein</i>)
OMS:	Organização Mundial da Saúde
ORF:	<i>Open Reading Frame</i>
<i>p</i> :	probabilidade estatística
P.E.1:	proteína eluída 1
P.E.2:	proteína eluída 2
P.E.3:	proteína eluída 3
pb:	pares de bases
PBS:	tampão fosfato salino
PCR:	reação em cadeia da polimerase
PE:	ficoeritrina
pH:	potencial hidrogeniônico
PHA:	fitohemaglutinina
PI:	iodeto de propídeo
PM:	peso molecular
pM:	pico mols
PMA:	phorbol 12-myristate 13-acetato
PS:	fosfatidilserina
QL:	quimioluminescência

q.s.p.:	quantidade suficiente para
RE:	retículo endoplasmático
R-LDL:	receptor de LDL
RNA:	ácido ribonucleico
RPM:	rotações por minuto
RPMI:	meio do Roswell Park Memorial Institute
SDS:	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE:	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
seg:	segundo(s)
SFB:	soro fetal bovino
SR-BI:	receptor <i>scavenger</i> classe B tipo 1
T0:	tempo zero
T1:	tempo 1
T2:	tempo 2
T3:	tempo 3
T4:	tempo 4
TAE:	tampão Tris-Acetato-EDTA
TBS:	tampão tris-HCl salino
TGF:	fator de crescimento transformante
Th1:	células T <i>helper</i> 1
TM :	Trade Mark
TMB:	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TMD:	domínio transmembrana
TNF- α :	fator de necrose tumoral alfa
U:	unidade
UTR:	<i>Untranslated Regions (regiões não-traduzidas)</i>
UV:	ultra-violeta
V:	volts
VCl3:	tricloreto de vanadium
VEGF:	Fator de Crescimento Endotelial Vascular (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
VLDL:	lipoproteína de muito baixa densidade (<i>very low density lipoprotein</i>)
x g:	força centrífuga
YEPD:	<i>Yeast Extract-Peptone-Dextrose</i>
Ω :	ohm
α -ISPF:	α -isonitrosopropiofenona
μ F:	micro farad
μ L:	microlitro(s)
μ mol:	micro mol(s)
μ g:	micro grama(s)

REVISÃO DA LITERATURA

HEPATITE C: O VÍRUS E SUAS IMPLICAÇÕES

Nos anos 70, após o desenvolvimento de testes de diagnóstico para os vírus da hepatite A e B, foi reconhecido um novo agente transmitido de forma parenteral, responsável pela maioria dos casos de hepatite não-A e não-B. No entanto, o vírus não era visualizado de forma conclusiva, e seus baixos títulos no soro e no tecido hepático impediam a caracterização bioquímica dos seus produtos. Além disso, também não era possível a cultura do vírus *in vitro*, dificultando a elucidação do ciclo de vida viral, o desenvolvimento de agentes anti-virais específicos e vacinas preventivas (MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007). Assim, a identificação deste agente tornou-se muito difícil e somente nos anos 80, com o advento da tecnologia do DNA recombinante, foi possível clonar o genoma deste novo vírus, que foi denominado Vírus da Hepatite C (HCV) e a partir de então identificado em todas as partes do mundo (CHOO et al., 1989; WHIDBY et al., 2009).

Apesar dos obstáculos iniciais, grande progresso foi feito nesses mais de 20 anos de estudos com o HCV, usando sistemas heterólogos de expressão, clones de cDNA, sistemas de replicação, pseudopartículas, entre outros, que permitiram ao longo dos anos conhecer um pouco mais sobre o vírus. No entanto, ainda há muito mais para se desvendar, como as formas de invasão viral das células hospedeiras e os seus efeitos decorrentes.

Epidemiologia

A Hepatite C é uma doença hepática causada pelo HCV encontrada em todas as partes do planeta. Aproximadamente 170 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas pelo HCV no mundo, o que corresponde a 3% da população mundial, tornando a Hepatite C um grave problema de saúde pública (BURKE, COX, 2010; World Health Organization, 2012).

Os países com as maiores taxas de infecção crônica pelo HCV são o Egito (22%), o Paquistão (4,8%) e a China (3,2%). A principal forma de transmissão da doença nestes países é atribuída ao uso de materiais contaminados, como o compartilhamento de seringas entre usuários de drogas (World Health Organization, 2012).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que no Brasil existam aproximadamente 2,7 milhões de infectados com o HCV (5 vezes o número de portadores de HIV) (Revista FAPESP, 2011), e que 3 a 4 milhões se infectam no mundo a cada ano (World Health Organization, 2012). Segundo dados do centro de vigilância epidemiológica (CVE), no período de Janeiro de 2000 à Julho de 2012 foram notificados no estado de São Paulo, 52.804 casos de Hepatite C. Ainda segundo à OMS (2012), mais de 350 mil pessoas morrem todos os anos em decorrência de doenças hepáticas relacionadas com o HCV.

Organização genômica e estrutural do HCV

O HCV é um vírus envelopado, que apresenta cerca de 40 a 70nm de diâmetro, é membro da família *Flaviviridae* e pertencente ao gênero *Hepacivirus* (CHOO et al., 1989; KATO et al., 1990; LINDENBACH, RICE, 2001). Seu genoma é constituído por uma fita simples positiva de RNA de aproximadamente 9500 nucleotídeos (TAYLOR et al., 2000) e exibe uma significativa variabilidade genética, como resultado de mutações espontâneas que ocorrem durante a replicação viral. Devido a esta variabilidade encontrada, um sistema consenso de nomenclatura foi proposto por Simmonds e colaboradores em 1994, onde os grupos principais do vírus são designados como genótipos e discriminados com numerais arábicos, e os subtipos dentro de um mesmo genótipo são indicados por letras minúsculas por ordem de descoberta. Sendo assim, existem pelo menos 6 genótipos e mais de 50 subtipos descritos para o HCV (LIANG et al., 2000; STUMPF; PYBUS, 2002; WHIDBY et al., 2009).

Embora todos os genótipos possam ser encontrados ao redor do mundo, existe uma clara distribuição geográfica. Os genótipos 1a, 1b, 2a, 2b, 2c, e 3a somam mais de 90% das infecções por HCV na América do Norte e do Sul, Europa, Rússia, China, Japão, Austrália e Nova Zelândia. Os genótipos 1a e 1b são responsáveis por 80% (40% cada) dos casos de infecção pelo HCV nos Estados Unidos. O genótipo 1b perfaz aproximadamente dois terços de isolados de HCV no sul da Europa, China, Rússia e Japão. O genótipo 4a é o mais predominante no Egito e o genótipo 5a é isolado em 50% de pessoas contaminadas pelo HCV na África do Sul. O genótipo 6 é encontrado no Sudeste Asiático (BUKH et al., 1995; FOURNIER et al., 1998).

Entretanto, um indivíduo infectado com o HCV também pode apresentar uma mistura heterogênea de vírus, conhecida pelo termo quasispécies, e estes diferem somente por poucos nucleotídeos, o que contribui para que o vírus evada-se do sistema imune e estabeleça uma infecção crônica no hospedeiro, além de tornar este último resistente às drogas utilizadas no tratamento. A composição de quasispécies em um indivíduo infectado pode ter grande significado clínico visto que diversos estudos sugerem que a complexidade de quasispécies pode influenciar a severidade da infecção hepática e a resposta à terapia com interferon. Estudos demonstraram uma correlação direta entre a diversidade de quasispécies e a progressão da infecção hepática, sugerindo que o grau de heterogenicidade de quasispécies no início da infecção do HCV pode ser usado para prever o resultado do tratamento a longo prazo (HONDA et al., 1996). Desta forma, a existência de quasispécies dificulta o desenvolvimento de vacinas para o HCV e favorece a perpetuação do vírus no organismo (BUKH et al., 1995).

O genoma do HCV apresenta regiões curtas não codificadoras e hiperconservadas nas extremidades 5' e 3'-UTR (*Untranslated Regions*) (TAYLOR et al., 2000). A região 5'-UTR, altamente conservada, possui 341 nucleotídeos com uma estrutura secundária complexa que funciona como *IRES* (*Internal Ribosome Entry Site*), que permite a ligação direta do RNA viral ao ribossomo da célula infectada, próxima ao códon de iniciação da *ORF* (*Open Reading Frame*), possibilitando a tradução das proteínas virais. A 3'-UTR é dividida em três regiões: um segmento hipervariável de 40 nucleotídeos, uma cauda poli-U variável em extensão e uma região altamente

conservada de 98 nucleotídeos, essencial para a replicação *in vivo* (BISCEGLIE, 1999; BARTENSCHLAGER; LOHMANN, 2000; ROSEMBERG, 2001). As regiões 5' e 3'-UTR flanqueiam uma única sequência codificadora conhecida como *ORF* (TAYLOR et al., 2000), que codifica uma poliproteína precursora de aproximadamente 3010 resíduos de aminoácidos, que é sintetizada em ribossomos associados ao retículo endoplasmático e é clivada co e pós-traducionalmente via mecanismos de sinalização do hospedeiro e proteases virais, gerando cerca de 10 diferentes proteínas estruturais e não estruturais (NS), além da proteína P7 (ENCKE et al., 1998; BARTENSCHLAGER; LOHMANN, 2000; PENIN et al., 2004).

As proteínas estruturais virais são derivadas da região 5' do RNA genômico, e as proteínas não-estruturais da região 3'. Assim os genes estão organizados na sequência:

- região estrutural consiste de 3 genes: o *core* (C) (codifica proteínas do nucleocapsídeo), o E1 e o E2 (codificam proteínas do envelope), que são consideradas os principais componentes protéicos do vírus,
- gene da proteína P7 que faz a ponte entre as regiões estrutural e não-estrutural e codifica canais de íons e
- região não-estrutural que apresenta seis ORFs (NS2, NS3, NS4a, NS4B, NS5a, NS5b) codificadoras das proteínas funcionais, como as enzimas transcriptase reversa, replicase/helicase, serina protease e metaloproteinase (STADHOUDERS et al., 1997; ROINGEARD et al., 2004; WHIDBY et al., 2009).

A organização do RNA genômico do HCV, destacando as regiões codificadoras das proteínas estruturais e não-estruturais e a P7, está demonstrada na figura 1.



Figura 1: Representação esquemática da organização do RNA genômico do HCV. O genoma é constituído por 9500 nucleotídeos. As regiões 5'UTR que contem *IRES* (*Internal Ribosome Entry Site*) e a 3'UTR flanqueiam a *ORF* (*Open Reading Frame*), cuja poliproteína correspondente é clivada em proteínas estruturais e não estruturais. Proteínas estruturais: C (*Core*), E1 e E2 (glicoproteínas de envelope 1 e 2, respectivamente) estão localizadas na porção N-terminal da poliproteína. Proteínas não estruturais: NS2-5 (proteínas não estruturais 2 a 5). P7: proteína P7, localizada na extremidade 3'. Extraído de ROINGEARD et al., 2004.

A proteína do *core* é uma estrutura α -helicoidal que apresenta uma sequência de aminoácidos altamente conservada entre os diferentes isolados de HCV (KATO et al., 1990; OKAMOTO et al., 1990; CHOO et al., 1991), sendo utilizada como importante alvo antigênico em vários testes diagnósticos comerciais para a detecção de anticorpos anti-HCV. O *core* é uma proteína fortemente básica e a principal constituinte do nucleocapsídeo; além disso, parece estar associada a diversas funções, como modulação da transcrição gênica, proliferação, morte e sinalização celular, podendo interferir com o metabolismo lipídico e suprir a resposta imune do hospedeiro (McLAUHLAN, 2000; LAI, WARE, 2000; KATO, 2000). Existem evidências de que a interação da proteína do *core* com resíduos de lipídios no fígado possa afetar o metabolismo dos

lipídios contribuindo para o desenvolvimento da esteatose hepática, que ocorre principalmente nos pacientes infectados com o genótipo 3 (WECK, 2005).

As proteínas do envelope, E1 e E2, são proteínas transmembrana N-glicosiladas, que estão presentes na superfície do HCV como heterodímeros ancorados à dupla-camada lipídica da membrana e apresentam 30 e 70kDa, respectivamente. Estudos demonstraram que estas proteínas apresentam funções fundamentais em diferentes etapas do ciclo de replicação do HCV, atuando de forma essencial para iniciar a infecção, incluindo a ligação ao receptor, fusão com a membrana da célula hospedeira e invasão (BARTENSCHLAGER; LOHMANN, 2000; BARTOSCH et al., 2003; DUBUISSON, et al., 2008; LIN et al., 2009). Pode-se dizer que elas ancoram o HCV na célula hospedeira (MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007). Estudos recentes demonstram uma interação cooperativa destas duas proteínas de envelope formando um heterodímero para facilitar o processo de invasão viral. No entanto, apesar do conhecimento sobre a estrutura e função das glicoproteínas de envelope ter aumentado bastante com as últimas pesquisas, ainda não é suficiente para o seu total entendimento (ALBECKA et al., 2011).

A proteína E1 apresenta aproximadamente metade do tamanho da E2, e embora sua função não esteja clara, muitos estudos têm mostrado que a E1 coopera com a E2 na formação de um complexo funcional de glicoproteínas que é essencial para o processo de invasão viral (LIN et al., 2009). Estas glicoproteínas são classificadas como proteínas transmembrana integrais tipo I com um ectodomínio glicosilado N-terminal e um domínio âncora hidrofóbico C-terminal (GOFFARD, DUBUISSON, 2003; LAVIE et al., 2007; BIAN et al., 2009; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al. 2009). A proteína E1 apresenta aproximadamente cinco potenciais sítios de glicosilação conservados nos seus ectodomínios, e é ancorada na membrana do retículo endoplasmático (RE) da célula hospedeira, pelos seus domínios transmembrana (DTM) que consistem somente de 30 aminoácidos (LIN et al., 2009). Para que os DTM sirvam como âncoras na membrana do RE, apresentam uma sequência sinalizadora na metade do C-terminal que tem o papel de localizar E1 e E2 para o RE, e está potencialmente envolvido na reunião das proteínas de envelope para a montagem da partícula viral (OP DE BEEK et al., 2001; GOFFARD, DUBUISSON, 2003; BIAN et al., 2009).

A proteína E2 é uma glicoproteína de envelope que apresenta um ectodomínio na região N-terminal e um domínio transmembrana na região C-terminal. Se estende do aminoácido 384 ao 746 da poliproteína da qual deriva, sendo o DTM codificado do aminoácido 718 ao 746, uma região extremamente hidrofóbica que retém a proteína no RE no momento da sua síntese (COCQUEREL et., 1998; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al. 2009). No intervalo entre os resíduos 384 e 661 é codificado um domínio de ligação à receptores celulares, tendo papel fundamental nas primeiras etapas da infecção viral (LIN et al., 2009). Também tem sido demonstrado que somente as cadeias polipeptídicas após o resíduo 661 são propriamente dobradas (MICHALAK et al., 1997; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al. 2009). Após a síntese, a glicoproteína E2 sofre um processo de modificação pós-traducional e passa a apresentar de 9 à 11 potenciais sítios de glicosilação, que dependem do genótipo e do subtipo do vírus, mas a maioria deles estão bem

conservados entre os genótipos e subtipos, sendo um bom alvo para o desenvolvimento de moléculas antivirais e também um importante alvo antigênico (LIU et al., 2001; WHIDBY et al., 2009). Além disso, apresenta regiões de hipervariabilidade (HVR1 e HVR2) que dentre suas funções facilitam a evasão do sistema imune (KATO et al., 1992; WHIDBY et al., 2009; McCAFFREY, et al., 2011).

A região mais variável, HVR1, está localizada nos 27 resíduos N-terminais (384 - 411) da E2, e difere aproximadamente 80% entre os genótipos do HCV (FARCI et al., 1996), enquanto que a região HVR2 reside no fragmento 476 a 480 e é encontrada em vírus pertencentes ao genótipo 1 do HCV com a proteína p7. Estudos apontam que estas regiões possam mediar a permeabilidade de íons e formar hexâmeros e, até mesmo, apresentar importante função na maturação e liberação da partícula viral (GRIFFIN et al., 2003; PAVLOVIC et al., 2003; ALBECKA et al., 2011). Pois quando a região HVR-1 é bloqueada por anticorpos específicos, a capacidade de ligação da glicoproteína E2 às células é inibida bloqueando também a infectividade do HCV *in vivo* e *in vitro* (OWSIANKA et al., 2001).

A proteína E2 vem sendo apresentada como uma estrutura complexa, na qual interações intra-moleculares bem como a associação com a glicoproteína E1 são necessárias para a interação com os receptores celulares e para a fusão do envelope viral com a membrana celular, facilitando o processo de invasão da célula hospedeira (ALBECKA et al., 2011). Desta forma, a proteína E2 tem sido descrita por interagir com um grande *loop* extracelular do CD81 humano, um dos seus receptores conhecidos (OWSIANKA et al., 2001, RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al. 2009). Tal proteína vem sendo considerada como a principal candidata para o desenvolvimento de uma vacina anti-HCV, pois observa-se a produção de anticorpos anti-E2 neutralizantes do vírus e anticorpos específicos para epítomos da região HVR1 capazes de inibir a ligação da E2 às células, bloqueando assim a infectividade do HCV tanto *in vivo* como *in vitro* (BARTOSCH, COSSET, 2006; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al. 2009).

A região não-estrutural da poliproteína consiste de domínios (NS2 – NS5) que codificam proteínas com atividade enzimática, ou seja, as enzimas RNA polimerase RNA-dependente, replicase/helicase, serina protease e metaloprotease (STADHOUDERS et al., 1997). A NS2 e o domínio amino-terminal da NS3 constituem a protease NS2-3 que catalisa a clivagem do sítio NS2-NS3 (BARTENSCHLAGER; LOHMANN, 2000). A NS3 é uma molécula bifuncional, que possui na extremidade amino-terminal uma serina protease e na extremidade carboxi-terminal atividades nucleotídeo-trifosfatase (NTPase) e helicase, essenciais para a tradução e a replicação do HCV (BISCEGLIE, 1999; TAYLOR et al., 2000; BARTENSCHLAGER; LOHMANN, 2000). A NS4A é uma proteína que atua como cofator, formando um complexo estável com a NS3. Esse complexo é requerido para um eficiente processamento das proteínas da região NS (LANDRO et al., 1997). A proteína NS4B é altamente hidrofóbica e sua função ainda é desconhecida. A NS5A é altamente fosforilada nos resíduos serina da região central (TANJI et al., 1995) e sua função no ciclo viral do HCV ainda não está bem conhecida, porém alguns estudos revelam a associação entre os aminoácidos 2209 a 2248 e a sensibilidade ou resistência ao interferon (IFN), podendo

essa região ser utilizada para se estabelecer um prognóstico à terapia (ENOMOTO et al., 1996). A NS5B foi identificada como RNA polimerase dependente de RNA (LOHMANN et al., 1997; YAMASHITA et al., 1998).

Infecção

As principais formas de infecção com o HCV são através de: transfusão de sangue de indivíduos infectados, compartilhamento de material para uso de drogas (seringas, agulhas, cachimbos, entre outros), higiene pessoal (lâminas de barbear e depilar, escovas de dente, alicates de unha ou outros objetos perfurocortantes), confecção de tatuagem ou colocação de *piercings* com objetos contaminados, da mãe infectada para o filho durante a gestação (transmissão vertical) e sexo sem camisinha com indivíduo infectado, porém esta é a forma mais rara de infecção (<http://www.aids.gov.br/pagina/hepatite-c>).

O HCV infecta apenas humanos e chimpanzés, sendo os hepatócitos os principais alvos de infecção do vírus (MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007). Estudos relatam a detecção das proteínas não-estruturais do HCV e o RNA viral no fígado de pacientes contaminados e no de chimpanzés experimentalmente inoculados, confirmando que o fígado é o local da replicação do HCV. Porém, as quantidades de proteínas virais e RNA nos tecidos contaminados são muito baixas, necessitando o uso de métodos de detecção altamente sensíveis. Isto explica porque o número relatado de células HCV-positivas detectadas no tecido contaminado do fígado é muitas vezes contraditório, e as estimativas variam entre menos de 5% a até 100% (BLIGHT, GOWANS, 1995).

A infecção pelo HCV é caracterizada pela replicação viral nos hepatócitos, entretanto, outras células extra-hepáticas também podem ser infectadas, tais como os mononucleares do sangue periférico (ex. células B, monócitos/macrófagos), células dendríticas e células biliares. As células não hepáticas infectadas podem atuar como potenciais reservatórios, contribuindo para a seleção de variantes e a persistência viral durante a infecção (GIANNINI, BRECHOT, 2003). Entretanto, a dinâmica da replicação do HCV pode ser deduzida a partir de taxas rápidas de produção do vírus e aparecimento de mutantes. Uma análise cuidadosa da dinâmica viral durante o tratamento antiviral dos pacientes com IFN revelou uma meia-vida do vírus de 3 a 5 horas e uma taxa de *clearance* e de produção de aproximadamente 10^{12} partículas por dia (ZEUZEM et al., 1998; NEUMANN et al., 1998; RAMRATNAM et al., 1999).

A entrada do HCV na célula é um processo altamente orquestrado que envolve fatores virais e da célula hospedeira, mas ainda é pouco conhecido. A primeira etapa do ciclo de vida do vírus é a ligação da partícula viral à célula hospedeira, para a qual uma interação específica entre um receptor na superfície da célula hospedeira e uma proteína viral de adesão na superfície da partícula é exigida (PILERI et al., 1998; WHIDBY et al., 2009). Este mecanismo tem se mostrado um alvo promissor da terapia antiviral (ZEISEL et al., 2011).

Após a entrada do vírus na célula hospedeira, há a liberação do RNA viral fita simples positiva no citoplasma. O genoma fita positiva serve de molde para a tradução e replicação, dando

origem às interações entre fatores de tradução do hospedeiro e replicação do RNA. Todos os vírus caracterizados como RNA fita positiva organizam o complexo de replicação do RNA nas membranas intracelulares (membrana perinuclear e membrana do RE) formando vesículas ou outros rearranjos da membrana (AHLQUIST et al., 2003; WHIDBY et al., 2009). Sabe-se que a maturação das proteínas virais nas células infectadas envolve muitas vias metabólicas da célula hospedeira. O tipo mais comum de modificação protéica é a glicosilação N-terminal, na qual oligossacarídeos são adicionados à resíduos de asparagina específicos na sequência Asn-X-Ser/Thr. Esta modificação afeta muitas das proteínas presentes na superfície do envelope viral, e por esta razão supõe-se que apresentam papel na estabilidade, antigenicidade e funções biológicas destas proteínas (GOFFARD; DUBUISSON, 2003). O RNA genômico é encapsulado pelo *core* e “brota” do RE, de onde deriva o envelope lipídico com as glicoproteínas virais encrustadas. A nova partícula viral percorre a via secretória e é então liberada da membrana causando a lise celular (WHIDBY et al., 2009). Além disso, estudos relatam a ocorrência da produção e liberação de nucleocapsídeos não envelopados do HCV na circulação sanguínea, e o acúmulo de partículas do *core* em células do fígado durante a fase inicial da infecção, o que representa um meio não convencional pelo qual o vírus “engana” a resposta imune do hospedeiro e assegura uma infecção persistente via interação com os receptores de complemento, e ocasiona a redução da resposta dos linfócitos T (KITTLESEN et al., 2000., MAILLARD et al., 2001). O ciclo de vida do HCV pode ser observado na figura 2.

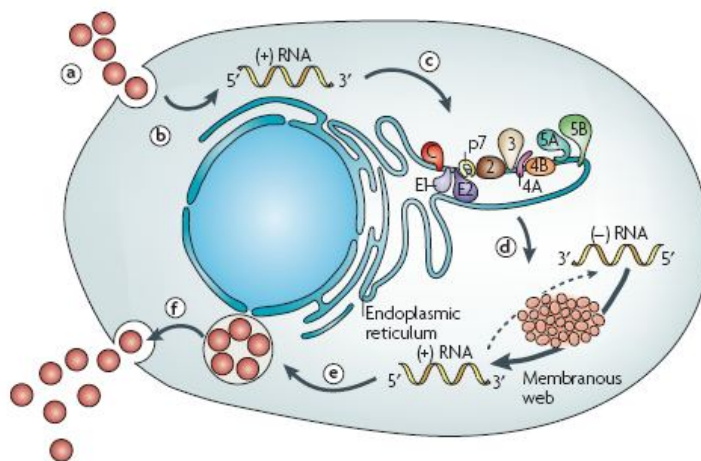


Figura 2: Ciclo de vida do HCV. Ligação do vírus na célula hospedeira e internalização (a); liberação citoplasmática do RNA (b); tradução e processamento da poliproteína (c); replicação do RNA (d); empacotamento e montagem das partículas virais (e); maturação do vírus e liberação (f). A topologia das proteínas estruturais e não-estruturais do HCV na membrana do retículo endoplasmático está apresentada esquematicamente. A replicação do RNA ocorre em uma alteração específica na membrana (*membranous web*). Extraído de MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007.

Entretanto, o mecanismo pelo qual o HCV entra na célula ainda não é bem conhecido, mas sabe-se que as proteínas do vírus podem interagir com receptores da superfície celular. Alguns estudos evidenciam que a proteína E2 interage com vários destes receptores, incluindo principalmente os receptores de lipoproteína de baixa densidade (R-LDL) (*Low Density Lipoproteins* – LDL), o CD81 (TAPA-1), o receptor *scavenger* classe B tipo 1 (SR-BI), o DC-SIGN

(*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*), o L-SIGN (*Liver/lymphnode-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin*) e o ASGPR (*asialoglycoprotein receptor*) (AGNELLO et al., 1999; WÜNSCHMANN, et al., 2006; DIEDRICH, 2006; WHIDBY et al., 2009); também estão envolvidas as proteínas de junção claudina-1 e ocludina, que medeiam a fusão do vírus com a membrana da célula hospedeira (ZEISEL, et al., 2010; McCAFFREY, et al., 2011; ALBECKA et al., 2011).

A glicoproteína E2 do HCV se liga com alta afinidade a uma alça do CD81, uma tetraespanina encontrada na superfície de muitas células, incluindo hepatócitos. No entanto, o CD81 isoladamente não é suficiente para mediar a entrada celular do vírus, assim vários outros receptores podem estar atuando nesta interação (PILERI et al., 1998) como o SR-BI (SCARSELLI et al., 2002), os R-LDL (AGNELLO et al., 1999) e outros que apresentariam grande importância nesta relação com o HCV. A figura 3 apresenta a interação do HCV com os receptores de superfície da célula hospedeira durante o processo de infecção.

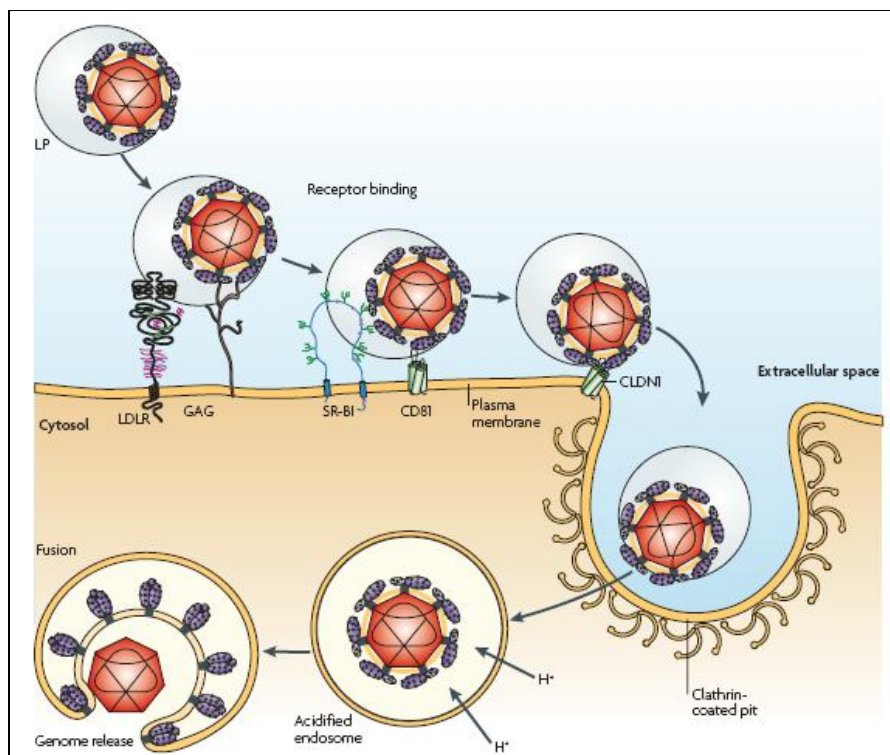


Figura 3: Modelo atual de entrada do HCV na célula hospedeira. Partículas de HCV circulantes podem estar associadas às lipoproteínas (LP), como LDL e VLDL. A ligação do vírus à superfície celular e entrada pode envolver o receptor de LDL (LDLR), glicosaminoglicanas (GAG), receptor scavenger de classe B tipo I (SR-BI), a tetraespanina CD81 e a claudina-1 (CLDN1). As funções da CLDN1 estão relacionadas com os estágios mais tardios da entrada do vírus na célula, possivelmente na polarização dos hepatócitos. A internalização depende da endocitose mediada por clatrina. A acidificação do endossomo induz a fusão das glicoproteínas do HCV com a membrana. Em seguida o genoma é liberado no citosol. Extraído de MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007.

Anteriormente dados físico-químicos a respeito da partícula viral eram inadequados devido aos baixos títulos do vírus no sangue e a dificuldade em isolar as partículas virais puras, o que pode ser devido às diferenças nas estruturas virais e a ligação do HCV às lipoproteínas

(THOMSON, LIANG, 2000). No entanto, estudos recentes têm mostrado o papel dos R-LDL na infecção pelo HCV (NAHMIAS, et al., 2006).

A lipoproteína de baixa densidade (LDL) é uma partícula carreadora lipídica incluída nos compostos de colesterol e triglicérides, sintetizada pelo fígado juntamente com a apolipoproteína B-100. O excesso de LDL circulante é depurado pelos hepatócitos, onde o R-LDL participa ativamente neste processo (NAHMIAS, et al., 2006). O R-LDL é um receptor misto, presente em vários tipos celulares, e reconhece como ligantes tanto a apolipoproteína B quanto a apolipoproteína E, sendo também por esta razão chamado de receptor B/E (HERZ et al., 2001).

Muitas células de mamíferos recolhem partículas lipoprotéicas, como o LDL, do espaço extracelular, por necessitarem de fosfolípidos e colesterol estocados no LDL para a construção de novas membranas. O LDL liga-se aos R-LDL na membrana plasmática das células e é internalizado por endocitose mediada por receptor (DIEDRICH, 2006).

Entretanto, o papel do R-LDL não se restringe ao metabolismo lipídico, pois já se sabe que este receptor apresenta pelo menos trinta ligantes reconhecidos (HERZ et al., 2001). Como o HCV no soro de indivíduos infectados está associado com LDL e VLDL, acredita-se que o vírus possa usar esta interação para se ligar aos R-LDL e invadir a célula, indicando que as lipoproteínas podem promover a infectividade viral (DIEDRICH, 2006). Diversos estudos têm relatado que a proteína E2 mostra uma forte associação com tal receptor, mediada pelo LDL, sugerindo que além de usá-lo para invadir a célula, este também pode ser um meio de evadir-se do sistema imune (NAHMIAS, et al., 2006). Thomssen e colaboradores em 1992 identificaram esta associação entre o HCV e as lipoproteínas do soro humano e subsequentemente demonstraram uma interação entre o HCV ou complexos HCV-LDL com os R-LDL.

Tal fenômeno pode acontecer através da formação de um complexo LDL plasmático-E2, mecanismo através do qual o HCV usa este ligante natural do R-LDL para ser carregado para dentro da célula. Este mecanismo pode ser corroborado por alguns estudos demonstrando que partículas do HCV circulantes mostravam densidade heterogênea (MEUNIER et al., 2005), o que poderia ser consequência da ligação desses vírus ao LDL (NAHMIAS, et al., 2006).

Pelo fato do HCV ser um vírus heterogêneo, mais do que uma via de entrada na célula pode existir. Assim, um dos mecanismos para a entrada do vírus na célula seria através da ligação da proteína E2 ao R-LDL mediada por LDL (WÜNSCHMANN et al., 2000), e a internalização viral ocorreria por endocitose dependente de clatrina (HONG, et al., 2010; McCaffrey, et al., 2011). Desta forma, o R-LDL tem sido apresentado como o principal mediador da internalização do HCV via associação HCV-LDL. Este fato foi demonstrado por ensaios experimentais utilizando células HepG2 deficientes de CD81, que internalizavam o HCV pela ligação deste às partículas de LDL, utilizando para isto os R-LDL (AGNELLO et al., 1999). Desta forma, tais achados tornaram-se alvos para o desenvolvimento de novas terapias anti-virais (ZEISEL et al., 2011).

Favre e Muellhanpt (2005) sugeriram um modelo representativo da associação HCV - LDL como a hipótese mais provável da facilitação mediada por lipídios na infecção viral, apresentado

na figura 4. Estes pesquisadores apontaram que o HCV pode estar presente como um complexo lipoprotéico no sangue humano de modo que, as proteínas do envelope viral E1 e E2 estariam protegidas da ação do sistema imune (Figura 4A). Em outra abordagem, o HCV estaria presente em exosomas contendo, além do HCV, o CD81 solúvel, associados através das glicoproteínas E1 e E2 (Figura 4B). É provável que os complexos de ligação da lipoproteína ao HCV e/ou exosoma-HCV com o R-LDL possam ser influenciados pelo excesso de lipoproteínas livres no sangue humano. O mesmo poderia ocorrer em relação ao SR-BI, uma vez que este também se liga ao LDL.

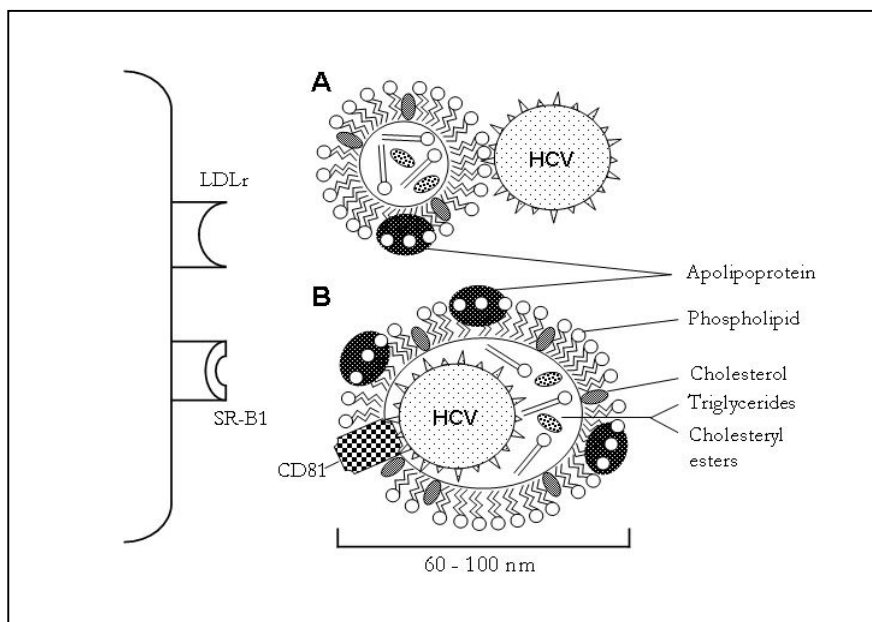


Figura 4: Modelo representativo da associação HCV e LDL proposto por Favre e Muellhanpt (2005), hipótese mais provável para a infecção viral mediada por lipídios.

Já está bem estabelecido que as partículas de HCV infectantes tem baixa densidade ($\leq 1,1\text{g/mL}$), o que parece ser determinado pela célula hospedeira, na qual o vírus é produzido. Isto provavelmente é devido à associação dos vírus com os componentes da célula durante a secreção da nova partícula viral, principalmente às lipoproteínas, como as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e apolipoproteína E (Apo E) (MERZ, et al., 2011), fatos que confirmam a hipótese de Favre e Muellhanpt (2005). Desta forma, as partículas de HCV circulantes no sangue apresentam-se associadas à lipoproteínas como LDL, VLDL, quilomícrons e partículas lipovírus (LVPs), sendo por elas carregadas, sugerindo então, que a associação com fatores de baixa densidade pode influenciar a infectividade (HISHIKI, et al., 2010).

Diversos estudos relatam a associação presente entre a infecção do vírus e o metabolismo de lipídios no fígado. Assim, a literatura hipotetiza que as lipoproteínas poderiam proporcionar acréscimo de infectividade (MEUNIER et al., 2005; LAVILLETTE et al., 2005). Além disso, a relação do HCV com LDL parece aumentar a entrada deste vírus mediada pela SR-BI e proteger as partículas virais de anticorpos neutralizantes (BARTOSCH et al., 2003; HISHIKI, et al., 2010).

Estudos recentes abordam ainda o fato de que a biossíntese das lipoproteínas apresenta um papel fundamental na produção de novas partículas do HCV e sua capacidade de infecção das células hospedeiras. Neste sentido, a depleção de Apo E suprime a produção de HCV e células deficientes de R-LDL também demonstram redução da infectividade pelo HCV associado à Apo E, sugerindo assim a importância das lipoproteínas no ciclo de vida do HCV. Entretanto, o papel preciso das lipoproteínas e apolipoproteínas na produção de novos vírus e na infectividade ainda não é completamente entendido (HISHIKI, et al., 2010).

Outros estudos também tem demonstrado a utilização dos R-LDL como “porta de entrada” para o HCV nas células, como Seipp et al., 1997, que mostraram que a persistente replicação do HCV em linhagens de hepatócitos só ocorria quando estas células eram mantidas sob condições que aumentavam a expressão dos R-LDL. Já estudos mais recentes têm apresentado que os HCV não se ligam a fibroblastos deficientes de R-LDL, mas que a expressão de R-LDL humano recombinante nestas células promove a ligação do vírus. Também, existem relatos de que os R-LDL promovam não somente a entrada do HCV, mas também de vários membros da família *flavivirus*, incluindo o Vírus da Hepatite G tipo C (WÜNSCHMANN et al., 2000).

Desta forma, o R-LDL pode facilitar a ligação do complexo HCV-LDL ou E2-LDL, e transferi-lo para os receptores subsequentes como CD81 ou SR-BI para iniciar a fusão do vírus com a membrana da célula hospedeira. Tal fato pode explicar, a necessidade das lipoproteínas para uma infecção eficiente. Assim, o CD81 pode não ser o receptor primário do HCV, mas ele é importante para o processo de invasão, já que também pode ligar partículas virais não associadas à lipoproteínas (DIEDRICH, 2006).

Um exemplo de desenvolvimento de uma terapia anti-viral baseada na ligação da proteína E2 à receptores na célula hospedeira é o estudo apresentado por VanCompernelle e colaboradores em 2003, onde o CD81 é um desses alvos potenciais. Compostos baseados em imidazol mimetizam uma alfa hélice do *loop* extracelular do CD81 e competem pela ligação E2-CD81. Essas drogas ligam-se à E2 de forma irreversível e bloqueiam a interação E2-CD81 sem efeito na expressão do CD81 pela célula hospedeira ou na interação deste com moléculas fisiológicas. Meuleman e colaboradores em 2008, observaram que anticorpos anti-CD81 inibiam a infecção *in vitro* pelo HCV, prevenindo também a infecção de células hepáticas humanas em modelos *in vivo*. Estes estudos sugerem que os receptores celulares, assim como o R-LDL, possam ser utilizados como estratégias eficientes para prevenir a infecção pelo HCV, mas para isso é necessário o conhecimento dos mecanismos de ligação das glicoproteínas de envelope do HCV aos receptores celulares.

Enquanto a natureza do receptor de HCV não é conhecida, acredita-se que a glicoproteína E2 do envelope seja provavelmente a principal responsável por iniciar o acoplamento do vírus à célula hospedeira (ROSA et al., 1996; ZIBERT et al., 1995; FARCI et al, 1996). Apesar de não haver uma descrição detalhada das interações entre a proteína E2 e outras proteínas do HCV com o LDL ou o R-LDL (WÜNSCHMANN et al., 2000), estudos têm demonstrado a associação da infecção pelo HCV com alterações nos níveis de lipoproteínas séricas (SIAGRIS, et al., 2006).

Patologia

A infecção pelo HCV é atualmente a principal causa da doença hepática crônica e a maior indicação de transplante de fígado no mundo, pois o vírus se aloja neste órgão e dispara uma inflamação que o agride. Isto, juntamente com a persistência da infecção pode levar à hepatite crônica complicada pela fibrose hepática e subsequentemente pela cirrose, falência hepática e/ou carcinoma hepatocelular (HCC), sendo que os mecanismos que desencadeiam todo este dano hepático ainda não estão bem definidos (BALASUBRAMANIAN et al., 2005; BURKE, COX, 2010; MING-JU et al., 2011). Desta forma, a Hepatite C é hoje uma das doenças hepáticas mais prevalentes no mundo, sendo responsável por 60% das hepatopatias crônicas (LAUER, WALKER, 2001; WHIDBY et al., 2009).

Nos Estados Unidos em 2010, existiam aproximadamente 4 milhões de pessoas com infecção persistente pelo HCV e acredita-se que mais de 10 mil mortes a cada ano estejam relacionadas com a Hepatite C. A partir destes dados, é esperado que a mortalidade pelo HCV nesta década seja o dobro da passada e possivelmente supere as mortes causadas pelo HIV (BURKE, COX, 2010).

O surgimento dos sintomas em indivíduos com Hepatite C aguda é muito raro. Entretanto, os que mais aparecem são cansaço, tontura, enjoos e/ou vômitos, febre, dor abdominal, pele e olhos amarelados, urina escura e fezes claras (<http://www.aids.gov.br/pagina/hepatite-c>). Manifestações extra-hepáticas, incluindo a crioglobulinemia e desordens proliferativas de linfócitos B, que são caracterizadas pela ativação policlonal de linfócitos B e pela produção de auto-anticorpos, também estão associadas com a infecção pelo HCV (FERRI et al., 1991; AGNELLO et al., 1992; SCHMIDT et al., 2000).

Por se tratar de uma doença silenciosa, e com sintomas muito inespecíficos, a Hepatite C pode ser facilmente confundida com outra infecção, como uma gripe. Por isso, nestes casos indica-se consultar um médico para realização de exames que detectem todas as formas de hepatite, contando que a janela imunológica da Hepatite C pode variar de 50 a 70 dias até o aparecimento dos primeiros anticorpos. O diagnóstico precoce da hepatite amplia a eficácia do tratamento, que é complexo e dependerá da realização de exames específicos, como biópsia hepática e exames de biologia molecular, onde as chances de cura variam de 50 a 80% dos casos (<http://www.aids.gov.br/pagina/hepatite-c>).

A severidade da inflamação crônica e a taxa de progressão da doença no fígado variam consideravelmente (GHANY et al., 2003). Assim, aproximadamente 15% dos indivíduos infectados progridem espontaneamente para a cura da doença, 85% apresentam uma viremia persistente que leva a uma infecção crônica, sendo que 20 a 50% desses indivíduos desenvolvem cirrose em 20 a 30 anos (WÜNSCHMANN et al., 2000); o restante apresenta uma hepatite crônica que não progride ou progride muito lentamente (AFDHAL, 2004; ZEREMISK et al., 2007), e 5% dos indivíduos com cirrose relacionada à Hepatite C desenvolvem carcinoma hepatocelular (HOOFNAGLE, 1997; MAJOR et al. 2001; BURKE, COX, 2010).

Entretanto, a erradicação viral espontânea durante a fase aguda necessita de uma intensa

resposta de células CD8⁺ e CD4⁺ contra múltiplos epítomos virais. Os pacientes que apresentam falhas no desenvolvimento de uma resposta viral específica ou aqueles cuja resposta diminui por um tempo, podem tornar-se cronicamente infectados. Nestes pacientes, o desenvolvimento e a persistência da inflamação mediada pelas células T *helper* 1 (Th1) (que predominam no fígado durante a infecção crônica) caracterizada pela secreção de IFN- γ e IL-2, podem promover o dano ao tecido e levar à fibrose do mesmo. Todavia, a inflamação intra-hepática parece ser mais importante do que a citotoxicidade viral direta, no desenvolvimento da lesão hepática progressiva. Vários estudos têm observado que a inflamação intra-hepática, especialmente a lobular e/ou a peri-portal, é um dos mais importantes determinantes da progressão da fibrose (ZEREMISK et al., 2007).

Estudos recentes em modelos pré-clínicos e em pacientes infectados com o HCV demonstram que o vírus tem desenvolvido múltiplas estratégias para evadir-se da resposta imune do hospedeiro, incluindo evasão dos anticorpos neutralizantes e disseminação viral por transmissão célula-célula (ZEISEL et al., 2011) tornando o indivíduo cronicamente infectado (BURKE, COX, 2010). Hoje diversos grupos de pesquisa baseiam-se nestes mecanismos de invasão e evasão viral para desenvolver novas estratégias anti-virais preventivas e terapêuticas para a Hepatite C (ZEISEL et al., 2011).

A patologia hepática causada pela infecção do HCV é caracterizada por um infiltrado inflamatório, que consiste de diferentes populações de células imunes. Sendo a magnitude desta reação inflamatória um dos maiores indícios do dano hepático progressivo, mas fatores exógenos e genéticos também podem determinar o grau da inflamação (YANO et al., 1996).

A infecção crônica pelo HCV pode resultar no desenvolvimento de cirrose, e a resposta inflamatória mais vigorosa está associada com a sua mais rápida progressão (POYNARD et al., 1997). Assim, muitos estudos sobre a patogênese do HCV focam a carcinogênese, não existindo estudos detalhados sobre a cirrose. Estudos prévios mostram que a ligação da proteína E2 do HCV ao CD81 leva ao aumento da atividade da matriz de metaloproteinase 2, indicando que esta proteína pode estar envolvida na fibrose induzida pelo HCV, sendo a fibrose o primeiro passo do desenvolvimento da cirrose. Também foi observado que várias citocinas pró-fibrogênicas e pró-inflamatórias, incluindo o TGF- β 1 (fator de crescimento transformante), CTGF (fator de crescimento de tecido conectivo), IL-6 e IL-1 β , apresentavam-se elevadas na presença da proteína E2, e que isto possa ser responsável pelo aumento da penetração de células inflamatórias nos sítios de lesão tecidual promovendo a fibrose. Desta forma, acredita-se que a proteína E2 esteja envolvida na patogênese causada pelo HCV, pois ela é um dos mediadores da fibrose aumentando a produção de colágeno e o *stress* oxidativo gerado na célula hospedeira. Assim, a cirrose é um processo progressivo do dano hepático causado pela infecção crônica pelo HCV. Entretanto, a contribuição das glicoproteínas de envelope para o dano hepático e consequente cirrose ainda não estão bem definidos, mas sabe-se do seu envolvimento (MING-JU et al., 2011).

Os danos hepáticos associados com o HCV causam alterações histopatológicas

características, que incluem: agregados e/ou folículos linfóides portal, infiltração linfocitária dos lóbulos (característica mais comum das biópsias), esteatose, inflamação sub-endotelial das veias hepáticas terminal e/ou portal, danos às células endoteliais, injúrias epiteliais ao ducto biliar e intensa atividade necroinflamatória (LORY, ZIMMERMANN, 1997; BADIZADEGAN et al., 1998).

A causa da patologia endotelial ainda não está bem definida, mas uma hipótese sugere que exista a liberação de citocinas quimiotáticas pelas células endoteliais, por exemplo a IL-8, um potente quimiotraente de neutrófilos e super-expressa na infecção pelo HCV, que recrutam linfócitos específicos para o fígado e aumentam a inflamação através das interações célula endotelial-leucócitos (WALD et al., 2007). Além disso, foi demonstrado que as proteínas do HCV podem ser tóxicas para as células endoteliais, independente da infecção viral direta, produzindo um efeito conhecido como *innocent bystander*, onde as proteínas do HCV ao se ligarem às células endoteliais (que não são susceptíveis diretamente a infecção) causam-lhes danos devido a este efeito, que a longo prazo contribuirão para o desenvolvimento da cirrose (BALASUBRAMANIAN et al., 2005).

Além das citocinas, outros fatores também podem contribuir para o processo inflamatório, como o óxido nítrico (NO), um mediador pleiotrópico da inflamação, que em um mecanismo compensatório para a redução do recrutamento de leucócitos leva o tecido a uma lesão inflamatória potencial que pode ser agravada pela liberação das EROs, os quais aumentam a expressão de quimiocinas (ex. IL-8), citocinas e moléculas de adesão endotelial, amplificando a cascata de inflamação (REMICK, VILLARETE, 1996). Tal processo também pode contar com a participação do PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), produzido por várias células, inclusive as endoteliais, que provoca tanto migração quanto proliferação de fibroblastos e monócitos, exibindo também propriedades pró-inflamatórias (BETSHOLTZ, RAINES, 1997).

O tratamento anti-viral padrão para os pacientes com infecção crônica é a combinação do interferon peguilado com ribavirina. Entretanto este tratamento é caro, relativamente tóxico, apresenta muitos efeitos colaterais e é limitado pela resistência, pois é efetivo em somente metade dos pacientes tratados (FELD, HOOFNAGLE, 2005; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al. 2009; ZEISEL et al., 2011). O genótipo 1, o mais prevalente na população mundial, apresenta altos níveis de resistência inata ao IFN (BIAN et al., 2009). Vários critérios são utilizados para o prognóstico da evolução da doença, como carga viral, idade, sexo e situação histológica do fígado (verificadas na biópsia): como presença de esteatose e extensão da fibrose hepática. Mas sobre todos esses fatores, o genótipo do HCV é o fator mais importante na predição de resposta ao tratamento antiviral, bem como para o entendimento da evolução e epidemiologia do vírus, além de determinar o prognóstico e o tempo de tratamento (HOLLAND et al., 1996).

Estes entraves no tratamento demonstram a necessidade de desenvolvimento de novas terapias e de uma vacina contra o HCV. Pois até o momento ainda não se conhece uma vacina comprovadamente eficaz contra o HCV, devido em grande parte à diversidade genética do vírus não ser distribuída de maneira regular no genoma, sendo as regiões não codificadoras relativamente conservadas, enquanto as regiões do envelope apresentam alta taxa de mutação, o

que dificulta a produção de uma vacina eficiente (FARCI et al., 2001; FELD, HOOFNAGLE, 2005; HOUGHTON, ABRIGNANI, 2005; BIAN et al., 2009).

A falta de uma resposta adequada ao tratamento pode levar à cirrose, que é hoje uma das principais causas de morte no mundo ocidental, contabilizando cerca de 27.000 mortes nos EUA em 2004 e mais de 228.145 anos potenciais de vida perdidos. No Brasil, não existem dados atuais que apontem corretamente o número de mortes causadas por cirrose em virtude da progressão da Hepatite C, mas estima-se que cerca de 3500 novos casos sejam diagnosticados anualmente, sendo que a falência hepática associada à cirrose está entre as dez principais causas de óbito no país, principalmente na faixa dos 50 aos 59 anos. No Estado de São Paulo registrou-se em 2002, uma taxa de mortalidade de 10,31 por 100.000 habitantes (MAEDA et al., 2008).

Estudos recentes relatam que as alterações na micro e macrovasculatura do órgão têm sido apontadas como elementos fundamentais na histogênese da doença, incluindo lesões como a capilarização dos sinusóides, a formação de desvios (*shunts*) anastomóticos pré e pós-sinusoidais e perda de ramos da veia porta (ONORI et al., 2000; WARD, HANINEE, 2004). Portanto, as alterações vasculares do fígado cirrótico de pacientes portadores de Hepatite C crônica, têm despertado crescente interesse, pois ainda pouco se sabe sobre a sua relação com as principais complicações, tais como a hipertensão portal, insuficiência hepática e o carcinoma hepatocelular e, a partir daí, sua implicação prognóstica, evidenciando-se então a necessidade de uma caracterização mais detalhada dos aspectos inflamatórios destas alterações relacionadas à presença do HCV no tecido hepático.

1. INTRODUÇÃO

O vírus da Hepatite C (HCV) representa hoje um grave problema de saúde global por infectar 3% da população mundial e levar à óbito mais de 10 mil indivíduos todos os anos devido às suas complicações (BURKE, COX, 2010). A infecção pelo HCV é considerada a principal causa da doença hepática crônica e a maior indicação de transplante de fígado no mundo. O vírus se aloja no fígado e dispara uma inflamação exacerbada que o agride, e juntamente com a persistência da infecção pode levar à hepatite crônica complicada pela fibrose hepática e subsequente pela cirrose e/ou carcinoma hepático (MING-JU et al., 2011).

A severidade da inflamação crônica e a taxa de progressão da doença no fígado variam consideravelmente (GHANY et al., 2003). Desta forma, os mecanismos de invasão e evasão viral são hoje alvos de estudos para o desenvolvimento de novas estratégias anti-virais preventivas e terapêuticas para a Hepatite C (ZEISEL et al., 2011).

O mecanismo de invasão celular pelo HCV ainda não é bem conhecido, mas sabe-se que se trata de um processo altamente orquestrado que envolve fatores virais e da célula hospedeira (PILERI et al., 1998; GIANNINI, BRECHOT, 2003). Estudos recentes têm relacionado a glicoproteína do envelope viral E2 ao acoplamento do vírus à célula hospedeira, pois esta tem exibido funções fundamentais em diferentes etapas do ciclo de replicação do HCV, atuando de forma essencial para iniciar a infecção, incluindo ligação ao receptor, fusão com a membrana da célula hospedeira e invasão (LIN et al., 2009). Este acoplamento é devido à interação que esta proteína realiza com vários receptores presentes na superfície celular, incluindo o receptor de LDL (R-LDL) e o CD81 (AGNELLO et al., 1999; WÜNSCHMANN, et al., 2006), alvos do nosso estudo.

Diversos estudos relatam que a proteína E2 mostra uma forte associação com o R-LDL, sugerindo que o HCV possa usá-lo para invadir a célula (NAHMIAS, et al., 2006). Em 1992, Thomssen e colaboradores identificaram uma associação entre o HCV e o LDL do soro humano e uma interação deste complexo (HCV-LDL) com os R-LDL, inferindo que o vírus utilizava este mecanismo para invadir a célula. Os autores também sugeriram que as lipoproteínas poderiam proporcionar acréscimo da infectividade (MEUNIER et al., 2005; LAVILLETTE et al., 2005) e proteger as partículas virais de anticorpos neutralizantes (BARTOSCH et al., 2003; HISHIKI, et al., 2010). Desta forma, o R-LDL tem sido apresentado como o principal mediador da internalização do HCV, sendo que tais achados tornaram-se alvos para o desenvolvimento de novas terapias anti-virais (ZEISEL et al., 2011).

A infecção pelo HCV causa uma patologia hepática que é caracterizada por um infiltrado inflamatório, que consiste de diferentes populações de células imunes. Sendo a magnitude desta reação inflamatória um dos maiores indícios do dano hepático progressivo (YANO et al., 1996). Muitas pesquisas sobre a patogênese do HCV focam a carcinogênese, existindo poucos estudos sobre as etapas anteriores que levam a ela, bem como à cirrose ou sobre os mecanismos moleculares que culminam nestas outras patologias resultantes da complicação causada pela infecção do HCV. Estudos prévios observaram que na presença da proteína E2, diversos tipos celulares são levados a responder a este estímulo, aumentando a produção de citocinas pró-

fibrogênicas e pró-inflamatórias, e também o *stress* oxidativo através da geração de EROs, sendo que a lesão tecidual pode levar as células do tecido hepático à apoptose ou à transformação cancerígena (MING-JU et al., 2011).

Vários estudos têm observado que a inflamação intra-hepática, especialmente a lobular e/ou a peri-portal, é um dos mais importantes determinantes da progressão da fibrose/cirrose, atualmente considerada uma das principais causas de morte no mundo ocidental. Sendo que as alterações na micro e macro-vasculatura do fígado têm sido apontadas como elementos fundamentais na histogênese da doença (ONORI et al., 2000; WARD, HANINEE, 2004). A causa desta patologia endotelial ainda não está bem definida, mas uma hipótese sugere que exista a liberação de citocinas quimiotáticas pelas células endoteliais, por exemplo a IL-8, um potente quimiotraente de neutrófilos e super-expressa na infecção pelo HCV, que recrutam linfócitos específicos para o fígado e aumentam a inflamação através das interações célula endotelial-leucócitos (WALD et al., 2007). Além das citocinas, outros fatores também podem contribuir para o processo inflamatório vascular, como o óxido nítrico (NO), que em um mecanismo compensatório para a redução do recrutamento de leucócitos, leva o tecido a uma lesão inflamatória potencial que pode ser agravada pela liberação das EROs, as quais aumentam a expressão de quimiocinas, citocinas e moléculas de adesão endotelial, amplificando a cascata de inflamação (REMICK, VILLARETE, 1996).

Outros estudos demonstram que as proteínas do HCV podem ser tóxicas para as células endoteliais, independente da infecção viral direta; sendo assim, a simples ligação destas aos receptores de superfície destas células produz um efeito conhecido como *innocent bystander*, que promove os danos celulares que em longo prazo contribuem para as principais complicações da Hepatite C (BALASUBRAMANIAN et al., 2005).

Desta forma, acredita-se que a proteína E2 possa estar diretamente envolvida na progressiva patogênese hepática causada pela infecção crônica do HCV. Sendo que as alterações vasculares do fígado cirrótico de pacientes portadores de Hepatite C crônica têm sido consideradas de grande importância para o entendimento das complicações futuras causadas por esta infecção e para a implicação prognóstica, aspectos ainda pouco estudados.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi estudar as interações *in vitro* da proteína de envelope 2 (E2) do HCV com o receptor de LDL (R-LDL) e o CD81 presentes em células endoteliais humanas (estudo de *binding*) e avaliar a resposta inflamatória destas, quando ativadas pela proteína E2 recombinante.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) expressão e purificação das proteínas recombinantes;
- b) testes *in vitro* de interação das proteínas recombinantes com os R-LDL e CD81 das células endoteliais na presença e ausência de LDL;
- c) caracterização da resposta inflamatória gerada nas células endoteliais humanas após ativação com as proteínas recombinantes virais, através da análise da produção de NO, EROs, H₂O₂, atividade da arginase, IL-8 e VEGF;
- d) caracterização da indução de morte celular provocada pela exposição às proteínas recombinantes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. OBTENÇÃO DOS POOLS DE AMOSTRAS POSITIVAS E NEGATIVAS PARA HCV

Um *pool* de soros HCV (+) com carga viral alta e somente do genótipo 1a foi fornecido pelo Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular do Centro de Referência Diagnóstica do Núcleo de Atendimento à Comunidade (CRD - NAC) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – Laboratório de Referência em Hepatite Molecular integrante do Programa Estadual de Hepatites Virais da Secretaria do Estado da Saúde. O controle sorológico negativo para o HCV foi proveniente de *pool* de soros negativos testados, para doenças infecciosas, submetidos à rotina sorológica para Chagas, Sífilis, Hepatites B e C, HIV-1/2 e HTLV, fornecidos pelo mesmo laboratório. Os *pools* de soro foram mantidos à temperatura de -80°C até o momento do uso.

3.2. OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE RNA

3.2.1. PROCEDIMENTO PARA ISOLAMENTO VIRAL E EXTRAÇÃO DO RNA

Para concentrar a amostra viral e aumentar o rendimento do RNA a ser extraído, foram utilizado o reagente *Bead Suspend*, do kit *VERSANT® HIV RNA 3.0 Assay (bDNA)* (Siemens, Tarrytown, NY 10591-5097 USA).

Em um tubo de microcentrífuga do tipo *Eppendorf* de 1,5mL *DNase* e *RNase free*, foi adicionados 1mL do *pool* de soros HCV (+) genótipo 1a e 50µL de *Bead Suspend* do kit acima referido. O tubo foi tampado, agitado em vórtex (*Agitador de tubos AP56 - Phoenix*) por 10seg e centrifugado à 35.060 *xg* por 60min à 4°C. Após a centrifugação, foram aspirados 1030µL de sobrenadante e descartado, o restante foi ressuspensionado em vórtex por 10seg e imediatamente congelado à -80°C por 30min. Após este tempo, o precipitado foi ressuspensionado em 120µL de tampão TE pH8,0 (Tampão Tris-EDTA (TE): Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM).

Para a extração do RNA viral foi utilizado o kit *QIAmp Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN), conforme a metodologia indicada no protocolo do fabricante sendo que ao invés de soro, foi utilizado o precipitado ressuspensionado em tampão TE resultante da etapa anterior. O RNA eluído da coluna foi armazenado à temperatura de -80°C até o momento do uso.

3.3. AMPLIFICAÇÃO DO PRODUTO DE INTERESSE

3.3.1. DESENHO DOS PRIMERS

Os *primers* para amplificação da sequência da proteína E2 do HCV foram desenhados no programa de análise de seqüências Bio-Edit, de acordo com a seqüência depositada no GENBANK sob o número de acesso AF009606, sendo a seqüência a ser amplificada correspondente do nucleotídeo 1491 ao 2324.

A proteína E2 solúvel recombinante expressa é a correspondente aos resíduos de aminoácidos 384 ao 661, sem o domínio transmembrana (figura 5) permitindo assim a sua maior solubilidade.

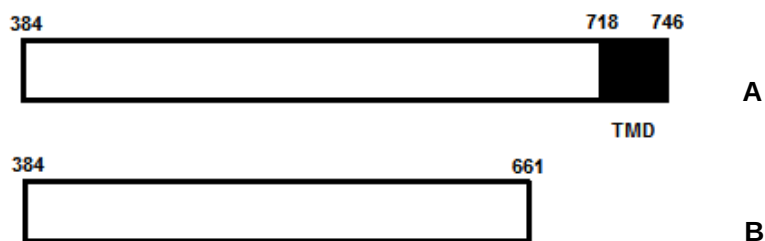


Figura 5 Representação esquemática da glicoproteína E2 do HCV, truncada ou insolúvel (A) e solúvel (B). Os números correspondem às posições na poliproteína do HCV cepa de referência H (número de acesso GenBank AF009606). O domínio transmembrana (TMD) está indicado.

Para a amplificação do fragmento que seria utilizado para a clonagem no plasmídeo destinado à expressão da proteína E2 recombinante em *E. coli* linhagem Rosetta foram sintetizados os seguintes *primers*: *sense* (E2.R.S) 5' ggc cat ggg gga aac cca cgt cac cgg 3' apresentando um sítio para a enzima de restrição *Nco I*, e o *anti-sense* (E2.R.AS) 5' gct cga ggc tcg gac ctg tcc ctg tc 3' com o sítio de restrição para *Xho I*. Para a amplificação do fragmento utilizado para clonagem nos plasmídeos destinados à expressão em *P. pastoris* foram sintetizados os seguintes *primers*: *sense* (E2.PP.S) 5' a aga att cga aac cca cgt cac cgg ggg aa 3' e *anti-sense* (E2.PP.AS) 5' aa tct aga ttc tcg gac ctg tcc ctg tct tcc 3'. Ao *primer sense* foi adicionado o sítio para a enzima de restrição *EcoR I*, e ao *anti-sense*, o sítio para a enzima de restrição *Xba I*. As soluções de trabalho foram diluídas em água Milli-Q estéril para a concentração final de 10pM/μL.

3.3.2. REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA

A síntese do cDNA do HCV foi realizada utilizando a enzima *SuperScript™ III Reverse Transcriptase* (Invitrogen), conforme especificações do fabricante, e o *primer anti-sense* E2.R.AS em termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf). Um controle negativo da reação foi inserido como controle de reagentes, sendo o volume de RNA substituído por água nuclease free (*Promega*). O cDNA foi armazenado à -80°C até o momento do uso.

3.3.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) DA ORF CODIFICADORA DA PROTEÍNA E2

Após o estudo dos parâmetros físico-químicos dos *primers sense* e *anti-sense* foram definidas e padronizadas as condições de PCR para a amplificação do fragmento de interesse a partir do cDNA do HCV, baseando-se nos métodos descritos em Sambrook et al, 1989.

Nas reações de PCR foi incluído, além das amostras, um controle negativo da reação, ou seja, o controle de contaminação de reagentes (todos os constituintes do mix de reação exceto o cDNA, sendo o volume deste substituído por água nuclease free (*Promega*)).

3.3.3.1. AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO A SER CLONADO EM *E. coli* LINHAGEM ROSETTA

Para cada amostra e controle negativo, foi realizada a preparação de um mix de reação. A um tubo de microcentrífuga do tipo *Eppendorf* de 0,2mL *DNase* e *RNase free* foram adicionados: 5µL de cDNA (ou o mesmo volume de água no controle negativo), 5µL de tampão de PCR 10x (concentração final: 1x) (sem $MgCl_2$), 1,5µL de $MgCl_2$ 50mM (concentração final: 1,5mM), 1µL de dNTP mix 10mM (concentração final: 0,2mM), 1µL de *primer sense* E2.R.S (*Invitrogen*) (10pM/µL) (concentração final: 0,2pM/µL), 1µL de *primer anti-sense* E2.R.AS (*Invitrogen*) (10pM/µL) (concentração final: 0,2pM/µL), 0,5µL de enzima Taq DNA polimerase (*Invitrogen*) (5U/µL) (concentração final: 0,05U/µL) e 35µL de água nuclease *free* (*Promega*), constituindo assim um volume final de 50µL. A reação foi realizada em gelo, brevemente centrifugada e imediatamente incubada no termociclador sob as seguintes condições padronizadas: 94°C por 4 min para desnaturação inicial, 35 ciclos de: 94°C por 1min para desnaturação, 55°C por 1min para anelamento e 72°C por 1min e 15seg para extensão, seguidos de um acréscimo de 10min à 72°C para completar a extensão final. Ao final da reação as amostras foram mantidas no termociclador à 4°C e posteriormente foram armazenadas à -20°C até o momento do uso.

3.3.3.2. AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO A SER CLONADO EM *Pichia pastoris*

Para a amplificação do gene de interesse, em um tubo de microcentrífuga do tipo *Eppendorf* de 0,2mL *DNase* e *RNase free* foram adicionados: 2µL de cDNA viral (ou o mesmo volume de água no controle negativo), 5µL de tampão da enzima com 25mM de Mg^{2+} (concentração final: 1x), 1µL de dNTP mix 10mM (concentração final: 0,2mM), 5µL de *primer sense* E2.PP.S (*Invitrogen*) (10pM/µL) (concentração final: 1pM/µL), 5µL de *primer anti-sense* E2.AS (*Invitrogen*) (10pM/µL) (concentração final: 1pM/µL), 0,5µL de enzima Taq DNA polimerase *Pfu* (*Fermentas*) (2,5U/µL) (concentração final: 1,25U/µL) e água nuclease *free* (*Promega*) para completar um volume final de 50µL. Além disso, um tubo contendo água nuclease *free* no lugar do cDNA serviu como controle negativo da reação.

A reação foi incubada no termociclador sob as seguintes condições: 95°C por 3min, 35 ciclos de: 95°C por 1min, 60°C por 1min e 72°C por 2min para extensão, seguidos de um acréscimo de 7min à 72°C para completar a extensão final. O produto amplificado foi armazenado à -20°C até o momento do uso.

3.4. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1%

Para a análise dos fragmentos amplificados, estes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% segundo método descrito por Sambrook et al, 1989, utilizando tampão TAE pH 8,0 (tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE): 20mM de Tris acetato; 0,5mM de EDTA). Aos orifícios do gel (contendo brometo de etídeo (0,5µg/ml)) foram aplicados 10µL do produto amplificado adicionado de 2µL de solução corante (azul de bromofenol 0,1%, SDS 1%, glicerol 50% e EDTA- Na_2 0,1M).

A corrida eletroforética foi realizada por 30min sob tensão de 110 volts (V) em tampão TAE. Ao final do processo, o gel foi levado a um fotodocumentador com mesa de luz ultra-violeta (UV) (*BioRad - software Quantity One 4.6.5*) e os produtos de amplificação foram observados. Esperavam-se fragmentos únicos correspondentes ao tamanho da sequência E2 amplificada. Sendo o tamanho dos produtos amplificados estimado pela inclusão de 4 μ L de um padrão de 100pb (*Invitrogen*) em um dos orifícios do gel.

Para a utilização em ambos os sistemas de expressão foram consideradas as amostras que apresentaram produtos de amplificação com 852pb, sendo: parte do gene da proteína E2 (834pb) adicionado dos sítios de restrição (18pb), num total de 852pb.

3.5. PURIFICAÇÃO, ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DO PRODUTO PURIFICADO

Os produtos de PCR foram purificados com o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA)*, conforme as especificações do fabricante. Ao final, 1 μ L de produto de PCR purificado foi adicionado de 1 μ L de solução corante e submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (tampão TAE pH8,0; 40min; 100V) para análise da integridade do material. Em seguida, o mesmo foi quantificado em espectrofotômetro ND-1000 (*NanoDrop*).

3.6. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA E2 RECOMBINANTE DO HCV EM SISTEMA BACTERIANO

3.6.1. CLONAGEM DO PRODUTO DE PCR PURIFICADO NO VETOR pTZ57R/T

3.6.1.1. LIGAÇÃO

O produto de PCR purificado foi inserido no vetor de clonagem pTZ57R/T (anexo 1), utilizando kit *InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas)* conforme as especificações do fabricante. Onde 50ng/ μ L de vetor, 40ng/ μ L de produto de PCR (inserto E2), tampão de reação e enzima T4 DNA ligase, foram incubados à temperatura ambiente por 1h.

3.6.2. PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS COMPETENTES

A preparação das células bacterianas (cepa bacteriana *E. coli*, linhagem DH5 α) competentes para transformação foi realizada através do tratamento com cloreto de cálcio (CaCl₂) segundo o protocolo descrito por Sambrook et al, 1989.

A cepa mantida em estoque a -80°C foi semeada em meio de cultura LB líquido (1% tripton, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl) e incubada durante 24h a 37°C. Uma colônia foi inoculada em 5,0mL de meio LB (*USB*) líquido e incubada por 16hs à 37°C sob agitação a 200rpm. A seguir, 1mL desta suspensão bacteriana foi inoculada em 100mL de meio LB (*USB*) e mantida sob agitação a 37°C até que a absorbância a 600nm atingisse um valor entre 0,4 a 0,6. Neste ponto, as células foram isoladas por centrifugação a 2.700 *xg* (*Centrifuge 5810R – Eppendorf*) durante 10min a 4°C e o sobrenadante foi descartado por inversão do tubo. O precipitado foi ressuscitado, gentilmente, em 1/3 do volume original com CaCl₂ 0,1M e mantido

em gelo durante 30min. A suspensão foi novamente centrifugada a 2.700 *xg* durante 10min a 4°C, o sobrenadante foi descartado por inversão do tubo. As células foram gentilmente ressuspensas em 1/10 de volume com CaCl₂ 0,1M. Foram realizados 3 controles: 1) pré-inóculo plaqueado com ampicilina e kanamicina; 2) inóculo plaqueado com ampicilina e kanamicina; 3) bactéria competente plaqueada com ampicilina e kanamicina. A suspensão bacteriana competente foi estocada a -80°C com adição de 15% de glicerol.

3.6.3. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

Bactérias *E. coli* CaCl₂ competentes linhagem DH5α foram transformadas por choque térmico com o produto de ligação, segundo o protocolo descrito por Mendel e Higa (SAMBROOK et al.; 2001). As bactérias competentes, armazenadas a - 80°C e aliqüotadas em 200μL, foram descongeladas em banho de gelo e adicionadas a 5μL do produto de ligação, seguida por uma suave homogeneização e choque térmico: 90seg a 42°C e 1min a 0°C. Foram adicionados 800μL de meio de cultura líquido LB (LB: *Luria-Bertani broth*) (10g/L triptona; 5g/L extrato de levedura; 5g/L NaCl; 15g/L ágar) e incubou-se a 37°C por 60min à 300rpm em termo-bloco com agitação (*Thermo Stat Plus - Eppendorf*). Duzentos microlitros do produto de transformação foram plaqueados em placa de petri plástica estéril e descartável (*J. Prolab*) (90X15mm de diâmetro) contendo: 15mL de meio LB ágar (*USB*) (fundido), 15μL de ampicilina (100mg/mL) (*GIBCO*), 50μL de IPTG 200mM (*Invitrogen*) e 40μL de X-gal 20mg/mL (*USB*), e incubada em estufa (*Quimis*) a 37°C por 16hs.

3.6.4. SCREENING DAS COLÔNIAS TRANSFORMANTES

3.6.4.1. PCR PARA SCREENING DAS COLÔNIAS TRANSFORMANTES

Decorrida a etapa anterior, foi realizada uma PCR para confirmação das colônias transformantes. A reação foi realizada em tubos do tipo *Eppendorf* de 0,2mL *DNase e RNase free* onde em cada um foram adicionados: 2,5μL de tampão de PCR 10x (sem MgCl₂) (concentração final: 1x), 0,75μL de MgCl₂ 50mM (concentração final: 1,5mM), 4μL de dNTP mix 1,25mM (concentração final: 0,2mM), 1μL de *primer sense* M13F (*Fermentas*) (10pM/μL) (5' gta aaa cga cgg cca gt 3') (concentração final: 0,2pM/μL), 1μL de *primer anti-sense* M13R (*Fermentas*) (10pM/μL) (5' cag aag aca gct atg ac 3') (concentração final: 0,2pM/μL), 0,5μL de enzima Taq DNA polimerase (*Invitrogen*) (5U/μL) (concentração final: 0,1U/μL) e água *DNase e RNase free* q.s.p. 25μL, e em seguida parte de cada colônia branca escolhida da placa foi transferida para um tubo deste. Um tubo controle negativo foi adicionado ao ensaio contendo todo o mix de reação menos parte da colônia bacteriana. A reação foi realizada em gelo, brevemente centrifugada e imediatamente incubada no termociclador sob as seguintes condições previamente padronizadas: 95°C por 2min, 35 ciclos de: 94°C por 30seg, 55°C por 30seg e 72°C por 1min, seguidos de um acréscimo de 5min à 72°C para completar a extensão final. Ao final da reação as amostras foram mantidas no termociclador à 4°C.

O fragmento amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% como descrito no item 3.4. Aos orifícios do gel foram aplicados 5µL do produto amplificado adicionado de 2µL da solução corante, e em um dos orifícios foi aplicado um padrão de pares de bases de 1Kb (*Generuler 1Kb DNA Ladder - Fermentas*), para a posterior comparação do tamanho das bandas.

Ao final do processo, o gel foi levado a um fotodocumentador e os produtos de amplificação foram observados. Esperavam-se fragmentos únicos correspondentes ao tamanho da sequência amplificada, considerando clones transformantes de interesse, as amostras que apresentassem produtos de amplificação com aproximadamente 1000pb (852pb inserto + 154pb parte do vetor pTZ57R/T = 1006pb).

3.6.5. EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL DA BACTÉRIA (MINI-PREP)

Com uma colônia positiva para o vetor pTZ57R/T recombinante foi preparado um pré-inóculo: 5mL de meio LB (*USB*), 5µL de ampicilina (100mg/mL) (*GIBCO*) e parte da colônia escolhida. O tubo foi incubado à 37°C, sob agitação de 250rpm por 16hs.

A técnica de mini-prep foi realizada utilizando o kit *QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)*, segundo o protocolo para microcentrifuga sugerido pelo fabricante. Este protocolo é destinado à purificação de mais de 20µg de DNA plasmidial em 1-5mL de cultura de *E. coli* em meio LB por 16hs.

Para a análise da qualidade do produto da mini-prep, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose 1% como descrito no item 3.4, utilizando-se 1µL do produto da mini-prep adicionado a 1µL da solução corante e um padrão de pares de bases de 1Kb (*Generuler 1Kb DNA Ladder - Fermentas*). A corrida ocorreu durante cerca de 15min a uma tensão de 100V.

Ao final do processo, o gel foi levado a um fotodocumentador e os fragmentos observados sob luz UV. O produto resultante da mini-prep foi quantificado pelo espectrofotômetro ND-1000 (*NanoDrop*), através da adição de 1µL da amostra ao seu sistema.

3.6.6. CLIVAGEM ENZIMÁTICA E PURIFICAÇÃO DO VETOR pTZ57R/T

O produto da mini-prep, ou seja, o vetor pTZ57R/T contendo o inserto da proteína E2 com os sítios de restrição, foi clivado com as enzimas *NcoI* e *XhoI*, através do protocolo estabelecido pelo fabricante. Utilizando-se para isto 4µg de vetor recombinante e 10U/µL de cada enzima de restrição.

Para confirmar a digestão, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% como descrito no item 3.4, a um orifício do gel foi aplicado 60µL da amostra digerida adicionada de 10µL de solução corante de amostra e em outro orifício 4µL do padrão de pares de bases de 1Kb (*Generuler 1Kb DNA Ladder - Fermentas*). A corrida foi realizada por cerca de 60min a uma tensão de 100V.

Ao final do processo, o gel foi levado a um fotodocumentador e o produto de clivagem enzimática foi observado. A banda correspondente ao inserto E2 já digerido com as enzimas de

restrição foi rapidamente recordada do gel e purificada utilizando-se o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison, WI, USA), conforme as especificações do fabricante. Foi realizada a análise e a quantificação do produto purificado, como descrito no item 3.5.

3.6.7. CLONAGEM NO VETOR DE EXPRESSÃO

3.6.7.1. TRANSFORMAÇÃO DAS BACTÉRIAS COMPETENTES COM O VETOR pET-42a E MINI-PREP

As bactérias *E. coli* CaCl₂ competentes linhagem DH5 α , mantidas em estoque a -80°C (preparadas como descrito no item 3.6.2) foram transformadas com o vetor pET-42a (anexo 2), segundo o protocolo descrito por Sambrook et al., 1989. Desta forma, a um tubo de microcentrífuga do tipo *Eppendorf* de 1,5mL estéril foram adicionados: 200 μ L de suspensão de células bacterianas competentes e 200ng de pET-42a, o tubo foi homogeneizado suavemente, e as bactérias foram submetidas ao choque térmico como descrito no item 3.6.3. Em seguida foram incubadas à 37°C por 60min à 300rpm. Então, 200 μ L das bactérias transformadas foram plaqueadas em 15ml de meio LB ágar (USB) contendo 15 μ L de kanamicina (25mg/mL) (USB) e incubada em estufa (*Quimis*) a 37°C por 16hs. No dia seguinte, uma colônia foi escolhida da placa e esta foi usada para o preparo de um inóculo contendo: 5mL de meio LB (USB) e 5 μ L de kanamicina (25mg/mL) (USB) que foi incubado à 37°C, sob agitação de 250rpm por 16hs. Decorrido este período, o inóculo foi centrifugado a 2.880 xg por 10min e o sobrenadante foi totalmente descartado. Então, procedeu-se o protocolo de extração do DNA plasmidial bacteriano através da técnica de mini-prep utilizando o kit *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN), segundo o protocolo para microcentrífuga fornecido pelo fabricante.

Ao final do processo foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1%, para analisar a qualidade do produto da mini-prep, ou seja, do vetor pET-42a, durante cerca de 15min a uma tensão de 100V. O gel foi levado a um fotodocumentador e os produtos da reação de mini-prep foram observados, sendo o tamanho estimado pelo padrão de pares de base. Foram consideradas as amostras que apresentaram produtos de amplificação com 5930pb. A quantificação da concentração de vetor pET-42a foi realizada no espectrofotômetro ND-1000 (*NanoDrop*).

3.6.7.2. CLIVAGEM ENZIMÁTICA DO VETOR pET-42a

O produto da mini-prep, ou seja, o pET-42a foi clivado com as enzimas de restrição *NcoI* e *XhoI*, através do protocolo estabelecido pelo fabricante, onde foram utilizados 2000ng de vetor pET-42a, 10U/ μ L da enzima *NcoI* (*Fermentas*) e 10U/ μ L *XhoI* (*Fermentas*), além do tampão de reação e de água Milli-Q estéril, totalizando um volume final de 100 μ L. A reação foi homogeneizada e incubada em banho de água à 37°C por 3h. Foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% utilizando orifícios de aproximadamente 2cm para a aplicação de todo o produto digerido adicionado do corante de amostra (10 μ L). A amostra foi submetida a uma tensão

de 100V por aproximadamente 30min.

Ao final do processo, o gel foi levado a um fotodocumentador e o produto de clivagem enzimática foi observado, sendo o tamanho do produto estimado pelo padrão de 1Kb adicionado em um dos orifícios do gel. A banda correspondente ao pET-42a foi rapidamente recordada do gel e purificada utilizando-se o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA)*, conforme as especificações do fabricante. Foi realizada a análise e a quantificação do produto purificado, de acordo como já descrito no item 3.5.

3.6.7.3. LIGAÇÃO DO INSERTO AO VETOR pET-42a

Seguindo o protocolo descrito por Sambrook et al., 1989, os produtos amplificados para a proteína E2 (852pb) e já clivados foram ligados ao vetor de expressão pET-42a (5930pb). A concentração de inserto utilizada na reação de ligação foi calculada seguindo-se a proporção:

$$\frac{\text{ng vetor} \times \text{kb de inserto}}{\text{kb do vetor}} \times \frac{\text{relação molar do inserto (2)}}{\text{relação molar do vetor (1)}} = \text{ng de inserto}$$

Em um tubo de microcentrífuga do tipo *Eppendorf* de 1,5mL estéril foram adicionados: 80ng de inserto E2 digerido e purificado, 160ng de vetor pET-42a digerido e purificado, 1,5μL de tampão da enzima 10x, 1,2μL de T4 DNA ligase (*New England Biolabs*) e 3,1μL de água Milli-Q autoclavada, completando assim um volume final de 15μL. A reação foi homogeneizada e incubada à 16°C por 16hs.

3.6.8. TRANSFORMAÇÃO DO VETOR pET-42a RECOMBINANTE EM BACTÉRIAS DE PROPAGAÇÃO - LINHAGEM DH5α

Células bacterianas *E. coli* linhagem DH5α CaCl₂ competentes foram transformadas com 5μL do produto de ligação (pET-42a + inserto E2) de acordo com o protocolo de transformação descrito no item 3.6.3. As bactérias transformadas (200μL) foram plaqueadas em 15ml de meio LB ágar (*USB*) (fundido) com 15μL de kanamicina (25mg/mL) (*USB*) e incubadas em estufa (*Quimis*) a 37°C por 16hs. Da placa foram escolhidas algumas colônias para a preparação de um inóculo de cada uma delas (5mL de meio LB (*USB*) + 5μL de kanamicina (25mg/mL) (*USB*) + parte da colônia) que foi incubado à 37°C, sob agitação de 300rpm por 16hs.

3.6.9. SELEÇÃO DOS CLONES TRANSFORMANTES E OBTENÇÃO DO VETOR RECOMBINANTE

Seguindo a metodologia descrita por Sambrook et al, 2001, foi realizada uma PCR de colônias para seleção das transformantes. Cada reação foi realizada em um tubo do tipo *Eppendorf* de 0,2mL *DNase e RNase free* onde foram adicionados: 1μL de suspensão celular, 5μL de tampão de PCR 10x (sem MgCl₂) (concentração final: 1x), 1,5μL de MgCl₂ 50mM (concentração final: 1,5mM), 1μL de dNTP mix 10mM (concentração final: 0,2mM), 1μL de *primer sense* E2.S (*Invitrogen*) (10pM/μL) (concentração final: 0,2pM/μL), 1μL de *primer anti-sense*

E2.AS (*Invitrogen*) (10pM/ μ L) (concentração final: 0,2pM/ μ L), 0,5 μ L de enzima Taq DNA polimerase (*Invitrogen*) (5U/ μ L) (concentração final: 0,05U/ μ L) e 39 μ L de água *DNase* e *RNase free*, constituindo assim um volume final de 50 μ L. Um tubo controle negativo também foi inserido na reação contendo todo o mix de reagentes mas sem a suspensão celular (seu volume foi substituído por água *DNase* e *RNase free*).

A reação foi realizada em gelo, brevemente centrifugada (*spin*) e imediatamente incubada no termociclador sob as seguintes condições previamente padronizadas: 94°C por 4min, 35 ciclos de: 94°C por 1min, 55°C por 1min e 72°C por 1min e 15seg, seguidos de um acréscimo de 10min à 72°C para completar a extensão final. Ao final da reação as amostras foram mantidas no termociclador à 4°C e posteriormente armazenadas à -20°C até o momento do uso. Para a análise do fragmento amplificado, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose 1% como descrito anteriormente. Aos orifícios do gel foram aplicados 5 μ L do produto amplificado adicionado de 2 μ L de uma solução corante. Em outro orifício foi aplicado um padrão de pares de bases de 1Kb (*Generuler 1Kb DNA Ladder - Fermentas*) para a posterior comparação do tamanho das bandas. A corrida eletroforética foi acompanhada pela migração do azul de bromofenol contido na solução corante da amostra, durante cerca de 40min a uma tensão de 100V. Ao final do processo, o gel foi levado a um fotodocumentador e os produtos de amplificação foram observados.

Uma colônia positiva para o inserto E2 na PCR foi escolhida para a realização da extração do vetor recombinante através de mini-prep, seguindo o protocolo descrito pelo fabricante do kit (*QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)*). Ao final do processo foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1%, para analisar a qualidade do produto da mini-prep, aplicando-se ao gel uma mistura formada por 1 μ L de amostra e 1 μ L de azul de corante de amostra, e também em outro orifício foram aplicados 4 μ L de um padrão de pares de bases de 1kb (*Generuler 1Kb DNA Ladder - Fermentas*). A corrida eletroforética foi acompanhada pela migração do azul de bromofenol contido na solução corante da amostra, durante cerca de 15min a uma tensão de 100V.

O gel foi levado a um fotodocumentador e os produtos da reação de mini-prep foram observados, sendo o tamanho estimado pelo padrão de pares de bases. Foram consideradas as amostras que apresentaram produtos de amplificação com aproximadamente 6695pb. A quantificação da concentração de pET-42a + inserto foi realizada no espectrofotômetro ND-1000 (*NanoDrop*).

3.6.10. SEQUENCIAMENTO DO VETOR pET-42a RECOMBINANTE

O vetor pET-42a foi sequenciado para confirmação da sequência e orientação correta dos fragmentos inseridos, através do método de terminação de cadeia (SANGER et al., 1977). Para isto foi utilizado o kit “*DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (MegaBACE™)*” (*GE Healthcare*) conforme orientações do fabricante. Foi utilizado como amostra o produto da mini-prep e os seguintes *primers*: *S-tag* (5' cga acg cca gca cat gga ca 3') e *T7 terminator* (5' ccg ctg agc aat aac tag ca 3'). As condições de amplificação foram: 1 ciclo inicial de 96°C durante 2min

seguidos por 30 ciclos de 95°C durante 20seg, 50°C durante 15seg e 60°C durante 1min e 15seg. A reação foi precipitada em etanol e acetato de amônio 7,5M segundo instruções do fabricante, para remover os dideoxinucleotídeos marcados não incorporados. O produto gerado em cada reação foi submetido à separação e detecção usando o seqüenciador automático “MegaBACE™ 1000 Flex” (GE Healthcare). A análise das seqüências foi realizada pelo software “Sequence Analyser-Base Caller Cimarron 3.12” (GE Healthcare) e alinhados no sistema BLAST.

3.6.11. TRANSFORMAÇÃO DO VETOR pET-42a RECOMBINANTE EM BACTÉRIAS DE EXPRESSÃO – LINHAGEM ROSETTA

As células bacterianas *E. coli* linhagem Rosetta, CaCl₂ competentes, foram preparadas segundo o protocolo descrito por Sambrook et al, 1989, como apresentado no item 3.6.2, sendo o antibiótico cloranfenicol (USB) a 25µg/mL acrescentado ao meio nas etapas de crescimento. A suspensão bacteriana competente estocada a -80°C foi descongelada e transformada com o vetor pET-42a recombinante, de acordo com a metodologia descrita no item 3.6.3, adicionando-se aos 200µL de suspensão de células bacterianas, 1µL do produto da mini-prep do vetor pET-42a recombinante (50µg/µL), o tubo foi homogeneizado suavemente e as bactérias foram submetidas ao choque térmico, como descrito anteriormente no item 3.6.3. Após a incubação no termo-bloco, 200µL de bactérias transformadas foram plaqueadas em 15ml de meio LB ágar (USB) contendo: 15µL de kanamicina (25mg/mL) (USB) e 15µL de cloranfenicol (25mg/mL) (USB). A placa foi incubada em estufa (*Quimis*) a 37°C por 16hs.

3.6.12. PREPARAÇÃO DO INÓCULO PARA INDUÇÃO

De acordo com a metodologia descrita por Sambrook et al., 2001, em um tubo de Falcon estéril foi preparado um pré-inóculo de indução, onde foram adicionados: 5mL de meio LB (USB), 5µL de kanamicina (25mg/mL) (USB) e 5µL de cloranfenicol (25mg/mL) (USB). Na placa descrita na etapa anterior, havia o crescimento das colônias, assim uma delas foi escolhida e transferida para o tubo de Falcon. O tubo foi incubado à 37°C, sob agitação de 250rpm por 16hs.

3.6.13. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA E2 RECOMBINANTE DO HCV EM BACTÉRIA (E2B)

3.6.13.1. INDUÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

Segundo metodologia descrita por Sambrook et al., 2001 e algumas alterações, a indução da expressão da proteína E2 recombinante foi padronizada. Foi realizada uma diluição em frasco erlemmeyer de 1L estéril, na proporção de 1:50, do inóculo (preparado como descrito no item 3.6.12) (4mL) em meio LB estéril (200mL) contendo 200µL de kanamicina (25mg/mL) e 200µL de cloranfenicol (25mg/mL).

O frasco foi incubado no *shaker* à 300rpm e à 37°C, até atingir a densidade óptica (D.O.) de 0,600 a 600nm. Assim, aproximadamente após 1h e 30min do início, 2mL do conteúdo do frasco foi retirado e lido no espectrofotômetro (*Spectronic® Genesys™ 2*) a 600nm, sendo este considerado o tempo zero da indução. Nesta D.O. foi coletado 1mL da cultura não induzida e

armazenado em um tubo de microcentrífuga do tipo *Eppendorf* de 1,5mL estéril.

A alíquota foi centrifugada por 1min à 15.700 xg e o sobrenadante foi descartado por inversão. Foram adicionados ao tubo 20 μ L de água Milli-Q autoclavada e este levado ao vórtex rapidamente, adicionou-se então 10 μ L de tampão de amostra 3x (625mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 2%, glicerol 87%, azul de bromofenol 0,5% e β -mercaptoetanol 5%) e a alíquota foi imediatamente guardada em freezer a -20°C. À cultura foi adicionado IPTG (*Invitrogen*) para uma concentração final de 0,4mM, iniciando-se assim a indução. Esta foi induzida durante 4h a 37°C e a 250rpm, coletando-se uma alíquota de 1mL da cultura em intervalos de 1, 2, 3 e 4h, que foram processadas como descrito acima para a alíquota do tempo zero. A cultura induzida foi centrifugada a 3.797 xg (SLA 1500) por 10min à 4°C (centrífuga: *Sorvall High Speed Centrifuge – RC 5C PLUS*). Em seguida, o sobrenadante foi totalmente descartado, o sedimento celular (*pellet*) foi ressuscitado em 10mL de tampão de lise (100mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 50mM NaH₂PO₄, pH8,0) e o frasco foi agitado manualmente em gelo até a total dissolução do *pellet*. A amostra foi então levada ao ultra-som (*Sonic Dismembrator*) em banho de gelo e sonicada por 4min com intervalos de 30seg e pulsos de 59,9, em seguida foi centrifugada à 20.200 xg (SL-34) por 10min à 4°C. O sobrenadante foi filtrado, em filtro MILLEX® HV Durapore® PVDF Membrane 0,45 μ m, e armazenado em gelo. O *pellet* foi ressuscitado em 10mL de tampão de lise e agitado no vórtex para dissolução. Uma alíquota de 60 μ L, tanto do sobrenadante como do *pellet*, foi retirada e adicionada de 20 μ L de tampão de amostra 3x e guardada em freezer a -20°C, para posterior avaliação da solubilidade da proteína E2 em SDS-PAGE 12%.

3.6.14. ANÁLISE DAS PROTEÍNAS E2B POR SDS-PAGE

As alíquotas dos diferentes tempos de indução, *pellet* e sobrenadante resultantes do processo de lise celular adicionados de tampão de amostra, foram aquecidos à 100°C por 10min.

Para a análise da expressão protéica, do melhor tempo de indução e da solubilidade da proteína, foi confeccionado um gel de poliacrilamida 12% (pH 8,8) contendo gel de resolução com 0,1% de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) e gel de empilhamento a 5% pH 6,8, segundo o método descrito por Laemmli, 1970. Os tempos de indução, o *pellet* e o sobrenadante, além de um marcador de massa de proteínas (*Bench Mark Protein Ladder*) foram aplicados nos orifícios do gel. A eletroforese foi realizada à temperatura ambiente em cuba de eletroforese Mini-Protean® Tetra Cell (*BioRad*) em placas de mini-gel (10x8cm) aplicando-se uma tensão de 120V durante aproximadamente 2h. O tampão dos eletrodos foi constituído por Tris 0,125M, glicina 0,96M, SDS 0,1% pH 8,3. Após a corrida eletroforética, o gel foi imerso em solução de *Coomassie Blue*, por 30min para coloração das proteínas, e descorado em solução descorante de ácido acético 7% para a revelação das bandas.

3.6.15. PURIFICAÇÃO PROTÉICA POR AFINIDADE COM RESINA DE GLUTATIONA

Para a purificação do sobrenadante filtrado que continha a proteína E2 recombinante, através da proteína de fusão GST, foi utilizada a resina *Glutathione Sepharose 4 Fast Flow* (*GE*

Healthcare), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante (técnica *Batch Purification*). Ao final deste processo, alíquotas do eluato, lavagens 1, 2 e 3 e proteínas eluídas 1, 2 e 3 foram adicionadas de tampão de amostra 3x e aquecidas à 100°C por 15min. As amostras foram analisadas em SDS-PAGE 12%, como descrito no item 3.6.14., para verificação da fração na qual estava presente a proteína de interesse (peso molecular (PM) = 63,5kDa).

3.6.16. WESTERN BLOT

Para o teste de detecção da proteína E2 através da sua cauda de histidina, foi realizado um ensaio de *Western Blot*, segundo metodologia descrita por Sambrook et al., 2001, dos precipitados bacterianos provenientes do tempo inicial (antes da indução) e de 1, 2, 3 e 4hs após o início da indução com IPTG (tempo final), do sobrenadante, do *pellet* e também das alíquotas provenientes de cada etapa da purificação por resina de glutationa. Foram utilizados anticorpos primários anti-his tag produzidos em camundongos (*anti-his antibody - GE*) e anticorpos secundários anti-IgG de camundongo marcado com fosfatase alcalina (*anti-mouse IgG – whole molecule – alkaline phosphatase conjugate antibody developed in goat – SIGMA*).

As amostras foram aquecidas à 100°C por 15min e em seguida aplicadas no gel SDS-PAGE 12%. Prosseguiu-se a eletroforese com voltagem inicial de 100V durante 20min e seguida por uma voltagem de 120V por aproximadamente 1h e 20min. O gel obtido foi mergulhado por 5min em tampão de transferência (Tris 200mM, glicina 50mM, metanol 15%), juntamente com as esponjas e papéis filtro do sistema de transferência de proteínas e a membrana de PVDF (*PVDF Transfer Membrane 0,45µM – Thermo Scientific*) (que havia ficado por 10min em metanol). Em seguida, o sistema de “sanduíche” foi montado, sendo o gel colocado no pólo negativo e a membrana no positivo. O sistema foi acoplado na cuba de eletroforese Mini V8 Blot Module (*BRL – Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA*) com tampão de transferência e submetido à 150mA por 2h, para a transferência das proteínas contidas no gel para a membrana.

Após este período, a membrana foi corada por 5min com solução de Ponceau (Ponceau 0,5%, ácido acético 0,1%), para a visualização das bandas transferidas. As bandas de interesse foram perfuradas nas suas extremidades com uma agulha, para marcação da sua posição na membrana.

A membrana foi então descorada com água Milli-Q e em seguida bloqueada com solução de bloqueio contendo tampão TBS (Tris 0,05M, NaCl 0,15M, pH 8,0) e 0,05% leite desnatado por 12-18h, em geladeira à 4°C. Após esse período, a membrana foi lavada com tampão TBS por 3 vezes de 5min cada, sob agitação suave em plataforma. A membrana foi então incubada, durante 1h sob leve agitação, com 2µL de anticorpo primário (anti-his tag) diluído em 10mL de tampão TBS.

Decorrido este tempo a membrana foi lavada novamente como descrito acima e, então, incubada durante 1h com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo, marcado com fosfatase alcalina, sob agitação branda em plataforma. A membrana foi novamente lavada como já descrito e então revelada com 2mL de solução reveladora (*1-StepTM NBT/BCIP – Pierce*)

coberta com papel alumínio e agitada em plataforma até o aparecimento das bandas desejadas (5 à 15min). A membrana foi lavada com água destilada para interromper a reação, seca entre folhas de papel filtro e fotografada no fotodocumentador.

3.6.17. QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS E2B

As proteínas eluídas, pelo procedimento de purificação por afinidade com resina de glutatona, foram dialisadas em PBS pH8,0 (3 trocas de tampão em 24hs) e quantificadas usando o kit *Pierce® BCA Protein Assay Kit* conforme instruções do fabricante. As amostras foram lidas em espectrofotômetro à 562nm e o resultado foi comparado com a curva de calibração do kit.

3.7. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA E2 RECOMBINANTE DO HCV EM LEVEDURA (*Pichia pastoris*)

3.7.1. ESCOLHA DO SISTEMA DE EXPRESSÃO E DOS VETORES

Como sistema de expressão da proteína E2 recombinante, foi escolhida a levedura *Pichia pastoris* linhagem KM71H^(Mut^S) (Invitrogen, USA), por apresentar muitas vantagens no processamento de proteínas como modificações pós-traducionais, além de ser este o sistema de escolha do Laboratório de Biologia Molecular na UFSCar, onde foi desenvolvida esta parte da pesquisa. Foram testados dois tipos de vetores para a expressão da proteína E2 recombinante do HCV, o pGAPZ α A (anexo 3) para uma expressão constitutiva, e o pPICZ α A (anexo 4) para uma expressão induzível. Todos os procedimentos aqui relatados para manipulação da levedura, vetores e expressão das proteínas neste sistema foram seguidos conforme protocolos contidos no Manual EasySelect[™] *Pichia* Expression Kit – Invitrogen.

3.7.2. PREPARAÇÃO DOS VETORES

Inóculos de 10mL de meio LB Low Salt contendo 2,5 μ L do antibiótico Zeocina[™] (concentração final = 25 μ g/mL) de bactérias (*E. coli* linhagem DH5 α CaCl₂ competentes) que continham o vetor pGAPZ α A ou o vetor pPICZ α A foram incubados à 37°C e à 250rpm por 16hs, e então submetidos à técnica de miniprep utilizando o kit *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN), segundo o protocolo para microcentrifuga sugerido pelo fabricante. O produto foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 1% e quantificado no espectrofotômetro ND-1000 (*NanoDrop*).

3.7.3. CLIVAGEM ENZIMÁTICA DOS VETORES E DO PRODUTO DE PCR PURIFICADO

Os vetores pGAPZ α A e pPICZ α A e o produto de PCR do inserto E2 purificado foram clivados com as enzimas de restrição *EcoR I* (*Fermentas*) e *Xba I* (*Fermentas*), através do protocolo estabelecido pelo fabricante. As reações foram incubadas em banho de água à 37°C por 3hs e em seguida as enzimas foram desnaturadas à 80°C por 20min em bloco térmico (*Thermo*

3.7.4. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS CLIVADOS E QUANTIFICAÇÃO

O volume total dos produtos de clivagem foram submetidos a uma nova eletroforese durante cerca de 60min a uma tensão de 110V e então recortados do gel e purificados com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) segundo as especificações do fabricante. O material foi então quantificado no espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop).

3.7.5. CLONAGEM DO INSERTO E2 NOS VETORES pGAPZ α A e pPICZ α A

3.7.5.1. LIGAÇÃO, TRANSFORMAÇÃO E PLAQUEAMENTO

A ligação do inserto E2 aos vetores obedeceu a proporção de 1 vetor para 5 insertos e foi realizado segundo o protocolo do fabricante da enzima T4 DNA ligase (Fermentas). As reações foram incubadas à 24°C por 2h. Bactérias *E. coli* CaCl₂ competentes linhagem DH5 α foram transformadas por choque térmico com o produto de ligação (pGAPZ α A + inserto E2 ou pPICZ α A + inserto E2), conforme protocolo descrito no item 3.6.3. Em seguida foram plaqueadas em meio LB low salt ágar contendo Zeocina™ [25 μ g/ μ L] e incubadas à temperatura de 37°C em estufa (Quimis) por 16hs.

3.7.6. SELEÇÃO DE COLÔNIAS TRANSFORMADAS

Uma PCR para confirmação das colônias transformantes foi realizada como descrito no item 3.6.4.1, utilizando: amostras diretas de cada colônia escolhida, enzima Taq DNA polimerase 10x (Invitrogen) e os primers sense E2.PP.S (Invitrogen) (10pM/ μ L) (concentração final: 10pM/ μ L) e anti-sense Aox3' (Invitrogen) (10pM/ μ L) (5' aat ggc att ctg açã tcc 3') (concentração final: 10pM/ μ L). A reação foi incubada no termociclador sob as seguintes condições: 95°C por 3min, 35 ciclos de: 95°C por 1min, 60°C por 1min e 72°C por 2min, seguidos de um acréscimo de 7min à 72°C para completar a extensão final. O produto amplificado foi submetido à uma eletroforese em gel de agarose 1%, à 110V, por aproximadamente 40min, em tampão TAE, e ao final o gel foi fotografado no fotodocumentador.

Foi selecionada uma colônia positiva de cada vetor recombinante para a preparação de um inóculo (10mL de meio LB low salt + 2,5 μ L de Zeocina™) que cresceu em shaker a uma temperatura de 37°C, sob agitação de 250rpm, por 16hs. O protocolo de miniprep foi realizado utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) segundo orientações do fabricante, para extração dos vetores recombinantes. Os produtos da miniprep foram quantificados no espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop). Para confirmação da presença do inserto nos vetores, estes foram digeridos com as enzimas EcoR I e Xba I (Fermentas) (conforme protocolo fornecido pelo fabricante), e analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%. Os vetores também foram seqüenciados assim como descrito no item 3.6.10 e utilizando os primers E2.PPS e E2.PP.AS.

3.7.7. LINEARIZAÇÃO DOS VETORES RECOMBINANTES

O vetor recombinante pGAPZ α A (com inserto E2) foi linearizado com o a enzima *BspHI* (*Pag I*) (*Fermentas*) e o vetor recombinante pPICZ α A com a enzima *Pme I* (*Biolabs*) ambos conforme instruções do fabricante e utilizando-se 10ng/ μ L de cada vetor recombinante.

As duas reações foram incubadas em banho de água à 37°C, por 16hs, e em seguida as amostras foram desnaturadas à 80°C por 20min em bloco térmico (*Thermo Stat Plus - Eppendorf*). Para se verificar a linearização dos vetores recombinantes, foi realizada uma corrida eletroforética em gel de agarose 1%, tampão TAE pH 8,0, à 110V, por aproximadamente 30min. O gel foi observado sob luz UV.

3.7.8. PRECIPITAÇÃO DO DNA

Foram adicionados ao material linearizado 1/10 de volume de acetato de sódio 3M, homogeneizou-se por inversão e adicionou-se 2,5 vezes o volume de etanol 100% e novamente homogeneizou-se. O material foi levado à temperatura de -80°C por 30min e em seguida centrifugado à 16.000 xg , por 10min, à 4°C. O sobrenadante foi descartado por inversão. O *pellet* foi lavado com 1mL de etanol 70% gelado e então centrifugado novamente à 16.000 xg , por 10min, à 4°C. O tubo foi seco por 10min em estufa à 65°C e então o material foi ressuspensionado em 10 μ L de água Milli-Q estéril.

3.7.9. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA E2 DO HCV EM LEVEDURA (E2L)

3.7.9.1. PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS COMPETENTES DE *P. pastoris*

Um pré-inóculo de *P. pastoris* foi preparado adicionando-se à um tubo do tipo Falcon 5mL de meio líquido YEPD - *Yeast Extract-Peptone-Dextrose* (1% de extrato de levedura; 2% de peptona e 2% de dextrose) e para este foi transferido parte de uma colônia de *P. pastoris* mantida em estoque à 4°C, que em seguida foi incubado por 8hs à 30°C e 250rpm. Decorrido este tempo preparou-se o inóculo, onde 50 μ L de pré-inóculo foram adicionados à 50mL de meio líquido YEPD e incubado por 16hs à 30°C e 250rpm. Quando a D.O. medida à 600nm atingiu a absorbância de 1.3, 25mL do inóculo foram centrifugados à 1500 xg , por 5min à 4°C. O sobrenadante foi descartado por inversão e o *pellet* foi mantido em gelo durante todo o experimento.

O *pellet* foi ressuspensionado em 5mL de meio líquido YEPD adicionado de 1mL de HEPES 1M pH7,0 e 125 μ L de DTT 1M, o tubo foi homogeneizado e incubado à 30°C por 15min. Então, o volume foi completado para 25mL com água milli-Q estéril gelada, e o tubo foi centrifugado à 1500 xg por 5min, à 4°C, ao final o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 12,5mL de água Milli-Q estéril gelada. O tubo foi novamente centrifugado à 1500 xg por 5min, à 4°C, e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuspensionado em 1mL de sorbitol 1M gelado e então centrifugado à 1500 xg por 5min, à 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 50mL de sorbitol 1M gelado. O material foi aliquoteado (40 μ L) em tubos do tipo *Eppendorf*.

3.7.9.2. TRANSFORMAÇÃO DE *P. pastoris*

Células competentes de *P. pastoris* foram transformadas tanto com o pGAPZ α A+E2 quanto com o pPICZ α A+E2 utilizando o mesmo procedimento. Desta forma, foram adicionados à 40 μ L de células competentes de *P. pastoris* 1 μ g de DNA (pGAPZ α A+E2 ou pPICZ α A+E2) linearizado e precipitado, o tubo foi homogeneizado cuidadosamente e incubado em gelo por 5min. O material foi transferido para uma cubeta de 0,2cm para eletroporação (*Gene Pulser® Cuvette BIO-RAD*), sob as seguintes condições: 1,5ku, 25 μ F e 200 Ω , utilizando para isso o *Eletroporador BIO-RAD – Capacitance Extender Plus – PULSE Controller Plus – Gene Pulser® II*. Ao final, foram adicionados 1mL de sorbitol 1M e o conteúdo da cubeta transferido para um tubo de Falcon de 50mL, que foi incubado à 30°C por 2h, sem agitação.

As leveduras transformadas com os vetores (pGAPZ α A+E2 ou pPICZ α A+E2) foram plaqueadas em placas de Petri plásticas estéreis e descartáveis (*J. Prolab*) (90X15mm de diâmetro), contendo meio YEPDS (1% de extrato de levedura; 2% de peptona; 2% de dextrose; 1M de sorbitol e 2% de ágar) e ZeocinaTM (*Invitrogen*). Foram plaqueadas 2 placas (para cada vetor) com 100 μ g/mL de ZeocinaTM, uma com 50 μ L e outra com 100 μ L de leveduras transformadas e 1 placa (de cada vetor) com 500 μ g/mL de ZeocinaTM com 200 μ L de leveduras transformadas. As placas foram incubadas à 30°C por 4 à 5 dias.

Ao final deste período, as colônias que cresceram nas placas foram numeradas. Foram escolhidas 22 colônias para cada vetor recombinante, que foram repicadas em placas contendo meio YEPDS com 100 μ g/mL de ZeocinaTM e controles positivo e negativo. As placas foram incubadas à 30°C por 24hs.

3.7.9.3. SCREENING DE CLONES RECOMBINANTES DE *P. pastoris*

Foi realizado um *screening* para verificar quais colônias, portadoras de pGAPZ α A ou pPICZ α A recombinantes, eram produtoras da proteína recombinante de interesse.

Para o *screening* foram utilizadas placas de cultura líquida de 24 orifícios estéreis, onde em cada orifício de uma placa foram adicionados 2mL de meio YEPD - *Yeast Extract-Peptide-Dextrose* com 100 μ g/mL de ZeocinaTM para o *screening* das colônias portadoras de pGAPZ α A recombinante, e na outra placa adicionou-se aos orifícios 3mL de meio BMGY - *Buffered Complex Methanol Medium* pH4,0 (1% de extrato de levedura; 2% peptona; tampão citrato fosfato 1M pH 4,0; 1,34% de YNB; 4x10⁻⁵% de biotina e 1% de glicerol) para o *screening* das colônias portadoras de pPICZ α A recombinante. Em seguida, uma parte de cada colônia crescida na placa de repique foi transferida para seu respectivo orifício da placa de cultura líquida. Ao final da transferência de todas as colônias, as placas foram incubadas à 30°C, 250rpm, por 24hs. Decorrido o tempo, ambas as placas foram centrifugadas à 1500 xg por 7min.

Da placa do pGAPZ α A, foi retirado 100 μ L de sobrenadante de cada orifício e armazenados em tubos do tipo *Eppendorf* à -20°C. A placa voltou para incubação e o mesmo procedimento foi repetido após 48 e 96hs. A cada alíquota foram adicionados 50 μ L de tampão de

amostra 3x, para posterior análise.

O sobrenadante da placa do pPICZ α A foi descartado por inversão, e então foram adicionados 2mL de meio BMMY pH4,0 (1% de extrato de levedura; 2% peptona; tampão citrato fosfato 1M pH 4,0; 1,34% de YNB; 4×10^{-5} % de biotina e 0,5% de metanol) em cada orifício da placa (início da indução), e esta foi incubada à 30°C e 250rpm. Após 24, 48, 72 e 96hs de indução, a placa foi centrifugada à 1700 xg por 5min e uma alíquota de 100 μ L de cada orifício, em cada tempo, foi retirada e armazenada em tubos do tipo *Eppendorf* à -20°C. Também nestes mesmos tempos foi adicionado em cada orifício metanol absoluto para uma concentração final de 0,75%. Em seguida a placa voltava para a incubação à 30°C e 250rpm.

Com 96hs de indução para pGAPZ α A e 120hs para pPICZ α A (final), as placas foram centrifugadas à 1700 xg por 5min e todo o sobrenadante foi retirado de cada orifício e armazenado à -20°C em tubos do tipo *Eppendorf*. Foram adicionados à todas as alíquotas tampão de amostra 3x.

As amostras foram aquecidas à 100°C por 15min e em seguida aplicadas (20 μ L) em gel SDS-PAGE 12%. A eletroforese ocorreu utilizando o tampão de corrida constituído por: Tris 0,125M, glicina 0,96M, SDS 0,1% pH 8,3, à temperatura ambiente em cuba de eletroforese Mini-Protean[®] Tetra Cell (BioRad) em placas de mini-gel (10x8cm) aplicando-se uma tensão de 100V durante aproximadamente 20min seguidos por 120V durante 1h e 20min. Ao final, os géis foram corados com *Coomassie Blue* por 30min e descorados em solução descorante para a revelação das bandas correspondentes à proteína E2.

Das amostras positivas para a presença da banda correspondente à proteína E2 do HCV, foi realizado um ensaio de *Western Blot* como descrito no item 3.6.16, pipetando-se 20 μ L de amostra em cada orifício e 10 μ L de marcador de massa de proteínas *BenchMarkTM Protein Ladder* (10 - 220 kDa).

3.7.9.4. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA E2 RECOMBINANTE (E2L) EM LARGA ESCALA

Uma colônia de *P. pastoris* positiva para a expressão da proteína de interesse no ensaio de *screening* e no *Western Blot* e portadora do vetor pPICZ α A recombinante, foi submetida ao seqüenciamento para confirmação da sequência da proteína E2 a ser expressa. Após esta certificação, para a expressão protéica em larga escala, foi preparado um pré-inóculo contendo 10mL de meio BMGY pH4,0 (1% de extrato de levedura; 2% peptona; tampão citrato fosfato 1M pH 4,0; 1,34% de YNB; 4×10^{-5} % de biotina e 1% de glicerol) e uma colônia de *P. pastoris* portadora do vetor pPICZ α A recombinante e produtora da proteína de interesse. O pré-inóculo foi incubado à 30°C e 250rpm por 24h e então transferido para 500mL de meio BMGY pH4,0, que foi incubado nas mesmas condições do pré-inóculo. Quando a D.O. à 600nm foi medida e esta apresentou-se maior do que 4, iniciou-se então a indução da expressão protéica, sendo neste ponto retirado 500 μ L de amostra e armazenada -20°C. A cultura foi centrifugada à 1500 xg , por 5min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas

em 100mL de meio BMMY pH4,0. A cultura foi incubada à 30°C e 250rpm por 24h, até completar um período de indução de 120hs, sendo que a cada 24h foi retirada uma alíquota da cultura de 500µL e adicionado metanol absoluto para uma concentração final de 0,75%. Com 120hs de indução a cultura foi centrifugada à 3.797 xg (SLA 1500) por 10min. O sobrenadante resultante da indução foi filtrado, dialisado e concentrado em PBS 1x pH8,0 no aparelho *Labscale TFF System (Millipore)* utilizando a membrana *Hydrophilic polyvinylidene fluoride*.

As alíquotas retiradas antes e durante a indução foram centrifugadas à 2.860 xg por 3min, o sobrenadante foi coletado e adicionado de tampão de amostra 3x. As amostras foram aquecidas à 100°C por 15min e em seguida aplicadas (20µL) em gel SDS-PAGE 12%, sob as mesmas condições de eletroforese descritas no *screening* (item 3.7.9.3). Com as alíquotas também foi realizado um ensaio de *Western Blot* como descrito no item 3.6.16.

3.7.10. PURIFICAÇÃO PROTÉICA POR COLUNA DE NÍQUEL (Ni-NTA)

Como a proteína E2L recombinante estava fusionada à uma cauda de histidina, pôde ser purificada por coluna de níquel utilizando o protocolo fornecido pelo fabricante da resina (*Ni-NTA Superflow, Qiagen*). A resina foi previamente carregada com sulfato de níquel 0,1M, e equilibrada com 5 volumes de tampão da coluna (100mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 50mM NaH₂PO₄, pH8,0).

O sobrenadante dialisado e concentrado em PBS 1x pH8,0 foi aplicado à coluna de níquel e as proteínas foram eluídas utilizando gradientes em duplicata de 10, 25, 50, 75, 100 e 250mM de imidazol em tampão da coluna. De cada amostra obtida foi retirada uma alíquota de 60µL que foi adicionada de 20µL de tampão de amostra 3x. Estas alíquotas foram aquecidas à 100°C por 15min e analisadas em SDS-PAGE 12%. O gradiente que apresentou banda no gel, foi dialisado em PBS 1x pH8,0, realizando-se três trocas de 1L de tampão em 24hs para retirada do imidazol e posteriormente submetido a uma análise em SDS-PAGE 12% e por *western blot*. A amostra dialisada foi filtrada em filtro Millex® de 0,45µm e a concentração de proteína foi estabelecida pela quantificação através do kit *Pierce® BCA Protein Assay Kit* conforme instruções do fabricante. As amostras foram lidas em espectrofotômetro à 562nm e o resultado foi comparado com a curva de calibração do kit.

3.8. ENSAIOS BIOLÓGICOS COM AS PROTEÍNAS E2 RECOMBINANTES (E2B E E2L)

3.8.1. IMUNORREATIVIDADE DAS PROTEÍNAS E2 RECOMBINANTES

O teste de reatividade das proteínas E2 recombinantes (E2B e E2L) foi realizado com um controle interno positivo para HCV, constituído por um *pool* de soros humanos positivos para o HCV, e com um controle interno negativo constituído por um *pool* de soros humanos negativos para HCV e outras doenças infecciosas testadas (Chagas, Sífilis, Hepatites B e C, HIV-1/2 e HTLV), fornecidos pelo Laboratório de Imunologia Clínica do Núcleo de Atendimento à Comunidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP. As proteínas recombinantes foram transferidas para a membrana de PVDF através do método de *western blot*

descrito no item 3.6.16, onde foram aplicados em vários orifícios do gel SDS-PAGE 12%, 20µg/mL de proteína E2B e 10µg/mL de proteína E2L. Após a incubação da membrana transferida em solução de bloqueio contendo TBS (Tris 0,05M, NaCl 0,15M, pH 8,0) e 0,05% leite desnatado, por 16hs à 4°C, esta foi colocada em estufa à 37°C para secar durante 40min.

A membrana contendo as proteínas recombinantes transferidas foi cuidadosamente cortada em tiras que foram identificadas e colocadas em canaletas individuais de plástico e lavadas 3 vezes com 2mL do tampão de lavagem do kit *Cambridge Biotech HIV-1 – Western Blot Kit*, sob agitação em plataforma durante 5min. Na última lavagem o tampão foi aspirado e foram adicionados 2mL de diluições 1:20 e 1:100 do controle positivo para HCV diluídos em solução de bloqueio. Em uma das tiras foi adicionado o controle negativo para HCV na concentração de 1:20 (diluído na solução de bloqueio). A reação foi mantida sob agitação suave em plataforma durante 1h.

Decorrido este tempo as tiras foram lavadas 3 vezes por 5min cada, com 2mL de tampão de lavagem do kit, ao final este foi aspirado e aplicado na canaleta 2mL de conjugado 1 (anti-IgG humana biotinizada) diluído 1:1000 no tampão de bloqueio, que foi incubado por 1h à temperatura ambiente sob suave agitação. As tiras foram lavadas 3 vezes como já descrito acima e então incubadas com 2mL de conjugado 2 (avidina-peroxidase), durante 1h sob agitação lenta em plataforma à temperatura ambiente. As tiras foram lavadas 3 vezes, e reveladas com 2mL de solução reveladora (TMB/H₂O₂). Após o aparecimento das bandas as tiras foram lavadas mais 1 vez com solução de lavagem e então secas em papel filtro e fotografadas.

3.8.2. PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS PARA OS ENSAIOS BIOLÓGICOS

► CÉLULAS ECV304 (ATCC® CRL-1998™)

As células humanas ECV304, nos anos noventa foram utilizadas como modelo de estudo de células endoteliais, anos mais tarde foi re-classificada pelo ATCC como células derivadas de epitélio de bexiga humana (linhagem T24). Entretanto, estas células apresentam muitas das características das células endoteliais o que gera controvérsias na comunidade científica (XIONG, SIMON, 2011). Neste estudo elas foram utilizadas por possuírem os receptores de interesse. Estas foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, e mantidas em meio RPMI (*RPMI Medium 1640 – Sigma*) pH 7,2, suplementado ou não com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de solução de antibióticos/antimicóticos (*Sigma*), 1% de L-glutamina 200mM, 2g de bicarbonato de sódio e 2,38g de HEPES, e mantidas em estufa de 5% CO₂ à temperatura de 37°C.

Para utilização, as garrafas de cultura celular de 75cm³, foram tripsinizadas com 2mL de Tripsina 1x (*Sigma*) por 5min, em seguida, foram adicionados 4mL de meio RPMI completo. As células foram aspiradas da garrafa e centrifugadas à 200 xg por 10min à temperatura ambiente.

Para os ensaios de citometria de fluxo, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi lavado duas vezes com PBS pH 7,2 e centrifugado nas mesmas condições acima. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1mL de PBS pH 7,2.

Para os ensaios de MTT, NO, arginase, QL, IL-8, VEGF e anexina V, o *pellet* celular foi ressuspendido em 1mL de meio de cultura.

Para o ajuste da concentração celular, as células foram diluídas na proporção de 1:10 em azul de Tripan 0,04% para a contagem em câmara de Neubauer, onde também se analisou a viabilidade celular, e o volume final foi acertado para a concentração desejada.

► CÉLULAS HUVEC (ATCC® CRL-2873™)

As células HUVEC (células endoteliais de veia umbilical humana), gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo – USP, foram mantidas em meio RPMI (*RPMI Medium 1640 – Sigma*) pH 7,2 suplementado ou não com SFB à 10%, 1% de solução de antibióticos/antimicóticos (*Sigma*), 1% de L-glutamina 200mM, 2g de bicarbonato de sódio e 4,68g de HEPES, em estufa de 5% CO₂ à temperatura de 37°C. O processo para utilização das células HUVEC nos ensaios biológicos foi o mesmo descrito para as células ECV304.

► CÉLULAS SC (ATCC® CRL-9855™)

As células SC (linhagem de monócitos/macrófagos humanos), gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, foram mantidas em meio ISCOVE (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium – Sigma*) pH 7,2 suplementado com 10% de SFB, 1% de solução de antibióticos/antimicóticos (*Sigma*), 4mM de L-glutamina, 1,5g/L de bicarbonato de sódio, 0,05mM de 2-mercaptoetanol, 0,1mM de hipoxantina, 0,016mM de timidina e mantidas em estufa de 5% CO₂ à temperatura de 37°C. Para utilização nos ensaios biológicos, as células juntamente com o meio de cultura foram aspiradas da garrafa de cultura celular e centrifugadas à 200 *xg* por 10min à temperatura ambiente. Em seguida o procedimento para utilização em citometria de fluxo ou nos outros ensaios, foram os mesmos descritos para as células ECV304.

3.8.3. ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DA LIGAÇÃO DAS PROTEÍNAS E2 RECOMBINANTES AOS RECEPTORES DE SUPERFÍCIE CELULAR

3.8.3.1. IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI)

No sentido de avaliarmos a influência do HCV sobre o receptor de LDL (R-LDL), foram utilizadas para o ensaio de IFI as células ECV304. Um aspecto relevante nestas células é a presença do R-LDL, alvo de nosso estudo, desta forma, estas células foram avaliadas quanto a ligação das proteínas E2 recombinantes (E2B e E2L) a este receptor. A metodologia abaixo descrita utilizou como base, mas com várias adaptações, o protocolo do kit de IFI para Chagas – Imuno-CON Chagas produzido pela Wama Diagnóstica.

Lamínulas circulares estéreis de 13mm de diâmetro foram inseridas no fundo dos orifícios de uma placa de cultura celular de 24 orifícios estéril. Foram adicionados aos orifícios

1x10⁶ células/mL em meio de cultura RPMI completo (ou seja, com SFB) e a placa foi incubada por 24hs em estufa à 37°C e 5% de CO₂, para a formação do tapete celular. Decorrido este período, o sobrenadante foi aspirado e o orifício foi lavado com PBS pH 7,2 por 5min. O PBS foi aspirado e em alguns orifícios foram adicionados somente 10µg/mL das proteínas E2B ou E2L e em outros 10µg/mL das proteínas E2B ou E2L e 20µg/mL de LDL humano (presentes em um *pool* de soros com alta concentração de LDL), e ainda como controles negativos em um orifício não foi adicionado proteína, mas apenas PBS pH 7,2 e em outro apenas o LDL humano (20µg/mL). A placa foi levada à estufa de 5% CO₂ à temperatura de 37°C por 40min. Os orifícios foram então lavados 3x de 5min com PBS pH 7,2, ao final o PBS foi aspirado e adicionou-se 1mL de paraformaldeído 4% por 15min. Os orifícios foram lavados 3x como descrito acima e foram adicionados 100µL de um controle interno positivo para HCV, constituído por um *pool* de soros humanos positivos para o HCV. Como controle negativo do experimento, para cada orifício de reação com o soro positivo realizou-se uma mesma reação com um controle interno negativo para HCV, constituído por um *pool* de soros humanos negativos para HCV e outras doenças infecciosas testadas (Chagas, Sífilis, Hepatites B e C, HIV-1/2 e HTLV).

A placa foi incubada em estufa à 37°C por 30min. O soro foi aspirado e os orifícios foram lavados 3x com PBS pH 7,2. Ao abrigo da luz, foi adicionado a cada orifício 50µL de anti-IgG humana conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC). A placa foi novamente incubada na estufa por 30min, ao final, os orifícios foram lavados 3x com PBS sendo que na última lavagem foi adicionado 1mL de PBS com 5% de Azul de Evans, por 5min. O PBS foi aspirado e as lâminas foram retiradas dos orifícios e montadas sobre lâminas de microscopia utilizando-se 1 gota de *Fluoromount* (Sigma) entre elas. As lâminas foram então observadas no microscópio de fluorescência, no aumento de 400x, no mesmo dia.

3.8.3.2. ENSAIO DE IMUNOFENOTIPAGEM

Aos tubos de citometria foram adicionados 500µL de uma suspensão à 1x10⁶ células (ECV304 ou HUVEC)/mL mantidas em meio com SFB. Os tubos foram centrifugados à 200 *xg* por 10min, e então o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 100µL de PBS pH 7,2. Os receptores de superfície celular CD81 (TAPA-1) e R-LDL foram imunofenotipados adicionando-se 5µL de anti-CD81 marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e 5µL de anti-R-LDL marcado com ficoeritrina (PE). Os tubos foram incubados à 4°C por 30min e ao abrigo da luz. Em seguida, foram lavados (2x) adicionando-se 500µL de PBS pH 7,2 e centrifugando à 200 *xg* por 10min. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 500µL de PBS pH 7,2 e armazenadas à 4°C até o momento da leitura no *FACSCanto BD* e análise no *FACSDiva software, Versão 6.1.3* (MEOLA et al., 2000). Um tubo contendo apenas células foi inserido ao experimento para controle de fluorescência espontânea, bem como tubos contendo isotipos controle. Um total de 30.000 células foram analisadas e o experimento foi repetido no mínimo 3 vezes para confirmação dos resultados.

3.8.3.3. ENSAIO DE LIGAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES AOS RECEPTORES CELULARES

As células ECV304 ou HUVEC foram mantidas em meio com e sem SFB, para avaliar a influência deste no ensaio. Foram adicionados aos tubos de citometria 500µL de uma suspensão de células (ECV304 ou HUVEC) em PBS pH 7,2 à 1×10^6 céls/mL, e centrifugados à 200 *xg* por 10min, em seguida o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 100µL de PBS pH 7,2. Os tubos foram incubados em estufa à 37°C por 45min com 5µg/mL de proteína (E2B ou E2L) ou com 5 µg/mL de proteína (E2B ou E2L) que foi anteriormente pré-incubada à 37°C por 1h com 10µg/mL de LDL, contidos em um *pool* de soros de indivíduos não portadores do HCV com alta concentração de LDL (valores acima do de referência considerado normal) (WÜNSCHMANN et al., 2006; HAHN, et al., 2006). As células foram lavadas adicionando-se 500µL de PBS pH7,2 e centrifugando-se à 200 *xg* por 10min, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100µL de PBS pH 7,2. Aos tubos foram adicionados 5µL de anti-His mouse MAb IgG1 marcado com alofococianina (APC) e incubados à 4°C por 30min. Um isotipo controle, *anti-Flag mouse MAb*, foi usado para determinar o *background* de fluorescência. Um tubo contendo apenas células foi inserido ao experimento para controle de fluorescência espontânea. Os tubos foram lavados 2 vezes como descrito acima e as células foram ressuspensas em 500µL de PBS pH 7,2 e analisadas por citometria de fluxo (*FACSCanto BD*, *FACSDiva software*, Versão 6.1.3) (MEOLA et al., 2000; WÜNSCHMANN et al., 2000). Foram analisadas 30.000 células por ensaio, e todos os experimentos foram repetidos no mínimo 3 vezes para confirmação dos resultados.

As concentrações de proteína E2 utilizadas no teste foram escolhidas tendo como base a concentração de 5µg utilizada por Flint et al., 1999.

3.8.3.4. ENSAIO DE INIBIÇÃO OU BLOQUEIO DA LIGAÇÃO AOS RECEPTORES CELULARES – CD81 e R-LDL

Aos tubos de citometria foram adicionados 500µL de uma suspensão celular à 1×10^6 células ECV304 ou HUVEC/mL (mantidas em meio com e sem SFB), os tubos foram centrifugados a 200 *xg* por 10min, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100µL de PBS pH 7,2. O bloqueio do R-LDL foi realizado para ambas as células, adicionando-se aos tubos 5µL de anti-R-LDL, e para o bloqueio do CD81 das células ECV304, foi adicionado 5µL de anti-CD81; desta forma, a HUVEC teve o seu R-LDL bloqueado e a célula ECV304 teve seus receptores bloqueados independentemente ou simultaneamente bloqueados. Os tubos foram incubados à 4°C por 30min e então lavados adicionando-se 500µL de PBS pH 7,2 em cada tubo e centrifugando-se à 200 *xg* por 10min, em seguida o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100µL de PBS pH 7,2. Às células bloqueadas para R-LDL ou CD81 ou ambos foram adicionados 5µg/mL de proteína (E2B ou E2L) pré-incubada à 37°C por 1h com 10µg/mL de LDL, contidos em um *pool* de soros de indivíduos não

portadores do HCV com alta concentração de LDL. Os tubos foram incubados à 37°C por 45min e então lavados como descrito acima. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100µL de PBS pH 7,2. A cada tubo foi adicionado 5µL de anti-his IgG1 *mouse MAb* marcado com APC e incubados à 4°C por 30min. As células foram lavadas duas vezes como descrito acima sendo ao final ressuspensas em 500µL de PBS pH 7,2 e analisadas por citometria de fluxo (*FACSCanto BD, FACSDiva software, Versão 6.1.3*) (ROCCASECCA et al., 2003). Um tubo contendo apenas células foi inserido ao experimento para controle de fluorescência espontânea. Foram analisadas 30.000 células por ensaio, e todos os experimentos foram repetidos no mínimo 3 vezes para confirmação dos resultados.

3.9. ENSAIOS DE RESPOSTA CELULAR

Em todos os ensaios para avaliação da resposta celular frente ao estímulo das proteínas recombinantes, as células utilizadas foram mantidas em meio com soro fetal bovino, ou seja, com a presença das lipoproteínas naturalmente presentes no soro, a fim de se proporcionar um ambiente que representasse o mais próximo da condição fisiológica dos indivíduos infectados pelo HCV.

3.9.1. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR – MÉTODO MTT

Para o ensaio de viabilidade celular, utilizou-se o método baseado na capacidade que têm as células viáveis de clivar o anel tetrazólico presente no MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) pela ação de enzimas desidrogenases contidas na mitocôndria ativa, formando cristais de formazana (MOSMANN, 1983).

A uma placa de microtitulação de 96 orifícios de fundo plano (*Corning, Inc.*) foram distribuídos 200µL de uma suspensão à 5×10^5 células ECV304 ou HUVEC (células aderentes) / mL (células aderentes), dispersas em meio de cultura completo apropriado (RPMI-1640-C) (C = completo - contendo SFB e mix de antibióticos e antimicóticos) por cavidade. A placa foi incubada por 24h, a 37°C, em estufa sob tensão constante de 5% de CO₂ (*Forma Scientific, EUA*). Para células em suspensão, como é o caso da SC, foram adicionados a cada orifício da placa 100µL de uma suspensão celular à 1×10^6 células/mL dispersas em meio ISCOVE-C sem a prévia incubação em estufa antes da adição dos estímulos.

Somente o sobrenadante das células aderentes foi vertido. Tanto nas células aderentes como naquelas em suspensão foram adicionados aos orifícios da placa os seguintes estímulos: proteínas E2B e E2L nas concentrações: 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63 e 7,81µg/mL, diluídas em meio de cultura específico para cada tipo celular (200µL para as aderentes e 100µL para aquelas em suspensão), 20µg/mL de LPS (lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*), 0,50µM de PMA (phorbol 12-myristate 13-acetato) e 100µg/mL de PHA (fitohemaglutinina) também diluídos em 200µL de meio de cultura RPMI-C para as células aderentes e 100µL de meio ISCOVE-C para as células SC. O LPS e a PHA também foram testados nas mesmas concentrações da proteínas

recombinantes. O PMA foi testado nas concentrações de 2,0; 1,0; 0,50 e 0,125 μ M.

O controle negativo foi constituído somente de meio de cultura completo apropriado ao tipo celular e adicionado à placa, equivalendo a 100% de viabilidade celular. A placa foi incubada em estufa por 24h, a 37°C e 5% de CO₂.

O sobrenadante das células aderentes foi descartado e foram adicionados aos orifícios da placa 100 μ L de uma solução de MTT (Sigma) a 1mg/mL em meio apropriado incompleto, ou seja, sem soro fetal e a placa foi, então, incubada por 3h nas mesmas condições de incubação anteriores.

À placa das células em suspensão foram adicionados aos orifícios 20 μ L de uma solução de MTT (Sigma) a 5mg/mL em meio apropriado incompleto e incubada por 4hs mesmas condições anteriores.

Após esta incubação, a placa de células SC foi centrifugada à 2.860 xg , 4°C por 10min. Os sobrenadantes de cultura de ambas as células foram descartados e adicionou-se à cada cavidade 100 μ L de álcool isopropílico (Mallinckrodt Chemical) para solubilizar os cristais de formazana formados. A leitura da densidade ótica (absorbância) foi determinada em espectrofotômetro (*Multiskan Ascent, Labsystems*) em UV/visível, a 540nm, com filtro de referência de 620nm. A viabilidade celular foi calculada em porcentagem, considerando-se o controle negativo como 100% de viabilidade.

Ambos os ensaios foram realizados em triplicata e em três ensaios independentes.

3.9.2. AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR POR ANEXINA V E IODETO DE PROPÍDEO

O ensaio para a verificação da indução de morte celular pelas proteínas recombinantes nas células HUVEC foi avaliado através da Anexina V e pela incorporação de Iodeto de Propídeo (PI) pelo DNA. A externalização de fosfatidil serina durante o processo de apoptose pode ser captada pela proteína anexina V, que na presença de íons de cálcio exibe alta afinidade para ligação seletiva a fosfatidil serina. Acoplada ao fluorocromo FITC, as células marcadas com anexina V podem ser contabilizadas em citômetro de fluxo. O PI é uma molécula que se intercala em qualquer DNA, desde que a membrana celular esteja permeável. Tal propriedade deve-se ao fato de que marcadores de DNA de elevado peso molecular, como o PI, não são passíveis de penetrar na célula intacta em decorrência do seu tamanho, bem como não marcam células apoptóticas sem que estas apresentem alterações na permeabilidade da membrana plasmática, como ocorre nos estágios finais da apoptose, sendo que as células marcadas com PI podem ser analisadas por citometria de fluxo. A metodologia utilizada foi a do kit *Anexina V - BD Pharmigen – FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I*, conforme instruções do fabricante.

Desta forma, 5x10⁴ células/mL foram adicionadas aos orifícios de uma placa de 24 orifícios e incubada à 37°C com 5% de CO₂ por 24hs. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1mL de meio de cultura apropriado e o volume de estímulo completado para 1mL de PBS pH 7,2. As proteínas recombinantes E2B e E2L foram testadas nas seguintes concentrações 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 e 7,81 μ g/mL. Também utilizou-se como estímulos controle 0,5 μ M de PMA (controle

positivo), 20µg/mL de LPS e 100µg/mL de PHA. Além disso, foi adicionado ao ensaio alguns controles como: controle negativo de células sem estímulos, controle de anexina, controle de iodeto de propídeo (PI) e controle de PI e anexina juntos, à estes orifícios foi adicionado 1mL de meio de cultura e 1mL de PBS pH 7,2. A placa foi incubada à 37°C com 5% de CO₂ por 24hs. O sobrenadante foi descartado, os orifícios foram lavados com 1mL de PBS pH 7,2 e foram adicionados 100µL de tripsina por 10min à 37°C. Foi acrescentado 1mL de meio de cultura apropriado completo, as células foram aspiradas para um tubo de citometria que foi centrifugado à 300 *xg* por 5min à 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas 2 vezes com PBS pH 7,2. As células foram ressuspensas em 100µL de tampão de ligação do kit. À temperatura ambiente e protegido da luz foram adicionados: tubos teste 5µL de anexina e 5µL de PI; tubo controle de células não foi adicionado nada; tubo controle de anexina foi adicionado apenas 5µL de anexina e no tubo controle PI apenas 5µL de PI. Os tubos foram agitados em vórtex por 10seg. Em seguida foram adicionados 300µL de tampão de ligação e os tubos foram agitados em vórtex novamente. As células foram analisadas em citômetro de fluxo (*FACSCanto BD, FACSDiva software, Versão 6.1.3*). Foram analisadas 30.000 células por ensaio, e todos os experimentos foram repetidos no mínimo 3 vezes para confirmação dos resultados.

3.9.3. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

O óxido nítrico foi quantificado por dois métodos distintos. No primeiro método, o acúmulo de nitrito no sobrenadante da cultura de células, foi quantificado através do método espectrofotométrico da reação de Griess, e as concentrações foram calculadas usando uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂) (GREEN et al., 1982). No outro, utilizado apenas para as células HUVEC, o NO total foi determinado no sobrenadante utilizando um analisador de NO (*Sievers Nitric Oxide Analyzer Overview – GE Analytical Instruments*, modelo NOA 280i), onde nitritos, nitratos e nitrosotióis presentes no sobrenadante foram convertidos em NO por uma solução saturada de tricloreto de vanadium (VCl₃) em 0,8M de HCl à 90°C. O NO foi detectado através de uma reação quimioluminescente em fase gasosa entre o NO e ozônio (ARCHER, 1993; JAISWAL et al., 2000).

A placa de microtitulação de 96 orifícios de fundo plano (*Corning, Inc.*) foi adicionada das mesmas concentrações de células (ECV304 ou HUVEC ou SC), proteínas e controles (C-: só meio; LPS, PMA e PHA) como descrito no item 3.9.1, em triplicata e em três ensaios independentes, incubada em estufa 37°C e 5% de CO₂ por 24h.

Ao final deste período, a placa foi centrifugada à 2.860 *xg*, 4°C por 10min e foram coletados 50µL de sobrenadante da cultura celular que foram transferidos para outra placa de cultura de células não-estéril contendo 96 orifícios de fundo plano (*Corning, Inc.*) para realização da dosagem de NO pelo método de Griess. Para outra placa também foram transferidos 100µL de sobrenadante da cultura para dosagem de NO pelo aparelho acima citado.

Ao sobrenadante destinado à dosagem pelo método de Griess foram adicionados 50µL de solução de Griess (constituída de: 0,1% de N-1-naftil-etilenodiamina (*Merk*), 1% de sulfanilamida

(Merk) em solução de ácido ortofosfórico (Mallinckrodt Chemical) a 2,5%) (GREEN et al., 1982). Após 10min de incubação em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a absorbância foi determinada com filtro de 540nm em espectrofotômetro (Multiskan Ascent, Labsystems). As concentrações de NO liberado nos sobrenadantes das culturas celulares foram calculadas a partir de uma curva padrão previamente obtida com concentrações molares conhecidas de NaNO₂ (Merck) em meio apropriado (RPMI ou ISCOVE), e os valores foram expressos em μmols de nitrito.

3.9.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ARGINASE EM CULTURA DE CÉLULAS

A mensuração da atividade da arginase foi realizada através da dosagem de seu produto uréia. A reação baseia-se na ocorrência de hidrólise de L-arginina pela enzima arginase, em lisado de células, método modificado de Corraliza et al. (1994).

Foram adicionadas a cada cavidade de uma placa de 96 orifícios de fundo plano (Corning, Inc.), 1x10⁵ células (ECV304 ou HUVEC ou SC) em meio apropriado completo. A placa de células aderentes (ECV304 e HUVEC) foi incubada em estufa à 37°C sob tensão de 5% de CO₂ por 24h e o sobrenadante foi descartado. Em ambas as placas foram acrescentados estímulos nas mesmas concentrações de proteínas (E2B e E2L) e controles (C-: só meio, LPS, PMA e PHA) como descrito no item 3.9.1, em triplicata e em três ensaios independentes. A placa foi incubada nas mesmas condições anteriores por 24hs, e então o sobrenadante foi descartado (sendo a placa de células SC previamente centrifugada como descrito anteriormente) e adicionou-se à cada orifício 100μL de Triton-X 0,1% para a lise celular. A placa foi incubada por 30min sob agitação e em seguida 50μL de cada lisado celular foi adicionado à *eppendorfs* contendo 50μL de Tris-HCl 25mM e 25μL de MnCl₂ 100 mM. Os *eppendorfs* foram agitados no vortex por 30seg e então incubados à 56°C por 10min, para ativação da enzima. Decorrido este período, foram acrescentados a cada *eppendorf* 50μL de L-arginina 0,5M (pH9,7) que foram agitados por 30seg em vórtex e então incubados por 60min à 37°C. A reação foi interrompida com 400μL de solução de parada constituída por: H₂SO₄ (96%), H₃PO₄ (85%) e H₂O, na proporção 1:3:7. Em seguida, foram adicionados 25μL de α-isonitrosopropiofenona (α-ISPF) 9% (Sigma) dissolvido em etanol 100%, e os *eppendorfs* foram agitados em vórtex por 30seg e então incubados à 95°C por 30min. Ao final os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 10min para estabilização da cor. Duzentos microlitros de cada *eppendorf* foram transferidos para orifícios de uma placa de 96 orifícios e então foi realizada a leitura da densidade ótica em espectrofotômetro (Multiskan Ascent, Labsystems) em UV/visível, à 540nm. A concentração de uréia foi calculada através de uma curva padrão previamente estabelecida, com quantidades conhecidas de uréia. Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1μmol de uréia por minuto.

3.9.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CELULAR PARA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO ATRAVÉS DE QL

As células ECV304, HUVEC e SC foram testadas para a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) através da avaliação do *burst* oxidativo pós-indução com as proteínas E2 recombinantes em diferentes concentrações e com estímulos controle (PMA, LPS e PHA), através do ensaio de quimioluminescência (QL) dependente de luminol. A geração de EROs por essas células como consequência da ativação da NADPH oxidase de membrana e geração do metabolismo oxidativo, proporciona a avaliação dos mecanismos celulares envolvidos na ativação dos R-LDL ou CD81 pela ligação das proteínas E2 recombinantes.

3.9.5.1. PREPARO DO CONTROLE DA REAÇÃO

Como controle da reação de QL foi realizado em paralelo um ensaio com neutrófilos humanos utilizando como estímulo o PMA, conhecido como o estímulo mais potente para células geradoras de *burst* oxidativo, para comparação da resposta gerada pelas células ECV304, HUVEC e SC frente aos diversos estímulos testados. Desta forma, foram colhidos 5mL de sangue de um voluntário saudável em tubo contendo EDTA-K₂ como anticoagulante para a obtenção dos neutrófilos submetidos ao ensaio QL dependente de luminol para a medida do *burst* oxidativo dos neutrófilos como controle da QL das células acima citadas. O sangue coletado foi adicionado de 5mL de Histopaque 1119 (*Sigma-Aldrich*[®]) e 3mL de Histopaque 1077 (*Sigma-Aldrich*[®]) e centrifugado à 700 *xg* por 30min. A camada de polimorfonucleares foi lavada 2 vezes com 10mL de PBS estéril pH 7,2 e centrifugada à 250 *xg* por 10min. Desprezou-se o sobrenadante e as células foram ajustadas para a concentração de 1x10⁶ células/mL.

3.9.5.2. ENSAIO DE QUIMIOLUMINESCÊNCIA DEPENDENTE DE LUMINOL

Em cada orifício da placa opaca de 96 orifícios de fundo plano foram adicionados: 1x10⁶ células ECV304 ou HUVEC ou SC ou neutrófilos de sangue periférico humano (avaliados apenas com PMA), 1x10⁻⁵ de luminol e os estímulos: 0,5μM de PMA (controle positivo) ou 20μg/mL de LPS ou 100μg/mL de Fitohemaglutinina (PHA) ou proteínas E2B ou E2L (nas concentrações: 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81μg/mL) e PBS pH 8,0 o suficiente para completar 250μL. Foi realizado também um *background* ou controle negativo, composto por 1x10⁻⁵ de luminol, 1x10⁶ células/mL, PBS pH 8,0 estéril para completar 250μL. A reação de QL foi acompanhada por 60min à 37°C em Luminômetro de placa *Biotek – Synergy 2*, pertencente ao Laboratório de Hematologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP. As quantidades de células, luminol e PMA para a análise foram definidas através da padronização da técnica por meio de vários trabalhos (SILVA, I.M., 2000; BONACORSI, C., 2009) que comprovaram que as quantidades citadas são suficientes para uma leitura fidedigna do *burst* oxidativo de neutrófilos e estatisticamente significativa. A concentração de PMA utilizada como estímulo para as células testadas foi o dobro da utilizada para ensaios de QL utilizando sangue total, onde existem células conhecidamente capazes de gerar *burst* oxidativo por possuir a maquinaria para tal, assim como

sugerido pelo manual do luminômetro *BioOrbit - 1251 Luminometer*. A concentração utilizada para LPS foi baseada naquela capaz de estimular macrófagos murinos à uma resposta inflamatória. A concentração de PHA utilizada foi baseada em ensaios de linfócitos, já que não se encontrou na literatura uma concentração definida destes estímulos para esta análise nas células em questão.

3.9.6. ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE H₂O₂ POR CITOMETRIA DE FLUXO

A determinação da produção de H₂O₂ foi realizada em tubos contendo 5x10⁵ células (ECV304 ou HUVEC ou SC) em tampão PBS pH 7,2 seguindo a metodologia descrita por Walrand et al., 2003 com adaptações. Aos tubos foram adicionados os estímulos nas concentrações descritas no item 3.9.1 e incubados na estufa à 37°C por 2hs. Em seguida, foram adicionados 6µL de DHR [600ng/ml] e incubou-se à 37°C por 10min. As células foram lavadas adicionando-se 400µL de PBS pH7,2 e centrifugadas à 200 *xg* por 10min, em seguida o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 500µL de PBS pH7,2. As amostras foram lidas no canal FL1 do *FACSCanto BD* e analisadas pelo *FACSDiva software, Versão 6.1.3*. Foram inseridos no experimento um controle de fluorescência espontânea (tubo contendo apenas células) e um controle de produção de H₂O₂ espontâneo (tubo contendo células sem estímulo e DHR).

3.9.7. QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE IL-8

As células HUVEC e SC foram avaliadas quanto à produção de IL-8 frente ao estímulo das proteínas recombinantes e estímulos controle usando como metodologia um teste de ELISA através do kit *Human Interleukin – 8 ELISA Ready-SET-Go - eBioscience*.

Para o teste com as células HUVEC foram adicionadas a uma placa de cultura de tecidos de 48 orifícios, 300µL de suspensão celular à 5x10⁴ células/mL. A placa foi incubada à 37°C com 5% de CO₂ por 24hs. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 300µL de meio de cultura apropriado e os estímulos: 250µg/mL das proteínas E2B e E2L, 20µg/mL de LPS, 100µg/mL de fitohemaglutinina (PHA) e 0,50µM de PMA num volume final de 300µL (completado com meio de cultura). Ao orifício destinado ao controle negativo foi adicionado 300µL de meio de cultura apropriado e 300µL de PBS pH7,2 (meio de diluição das proteínas).

Aos orifícios destinados ao teste com as células SC foram adicionados 300µL de suspensão celular à 5x10⁵ células/mL. Os compostos foram adicionados aos orifícios num volume final de 300µL assim como realizado para as células HUVEC.

Ambas as placas foram incubadas à 37°C com 5% de CO₂ por 24hs. O sobrenadante foi coletado e centrifugado à 2.860 *xg*, 4°C por 10min e utilizado para dosagem de IL-8 através do kit de ELISA acima descrito conforme instruções do fabricante.

3.9.8. QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE VEGF

O sobrenadante utilizado para dosagem de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) foi adquirido através da mesma metodologia descrita para IL-8. O VEGF foi quantificado por método de ELISA através do kit *Human VEGF-A – Platinum ELISA eBioscience*, conforme protocolo fornecido pelo fabricante. Este fator foi dosado no sobrenadante de células HUVEC e SC que foram expostas aos mesmos estímulos e concentrações utilizados no ensaio de IL-8.

3.9.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando método de análise de variância (One-Way ANOVA), seguido pelo teste *t*-Student na versão de comparações múltiplas de Tukey, para avaliar a diferença significativa entre pares. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.0 (*GraphPad Software, San Diego, California, United States*).

4. RESULTADOS

4.1. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA E2 RECOMBINANTE DO HCV EM BACTÉRIA

4.1.1. PERFIL ELETROFORÉTICO DO PRODUTO DE PCR DO FRAGMENTO E2 AMPLIFICADO A PARTIR DE cDNA

A padronização da técnica de amplificação do cDNA por PCR, para a região de interesse da proteína E2, foi realizada com *primers* específicos, cujas seqüências e condições foram descritas nos materiais e métodos. A figura 6 apresenta o perfil eletroforético dos produtos de PCR para o fragmento da proteína E2 (852pb) em gel de agarose 1%.

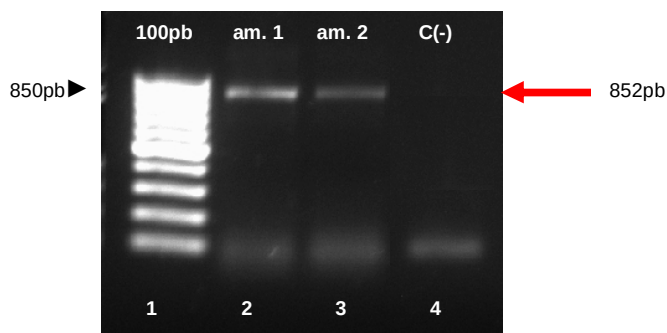


Figura 6: Perfil eletroforético dos produtos de PCR para amplificação da seqüência correspondente à proteína E2 (852pb) por PCR (canaletas 2 e 3) em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio 0,5mg/mL, tampão TAE e tensão de 100V. Canaleta 1: Marcador do número de pares de bases (100pb). Canaletas 2 e 3: amostras amplificadas. Canaleta 4: controle de contaminação de reagentes da PCR. am. = amostra.

Após a análise do perfil eletroforético, podemos observar que nas canaletas 2 e 3 os fragmentos amplificados apresentaram aproximadamente 850pb, o que corresponde ao tamanho esperado para o fragmento de interesse. Nenhuma amplificação foi vista na canaleta do controle de contaminação dos reagentes da PCR (canaleta 4). Portanto, nenhum reagente encontrava-se contaminado com DNA no momento da reação e nada além da região de interesse do genoma do HCV foi amplificado, comprovando que a padronização das nossas condições de isolamento do material genético viral e amplificação da região de interesse funcionaram adequadamente.

O produto de PCR foi purificado, e submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, revelando que o DNA apresentava-se íntegro. Após a análise do perfil eletroforético, a amostra foi submetida à quantificação por espectrofotometria, e apresentou concentração de 40ng/μL, sendo assim concluímos que o produto de PCR purificado mostrava-se adequado para ser utilizado na próxima etapa, pois indicava boa qualidade, integridade e concentração.

4.1.2. SCREENING DAS COLÔNIAS TRANSFORMANTES COM O VETOR pTZ57R/T RECOMBINANTE

Na placa de *screening* de colônias bacterianas transformantes após o crescimento destas

em meio contendo X-gal e IPTG, pôde-se distinguir colônias brancas e azuis. As colônias brancas indicaram que provavelmente as bactérias foram transformadas com vetores que continham o inserto de interesse, o que tornou o gene *lacZ* afuncional. Mas para verificar se essas colônias realmente haviam adquirido o vetor pTZ57R/T com o inserto E2 foi realizada uma PCR e uma posterior eletroforese em gel de agarose 1% para evidênciação das bandas. A figura 7 mostra o perfil eletroforético do produto amplificado.

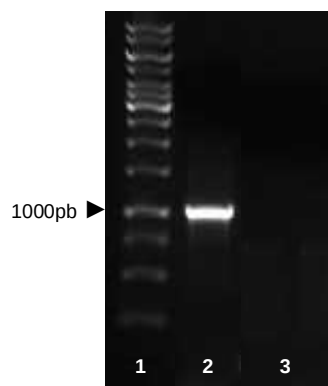


Figura 7: Perfil eletroforético do produto amplificado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5mg/mL, tampão TAE e tensão de 100V. Canaleta 1: Marcador do número de pares de bases (1Kb). Canaleta 2: produto de PCR. Canaleta 3: controle negativo.

Ao analisarmos o perfil eletroforético concluímos que a amostra (canaleta 2) havia adquirido o vetor com o inserto E2, pois apresentou amplificação e banda do tamanho esperado (852pb inserto + 154pb parte do pTZ57R/T = 1006pb). Na canaleta 3, controle negativo dos reagentes da reação de PCR, não observamos sinais de amplificação o que indica que estes não estavam contaminados com DNA.

4.1.3. SCREENING DAS COLÔNIAS TRANSFORMANTES COM O VETOR pET-42a RECOMBINANTE

Colônias de *E. coli* linhagem DH5 α transformantes foram avaliadas quanto à aquisição do vetor pET-42a com inserto E2 (vetor recombinante) através de PCR. O produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% para análise da amplificação e confirmação dos clones transformantes (figura 8).

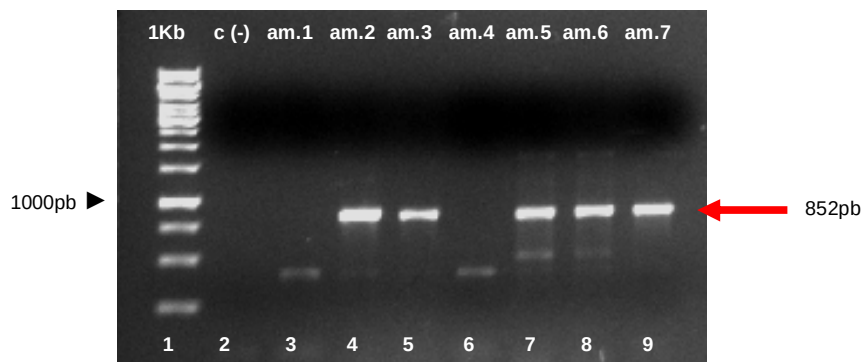


Figura 8: Perfil eletroforético dos produtos de PCR das colônias transformantes para verificação da amplificação da sequência correspondente ao inserto E2 (852pb) em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5mg/mL, tampão TAE e tensão de 100V. Canaleta 1: Marcador do número de pares de bases (1Kb). Canaleta 2: controle de contaminação de reagentes da PCR. Canaletas 3 e 6: colônias não transformadas. Canaletas 4, 5, 7, 8 e 9: colônias transformadas. am. = amostra.

Ao analisarmos o perfil eletroforético das bandas do gel de agarose 1%, observamos que as amostras 2 (canaleta 4), 3 (canaleta 5), 5 (canaleta 7), 6 (canaleta 8) e 7 (canaleta 9) apresentam uma banda de amplificação de aproximadamente 852pb o que corresponde ao tamanho do inserto E2. Desta forma, podemos afirmar que apenas estas colônias transformantes adquiriram o vetor pET-42a com o inserto E2. Já as amostras 1 (canaleta 3) e 4 (canaleta 6) não apresentam banda de amplificação pois estas colônias não adquiriram o vetor pET-42a com o inserto E2. Como na canaleta 2 não observamos banda de amplificação concluímos que os reagentes da PCR não estavam contaminados, garantindo a qualidade do experimento.

4.1.4. SEQUENCIAMENTO DO PRODUTO CLONADO

O vetor pET-42a recombinante, ou seja, acrescido do inserto E2, foi sequenciado para análise da sequência do inserto e orientação deste. Os dados obtidos com o sequenciamento foram alinhados no sistema BLAST, e o resultado mostrou que a sequência obtida possuía similaridade com a sequência referente ao vírus da Hepatite C subtipo 1a, depositada no banco de dados do NCBI sob número de acesso M67463 (bem como em: NC_004102 e AF009606), e que estava clonada na orientação correta.

4.1.5. ANÁLISE DO TEMPO DE INDUÇÃO

Os clones transformados com pET-42a recombinante foram induzidos, com IPTG, à produção da proteína E2 (63,5kDa) durante 4h, coletando-se uma alíquota em intervalos de 1 (T1), 2 (T2), 3 (T3) e 4h (T4). A figura 9A apresenta o gel SDS-PAGE 12% como resultado da expressão da proteína E2 recombinante para escolha do melhor tempo de indução, em bactéria *E. coli* linhagem Rosetta. A proteína E2 estava fusionada à GST (26kDa) e à 6xHisTag (1kDa), portanto o peso molecular correspondente apenas à proteína E2 é de 36,5kDa. A figura 9B mostra o ensaio de *Western blot* com estas alíquotas.

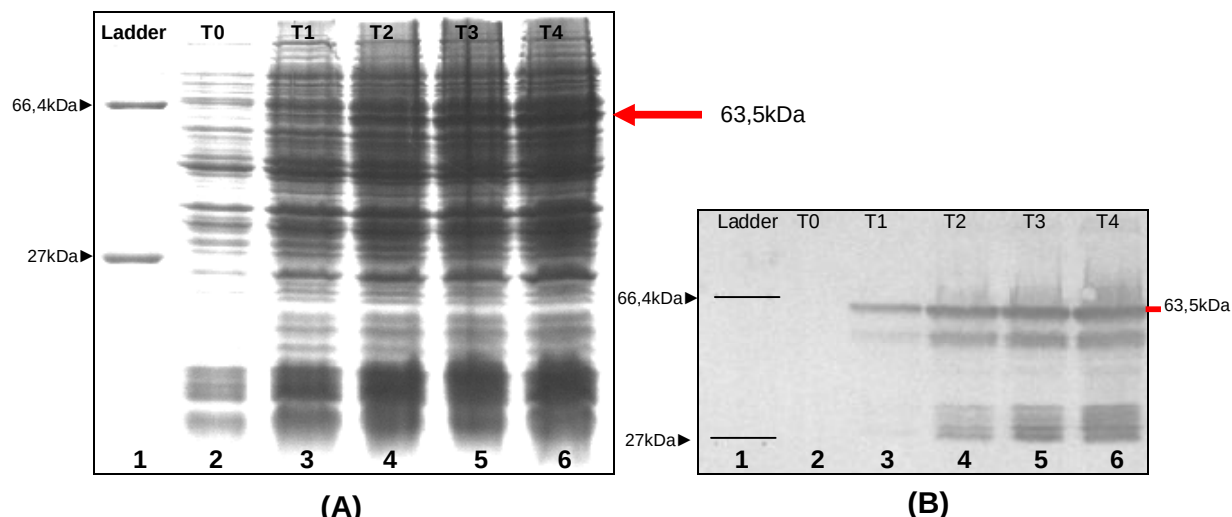


Figura 9: **A:** Gel SDS-PAGE 12% da expressão da proteína E2 (fusionada com GST e histidina = 63,5kDa), em células bacterianas, antes e depois da indução com IPTG 0,4mM, à temperatura de 30°C – 300rpm. Na primeira canaleta encontra-se o marcador de massa molecular - *Protein Marker Broad Range* (2 - 212 kDa) - *Biolabs*. T0 (canaleta 2): antes da indução; T1 (canaleta 3): 1h após a indução; T2 (canaleta 4): 2h após a indução; T3 (canaleta 5): 3h após a indução e T4 (canaleta 6): 4h após a indução. O gel foi corado com *Coomassie blue*. A seta indica uma banda de aproximadamente 63,5kDa (GST = 26kDa, 6xHisTag = 1kDa, E2 = 36,5kDa), correspondente à proteína E2 recombinante, observada em T1, T2, T3 e T4. **B:** Membrana de nitrocelulose PVDF (*PVDF Transfer Membrane 0,45μm* – *Thermo Scientific*), resultante da reação de *Western Blot*, transferida com o precipitado bacteriano dos diferentes tempos de indução da proteína E2 recombinante (1h, 2h, 3h e 4h). Na primeira canaleta encontra-se o marcador de massa molecular - *Protein Marker Broad Range* (2 - 212 kDa) - *Biolabs*. T0 (canaleta 2): antes da indução; T1 (canaleta 3): 1h após a indução; T2 (canaleta 4): 2h após a indução; T3 (canaleta 5): 3h após a indução e T4 (canaleta 6): 4h após a indução.

Analisando os tempos de indução (1h, 2h, 3h e 4h), nas figuras 9A e 9B, podemos observar que a expressão da proteína E2 recombinante foi semelhante nos tempos de 2h, 3h e 4h, portanto o tempo de indução foi padronizado para 3h. Além disso, a revelação da membrana mostra uma banda na altura de 63,5kDa, o tamanho esperado para a proteína recombinante. A marcação da banda revela que o anticorpo anti-his tag foi capaz de reagir com a cauda de histidina da proteína E2 recombinante e assim com os anticorpos secundários anti-IgG marcados com fosfatase alcalina. Revelando também uma degradação protéica. No tempo zero (T0), ou seja, antes do início da indução, não é possível observar a banda correspondente à proteína E2 nem no gel e nem na membrana. Desta forma, pode-se supor que se trata da proteína de interesse.

4.1.6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA E2 EM SISTEMA BACTERIANO E PURIFICAÇÃO ATRAVÉS DA PROTEÍNA DE FUSÃO

Inicialmente a proteína E2 recombinante apresentou-se muito insolúvel, ficando quase que em sua totalidade no *pellet*. Para solucionar este problema, foram realizadas algumas alterações no protocolo de indução inicial, como: alterações de temperatura (20°C, 28°C, 30°C e 37°C), rotação (250 e 300rpm), tempo de indução (1, 2, 3, 6 e 14h), tampões de lise (100mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 50mM NaH₂PO₄, pH8,0 // 0,5mM de uréia // uréia [0,5mM], lisozima [0,2mg/mL], NaCl [150mM], Tris [10mM] e NaH₂PO₄ [50mM] // uréia [0,5mM], lisozima [0,2mg/mL], NaCl

[200mM], Tris [10mM] e NaH_2PO_4 [50mM] // 4mg/mL lisozima, 2% Triton X-100, 1,5% N-laurysarcosine, 5mM DTT) e vários tempos de repouso nestes tampões (15, 30, 40 e 60min). O ensaio de indução da expressão da proteína E2 recombinante foi então padronizado à 37°C, 250rpm por 3h e o *pellet* ressuspendido em 10mL do tampão de lise contendo: 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 50mM NaH_2PO_4 , pH8,0. Após a sonicação e a centrifugação da cultura induzida, uma alíquota das respectivas frações solúvel (sobrenadante) e insolúvel (*pellet*) foram analisadas em gel SDS-PAGE 12%. A figura 10 mostra a solubilidade da proteína E2 recombinante com o protocolo padronizado.

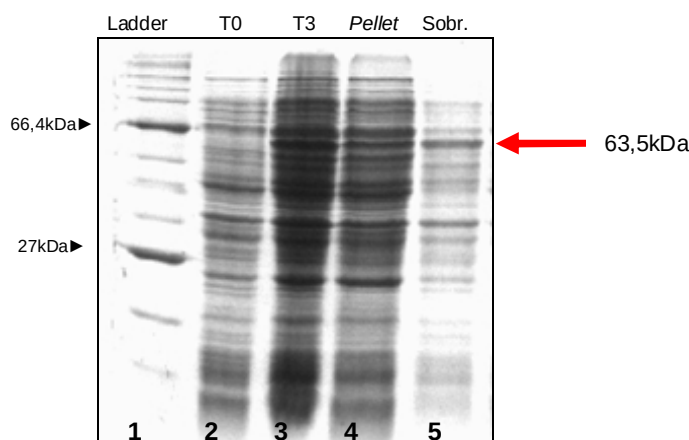


Figura 10: Gel SDS-PAGE 12%, corado com *Coomassie blue*, destacando (seta) a presença da proteína E2 recombinante (63,5kDa) no sobrenadante e no *pellet* da cultura induzida à 37°C – 250rpm, durante 3h. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *Protein Marker Broad Range* (2 - 212 kDa) – *Biolabs*. Canaleta 2: T0 - tempo zero (antes do início da indução). Canaleta 3: T3 – 3h após o início da indução. Canaleta 4: *Pellet*. Canaleta 5: Sobrenadante. A seta indica a banda correspondente à proteína E2 de aproximadamente 63,5kDa (GST = 26kDa, 6xHisTag = 1kDa, E2 = 36,5kDa).

A figura 10 mostra a presença da proteína E2 recombinante tanto no *pellet* (canaleta 4) quanto no sobrenadante (canaleta 5), em proporções semelhantes, havendo proteína na forma solúvel no sobrenadante. A indução realizada à temperatura de 37°C e 250rpm durante 3h apresentou boa expressão da proteína. Ao aumentarmos a quantidade de tampão de lise para sonicar a amostra, de 5 para 10mL, observamos um aumento na solubilidade da proteína de interesse (canaleta 5 – sobrenadante), apesar do *pellet* (canaleta 4) ainda apresentar proteína insolúvel.

A amostra foi purificada por técnica de cromatografia de afinidade em coluna de níquel (Ni-NTA *Superflow Qiagen*) conforme protocolo sugerido pelo fabricante, e os gradientes resultantes deste processo foram analisados por SDS-PAGE 12%, onde foi possível concluir que esta metodologia não foi satisfatória para a purificação da proteína de interesse, já que bandas na altura esperada para a proteína não foram observadas no gel. Estas bandas só foram observadas na membrana resultante do processo de *western blot*, mas com uma fraca intensidade (dados não mostrados). Desta forma, optou-se pela purificação por afinidade com resina de glutationa e o resultado está apresentado na figura 11.

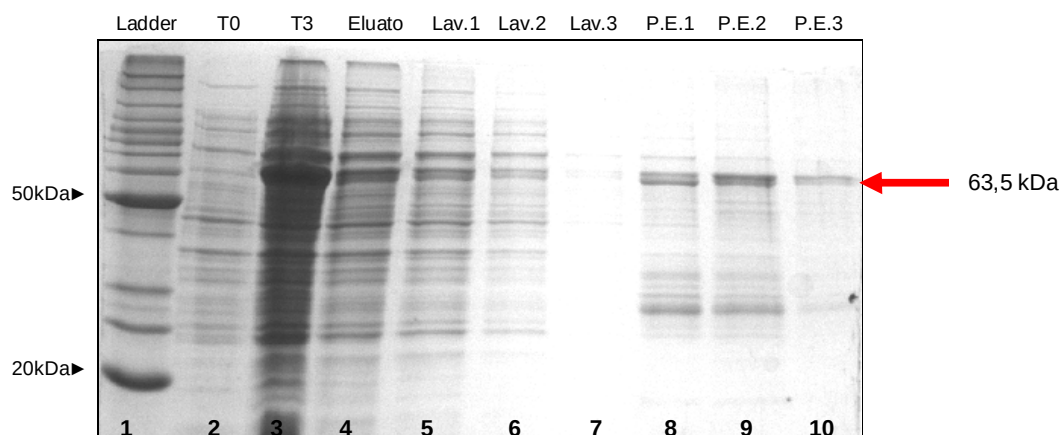


Figura 11: Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da purificação da proteína E2 recombinante, fusionada à his tag e à GST, por afinidade com resina de glutaciona, em diferentes gradientes de purificação, após indução padronizada à 37°C – 250rpm - 3h, e sonicação com tampão de lise contendo 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 50mM NaH₂PO₄, pH8,0. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *BenchMark™ Protein Ladder* (10 - 220 kDa) - *Invitrogen*. Canaleta 2: T0 – tempo zero. Canaleta 3: T3 - 3h após o início da indução. Canaleta 4: Eluato. Canaleta 5: lavagem 1. Canaleta 6: lavagem 2. Canaleta 7: lavagem 3. Canaleta 8: proteína eluída 1. Canaleta 9: proteína eluída 2. Canaleta 10: proteína eluída 3. A seta indica a banda correspondente à proteína E2 de aproximadamente 63,5kDa (GST = 26kDa, 6xHisTag = 1kDa, E2 = 36,5kDa).

Na figura 11 podemos observar uma banda correspondente ao peso molecular de 63,5kDa nas proteínas eluídas 1, 2 e 3, indicando ser a proteína E2 recombinante purificada. Estas frações citadas apresentam não somente a banda correspondente à proteína de interesse mas também outras sugestivas de degradação da proteína de interesse. Também pode-se observar que parte da proteína expressa foi perdida no eluato e nas lavagens, o que demonstra que nem todas as proteínas fusionadas à GST ligaram-se à resina.

Mediante estes resultados, realizou-se uma reação de *Western blot* com todos os gradientes da purificação por coluna de glutaciona para verificar se as bandas de peso molecular inferiores à da proteína de interesse (63,5kDa) eram produtos de degradação desta. A foto da membrana de PVDF transferida com as alíquotas da purificação da proteína E2 está apresentada na figura 12.

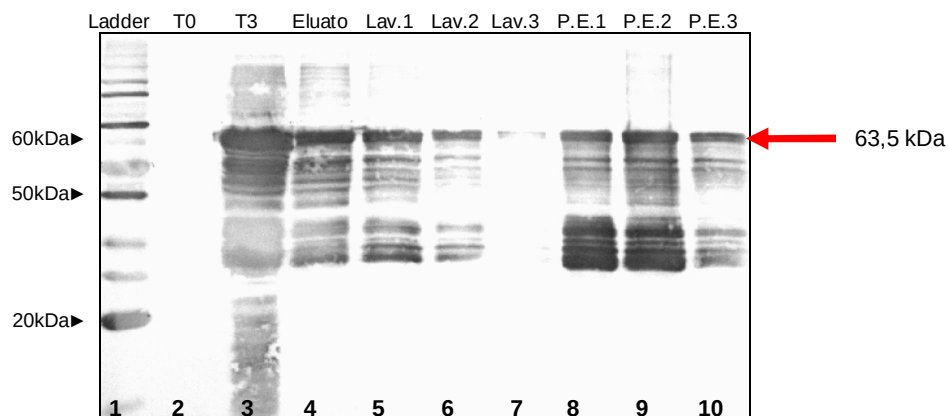


Figura 12: Membrana de PVDF transferida com os gradientes de purificação da proteína E2 recombinante, em resina de glutaciona, resultante do ensaio de *Western Blot*. Proteínas resultantes da indução à 37°C – 250rpm – 3h. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *BenchMark™ Protein Ladder* (10 - 220 kDa) -

Invitrogen. Canaleta 2: T0: tempo zero. Canaleta 3: T3 - 3h após a indução. Canaleta 4: Eluato. Canaleta 5: lavagem 1. Canaleta 6: lavagem 2. Canaleta 7: lavagem 3. Canaleta 8: proteína eluída 1. Canaleta 9: proteína eluída 2. Canaleta 10: proteína eluída 3. A seta indica a banda correspondente à proteína E2 de aproximadamente 63,5kDa (GST = 26kDa, 6xHisTag = 1kDa, E2 = 36,5kDa).

Ao analisar a figura 12 podemos observar a presença da proteína E2 recombinante em todas as canaletas, com exceção de T0, pois existe uma marcação na altura de 63,5kDa correspondente à proteína de interesse. A análise da membrana também nos permite dizer que as bandas de pesos moleculares inferiores à 63,5kDa e purificadas juntamente com a proteína de fusão GST-E2 são decorrentes de um processo de degradação da proteína em questão.

Considerando que muita proteína estava sendo perdida no eluato e nas lavagens pelo fato de parecer que elas não estavam se ligando à resina de níquel e de glutatona, foi realizado um teste de ligação a estas resinas, demonstrando que a proteína apresentava baixa afinidade pelas resinas, por isso da perda no eluato e na lavagem. Inferiu-se que tal afinidade poderia estar sendo influenciada pelo tampão de lise, então foi realizada uma diálise, segundo metodologia descrita por Sambrook et al., 2001, em tampão PBS pH8,0 do material resultante da centrifugação após sonicação. O material resultante da diálise foi purificado por coluna de resina de níquel e por afinidade por resina de glutatona e a purificação foi analisada em gel SDS-PAGE 12%, demonstrando que a troca de tampões não melhorou a afinidade da proteína pelas resinas. Como o problema não foi resolvido e, além disso, muitas bandas de diferentes pesos moleculares contaminavam (produtos de degradação) a amostra purificada, as proteínas eluídas foram reunidas e dialisadas em tampão PBS pH8,0, como já descrito anteriormente, e em seguida foram purificadas por coluna de níquel (*Ni-NTA Superflow*, *Qiagen*) utilizando o protocolo fornecido pelo fabricante e analisadas em SDS-PAGE 12%, como pode ser observado na figura 13.

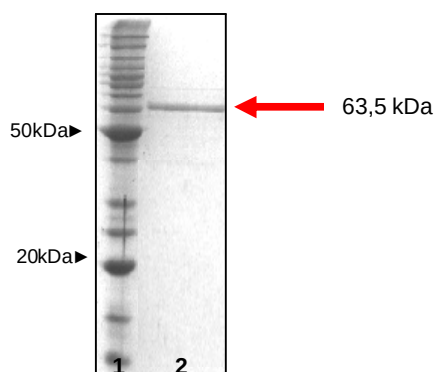


Figura 13: Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da re-purificação da proteína E2 recombinante, fusionada à histidina e à GST, após diálise e purificação em coluna de níquel. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *BenchMark™ Protein Ladder* (10 - 220 kDa) - *Invitrogen*. Canaleta 2: proteína E2B. A seta indica a banda correspondente à proteína E2 de aproximadamente 63,5kDa (GST = 26kDa, 6xHisTag = 1kDa, E2 = 36,5kDa).

Ao analisarmos a figura 13, podemos constatar que a re-purificação da proteína tornou a amostra muito mais pura e limpa das bandas contaminantes (produtos de degradação). Esta mesma amostra foi submetida ao ensaio de *western blot* utilizando anticorpos monoclonais anti-his tag, demonstrando a marcação da banda de interesse correspondente à proteína e de uma

pequena quantidade de degradação da mesma (figura 14, canaleta 3). Desta forma, considerou-se que a proteína estava purificada o suficiente para ser usada nos testes biológicos.

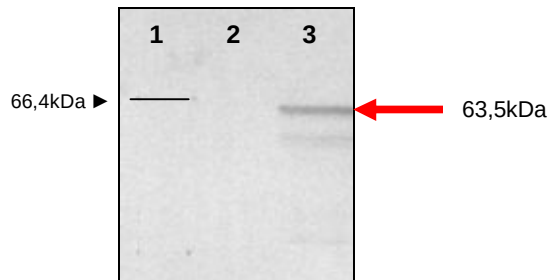


Figura 14: Membrana de PVDF (PVDF Transfer Membrane 0,45 μ M – Thermo Scientific), resultante da reação de Western Blot, transferida com a proteína E2 recombinante produzida em *E. coli*, após re-purificação. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *Protein Marker Broad Range* (2 - 212 kDa) - *Biolabs*. Canaleta 2: controle negativo da reação. Canaleta 3: proteína E2 recombinante produzida em *E. coli* com 63,5kDa (GST = 26kDa, 6xHisTag = 1kDa, E2 = 36,5kDa).

4.1.7. QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA EXPRESSA

A proteína E2 recombinante re-purificada foi dialisada em tampão PBS pH 8,0 e quantificada através do kit *Pierce® BCA Protein Assay Kit*, em espectrofotômetro à 562nm e o resultado foi comparado com a curva de calibração, então a concentração foi calculada e obteve-se o valor de 1000 μ g/mL, que demonstrou-se satisfatória para os testes biológicos.

4.2. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA E2 RECOMBINANTE DO HCV EM LEVEDURA (*Pichia pastoris*)

4.2.1. ANÁLISE DO FRAGMENTO A SER CLONADO EM *Pichia pastoris*

A PCR padronizada para amplificação da região de interesse, a partir do cDNA, para produção da proteína E2 recombinante em *P. pastoris* foi analisada em gel de agarose 1%, como mostra a figura 15.

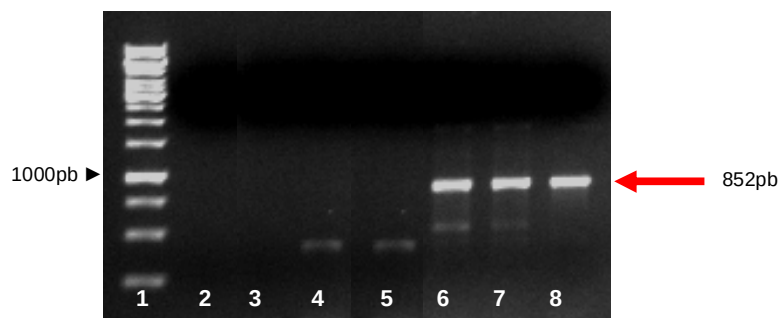


Figura 15: Perfil eletroforético dos produtos de PCR para amplificação da sequência correspondente à proteína E2 (852pb) por PCR em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5mg/mL, tampão TAE e tensão de 100V. Canaleta 1: Marcador do número de pares de bases (100pb). Canaleta 2: controle negativo. Canaletas 3, 4 e 5: amostras não amplificadas. Canaletas 6, 7 e 8: amostras amplificadas. am. = amostra.

Analisando a figura 15, observamos nas canaletas de 6 a 8 fragmentos amplificados com o

tamanho esperado para a proteína de interesse, aproximadamente 852pb. Estes produtos foram purificados e o perfil apresentado no gel de agarose 1% demonstrou uma boa qualidade, integridade e concentração de 100ng/μL, sendo adequados para ser utilizado na etapa seguinte.

O inserto E2 foi clivado e ligado nos vetores pPICZαA e pGAPZαA também digeridos, e os vetores recombinantes foram transformados em bactérias *E. coli* linhagem DH5α CaCl₂ competentes. As colônias transformantes foram avaliadas quanto à aquisição dos vetores através de PCR, sendo seu produto submetido à eletroforese em gel de agarose 1% para análise da amplificação e confirmação dos clones transformantes. A figura 16A apresenta o resultado da PCR de colônias transformantes com o vetor pGAPZαA e a figura 16B com o vetor pPICZαA recombinantes com o inserto E2.

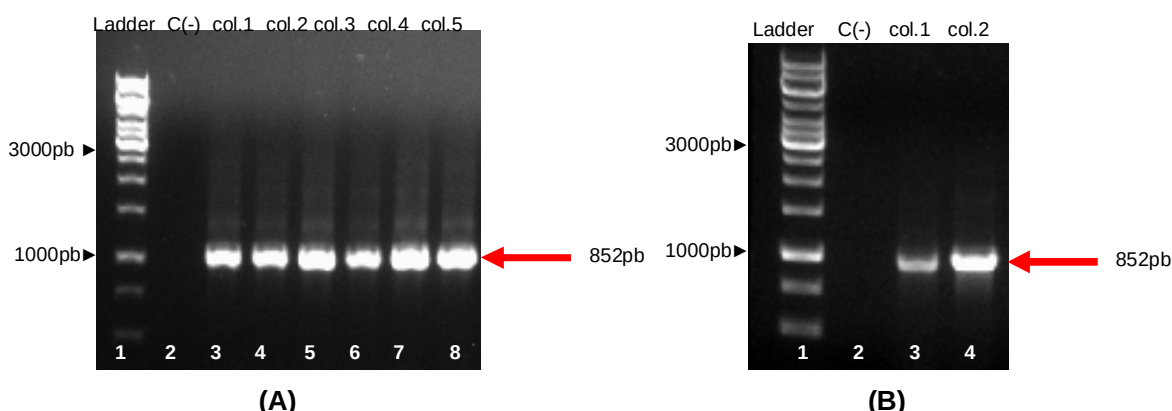


Figura 16: Perfil eletroforético dos produtos de PCR de colônias de bactérias *E. coli* linhagem DH5α CaCl₂ competentes, transformadas com os vetores pGAPZαA (em **A**) e pPICZαA (em **B**) recombinantes para verificação da amplificação da sequência correspondente ao inserto E2 (852pb) em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5mg/mL, tampão TAE e tensão de 100V. Canaleta 1: Marcador do número de pares de bases (1Kb) (*GeneRuler™ 1Kb ladder* – Fermentas). Canaleta 2: controle negativo da reação de PCR. Canaletas de 3 a 8: colônias transformadas. A seta indica a banda correspondente ao fragmento da proteína E2.

Analisando a figura 16A, podemos observar que as colônias 1 a 5 adquiriram o vetor pGAPZαA recombinante, sendo que o mesmo ocorreu com as colônias 1 e 2 que adquiriram o vetor pPICZαA recombinante na figura 16B, pois observa-se a presença de uma banda com aproximadamente 852pb que é correspondente ao inserto de interesse.

Uma colônia de cada vetor foi escolhida para extração dos vetores recombinantes, e estes foram clivados com as enzimas de restrição *EcoR* I e *Xba* I para a confirmação da presença do inserto de interesse no vetor, e então submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, o resultado pode ser observado na figura 17.

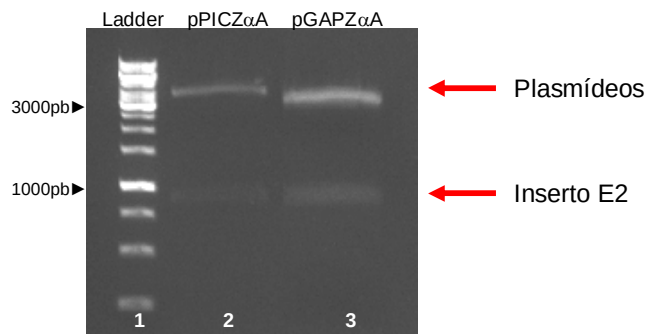


Figura 17: Perfil eletroforético dos vetores pPICZ α A e pGAPZ α A recombinantes clivados com as enzimas de restrição *EcoR I* e *Xba I*, em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio 0,5mg/mL, tampão TAE e tensão de 100V. Canaleta 1: Marcador do número de pares de bases (1Kb) (*GeneRuler™ 1Kb ladder* – *Fermentas*). Canaleta 2: banda correspondente ao vetor pPICZ α A (aproximadamente 3,6Kb) e banda correspondente ao inserto E2 (852pb). Canaleta 3: banda correspondente ao vetor pGAPZ α A (aproximadamente 3,1Kb) e banda correspondente ao inserto E2 (852pb).

Analisando a figura 17 é possível observar que os dois vetores apresentavam o inserto correspondente à proteína E2, pois após a clivagem observa-se a presença de duas bandas, uma referente ao vetor e outra ao inserto de 852pb. Os vetores recombinantes também foram seqüenciados para análise, e demonstraram após alinhamento no sistema BLAST, similaridade com a sequência referente ao vírus da Hepatite C subtipo 1a, depositada no banco de dados do NCBI sob número de acesso M67463 (bem como em: NC_004102 e AF009606), e estarem clonados de forma adequada no vetor.

Os vetores recombinantes pGAPZ α A e pPICZ α A foram linearizados e podem ser observados na figura 18, que apresenta o perfil eletroforético de tais vetores em gel de agarose 1%.

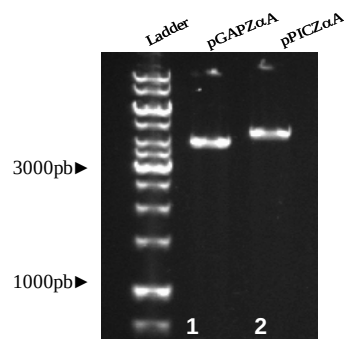


Figura 18: Perfil eletroforético dos vetores pGAPZ α A e pPICZ α A recombinantes linearizados respectivamente com as enzimas *Pme I* e *BspHI* (*Pag I*), em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5mg/mL, tampão TAE e tensão de 100V. Canaleta 1: Marcador do número de pares de bases (1Kb) (*GeneRuler™ 1Kb ladder* – *Fermentas*). Canaleta 2: banda correspondente ao vetor pGAPZ α A recombinante (aproximadamente 3,1Kb) linearizado. Canaleta 3: banda correspondente ao vetor pPICZ α A recombinante (aproximadamente 3,6Kb) linearizado.

Pelo perfil eletroforético e peso molecular das bandas conclui-se que os vetores foram linearizados.

4.2.2. SCREENING PARA *P. pastoris* PORTADORAS DE pGAPZ α A RECOMBINANTE

As alíquotas dos sobrenadantes das colônias de *P. pastoris* transformadas com o vetor recombinante pGAPZ α A (ou seja, contendo o inserto E2) e crescidas em placa de cultura de 24 orifícios estéril, com meio líquido YEPD e Zeocina®, retiradas após 48 e 96hs de crescimento foram adicionadas de tampão de amostra 3x. O resultado do *screening* de colônias produtoras da proteína foi analisado em gel SDS-PAGE 12%, onde foram aplicados 10 μ L de *ladder* e 20 μ L de amostra, para realização da corrida eletroforética. As colônias de 1 a 22 foram analisadas, e foi observada a presença de bandas muito discretas referentes às colônias 4, 6, 9, 21 e 22, nos 2 tempos analisados, além da banda do controle positivo. As amostras que apresentaram bandas mesmo que muito discretas foram submetidas ao ensaio de *Western Blot*.

A figura 19A apresenta o gel SDS-PAGE 12% resultante do *screening* dos sobrenadantes após 96hs de indução e a figura 19B, a membrana transferida com os mesmos sobrenadantes das colônias que apresentaram banda no gel.

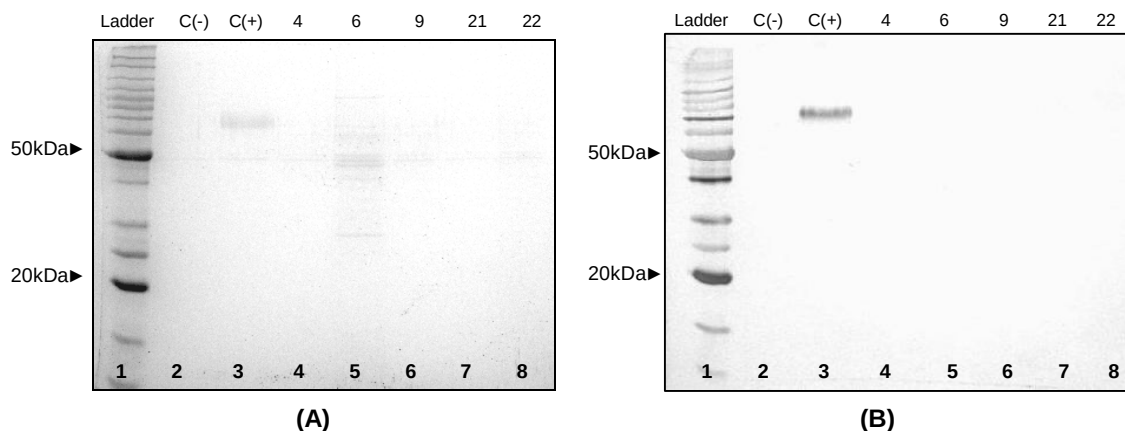


Figura 19: (A) Perfil eletroforético do gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado do *screening* para pGAPZ α A recombinante, 96hs após o início do crescimento, das colônias que apresentaram banda nos géis anteriores. Eletroforese em tampão de cuba (Tris 0,125M, glicina 0,96M, SDS 0,1% pH 8,3); tensão 120V; gel corado com *Coomassie Blue* e descorado com solução de ácido acético 7%. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *BenchMark™ Protein Ladder* (10 - 220 kDa) - *Invitrogen*. Canaleta 2: controle negativo. Canaleta 3: controle positivo. Canaletas 4 à 8: amostras 4, 6, 9, 21 e 22 respectivamente. **(B)** Membrana transferida com o sobrenadante do *screening* de 96hs das colônias que apresentaram banda nos géis anteriores. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *BenchMark™ Protein Ladder* (10 - 220 kDa) - *Invitrogen*. Canaleta 2: controle negativo. Canaleta 3: controle positivo (60kDa). Canaletas 4 à 8: amostras 4, 6, 9, 21 e 22 respectivamente.

A figura 19(A) revela a presença de bandas muito discretas em todas as canaletas correspondentes às amostras. A figura 19(B) apresenta a membrana resultante do ensaio de *western blot*, onde observamos que não houve reatividade em nenhuma canaleta, demonstrando que as bandas observadas nos géis anteriores não correspondiam à proteína E2 recombinante. Desta forma sugere-se que as bandas observadas possam ser resultado de contaminação bacteriana e que a proteína de interesse não foi expressa.

4.2.3. SCREENING PARA *P. pastoris* PORTADORAS DE pPICZ α A RECOMBINANTE E PRODUÇÃO EM LARGA ESCALA

Foi realizado um *screening* nas colônias de *P. pastoris* portadoras do vetor pPICZ α A recombinante (pPICZ α A+E2), para análise da produção da proteína de interesse. Após 120hs de indução em meio líquido com 0,75% de metanol, uma alíquota do sobrenadante de cultura de cada orifício da placa foi adicionada de tampão de amostra 3x e aquecida à 100°C. O resultado do *screening* das colônias foi analisado em gel SDS-PAGE 12%, onde foram aplicados 10 μ L de *ladder* e 20 μ L de amostra. As colônias de 1 a 21 foram observadas para a presença de bandas, sendo encontradas de forma muito discreta nas canaletas referentes às colônias 5, 11 e 13, e também no controle positivo (banda mais evidente), resultados não apresentados. As amostras que apresentaram estas bandas foram submetidas ao ensaio de *Western Blot*, mas não foi observada reatividade, demonstrando novamente que as bandas observadas nos géis anteriores não correspondiam à proteína E2 recombinante, sugerindo que as bandas observadas pudessem ser resultantes de contaminação bacteriana e que a proteína E2 não foi expressa. Desta forma, várias alterações no protocolo de indução foram realizadas, como tempo (até 144h), temperatura (20°C, 26°, 30°C) e pH (4,0 e 6,0). Assim, uma das colônias positivas no *screening* à pH 4,0 e à 30°C foi escolhida e submetida à indução em larga escala sob estas mesmas condições, sendo assim foi possível observar as bandas no gel SDS-PAGE 12% nos diferentes tempo de indução.

A figura 20 apresenta o gel SDS-PAGE 12% dos sobrenadantes resultantes dos vários tempo de indução em pH4,0 e à 30°C.

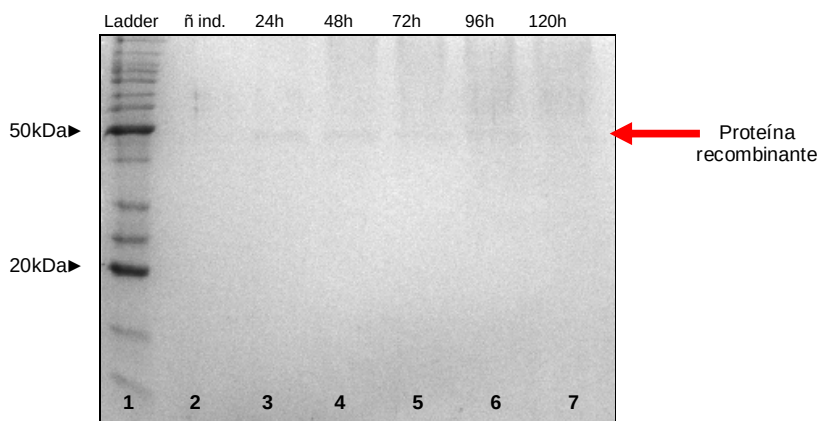


Figura 20: Perfil eletroforético do gel SDS-PAGE 12% mostrando a banda supostamente correspondente à proteína de interesse, glicosilada e fusionada a 6xHisTag, com 50kDa (6xHisTag = 1kDa, E2 = 49kDa), após a indução utilizando o vetor pPICZ α A recombinante em *Pichia pastoris* sob pH 4,0, 30°C nos diferentes tempo de indução. Eletroforese em tampão de cuba (Tris 0,125M, glicina 0,96M, SDS 0,1% pH8,3); tensão 120V; gel corado com *Coomassie Blue* e descorado com solução de ácido acético 7%. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *BenchMark™ Protein Ladder* (10 - 220 kDa) - *Invitrogen*. Canaleta 2: sobrenadante antes do início da indução. Canaleta 3: sobrenadante das colônias após 24h de indução. Canaleta 4: sobrenadante após 48h de indução. Canaleta 5: sobrenadante após 72h de indução. Canaleta 6: sobrenadante após 96h de indução. Canaleta 7: sobrenadante após 120h de indução.

Ao analisar a figura 20 observamos a presença de bandas nas canaletas correspondentes às amostras induzidas sugerindo se tratar da proteína de interesse glicosilada, pois esta é a única

proteína secretada pela levedura por apresentar sinal de secreção em sua sequência gênica, além de apresentar aproximadamente o peso molecular estimado para a proteína E2 recombinante glicosilada (50kDa). Na membrana resultante do WB foi possível observar bandas muito discretas (dados não apresentados).

4.2.4. PURIFICAÇÃO PROTÉICA POR COLUNA DE NÍQUEL (Ni-NTA)

O sobrenadante da cultura após ser dialisado e concentrado em tampão PBS pH8,0 (para aumentar a afinidade pela resina de purificação pois no pH4,0 a afinidade é muito reduzida) foi submetido à purificação em coluna de níquel, utilizando-se diferentes concentrações de tampão com imidazol. Todos os gradientes de eluição foram analisados em gel SDS-PAGE 12%, sendo possível a observação de uma banda correspondente à proteína E2 na fração de 100mM de imidazol. Esta fração foi dialisada em tampão PBS pH8,0 e submetida à análise em gel SDS-PAGE 12% e *Western blot*, como pode ser observado nas figuras 21A e 21B respectivamente.

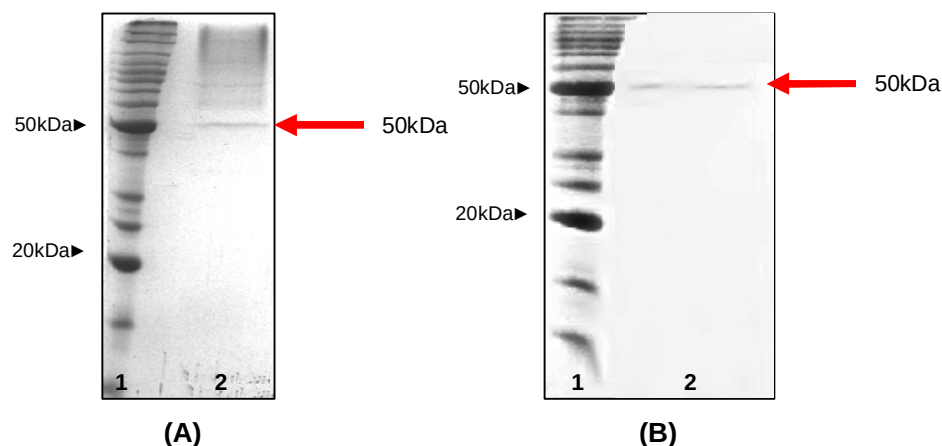


Figura 21: (A) Perfil eletroforético do gel SDS-PAGE 12% mostrando a proteína E2 recombinante produzida em *P. pastoris* após ser purificada em coluna de níquel. Eletroforese em tampão de cuba (Tris 0,125M, glicina 0,96M, SDS 0,1% pH 8,3); tensão 120V; gel corado com *Coomassie Blue* e descorado com solução de ácido acético 7%. (B) Membrana resultante do ensaio de *western blot* transferida com a mesma proteína. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *BenchMark™ Protein Ladder* (10 - 220 kDa) - *Invitrogen*. Canaleta 2: proteína purificada. A seta indica a banda correspondente à proteína E2, glicosilada e fusionada à 6xHisTag, com aproximadamente 50kDa (6xHisTag = 1kDa, E2 = 49kDa).

Analisando a figura 21 podemos observar a presença de uma banda com aproximadamente 50kDa correspondente à proteína E2, que foi quantificada pelo kit *Pierce® BCA Protein Assay Kit* e apresentou uma concentração de 500µg/mL.

A diferença no peso molecular da proteína E2 produzida em *E. coli* (63,5kDa → GST = 26kDa + 6xHisTag = 1kDa + E2 = 36,5kDa) e da produzida em *P. pastoris* (50kDa → 6xHisTag = 1kDa + E2 = 49kDa) corresponde à glicosilação.

4.3. IMUNORREATIVIDADE DA PROTEÍNA E2 RECOMBINANTE COM SORO HUMANO POSITIVO PARA HCV

Para verificar se anticorpos presentes no soro humano de indivíduos infectados com o vírus da hepatite C crônica eram capazes de reconhecer a proteína E2 recombinante produzida em

sistema de expressão procarioto (E2B) e eucarioto (E2L), foi realizado um ensaio de *Western Blot*, utilizando as proteínas purificadas e um *pool* de soros humanos positivos para HCV constituente do controle interno positivo (pertencente ao Laboratório de Imunologia Clínica do NAC) diluído 1:20 e 1:100 em solução de bloqueio, para a verificação da imunorreatividade da proteína em questão. Além de um controle negativo da reação, utilizando *pool* de soros negativos para o HCV e outras doenças infecciosas (constituintes do controle interno negativo do mesmo laboratório). A figura 22 mostra o resultado desta reação para a proteína produzida em bactéria (E2B) e a figura 23 para a produzida em levedura (E2L):

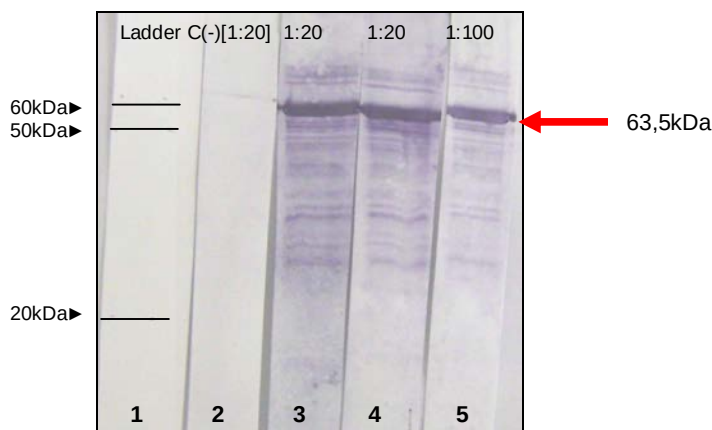


Figura 22: Tiras de membrana de PVDF transferidas com proteína E2 recombinante, produzida em *E. coli* linhagem Rosetta (E2B) através de ensaio de *western blot* e reagidas com diluições (1:20 e 1:100) de soro humano positivo para HCV. C(-) [1:20]: soro humano negativo para HCV e outras doenças infecciosas testadas, diluído 1:100 em solução de bloqueio. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *BenchMark™ Protein Ladder* (10 - 220 kDa) - *Invitrogen*. Canaleta 2: *pool* de soros controle negativos diluído 1:100. Canaletas 3 e 4: *pool* de soros positivos para HCV diluído 1:20 em solução de bloqueio. Canaleta 5: *pool* de soros positivos para HCV diluído 1:100 em solução de bloqueio. A seta indica a banda correspondente à proteína E2 recombinante com aproximadamente 63,5kDa (GST= 26kDa, 6xHisTag = 1kDa, E2 = 36,5kDa).

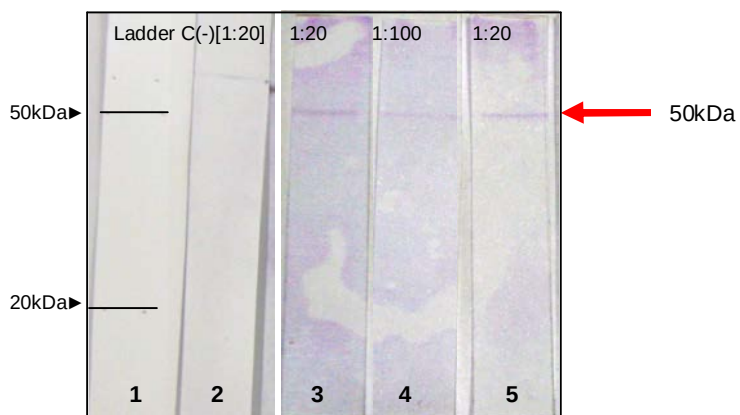


Figura 23: Tiras de membrana de PVDF transferidas com proteína E2 recombinante, produzida em *P. pastoris* (E2L), através de ensaio de *western blot* e reagidas com diluições (1:20 e 1:100) de soro humano positivo para HCV. C(-) [1:20]: soro humano negativo para HCV e outras doenças infecciosas testadas, diluído 1:100 em solução de bloqueio. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *BenchMark™ Protein Ladder* (10 - 220 kDa) - *Invitrogen*. Canaleta 2: *pool* de soros controle negativos diluído 1:100. Canaletas 3 e 5: *pool* de soros positivos para HCV diluído 1:20 em solução de bloqueio. Canaleta 4: *pool* de soros positivos para HCV diluído 1:100 em solução de bloqueio. A seta indica a banda correspondente à proteína E2 recombinante com aproximadamente 50kDa (6xHisTag = 1kDa, E2 = 49kDa).

Após a análise das membranas observa-se que as proteínas E2 apresentam imunorreatividade frente ao *pool* de soros de indivíduos infectados com o vírus da hepatite C diluídos 1:20 e 1:100 (canaletas 3, 4 e 5). A mesma imunorreatividade não é observada no controle negativo (canaleta 2), mostrando a sua especificidade.

4.4. ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DA LIGAÇÃO DAS PROTEÍNAS E2 RECOMBINANTES AOS RECEPTORES DE SUPERFÍCIE CELULAR

4.4.1. DEMONSTRAÇÃO DA LIGAÇÃO DA PROTEÍNA E2 RECOMBINANTE NA SUPERFÍCIE DE CÉLULAS ENDOTELIAIS-LIKE - ECV304 - ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

No ensaio de ligação das proteínas E2 recombinantes (E2B e E2L) com receptores de superfície da célula ECV304 (mantidas em meio com SFB), foi possível observar a reação de imunofluorescência na superfície das células que foram incubadas com as respectivas proteínas.

Na figura 24 podemos observar a fluorescência das células ECV304 após incubação: em (A) somente com as proteínas E2B, (B) proteínas E2B adicionadas de LDL, (C) somente com as proteínas recombinantes E2L, (D) proteínas E2L adicionadas de LDL. Em (E): controle negativo das reações de IFI, onde não foi adicionada nenhuma proteína, somente os outros componentes da reação, para descartar a possibilidade de uma ligação inespecífica pelos anticorpos tanto do soro do paciente portador de HCV como do anticorpo secundário marcado com FITC.

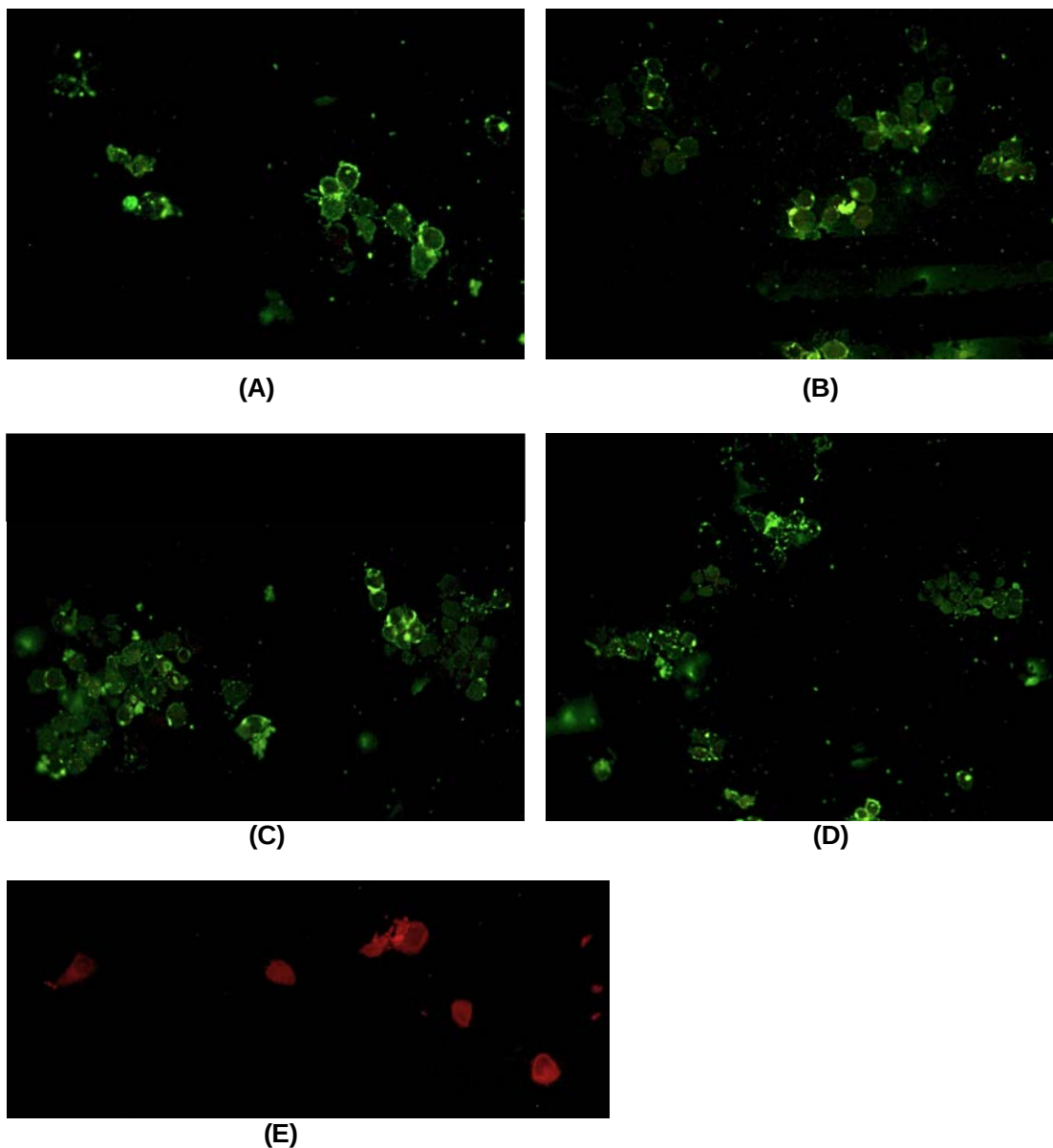


Figura 24: Células ECV304 (mantidas em meio RPMI com 10% de SFB) visualizadas em microscópio de fluorescência em várias condições de ligação das proteínas E2 recombinantes aos receptores de superfície e reação com anti-IgG humana conjugada com FITC. Aumento de 400x. Condições: **(A)** após ligação das proteínas E2B aos receptores de superfície celular; **(B)** após ligação das proteínas E2B incubadas com LDL aos receptores de superfície celular; **(C)** após ligação das proteínas E2L aos receptores de superfície celular; **(D)** após ligação das proteínas E2L incubadas com LDL, aos receptores de superfície celular. **(E)** Lâmina representativa do controle negativo da reação de IFI, observada em microscópio de fluorescência.

O ensaio de IFI foi feito de duas formas diferentes para a fixação das células ECV304 à lâmina, por *CitoSpin* ou citocentrifugação e por formação de tapete celular em lamínula circular dispostas em placas de cultura celular. O ensaio de IFI foi realizado igualmente para as duas formas de fixação das células à lâmina, mas ao final, o método de fixação na lamínula circular em cultura apresentou melhor resultado. Apesar da dificuldade de fixação do tapete celular à lamínula, onde na tentativa variou-se os fixadores (paraformaldeído 4% e metanol). Na figura 24 podemos observar a ligação das proteínas E2B e E2L aos receptores de superfície das células ECV304. A intensidade da fluorescência da ligação da proteína produzida em bactéria (E2B) aos

receptores de superfície, e portanto não glicosilada, foi a mesma da produzida pelas proteínas expressas em levedura (E2L) e portanto glicosilada, assim como a intensidade das proteínas com e sem incubação com LDL não foi alterada. Desta forma, não se observou diferença entre as variações nos experimentos. A figura 24E representa os controles negativos da reação (somente células, células e LDL, somente soro, células e anticorpo secundário), mostrando que os anticorpos anti-HCV presentes no soro do paciente e os anticorpos secundários não reconheceram inespecificamente qualquer estrutura celular ou componentes da reação, pois não se observou fluorescência.

4.4.2. IMUNOFENOTIPAGEM CELULAR

A figura 25 apresenta os histogramas resultantes do ensaio de imunofenotipagem dos receptores CD81 (TAPA-1) e R-LDL, por citometria de fluxo, das células ECV304:

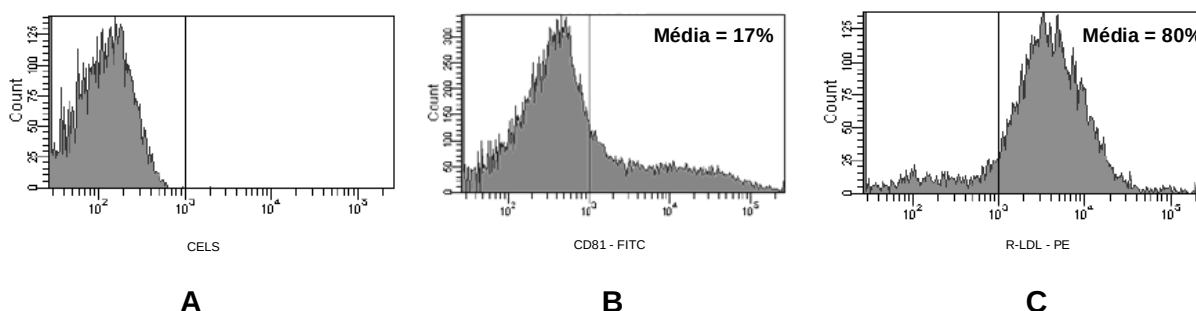


Figura 25: Ensaio de imunofenotipagem dos receptores de superfície, R-LDL e CD81 (TAPA-1), das células ECV304, através de citometria de fluxo. Os histogramas representam os resultados obtidos em: **A:** Apenas células (controle da reação); **B:** Imunofenotipagem do CD81 (anticorpo anti-CD81 conjugado com FITC); **C:** Imunofenotipagem do R-LDL (anticorpo anti-R-LDL conjugado com PE). *FACSCanto BD, FACSDiva software, Versão 6.1.3.*

Ao analisar a porcentagem de ligação dos anticorpos às células ECV304 para caracterização dos seus receptores observamos que estas apresentam, como média de todas as repetições deste ensaio, 17% de CD81 e 80% de R-LDL. O experimento foi realizado em triplicata e com repiques celulares diferentes, todos os resultados foram reunidos e a média foi calculada.

A figura 26 apresenta os histogramas resultantes do ensaio de imunofenotipagem dos receptores CD81 (TAPA-1) e R-LDL, por citometria de fluxo, das células HUVEC:

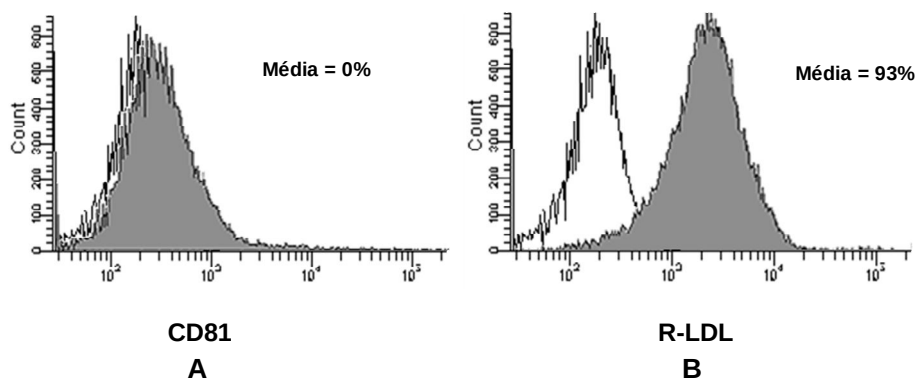


Figura 26: Ensaio de imunofenotipagem dos receptores de superfície, R-LDL e CD81 (TAPA-1), das células HUVEC, através de citometria de fluxo. Os histogramas representam os resultados obtidos em: **A:** Imunofenotipagem do CD81 (anticorpo anti-CD81 conjugado com FITC); **B:** Imunofenotipagem do R-LDL (anticorpo anti-R-LDL conjugado com PE). O pico branco representa o isotipo controle utilizado na calibração do citômetro. O pico cinza representa a fluorescência. *FACSCanto BD, FACSDiva software, Versão 6.1.3.*

As células HUVEC foram imunofenotipadas por citometria de fluxo para caracterização dos receptores CD81 e R-LDL em sua superfície, revelando que estas apresentam como média de todas as repetições deste ensaio 93% de R-LDL, sendo que após análise pode-se dizer que o CD81 não é expresso nas células HUVEC (figura 26A). O experimento foi realizado em triplicata, e com repiques celulares distintos. Todos os resultados foram reunidos e a média da porcentagem de fluorescência dos receptores foi calculada.

4.4.3. ENSAIO DE LIGAÇÃO DAS PROTEÍNAS E2B E E2L AOS RECEPTORES CELULARES

O experimento de ligação das proteínas recombinantes aos R-LDL e CD81 na ausência ou presença de LDL foram realizados por citometria de fluxo, já que a sensibilidade da técnica de IFI não permitiu a observação de diferenças entre as condições estudadas. A figura 27 apresenta os histogramas resultantes do ensaio de ligação das proteínas E2B e E2L, com e sem LDL, aos receptores de superfície, CD81 e R-LDL, das células ECV304, por citometria de fluxo:

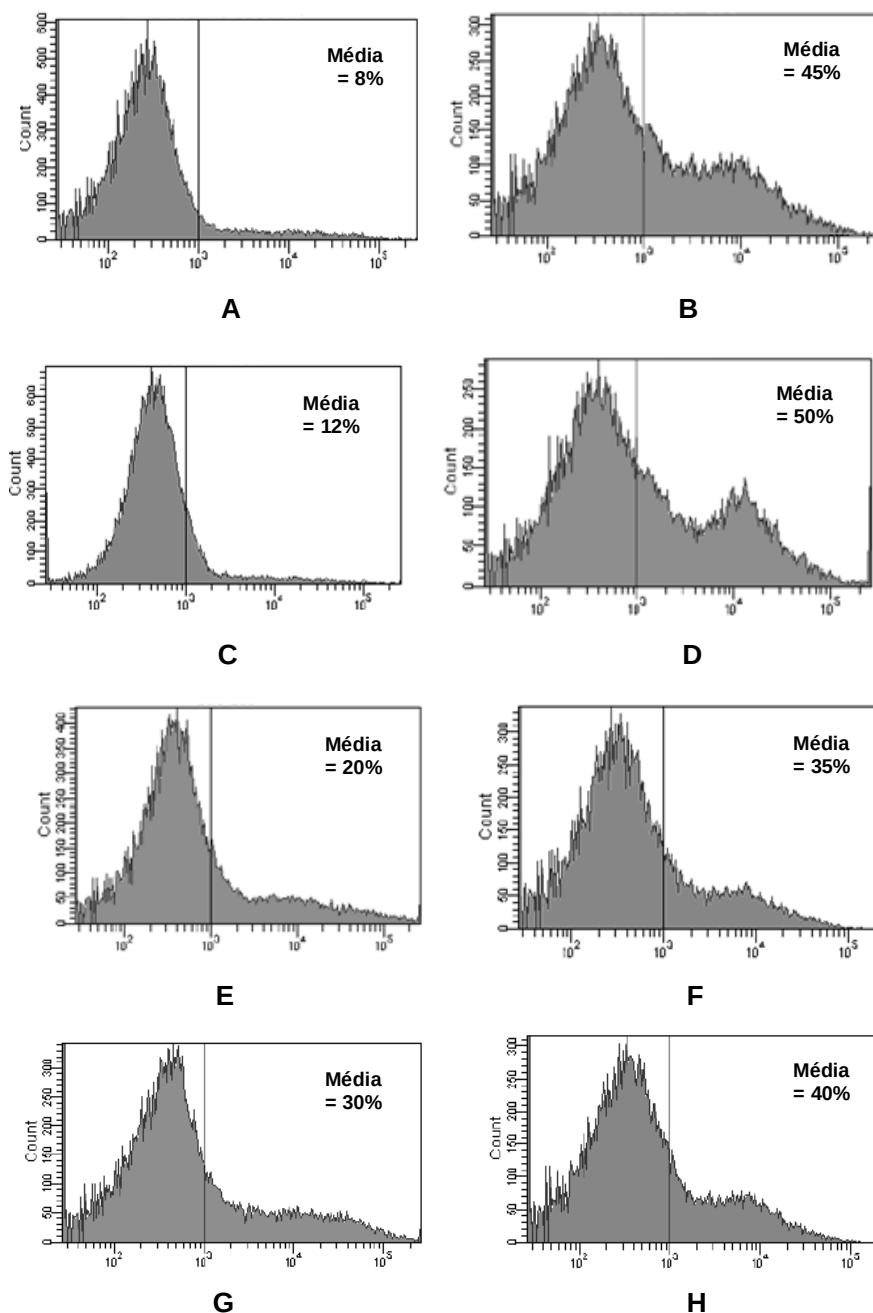


Figura 27: Ensaio de determinação da ligação das proteínas recombinantes E2B e E2L aos receptores de superfície, CD81 e R-LDL, das células ECV304, mantidas com e sem SFB, e na presença ou na ausência de LDL humano. Os histogramas representam os resultados obtidos em: **A:** Ligação da E2B [5 μ g/mL] às células ECV304 mantidas sem SFB. **B:** Ligação da proteína E2B [5 μ g/mL] adicionada de LDL humano [10 μ g/mL] às células ECV304 mantidas sem SFB. **C:** Ligação da proteína E2L [5 μ g/mL] às células ECV304 mantidas sem SFB. **D:** Ligação da proteína E2L [5 μ g/mL] adicionada de LDL humano [10 μ g/mL] às células ECV304 mantidas sem SFB. **E:** Ligação da E2B [5 μ g/mL] às células ECV304 mantidas com SFB. **F:** Ligação da proteína E2B [5 μ g/mL] adicionada de LDL humano [10 μ g/mL] às células ECV304 mantidas com SFB. **G:** Ligação da proteína E2L [5 μ g/mL] às células ECV304 mantidas com SFB. **H:** Ligação da proteína E2L [5 μ g/mL] adicionada de LDL humano [10 μ g/mL] às células ECV304 mantidas com SFB. A ligação das proteínas E2 recombinantes (E2B e E2L), fusionadas à histidina, foi detectada pelo anticorpo anti-his conjugado com APC. FACSCanto BD, FACSDiva software, Versão 6.1.3.

O ensaio teve como objetivo a avaliação da capacidade de ligação das proteínas recombinantes não-glicosiladas (E2B) e glicosiladas (E2L), com e sem LDL, aos receptores das

células ECV304 mantidas em meio de cultura com e sem SFB 10%, para verificação da influência da glicosilação e do LDL nesta ligação. O experimento foi realizado em triplicata e com repiques celulares diferentes, todos os resultados de porcentagem de células ligadas às proteínas, verificadas por citometria de fluxo, foram reunidos e a média foi calculada. Os resultados revelaram que quando as células foram mantidas em meio sem SFB, 8% das células estavam ligadas à proteína E2B (figura 27A), 45% à E2B adicionada de LDL humano (figura 27B), 12% à E2L (figura 27C) e 50% à E2L adicionada de LDL humano (figura 27D). Quando as células ECV304 foram mantidas em meio de cultura contendo 10% de SFB: 20% das células estavam ligadas à proteína E2B (figura 27E), 35% à E2B adicionada de LDL humano (figura 27F), 30% à E2L (figura 27G), 40% à E2L adicionada de LDL humano (figura 27H).

Quando as células ECV304 foram mantidas em meio sem SFB e levando-se em conta apenas a glicosilação, quando comparado com a proteína não-glicosilada, observa-se um aumento de 50% na ligação. Ao analisar o quanto o LDL favorece a ligação, nestas condições (sem SFB) quando comparamos a porcentagem de ligação apenas da proteína E2B e depois a porcentagem da proteína E2B associada à LDL, observa-se um aumento de 462% na porcentagem de ligação à célula. Já quando analisamos a influência do LDL sob a proteína E2L, observa-se um aumento de aproximadamente 316% na porcentagem de ligação da proteína à célula, proporcionado pelo LDL.

Quando as células ECV304 foram mantidas em meio contendo 10% de SFB e levando-se em conta apenas a glicosilação, quando comparado com a proteína não-glicosilada, observa-se um aumento de 50% na ligação. Ao analisar o quanto o LDL favorece a ligação, quando comparamos a porcentagem de ligação apenas da proteína E2B e depois a porcentagem da proteína E2B associada à LDL, observa-se um aumento de 75% na porcentagem de ligação à célula. Já quando analisamos a influência do LDL sob a proteína E2L, observa-se um aumento de aproximadamente 33% na porcentagem de ligação da proteína à célula, proporcionado pelo LDL. Desta forma, em ambos os casos, observa-se um efeito maior do LDL sobre a E2B do que sobre a E2L, além do fato da glicosilação favorecer a ligação da proteína E2L.

A figura 28 mostra as porcentagens de ligação da proteína E2 às células ECV304:

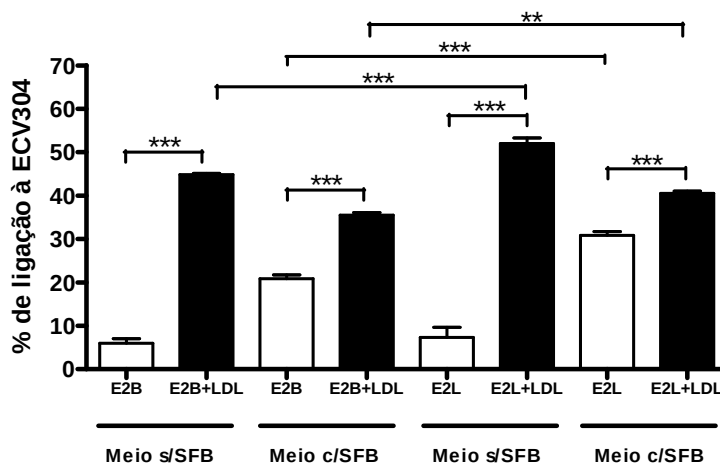


Figura 28: Distribuição percentual da ligação das proteínas E2 recombinantes, E2B e E2L, na presença ou não de LDL, às células ECV304 cultivadas ou não com SFB (10%). Foram utilizados 5µg/mL de cada proteína recombinante e 10µg/mL de LDL. Resultados apresentados em média e desvio padrão. Testes de ANOVA e Tukey para comparações múltiplas - *GraphPad Prism 5*. *** $p < 0,001$: E2B(s/SFB) x E2B+LDL(s/SFB); E2B+LDL(s/SFB) x E2B+LDL(c/SFB); E2B(c/SFB) x E2B+LDL(c/SFB); E2L(s/SFB) x E2L+LDL(s/SFB); E2L+LDL(s/SFB) x E2L+LDL(c/SFB); E2L(c/SFB) x E2L+LDL(c/SFB); E2B(s/SFB) x E2B(c/SFB); E2L(s/SFB) x E2L(c/SFB); E2B+LDL(s/SFB) x E2L+LDL(s/SFB); E2B(c/SFB) x E2L(c/SFB). SFB = soro fetal bovino.

Os resultados de ligação das proteínas recombinantes na presença ou ausência de LDL às células ECV304 mantidas em meio de cultura com e sem SFB foram analisados estatisticamente e mostraram diferenças significativas *** $p < 0,001$, quando comparado ambas as proteínas recombinantes na ausência e na presença de LDL, demonstrando que o LDL aumenta a ligação da proteína E2 às células. Também foi observada diferença estatística ($p < 0,001$) na ligação das proteínas E2B e E2L às células mantidas sem SFB quando comparado com a ligação destas às células mantidas com SFB. Diferença estatística ($p < 0,001$) também foi observada quando ambas as proteínas adicionadas de LDL ligam-se às células mantidas sem SFB comparada à ligação das mesmas com LDL às células mantidas com SFB. Outras combinações também apresentaram a mesma diferença estatística ($p < 0,001$): E2B+LDL(s/SFB) x E2L+LDL(s/SFB); E2B(c/SFB) x E2L(c/SFB); E2B+LDL(s/SFB) x E2L+LDL(s/SFB). Outras diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$) são encontradas entre as combinações: E2B(c/SFB) x E2L(c/SFB); E2B+LDL(c/SFB) x E2L+LDL(c/SFB).

O mesmo ensaio foi utilizado para avaliação da capacidade de ligação das proteínas recombinantes aos R-LDL das células HUVEC, na presença ou ausência de LDL, para verificação da influência da glicosilação e do LDL nesta ligação, os histogramas obtidos estão apresentados na figura 29.

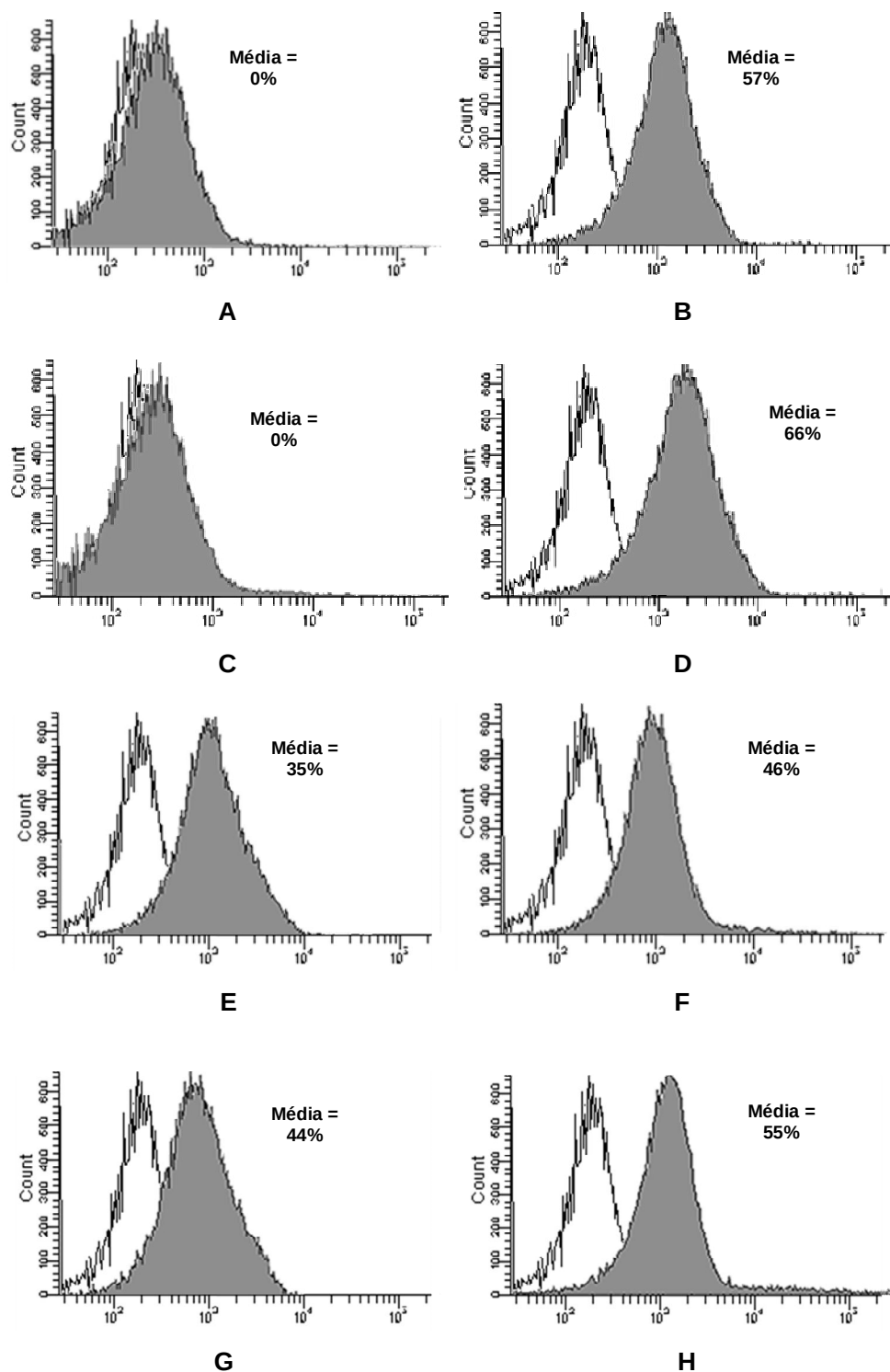


Figura 29: Ensaio de determinação da ligação das proteínas recombinantes E2B e E2L na presença ou ausência de LDL humano aos R-LDL das células HUVEC, mantidas com e sem SFB. Os histogramas representam os resultados obtidos em: **A:** Ligação da E2B [5 μ g/mL] às células ECV304 mantidas sem SFB. **B:** Ligação da proteína E2B [5 μ g/mL] adicionada de LDL humano [10 μ g/mL] às células ECV304 mantidas sem SFB. **C:** Ligação da proteína E2L [5 μ g/mL] às células ECV304 mantidas sem SFB. **D:** Ligação da proteína E2L [5 μ g/mL] adicionada de LDL humano [10 μ g/mL] às células ECV304 mantidas sem SFB. **E:** Ligação da E2B [5 μ g/mL] às células ECV304 mantidas com SFB. **F:** Ligação da proteína E2B [5 μ g/mL] adicionada de LDL humano [10 μ g/mL] às células ECV304 mantidas com SFB. **G:** Ligação da proteína E2L [5 μ g/mL] às células ECV304 mantidas com SFB. **H:** Ligação da proteína E2L [5 μ g/mL] adicionada de LDL humano [10 μ g/mL] às células ECV304 mantidas com SFB. A ligação das proteínas E2 recombinantes (E2B e E2L), fusionadas à histidina, foi detectada pelo anticorpo anti-his conjugado com APC. O pico branco

representa o isotipo controle utilizado na calibração do citômetro que coincide com as células sem marcação. O pico cinza representa a fluorescência. *FACSCanto BD, FACSDiva software, Versão 6.1.3.*

O ensaio foi realizado com células mantidas com e sem SFB 10% e teve como objetivo a avaliação da capacidade de ligação das proteínas recombinantes não-glicosiladas (E2B) e glicosiladas (E2L), com e sem LDL humano, aos receptores das células HUVEC, para verificação da influência da glicosilação e do LDL nesta ligação. O experimento foi realizado em triplicata e com repiques celulares diferentes, todos os resultados de porcentagem de células ligadas às proteínas, verificadas por citometria de fluxo, foram reunidos e a média foi calculada, demonstrando que quando as células foram mantidas em meio sem SFB, nem a E2B e nem a E2L puderam se ligar às células, pois não foi observada fluorescência (figura 29A e 29C respectivamente), entretanto quando LDL humano foi adicionado à reação 57% das células se ligaram à E2B (figura 29B) e 66% à E2L (figura 29D). Quando as células HUVEC foram mantidas em meio com 10% de SFB: 35% das células estavam ligadas à proteína E2B (figura 29E), 46% à E2B adicionada de LDL humano (figura 29F), 44% à E2L (figura 29G), 55% à E2L adicionada de LDL humano (figura 29H).

Quando as células HUVEC foram mantidas em meio sem SFB, a ligação de ambas as proteínas E2 recombinantes só foi possível após a adição de LDL humano, sugerindo que a ligação estava ocorrendo somente no R-LDL já que esta célula não foi fenotipada para CD81. Analisando os resultados obtidos com as células que foram mantidas em meio de cultura contendo 10% de SFB, podemos dizer que a adição de LDL humano favorece a ligação de ambas as proteínas, sendo observado um aumento de 31% para E2B e 25% para E2L. Nestas mesmas condições celulares, quando analisamos a influência da glicosilação na ligação das proteínas aos R-LDL das células HUVEC, observamos um aumento de 25% na ligação. Assim, pode-se dizer que o LDL exerce um efeito maior sobre a E2B do que sobre a E2L, além do fato da glicosilação favorecer a ligação da proteína E2L. Resultados também observados para as células ECV304. Os resultados da ligação à HUVEC encontram-se apresentados na figura 30.

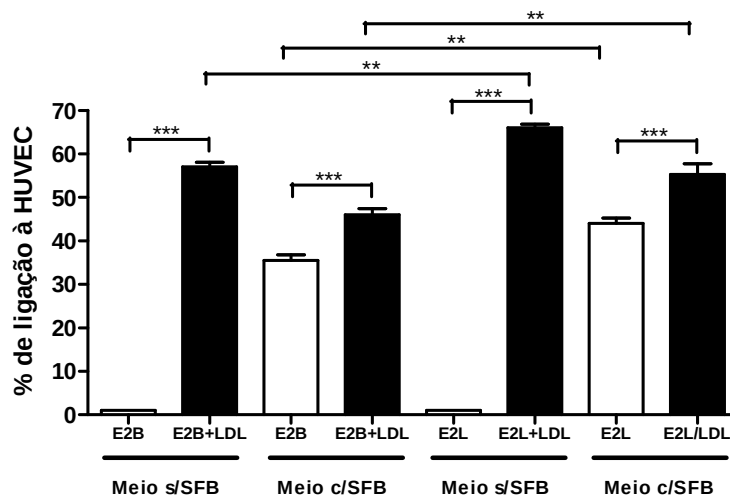


Figura 30: Distribuição percentual da ligação das proteínas E2 recombinantes, E2B e E2L, na presença ou não de LDL, às células HUVEC mantidas ou não com SFB (10%). Foram utilizados 5µg/mL de cada proteína recombinante e 10µg/mL de LDL. Resultados apresentados em média e desvio padrão. Testes de One-Way ANOVA e Tukey para comparações múltiplas - *GraphPad Prism 5*. *** $p < 0,001$: E2B(s/SFB) x E2B+LDL(s/SFB); E2B+LDL(s/SFB) x E2B+LDL(c/SFB); E2B(c/SFB) x E2B+LDL(c/SFB); E2L(s/SFB) x E2L+LDL(s/SFB); E2L+LDL(s/SFB) x E2L+LDL(c/SFB); E2L(c/SFB) x E2L+LDL(c/SFB); E2B(s/SFB) x E2B(c/SFB); E2L(s/SFB) x E2L(c/SFB). SFB = soro fetal bovino.

Os resultados de ligação das proteínas recombinantes na presença ou ausência de LDL às células HUVEC crescidas em meio de cultura com e sem SFB foram analisados estatisticamente e mostraram diferenças significativas ($p < 0,001$), quando comparado ambas as proteínas recombinantes na ausência e na presença de LDL, demonstrando que o LDL aumenta a ligação da proteína E2 às células. Também foi observada diferença estatística ($p < 0,001$) na ligação das proteínas E2B e E2L às células mantidas sem SFB quando comparado com a ligação destas às células mantidas com SFB. Diferença estatística ($p < 0,001$) também foi observada quando ambas as proteínas adicionadas de LDL ligam-se às células mantidas sem SFB comparada à ligação das mesmas com LDL às células mantidas com SFB. Outras diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$) são encontradas entre as combinações: E2B+LDL(s/SFB) x E2L+LDL(s/SFB); E2B(c/SFB) x E2L(c/SFB); E2B+LDL(c/SFB) x E2L+LDL(c/SFB).

4.4.4. ENSAIO DE INIBIÇÃO OU BLOQUEIO DA LIGAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES AOS RECEPTORES DAS CÉLULAS ECV304 E HUVEC

O ensaio de bloqueio foi realizado para verificar a qual receptor as proteínas estavam se ligando. A literatura relata que a proteína E2 pode se ligar tanto ao CD81 quanto ao R-LDL, desta forma esses receptores foram bloqueados, e avaliou-se a ligação das proteínas na presença e na ausência de LDL.

A figura 31 apresenta a comparação das porcentagens de células ECV304 ligadas às proteínas recombinantes:

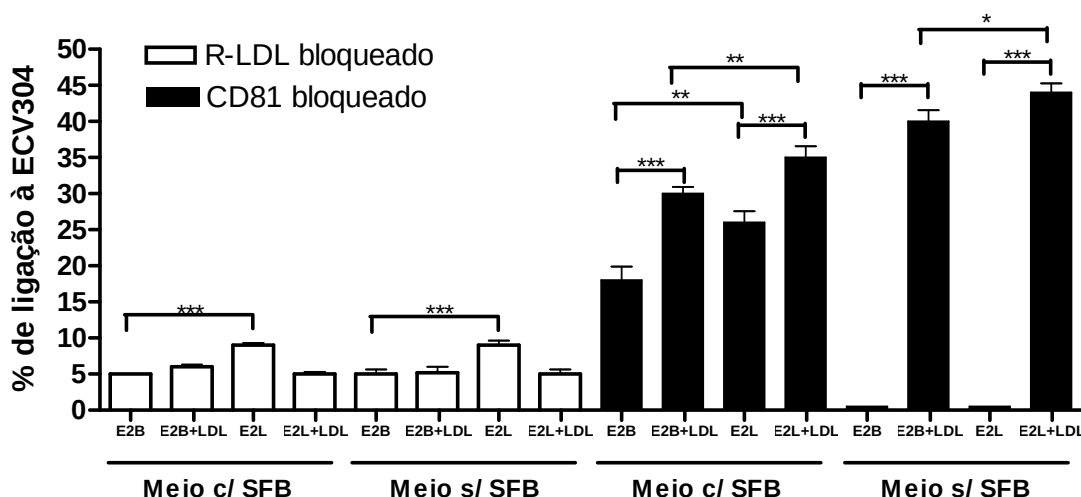


Figura 31: Distribuição percentual da ligação das proteínas E2 recombinantes, E2B e E2L, na presença ou não de LDL, às células ECV304, mantidas com ou sem SFB, bloqueadas para R-LDL ou CD81. Foram utilizados 5µg/mL de cada proteína recombinante e 10µg/mL de LDL. Resultados apresentados em média e desvio padrão. Testes de ANOVA e Tukey para comparações múltiplas - *GraphPad Prism 5*. *** $p < 0,001$: R-LDL bloqueado: E2B(c/SFB) x E2L(c/SFB); E2B(s/SFB) x E2L(s/SFB) e para CD81 bloqueado: E2B(c/SFB) x E2B+LDL(c/SFB); E2B(c/SFB) x E2B(s/SFB); E2B+LDL(c/SFB) x E2B+LDL(s/SFB); E2L(c/SFB) x E2L(s/SFB); E2L+LDL(c/SFB) x E2L+LDL(s/SFB); E2B(s/SFB) x E2B+LDL(s/SFB); E2L(s/SFB) x E2L+LDL(s/SFB). ** $p < 0,01$: E2B(c/SFB) x E2L(c/SFB). SFB = soro fetal bovino.

Quando as células (cultivadas tanto na presença quanto na ausência de SFB) foram bloqueadas simultaneamente para os dois receptores (R-LDL e CD81), não foi detectada fluorescência. Assim, sugere-se que as proteínas E2 recombinantes não estavam se ligando a qualquer outro receptor de superfície das células ECV304.

Os resultados de ligação das proteínas recombinantes às ECV304 na presença ou ausência de LDL, após o bloqueio do R-LDL ou CD81, foram analisados estatisticamente e os resultados demonstraram diferenças significativas ($p < 0,001$) entre as proteínas E2B e E2L quando o R-LDL estava bloqueado, portanto a ligação estava acontecendo no CD81, sugerindo que a glicosilação melhora a afinidade da proteína pelo receptor. Quando as células mantidas em meio com SFB foram bloqueadas para CD81, observamos a ligação tanto de E2B quanto de E2L ao R-LDL, havendo entre elas uma diferença estatística ($p < 0,05$) mostrando mais uma vez o favorecimento da ligação mediado pela glicosilação. Tanto para E2B quanto para E2L observa-se uma melhora na ligação às células ECV304, mantidas em meio com SFB, quando é adicionado LDL à reação.

O ensaio de bloqueio do R-LDL nas células HUVEC foi realizado para verificar se as proteínas E2 recombinantes estavam se ligando apenas a este receptor, já que as células não apresentaram marcação para CD81. Desta forma, o R-LDL foi bloqueado e avaliou-se a ligação das proteínas na presença e na ausência de LDL, além da influência da glicosilação e da cultura celular com e sem SFB, assim as seguintes diferenças foram encontradas: $p < 0,001$: E2B(c/SFB) x E2B+LDL(c/SFB); E2B(c/SFB) x E2B(s/SFB); E2B+LDL(c/SFB) x E2B+LDL(s/SFB); E2L(c/SFB) x E2L(s/SFB); E2L+LDL(c/SFB) x E2L+LDL(s/SFB); E2B(s/SFB) x E2B+LDL(s/SFB); E2L(s/SFB) x

E2L+LDL(s/SFB) e $p < 0,01$: E2B(c/SFB) x E2L(c/SFB).

Os resultados obtidos no ensaio de citometria de fluxo revelaram que quando os R-LDL estão bloqueados, ambas as proteínas recombinantes, na presença ou ausência de LDL não são capazes de se ligarem às células HUVEC cultivadas com ou sem SFB (figura 32).

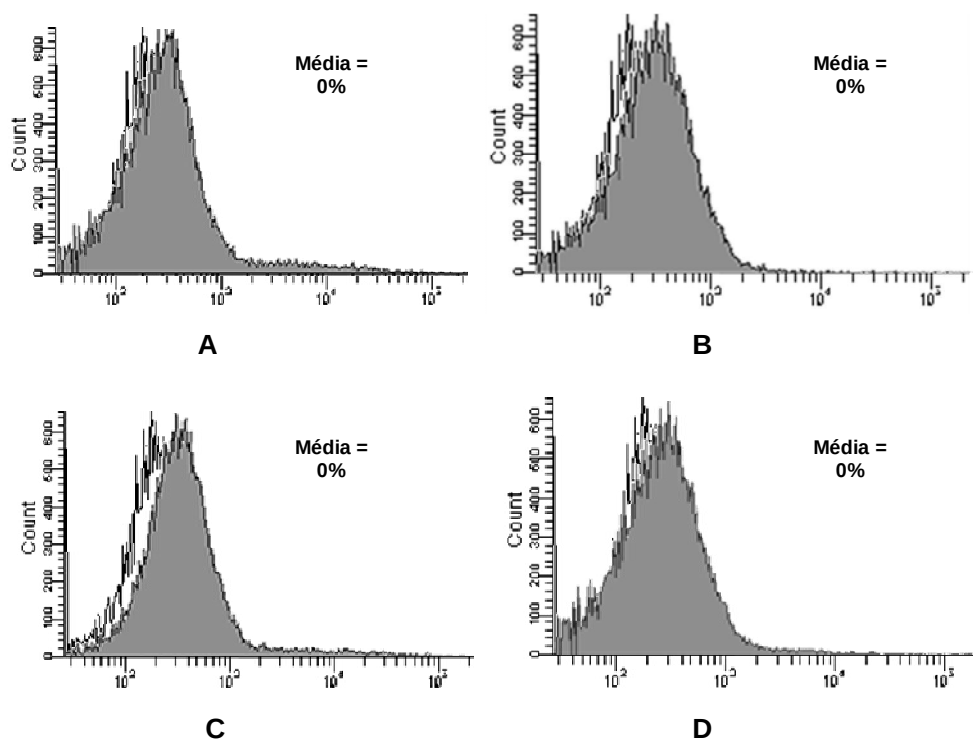
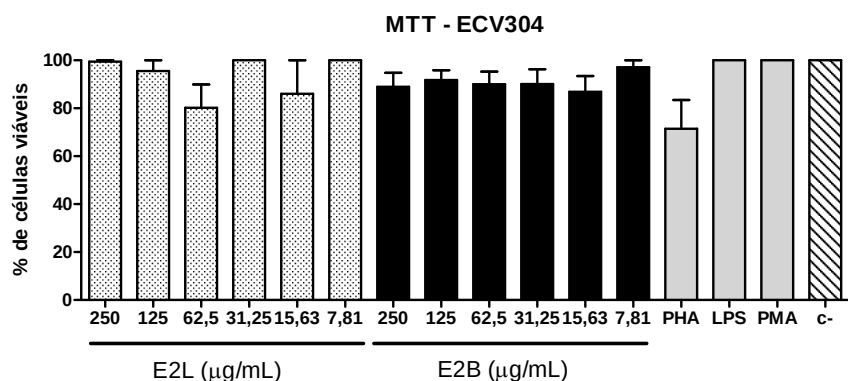


Figura 32: Ensaio de inibição da ligação das proteínas E2 recombinantes, glicosiladas ou não (E2L e E2B respectivamente), aos R-LDL das células HUVEC (cultivadas sem SFB), na presença ou ausência LDL. Os histogramas representam os resultados obtidos em: **A:** Bloqueio do R-LDL e ligação da proteína E2B [5µg/mL]. **B:** Bloqueio do R-LDL e ligação da proteína E2B [5µg/mL] adicionada de LDL [10µg/mL]. **C:** Bloqueio do R-LDL e ligação da proteína E2L [5 µg/mL]. **D:** Bloqueio do R-LDL e ligação da proteína E2L [5µg/m] adicionada de LDL [10µg/mL]. As proteínas recombinantes estavam fusionadas à histidina e foram detectadas pelos anticorpos anti-his conjugados com APC para detecção da ligação. O pico branco representa o isotipo controle utilizado na calibração do citômetro, que coincide com as células sem marcação. O pico cinza representa a fluorescência. *FACSCanto BD, FACSDiva software, Versão 6.1.3.*

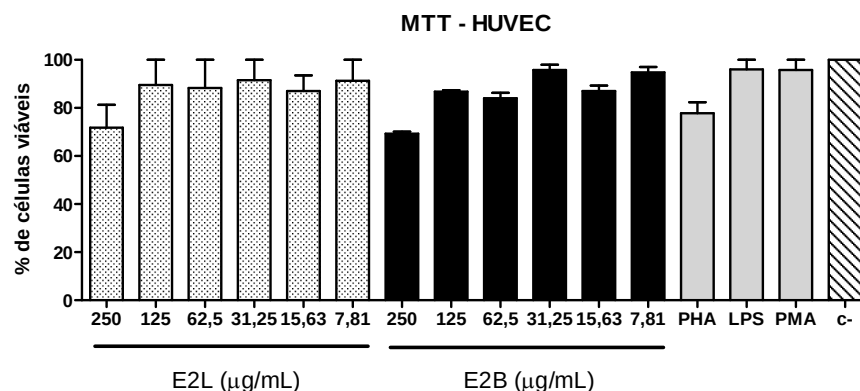
4.5. ENSAIOS DE RESPOSTA CELULAR

4.5.1. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR – MÉTODO MTT

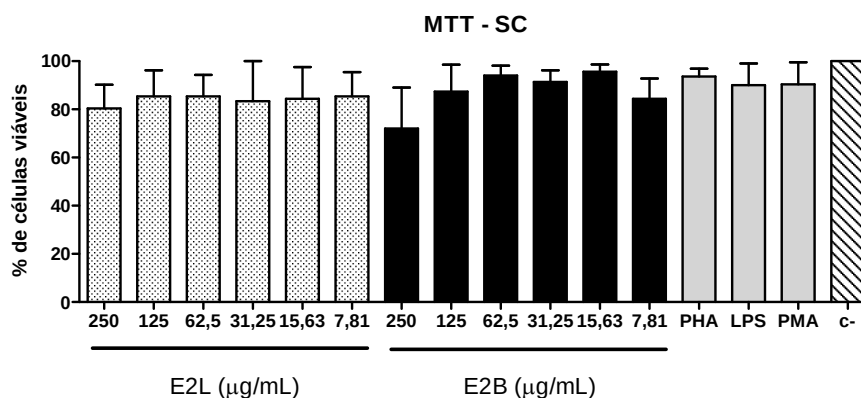
Os testes de MTT para as células ECV304, HUVEC e SC demonstraram como resultado a viabilidade celular em todos os orifícios da placa, em condições onde foram variados o estímulo (proteínas E2B e E2L, PHA, LPS e PMA) e a concentração das proteínas (250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81µg/mL). Em algumas concentrações foi observada morte celular, mas não significativa ($p > 0,05$) quando comparadas ao controle negativo, como pode ser observado na figura 33.



A



B



C

Figura 33: Teste de MTT para avaliação da viabilidade das células ECV304 (A), HUVEC (B) e SC (C) após exposição à vários estímulos (proteínas E2B e E2L, LPS, PMA e PHA) e a diferentes concentrações de proteína E2 (250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81µg/mL). PHA (fitohemaglutinina) [100µg/mL]. LPS (Lipopolissacarídeo) [20µg/mL]. PMA (phorbol 12-myristato 13-acetato) [0,50µM]. C- (controle negativo, apenas meio de cultura). Células por orifício da placa: 1×10^5 . Condições: 24h, 37°C e 5% de CO₂. Resultados expressos em média e desvio padrão de células viáveis (%). *GraphPad Prism 5*.

Analisando os resultados estatísticos obtivemos uma viabilidade mínima para as células ECV304 de $71,49 \pm 20,67\%$ quando exposta à concentração de 100µg/mL de PHA. Para as células HUVEC a viabilidade mínima foi de $69,25 \pm 1,70\%$ quando exposta à concentração de 250µg/mL de E2B. Para as células SC a viabilidade mínima foi de $72,00 \pm 29,55\%$ quando exposta à concentração de 250µg/mL de E2B. Assim, concluímos que as células permaneceram viáveis mesmo após a exposição aos estímulos de PHA, LPS, PMA e proteínas E2L e E2B, por 24hs.

Portanto, deu-se prosseguimento aos ensaios.

4.5.2. AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR POR ANEXINA V E IODETO DE PROPÍDEO

Através do ensaio de Anexina V e do Iodeto de propídeo foi possível observar qual o tipo de morte celular (apoptose precoce, apoptose tardia ou necrose) as proteínas E2 recombinantes em diferentes concentrações e os estímulos-controle são capazes de causar nas células HUVEC. A figura 34 exemplifica o perfil dos resultados obtidos no experimento.

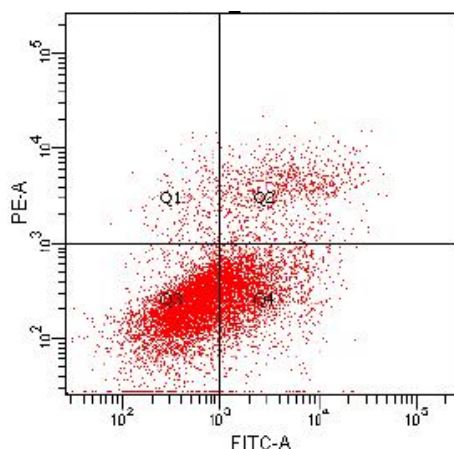


Figura 34: *Dot plot* representativo do ensaio de Anexina V para análise do tipo de morte celular. Q1: células marcadas com PI, portanto em necrose. Q2: células duplo positivas para PI e Anexina V, portanto em apoptose tardia. Q3: células sem marcação, portanto vivas. Q4: células marcadas com Anexina V, portanto em apoptose precoce. *FACSCanto BD, FACSDiva software, Versão 6.1.3.*

Após a análise dos resultados obtidos pode-se inferir que tanto as proteínas E2 recombinantes, em suas diversas concentrações, quanto os estímulos-controle testados apresentam uma porcentagem maior de células em estágio de apoptose precoce (Q4).

A figura 35 apresenta as porcentagens de cada tipo de morte celular para cada concentração das proteínas E2 recombinantes e para os estímulos-controle.

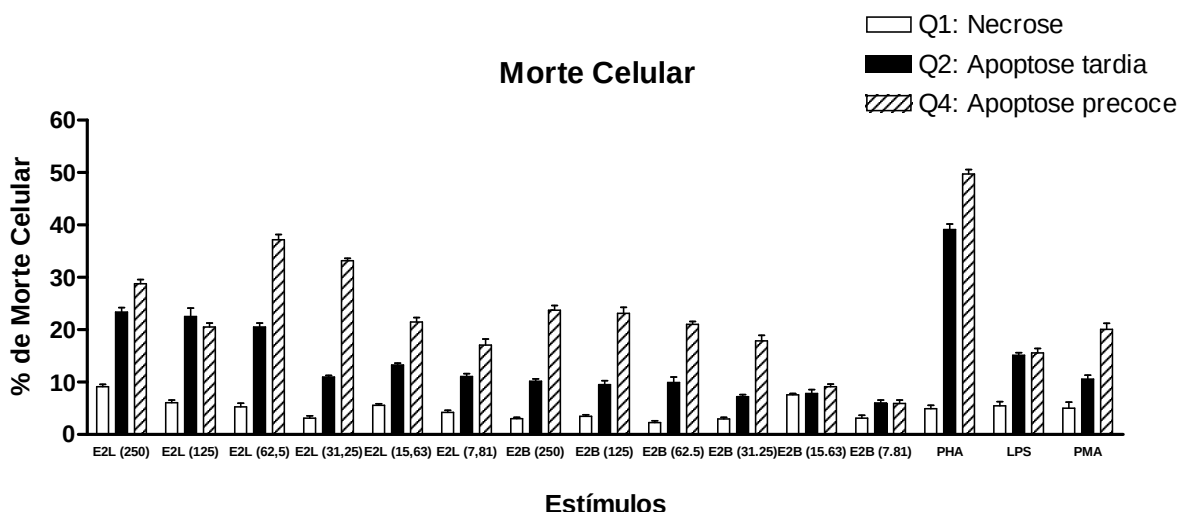


Figura 35: Porcentagens de morte celular (HUVEC) caracterizada por marcação analisada por citometria de fluxo para cada concentração de cada proteína E2 recombinante (E2B e E2L) (250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81 µg/mL) e estímulos-controle: PHA (fitohemaglutinina) [100 µg/mL], LPS (Lipopolissacarídeo) [20 µg/mL] e PMA (phorbol 12-myristato 13-acetato) [0,50 µM]. Condições: 24h, 37°C e 5% de CO₂. Q1: células marcadas com PI, portanto em necrose. Q2: células duplo-positivas para PI e Anexina V, portanto em apoptose tardia. Q3: células sem marcação, portanto vivas. Q4: células marcadas com Anexina V, portanto em apoptose precoce. Resultados apresentados em média e desvio padrão da porcentagem obtida no ensaio. Testes de ANOVA e Tukey para comparações múltiplas - *GraphPad Prism 5*.

Após a análise estatística dos resultados obtidos, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre: Q1 x Q4 ($p < 0,001$), Q1 x Q2 ($p < 0,01$) e Q2 x Q4 ($p < 0,05$). Mostrando que a maior porcentagem de células encontrava-se em apoptose precoce. O fato da maior porcentagem de células apresentarem-se neste estágio pode ser devido ao curto tempo de exposição aos estímulos (24h).

4.5.3. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

Ao analisar os resultados da produção de NO pelas células ECV304, HUVEC e SC frente aos estímulos das proteínas recombinantes (E2B e E2L) em diferentes concentrações (250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81 µg/mL) e de LPS [20 µg/mL], PMA [0,50 µM] e PHA [100 µg/mL], pode-se dizer que pelo método utilizado (Método de Griess) não foi possível detectar a produção de NO pelas células testadas mediante nenhum dos estímulos e concentrações testadas. Entretanto, foi realizado um ensaio utilizando a mesma metodologia empregada para as células anteriormente citadas, mas neste caso com macrófagos peritoneais previamente obtidos de camundongos normais Balb/c, doados pelo Laboratório de Imunologia Clínica da Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos, para verificação da possível geração de NO nestas células quando em contato com as proteínas recombinantes e com os estímulos controle, determinados pelo método de Griess. A figura 36 apresenta a viabilidade celular após exposição aos estímulos e a figura 37 apresenta os resultados de NO.

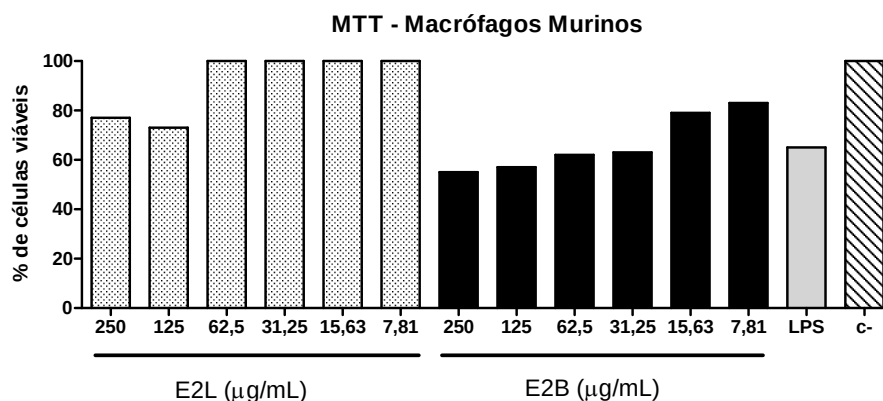


Figura 36: Teste de MTT para avaliação da viabilidade dos macrófagos peritoneais de camundongos após exposição à vários estímulos (proteínas E2B e E2L, e LPS) e a diferentes concentrações de proteína E2 (250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81µg). LPS (Lipopolissacarídeo) [20µg/mL]. C- (controle negativo, apenas meio de cultura). Células por orifício da placa: 1×10^5 . Condições: 24h, 37°C e 5% de CO₂. *GraphPad Prism 5*.

Apesar de não haver resultados suficientes para uma análise mais apurada, pode-se sugerir que quando as células são expostas aos estímulos citados, as concentrações mais altas da proteína recombinante em suas duas formas provocam a morte celular de pelo menos 50% na concentração de 250µg/mL de E2B. A figura 37 mostra o resultado da produção de NO frente aos estímulos testados em macrófagos murinos.

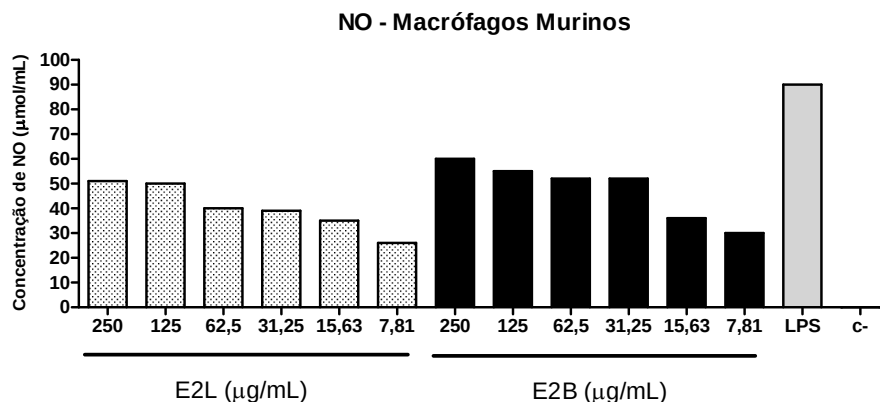


Figura 37: Teste para avaliação da produção de NO em macrófagos peritoneais murinos após exposição à várias concentrações da proteínas E2 recombinantes (E2B e E2L) 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81µg/mL. Método utilizado: Griess. Controle positivo: LPS (Lipopolissacarídeo) [20µg/mL]. C- (controle negativo): apenas células e meio de cultura. Células por orifício da placa: 5×10^5 . Condições: 24h, 37°C e 5% de CO₂. As barras representam os valores de concentração obtidos. As concentrações de nitrito foram obtidas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio (NaNO₂) e os resultados expressos em µmols/mL.

Analisando os resultados de NO, pode-se sugerir que as concentrações mais altas das proteínas induzem uma maior produção de NO quando comparado com o controle negativo. A concentração de 250µg/mL de E2L leva a uma produção de 51,42µmols de nitrito por mL e a mesma concentração de E2B leva a 60,30µmols de nitrito por mL.

Os resultados da determinação de NO através do analisador de NO estão apresentados na figura 38.

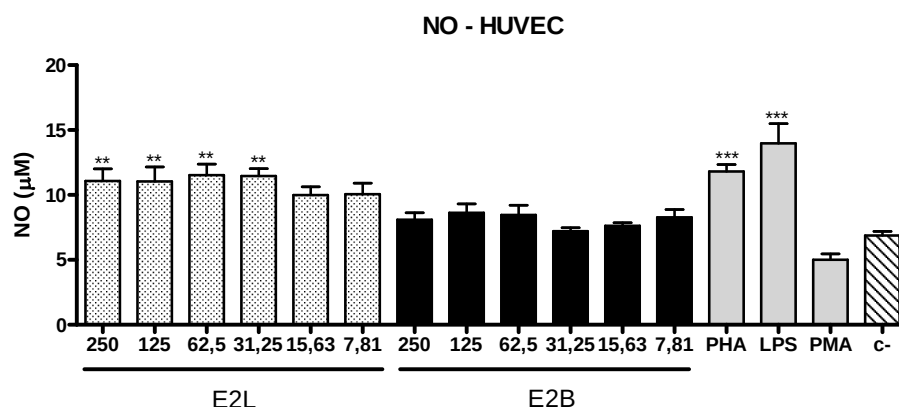
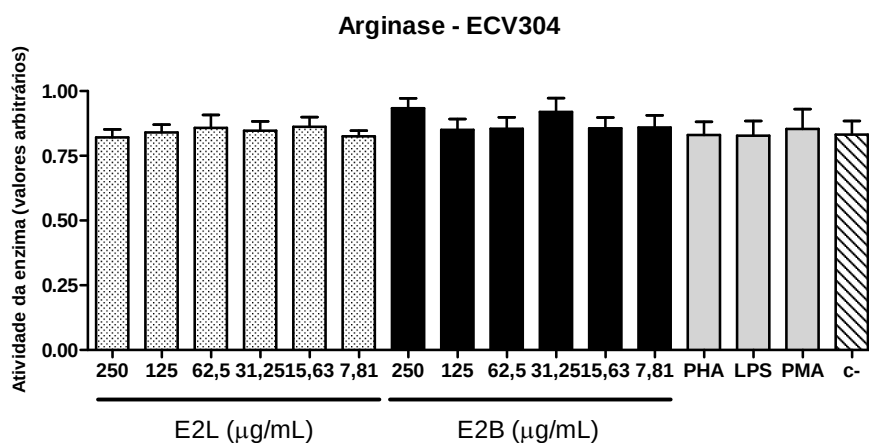


Figura 38: Teste para avaliação da produção de NO por células HUVEC após exposição à várias concentrações da proteínas E2 recombinantes (E2B e E2L) 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81µg/mL e estímulos controle: PHA (fitohemaglutinina) [100µg/mL], LPS (Lipopolissacarídeo) [20µg/mL] e PMA (phorbol 12-myristato 13-acetato) [0,50µM], c- (controle negativo): células e meio de cultura. Células por orifício da placa: 5×10^5 . Condições: 24h, 37°C e 5% de CO₂. Resultados expressos em média e desvio padrão de NO produzidos em µM. Testes de ANOVA e Tukey para comparações múltiplas. Analisador de NO - Sievers Nitric Oxide Analyzer Overview – GE Analytical Instruments, modelo NOA 260i. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ em relação ao controle negativo.

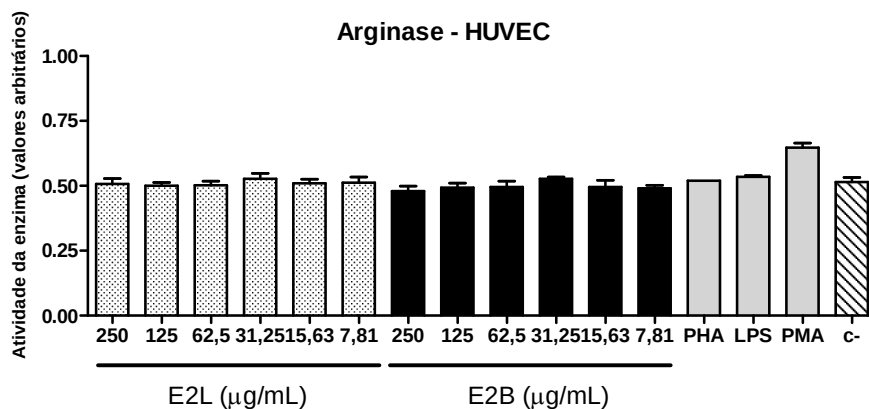
A análise estatística dos resultados obtidos revelou que existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$) entre as concentrações 250, 125, 62,5 e 31,25µg/mL de E2L e o controle negativo. Os controles PHA e LPS demonstraram significância de $p < 0,001$ em relação ao controle negativo. Nenhuma concentração de E2B demonstrou diferença significativa em relação ao controle negativo. As quatro maiores concentrações de E2L (250; 125; 62,5 e 31,25µg/mL) apresentam diferença significativa na produção de NO quando comparadas PMA ($p < 0,001$) e as duas últimas (15,62 e 7,81µg/mL) de $p < 0,01$, mostrando que a proteína induz maior produção de NO do que o PMA. Quando qualquer uma das concentrações de E2B é comparada com LPS observa-se uma diferença estatística de pelo menos $p < 0,01$, mostrando que o LPS induz maior produção de NO do que a E2B. As concentrações de E2L apresentam diferenças estatísticas de pelo menos $p < 0,05$ com as concentrações de E2B, mostrando que a proteína E2L é capaz de induzir maior produção de NO do que a E2B.

4.5.4. ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ARGINASE EM CULTURA DE CÉLULAS ECV304

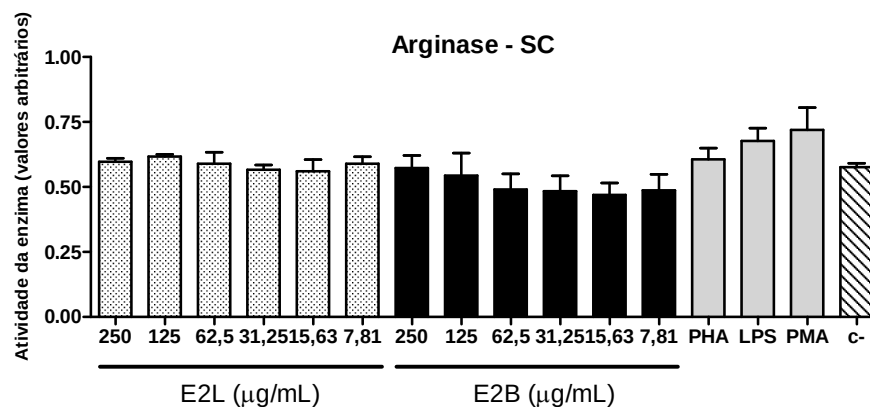
Abaixo se encontram os gráficos relativos à análise estatística da atividade da arginase nas três linhagens celulares estudadas quando estimuladas com a proteína E2 recombinante em suas duas formas e com os estímulos controle.



A



B



C

Figura 39: Teste de determinação da atividade da arginase nas células ECV304 (A), HUVEC (B) e SC (C) após exposição à diferentes estímulos (proteínas E2B e E2L, LPS, PMA e PHA) e à diferentes concentrações de proteínas E2 recombinantes (250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81 µg/mL). PHA (fitohemaglutinina) [100 µg/mL]. LPS (Lipopolissacarídeo) [20 µg/mL]. PMA (phorbol 12-myristato 13-acetato) [0,50 µM]. C- (controle negativo, apenas meio de cultura). Células por orifício da placa: 1×10^5 . Condições: 24h, 37°C e 5% de CO₂. A concentração de uréia foi calculada através de uma curva padrão previamente estabelecida com quantidades conhecidas de uréia. Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 µmol de uréia por minuto. Resultados expressos em média e desvio padrão. Testes de ANOVA e Tukey para comparações múltiplas. PMA apresenta uma atividade significativamente mais alta do que todas as amostras testadas ($p < 0,01$) nas células HUVEC e SC. *GraphPad Prism 5*.

O resultado do ensaio de determinação da arginase em cultura celular revelou que nas células ECV304 e SC não houve alteração significativa ($p>0,05$) na atividade da arginase frente às proteínas E2B e E2L e concentrações testadas, como pode ser observado nas figuras 39A e 39C. A variação nas concentrações das proteínas recombinantes (250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,8 μ g/mL) não foi suficiente para estimular um aumento ou redução notável da atividade da arginase em relação ao controle negativo. Entretanto, quando os resultados são analisados para a célula HUVEC e SC (figura 39B e 39C) observa-se que existe uma diferença estatisticamente significativa de pelo menos $p<0,05$ entre a atividade observada quando as células são estimuladas com PMA (para ambas as células) e com LPS (para SC), comparadas a todas as outras amostras e o controle negativo.

4.5.5. DETERMINAÇÃO DO *BURST* OXIDATIVO CELULAR POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA DEPENDENTE DE LUMINOL

O ensaio de QL dependente de luminol com as células ECV304, HUVEC e SC foi realizado utilizando como estímulos-controle PHA, LPS e PMA, e as proteínas recombinantes E2B e E2L, a fim de caracterizar estas células quanto à capacidade de geração do *burst* oxidativo em resposta aos estímulos citados. Em paralelo como controle da reação, foi realizado um ensaio de QL com neutrófilos já que o *burst* oxidativo para estas células já é bem conhecido. Assim, analisando os resultados obtidos observamos que estas células não apresentaram resposta de *burst* oxidativo dependente de luminol, sugerindo que estes tipos celulares podem não ser capazes de gerar uma resposta como a observada nos neutrófilos estimulados com PMA nestas condições.

4.5.6. ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE H_2O_2 POR CITOMETRIA DE FLUXO

Analisando os *dot plots* obtidos para verificação da produção de H_2O_2 pelas células ECV304 em resposta aos estímulos testados, pode-se inferir que não foi observada produção significativa com nenhum dos estímulos, pois não detectou-se fluorescência significativa resultante da reação do H_2O_2 com o DHR (dihidrorodamina 123) que produz o fluoróforo rodamina 123, como representado pelo *dot plot* da figura 40B.

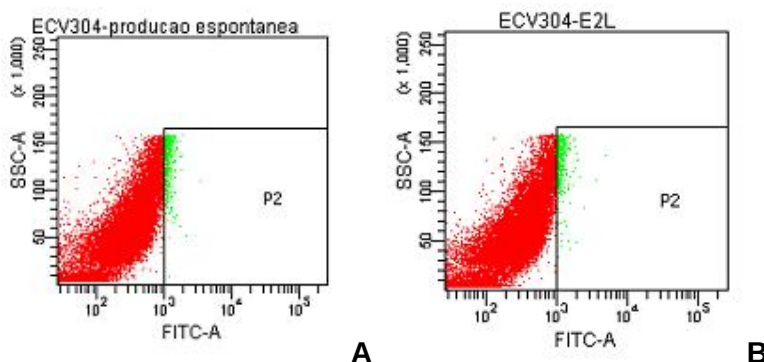


Figura 40: *Dot plots* representativos do ensaio de H_2O_2 com as células ECV304 mediante estímulos-controle (PHA, LPS, PMA) e proteínas E2 recombinantes (E2L e E2B). **A:** *Dot plot* referente à produção espontânea de H_2O_2 pelas células. **B:** *Dot plot* representativo de todos os testes com estímulos em diferentes concentrações e estímulos-controle. FACSCanto BD, FACSDiva software, Versão 6.1.3.

As células HUVEC também foram testadas para a produção de H_2O_2 frente aos mesmos estímulos e nas mesmas concentrações, e esta foi demonstrada. A figura 41 apresenta os resultados obtidos.

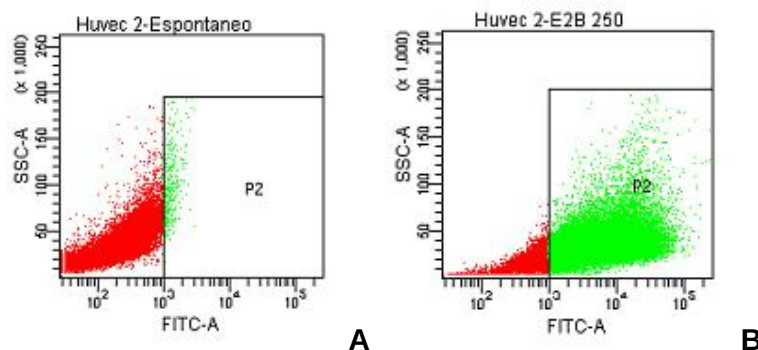


Figura 41: Dot plots representativos do ensaio de H_2O_2 com as células HUVEC mediante estímulos-controle (PHA, LPS, PMA) e proteínas E2 recombinantes (E2L e E2B). **A:** Dot plot referente à produção espontânea de H_2O_2 pelas células. **B:** Dot plot representativo de todos os testes com estímulos em diferentes concentrações e estímulos-controle. FACSCanto BD, FACSDiva software, Versão 6.1.3.

A figura 42 apresenta os resultados do ensaio de H_2O_2 em média de intensidade de fluorescência (MIF), para todos os estímulos testados.

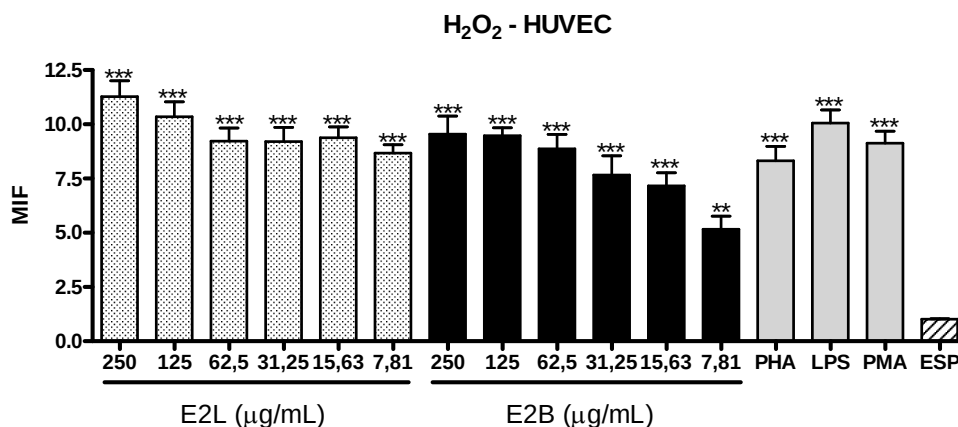


Figura 42: Ensaio de H_2O_2 com as células HUVEC após exposição aos estímulos-controle (PHA, LPS, PMA) e à diferentes concentrações de proteínas E2 recombinantes (E2L e E2B) (250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81 μ g/mL). PHA (fitohemaglutinina) [100 μ g/mL]. LPS (Lipopolissacarídeo) [20 μ g/mL]. PMA (phorbol 12-myristato 13-acetato) [0,50 μ M]. ESP (controle de fluorescência espontânea – células sem estímulo). Condições: 24h, 37°C e 5% de CO_2 . Resultados apresentados em média e desvio padrão da média de intensidade de fluorescência (MIF). Testes de ANOVA e Tukey para comparações múltiplas. GraphPad Prism 5. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ em relação ao ESP.

Após análise estatística encontrou-se uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre todas as concentrações de E2L, de E2B (com exceção para a concentração de 7,81 μ g/mL – $p < 0,01$) e dos estímulos-controle (PHA, LPS, PMA) quando comparadas com a amostra espontânea. Pareando-se as concentrações de E2B e E2L observou-se diferença ($p < 0,05$) apenas na concentração de 7,81 μ g/mL.

Desta forma, observa-se que as proteínas E2 recombinantes e os estímulos-controle são capazes de induzir a produção de H_2O_2 nas células HUVEC.

O resultado do teste de produção de H_2O_2 para as células SC com os mesmos estímulos utilizados com as mesmas linhagens, está representado pelos *dot plots* da figura 43.

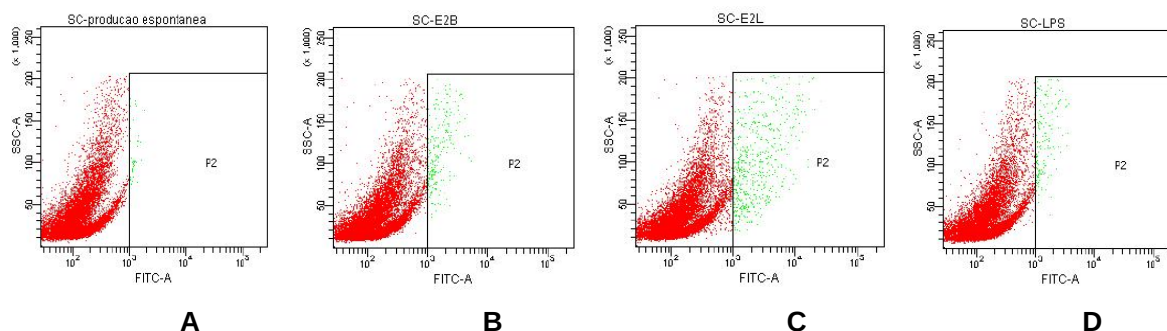


Figura 43: *Dot plots* representativos do ensaio de produção de H_2O_2 com as células SC mediante estímulos-controle (PHA, LPS, PMA) e proteínas E2 recombinantes (E2L e E2B). **A:** *Dot plot* referente à produção espontânea de H_2O_2 pelas células. **B:** *Dot plot* da concentração de 250 μ g/mL de proteína E2B. **C:** *Dot plot* da concentração de 250 μ g/mL de proteína E2L. **D:** *Dot plot* representativo dos estímulos-controle (PHA, LPS e PMA). FACSCanto BD, FACSDiva software, Versão 6.1.3.

Após analisar os resultados obtidos para a célula SC, considerando-se que mesmo estas apresentando uma baixa resposta de produção de H_2O_2 , é sugestivo que a proteína E2L estimule mais as células SC a gerarem uma resposta de produção de H_2O_2 (MIF = 2,152) do que os estímulos-controle (PHA: MIF = 1,225; LPS: MIF = 1,322 e PMA: MIF = 1,319) e do que a proteína E2B (MIF = 1,476). E ainda que a resposta desta à proteína E2B é semelhante à resposta aos estímulos-controle. A figura 44 apresenta os resultados do ensaio de produção de H_2O_2 em média de intensidade de fluorescência (MIF), para todos os estímulos testados.

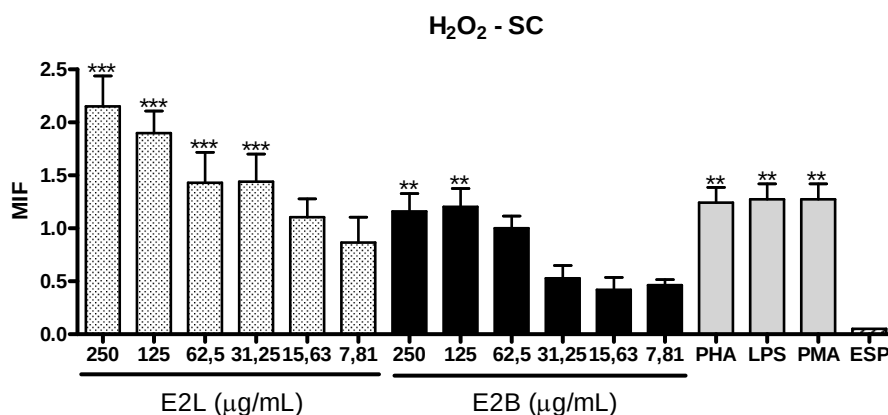


Figura 44: Ensaio de produção de H_2O_2 com as células HUVEC após exposição aos estímulos-controle (PHA, LPS, PMA) e à diferentes concentrações de proteínas E2 recombinantes (E2L e E2B) (250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81 μ g/mL). PHA (fitohemaglutinina) [100 μ g/mL]. LPS (Lipopolissacarídeo) [20 μ g/mL]. PMA (phorbol 12-myristato 13-acetato) [0,50 μ M]. ESP (controle de fluorescência espontânea – células sem estímulo). Condições: 24h, 37°C e 5% de CO_2 . Resultados apresentados em média e desvio padrão da média de intensidade de fluorescência (MIF). *** p <0,001 e ** p <0,01 em relação ao ESP. Testes de ANOVA e Tukey para comparações múltiplas. GraphPad Prism 5.

A análise dos dados revela que existe uma diferença estatística significativa (p <0,05) entre as concentrações de 250 μ g/mL das duas proteínas, assim nesta concentração a proteína E2L

induz uma maior produção de H_2O_2 do que a E2B. As quatro maiores concentrações de E2L apresentam diferença estatística de $p<0,001$ quando comparadas ao controle de produção de H_2O_2 espontâneo. As concentrações de 250 e 125 μ g/mL de E2B apresentam diferença estatística de $p<0,01$ com o espontâneo. PHA, LPS e PMA possuem diferença estatística de $p<0,01$ com o espontâneo.

Assim, observa-se que as proteínas recombinantes e os estímulos-controle são capazes de induzir a produção de H_2O_2 nas células SC, mesmo que em pequena quantidade quando comparada com a resposta produzida nas células HUVEC.

4.5.7. ENSAIO DE DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE IL-8

O resultado de detecção da produção de IL-8 pelas células HUVEC está apresentado no figura 45.

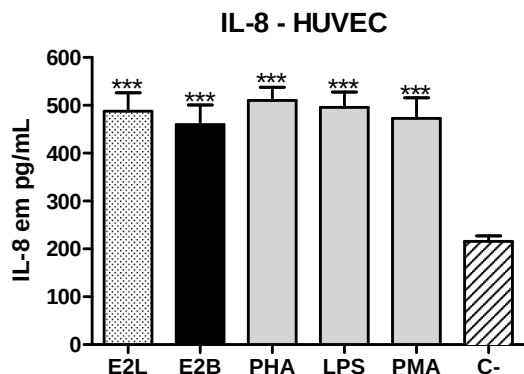


Figura 45: Ensaio de detecção da produção de IL-8 pelas células HUVEC em resposta à exposição aos estímulos-controle (PHA, LPS, PMA) e à concentração de 250 μ g/mL das proteínas E2 recombinantes (E2L e E2B). PHA (fitohemaglutinina) [100 μ g/mL]. LPS (Lipopolissacarídeo) [20 μ g/mL]. PMA (phorbol 12-myristato 13-acetato) [0,50 μ M]. C- (células com meio apropriado e PBS pH7,2). Condições: 24h, 37°C e 5% de CO_2 . Resultados apresentados em média e desvio padrão. Testes de ANOVA e Tukey para comparações múltiplas - *GraphPad Prism 5*. *** $p<0,001$ em relação ao controle negativo.

Após a análise estatística dos resultados obtidos, observa-se uma diferença estatisticamente significativa ($p<0,001$) entre todos os estímulos testados quando comparados ao controle negativo. Demonstrando que os estímulos são capazes de induzir a produção de IL-8 quando comparados com células não estimuladas.

No ensaio realizado com as células SC não foi possível detectar a produção de IL-8, sugerindo que talvez estas células não sejam capazes de produzir IL-8 frente aos estímulos testados ou nas condições do ensaio.

4.5.8. ENSAIO DE DETECÇÃO DE VEGF

Os resultados de detecção de VEGF em resposta aos estímulos-controle e às proteínas recombinantes pelas células HUVEC e SC estão apresentados nas figuras 46 e 47, respectivamente.

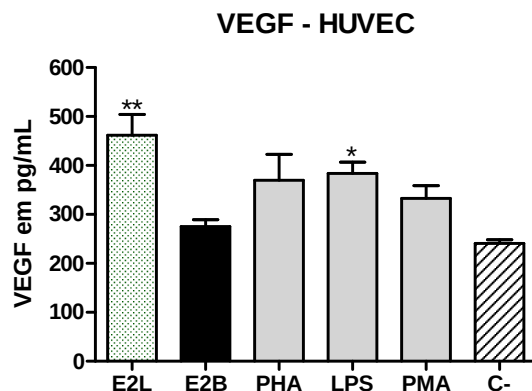


Figura 46: Ensaio de detecção da produção de VEGF pelas células HUVEC em resposta à exposição aos estímulos-controle (PHA, LPS, PMA) e à concentração de 250µg/mL das proteínas E2 recombinantes (E2L e E2B). PHA (fitohemaglutinina) [100µg/mL]. LPS (Lipopolissacarídeo) [20µg/mL]. PMA (phorbol 12-myristato 13-acetato) [0,50µM]. C- (células com meio apropriado e PBS pH7,2). Condições: 24h, 37°C e 5% de CO₂. Resultados apresentados em média e desvio padrão. Testes de ANOVA e Tukey para comparações múltiplas - *GraphPad Prism 5*. ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo.

Analisando os resultados obtidos para produção de VEGF pelas células HUVEC após exposição aos estímulos citados observa-se diferenças estatisticamente significativas de $p < 0,01$ para E2L x E2B e E2L x C- e de $p < 0,05$ para LPS x C-. Demonstrando que a proteína E2L é capaz de induzir uma maior produção de VEGF pelas células HUVEC quando comparada à proteína E2B e ao controle negativo.

As células SC também foram avaliadas quanto à produção de VEGF após exposição às proteínas recombinantes e aos estímulos controle. O resultado está apresentado na figura 47.

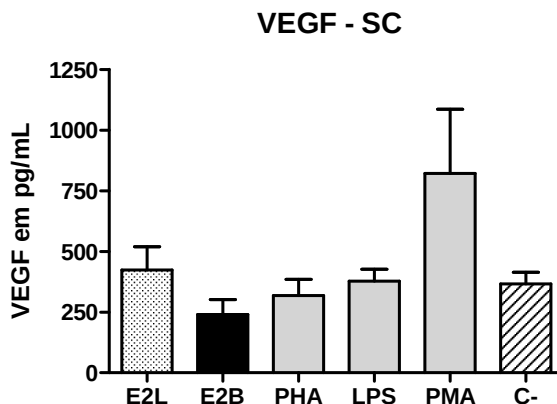


Figura 47: Ensaio de detecção da produção de VEGF pelas células SC em resposta à exposição aos estímulos-controle (PHA, LPS, PMA) e à concentração de 250µg/mL das proteínas E2 recombinantes (E2L e E2B). PHA (fitohemaglutinina) [100µg/mL]. LPS (Lipopolissacarídeo) [20µg/mL]. PMA (phorbol 12-myristato 13-acetato) [0,50µM]. C- (células com meio apropriado e PBS pH7,2). Condições: 24h, 37°C e 5% de CO₂. Resultados apresentados em média e desvio padrão. Testes de ANOVA e Tukey para comparações múltiplas - *GraphPad Prism 5*.

Os resultados obtidos com as células SC para a produção de VEGF frente aos estímulos testados revelam que não existe diferença estatisticamente significativa entre os estímulos e o controle negativo.

5. DISCUSSÃO

O HCV codifica duas glicoproteínas de envelope, E1 e E2, que estão envolvidas nos passos iniciais de ligação viral e infecção das células hospedeiras, assim como na fusão do envelope viral com a membrana celular (TELLO et al., 2010). As propriedades estruturais destas proteínas são alvos de estudos das suas implicações nos mecanismos de infecção, entretanto relatos sobre as propriedades isoladas destas são escassos.

As proteínas estruturais do HCV já foram produzidas em vários sistemas de expressão, como: bactérias *E. coli*, células de mamíferos, leveduras e células de insetos infectadas com baculovírus recombinante, variando em seu peso molecular devido às modificações pós-traducionais de alguns sistemas de expressão que levam à glicosilação (HÜSSY et al., 1997; LORENT et al., 2008; MARTINEZ-DONATO et al., 2006; MATSUO et al., 2006; OWSIANKA et al., 2001; PATEL et al., 2000; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2009).

Em vista disso, no presente trabalho avaliamos as diferenças da proteína E2 recombinante produzida em dois sistemas de expressão, sendo uma glicosilada e fusionada à 6xHisTag (1kDa), com 50kDa produzida em *P. pastoris* (chamada de E2L) e a outra não-glicosilada e fusionada à GST (26kDa) e 6xHisTag (1kDa) com 63,5kDa produzida em *E. coli* (chamada de E2B), expressas após indução dos vetores recombinantes pPICZ α A e pET42a, respectivamente. Desta forma, as proteínas apresentaram PM diferentes, devido às proteínas de fusão e à glicosilação. Se das proteínas fosse descontado o PM das proteínas de fusão, elas teriam aproximadamente os seguintes PM: E2L=49kDa e E2B=36,5kDa, diferença devida à glicosilação. Quando os pesos moleculares foram comparados com o de proteínas E2 expressas nos mesmos sistemas utilizados neste presente estudo e utilizando a mesma sequencia gênica, observamos que os nossos resultados estão de acordo com os de Yurkova et al., 2004 para expressão em *E. coli* e Martinez-Donato et al., 2006, para expressão em *P. pastoris*. Sendo que, estas proteínas de fusão, 6xHisTag introduzida na região C-terminal e a GST na N-terminal, foram inseridas nas proteínas de interesse para que estas pudessem ser purificadas.

As diferenças moleculares existentes entre as duas proteínas recombinantes foram avaliadas para verificar se eram capazes de interferir na ligação aos receptores CD81 e R-LDL e ao próprio LDL, e também nos testes biológicos que verificaram as respostas celulares frente a estas proteínas.

Trabalhos prévios mostraram a expressão da proteína E2 recombinante não-glicosilada em *E. coli*, e que estas foram capazes de interagir com receptores de superfície celular como CD81 e R-LDL, além de serem reconhecidas por anticorpos anti-E2 tal como a forma nativa glicosilada (HÜSSY et al., 1997; TELLO et al., 2010; YURKOVA et al., 2004).

Tais achados também foram observados em nosso estudo, onde ambas as proteínas recombinantes foram reconhecidas pelos anticorpos anti-HCV presentes no *pool* de soros de portadores de Hepatite C crônica, como pôde ser visto no teste de imunorreatividade. O resultado obtido neste teste demonstra que a proteína E2 expressa em um sistema procarioto e, portanto

sem passagem pela etapa de glicosilação, pôde ser reconhecida pelos anticorpos do *pool* de soros HCV positivos, mostrando que a glicosilação não é primordial para este reconhecimento. Isto demonstra que a proteína E2 apresenta outros epítomos antigênicos que não são dependentes de glicosilação, e que puderam ser reconhecidos pelos anticorpos do soro, mostrando não ser ela somente o alvo dos anticorpos. Estes resultados sugerem a existência de múltiplos alvos imunogênicos na proteína E2, uma vez que a proteína glicosilada, produzida em *P. pastoris*, também foi reconhecida pelos anticorpos do *pool* de soros positivos para o HCV. Além disso, este achado mostra que as proteínas recombinantes satisfatoriamente refletem as propriedades bioquímicas e antigênicas similares às da proteína naturalmente expressa no vírus, mantendo sua conformação nativa, pois puderam ser reconhecidas pelos anticorpos anti-HCV presentes no soro dos portadores de Hepatite C crônica, por apresentarem propriedades antigênicas similares às daquelas do HCV.

Enquanto a natureza do receptor celular do HCV não é completamente conhecida, acredita-se que a glicoproteína E2 seja provavelmente a principal responsável por iniciar o acoplamento do vírus à célula hospedeira (FARCI et al., 1996; ROSA et al., 1996; ZIBERT et al., 1995) e que este aconteça via R-LDL, já que o HCV pode ser encontrado no soro em associação com lipoproteínas de baixa densidade, como LDL e VLDL (VOISSET; DUBUISSON, 2004). Entretanto, existe uma quantidade limitada de dados sobre a interação do HCV ou complexos HCV-lipoproteínas com receptores de superfície celular e menos ainda sobre a interação específica da proteína E2 do HCV com o LDL e conseqüentemente com o R-LDL. Desta forma, pelo fato da proteína E2 ser uma glicoproteína, analisamos se a glicosilação e o LDL poderiam influenciar na ligação às células estudadas, ECV304 e HUVEC.

Estudos recentes abordam o fato de que a biossíntese das lipoproteínas apresenta um papel fundamental na produção de novas partículas do HCV e sua capacidade de infecção das células hospedeiras. A depleção de Apo E suprime a produção de HCV, e células deficientes de R-LDL também demonstram redução da infectividade pelo HCV associado à Apo E, sugerindo assim a importância das lipoproteínas no ciclo de vida do vírus. Entretanto, o papel preciso das lipoproteínas e apolipoproteínas na produção de novos vírus e na infectividade ainda não são completamente compreendidos (HISHIKI, et al., 2010).

Através do teste de IFI pudemos analisar microscopicamente a ligação das proteínas recombinantes aos receptores de superfície das células ECV304. Entretanto, não observamos diferenças entre as ligações das proteínas, que poderiam ser causadas pela presença de glicosilação em uma delas, e nem diferenças quando foi adicionado LDL. Acreditamos que pelo fato das células terem sido previamente mantidas em meio de cultura com soro fetal bovino e que provavelmente este continha lipoproteínas, estas ligaram-se aos R-LDL favorecendo a ligação da proteína E2 à célula, e quando LDL humano foi adicionado não observou-se diferenças pois a proteína já estava ligada ao LDL ou VLDL bovino, como foi observado no estudo de Wünschmann e colaboradores (2006). Pode-se sugerir também que parte das proteínas poderiam estar ligadas aos CD81 presentes nestas células. Quanto ao fato da não observação de uma diferença na

ligação entre proteínas glicosiladas ou não deve-se à sensibilidade da técnica, sendo que não foi possível observar esta diferença visualmente. Por este motivo, a avaliação da ligação através de citometria de fluxo ofereceu-nos maior precisão a respeito das diferenças na ligação.

Após informações de estudos anteriores sobre a influência das lipoproteínas contidas no SFB que constituía o meio de cultura das células utilizadas para o ensaio de ligação das proteínas aos receptores, decidimos realizar os ensaios com células mantidas com e sem SFB para avaliarmos adequadamente a ligação. Desta forma, quando as células ECV304 foram cultivadas em meio de cultura sem SFB, tanto a E2B quanto a E2L, ligaram-se a 8 e 12% das células, respectivamente. Sugerindo que esta ligação possa ter ocorrido no CD81, já que na ausência de LDL as proteínas E2 não são capazes de se ligarem às células através do R-LDL. Entretanto, quando à elas foi adicionado LDL, as proteínas E2 puderam se ligar às células de forma mais eficiente (E2B: 45% e E2L: 50%), demonstrando a importância do LDL para a ligação da proteína, que supostamente ocorreu predominantemente no R-LDL, sendo que houve maior ligação da proteína E2L às células quando comparadas com a ligação da E2B ($p < 0,001$), isto ocorreu provavelmente devido à glicosilação. Como as células HUVEC não apresentaram marcação para CD81, expressando naquele momento apenas o R-LDL, quando as células foram mantidas em meio sem SFB não foi detectada ligação das proteínas E2 às células, sugerindo mais uma vez que elas necessitam de LDL para se ligarem aos R-LDL, fato que foi confirmado quando adicionou-se LDL e a fluorescência referente à ligação das proteínas nas células foi observada.

Em outra situação, onde as células foram mantidas em meio de cultura suplementado com 10% de SFB, as proteínas E2 puderam se ligar às células HUVEC mesmo sem a adição de LDL humano. Sendo que a proteína E2L ligou-se mais eficientemente às células, tanto ECV304 quanto HUVEC, do que a E2B ($p < 0,001$), mostrando a influência da glicosilação nesta ligação. Quando LDL humano foi adicionado à esta reação, percebeu-se um aumento na ligação de ambas as proteínas às células ($E2B+LDL \times E2L+LDL = p < 0,01$, células mantidas com soro), entretanto, este aumento foi inferior ao apresentado quando as células são cultivadas sem SFB e recebem as proteínas com LDL humano. O fato das proteínas recombinantes poderem se ligar às células, mantidas com SFB, mesmo sem a adição de LDL humano, é porque esta ligação provavelmente está ocorrendo em parte no CD81 (no caso das ECV304) e também devido à constituição do SFB, que apresenta lipídios/lipoproteínas, dentre eles LDL e VLDL, que são capazes de se ligarem-se ao R-LDL da célula ainda em cultura permitindo assim que quando proteína E2 é adicionada sem LDL humano, esta possa se ligar aos lipídios bovinos que já estão ligados ao receptor. Entretanto, quando compara-se a ligação das proteínas E2 aos lipídios bovinos e LDL humano, observa-se que a ligação da proteína E2 com o LDL humano é melhor ($p < 0,001$), pois isso fica evidente nas células que cresceram livres de SFB e é adicionado LDL humano, mostrando uma maior ligação das proteínas, do que quando comparado com as células que cresceram na presença de SFB e adiciona-se proteína sozinha ou proteína com LDL humano. Isto provavelmente ocorre porque o LDL humano compete com os lipídios bovinos, que já estão ligados ao receptor, por isso a ligação das proteínas não é tão eficiente quanto a mostrada no ensaio onde as células cresceram livres

de SFB e por isso apresentam apenas o LDL humano adicionado ligado ao R-LDL.

Este fato também foi observado por Wünschmann e colaboradores (2006), que usaram células MOLT-4 mantidas com SFB 10%, proteínas E2 recombinantes expressas em células CHO (células de ovário de Hamster Chinês) e LDL humano. Assim como observado em nossos resultados, a ligação da E2 às células aumentou quando foi adicionado LDL humano à reação. Estes pesquisadores, além de testarem a interação da E2 com o LDL, também avaliaram esta com VLDL, HDL e lipídios bovinos, mostrando que a E2 é capaz de interagir com todos eles, sendo que as lipoproteínas bovinas podem se ligar ao R-LDL humano. Ao contrário do nosso estudo, esses pesquisadores mantiveram as células em meio contendo SFB e este foi desligado das células com sulfato de dextran, para observar a influência das lipoproteínas do SFB na ligação da proteína E2 às células.

Quanto ao fato de maiores porcentagens de células, tanto ECV304 quanto HUVEC, apresentarem-se ligadas à proteína glicosilada estão de acordo com os resultados de trabalhos anteriores que consideram a glicosilação como um fator indispensável para o dobramento (ou *folding*) e assim pela conformação espacial desta glicoproteína de envelope. Sabe-se também que a glicosilação confere a esta, glicanas que são importantes tanto para o dobramento quanto para a ligação da proteína ao LDL e aos receptores das células hospedeiras e assim, contribuindo para a entrada do vírus na célula (DUBUISSON; RICE, 1996; HELENIUS; AEBI, 2001; GOFFARD et al., 2005; TELLO et al., 2010).

Podemos dizer ainda que a ligação das proteínas E2 recombinantes observada nos ensaios de ligação às células HUVEC ocorre totalmente no R-LDL, visto que no ensaio de inibição da ligação, ao bloquear os R-LDL com um anticorpo anti-R-LDL não é possível detectar a ligação das proteínas às células. A ligação aos R-LDL já havia sido relatada em estudos anteriores, assim como descrito em Agnello et al., 1999, estando em acordo com os nossos achados.

Além disso, as células HUVEC também foram imunofenotipadas para o CD81, descrito na literatura como outro ligante da proteína E2 do HCV (SCARSELLI et al., 2002), e como estas não apresentaram fluorescência, pode-se dizer que estes receptores não são expressos constitutivamente neste tipo celular em condições normais. Este fato pode ser confirmado no estudo de Rohlena e colaboradores (2009), onde estes autores relatam a ausência de CD81 no endotélio saudável, ou seja, na ausência de inflamação, sendo que tecidos endoteliais lesionados ou inflamados passam a expressar tal receptor nestas condições. O fato das células endoteliais só expressarem CD81 mediante inflamação ou lesão, quando correlacionado com a forma crônica da Hepatite C, onde há lesão praticamente em todos os tipos celulares pertencentes ao fígado, pode contribuir para o aumento da ligação do HCV a este tecido, já que a proteína E2 é capaz de se ligar a este receptor, e com isso causar aumento do dano ao órgão.

As células ECV304 também foram imunofenotipadas para R-LDL e CD81, e estas apresentaram 17% de células com marcação para CD81 e 80% para R-LDL. Diante disto, estes receptores foram bloqueados simultaneamente e independentemente para observarmos a ligação das proteínas E2 recombinantes a estas células.

Ao analisarmos o ensaio de bloqueio, observamos que quando o R-LDL é bloqueado, deixando livre o CD81, uma menor porcentagem de células apresenta marcação para a ligação às proteínas recombinantes, quando comparado ao resultado do bloqueio de CD81, deixando livre o R-LDL, onde um maior percentual de células apresenta marcação para a ligação. Podemos sugerir que esta menor ligação às células quando estas apresentavam apenas o CD81 livre, pode estar relacionado ao fato de que as ECV304 expressem pouco CD81 por serem derivadas de células endoteliais, que assim como as HUVEC, em condições não-inflamatórias não expressam CD81. Como recentemente a literatura tem considerado a ECV304 uma célula híbrida, proveniente de células endoteliais contaminadas com células epiteliais de carcinoma de bexiga (T24/83) (BROWN et al., 2000), talvez isso as tenha feito expressar CD81, embora na literatura não tenhamos encontrado relatos sobre isso.

Com o ensaio de bloqueio, também pudemos perceber que a glicosilação aumenta a ligação ao CD81. Além disso, observamos que quando LDL é adicionado ao experimento, este favorece apenas a ligação ao R-LDL, mas não ao CD81. Pois quando analisamos a ligação das proteínas com e sem LDL ao CD81, não observamos um aumento da ligação da E2 na presença de LDL, como é observado na ligação ao R-LDL. Isto também foi relatado por Wünschmann et al., 2006. Apesar de parecer que o complexo HCV-LDL prefira o R-LDL, Bartosch et al, 2003 observou que o CD81 e o SR-BI também são necessários para a entrada do HCV na célula, pois quando estes dois receptores foram bloqueados com anticorpos específicos, a infectividade pelo HCV foi drasticamente reduzida.

Desta forma o R-LDL tem sido apresentado como o principal mediador da internalização do HCV via associação HCV-LDL, fato que também foi demonstrado por ensaios experimentais quando células HepG2 deficientes de CD81 internalizam o HCV pela ligação deste à partículas de LDL, utilizando para isto os R-LDL (AGNELLO et al., 1999).

Quando analisamos os resultados de bloqueio simultâneo dos dois receptores, R-LDL e CD81, para a ECV304 e bloqueio do R-LDL nas HUVEC, não observamos fluorescência em nenhuma delas, demonstrando que as proteínas E2 recombinantes não estavam se ligando em nenhum outro receptor presente na superfície celular, validando nosso experimento quanto à ligação aos receptores.

Levando-se em conta apenas a glicosilação, quando comparadas as porcentagens de ligação das proteínas recombinantes (E2B e E2L) às células mantidas com SFB, observa-se um aumento de aproximadamente 25% na ligação da proteína às células HUVEC ($p < 0,01$ entre E2B e E2L) e 50% nas células ECV304 ($p < 0,001$ entre E2B e E2L), mostrando que a glicosilação favorece a ligação da proteína E2 do HCV ao LDL e consequentemente aos R-LDL. Este resultado está de acordo com os trabalhos publicados anteriormente (BIAN et al., 2009; GOFFARD; DUBUISSON, 2003; LIN et al., 2009) que demonstram a importância da glicosilação para muitas das funções da proteína E2, entre elas para o acoplamento do HCV à célula hospedeira. Pois a falta de glicosilação leva a mudanças conformacionais na proteína (VOISSET; DUBUISSON, 2004). Entretanto, Xiang e colaboradores (2006) e Yurkova e colaboradores (2004),

observaram que a glicosilação não parecia ser necessária para a ligação da proteína E2 ao CD81, mas em nossos achados esta favoreceu a ligação.

Estes achados demonstram que a proteína E2 do HCV pode se associar ao LDL para facilitar o seu acoplamento à célula hospedeira, fato semelhante ao que foi apresentado em 1992, por Thomssen e colaboradores, que foram os primeiros a identificar a associação entre o HCV e o LDL do soro humano e subseqüentemente demonstraram a interação entre complexos HCV-LDL com os R-LDL, para ser carregado para dentro da célula, como foi observado em alguns estudos onde partículas do HCV circulantes mostravam densidade heterogênea (MEUNIER et al., 2005), o que poderia refletir a ligação do vírus ao LDL (NAHMIAS et al., 2006). Com o nosso estudo sugerimos que esta associação observada por estes pesquisadores entre o HCV e o LDL pode ter sido mediada pela proteína E2, e que a ligação da proteína E2 ao R-LDL mediada por LDL, observada em nossos resultados, pode sugerir que altas taxas de LDL no sangue de pacientes portadores de Hepatite C crônica possam contribuir para uma maior invasão celular e assim taxas mais altas de vírus circulantes. Nossos achados vão de encontro com a literatura que apresenta alguns trabalhos inferindo que a ligação do HCV aos receptores celulares e conseqüente invasão celular pode ser melhorada quando este se complexa às moléculas de LDL, havendo assim um acréscimo de infectividade (LAVILLETTE et al., 2005; MEUNIER et al., 2005; NAHMIAS et al., 2006). Estudos recentes também demonstram o papel dos R-LDL na infecção pelo HCV (NAHMIAS et al., 2006) e a associação entre a infecção pelo vírus e o metabolismo de lipídios com alterações nos níveis de lipoproteínas séricas (SIAGRIS et al., 2006), além de sugerir que a relação do HCV com LDL possa proteger as partículas virais de anticorpos neutralizantes (BARTOSCH et al., 2003).

Os mecanismos pelos quais o HCV se liga à célula hospedeira e a invade parecem ser muito complexos, não envolvendo apenas um receptor celular, ou uma proteína. Sabe-se que além da proteína E2, a E1 também é importante para formar um complexo com a E2 e assim interagirem com os receptores. Além do mais, a interação com o R-LDL é muito importante para a ancoragem do vírus à célula, entretanto a invasão desta não pode ocorrer sem o auxílio do CD81.

Desta forma, a interação da proteína E2 com o R-LDL parece ser mediada pelo LDL. Como o HCV é encontrado na circulação sanguínea associado com lipoproteínas, podemos sugerir que o complexo E2-LDL possa ser responsável por acoplar o vírus no R-LDL, utilizando assim este ligante natural (LDL) do receptor para carregar o vírus para dentro da célula. Entretanto, não descartamos a hipótese de que outras proteínas virais possam interagir com outros receptores celulares e assim contribuírem para a invasão celular. Um bom exemplo disto são as GAGs (glicosaminoglicanas), presentes em grande quantidade na superfície de praticamente todas as células, e que são capazes de se ligarem a um grande número de microrganismos, incluindo vários vírus (WÜNSCHMANN et al., 2000). Assim sugere-se que a ligação do HCV às células inicialmente possa envolver o R-LDL, as GAGs e o CD81.

Após os resultados confirmatórios de que ambas as proteínas E2 recombinantes eram capazes de se ligarem às células estudadas, analisamos quais efeitos esta ligação produzia nas

células hospedeiras para podermos assim correlacionar estes efeitos com as principais complicações da Hepatite C crônica, que são a cirrose e o carcinoma hepatocelular.

Para os testes biológicos, foram utilizados como estímulos-controle das reações, três substâncias conhecidamente estimulantes, a fitohemaglutinina (PHA), o LPS (lipopolissacarídeo) e o PMA (phorbol 12-myristate 13-acetato). A fitohemaglutinina (PHA), lectina de *Phaseolus vulgaris*, foi utilizada por ser dotada das propriedades de ativar e induzir a proliferação de linfócitos humanos *in vitro* e em altas concentrações apresenta potencial tóxico (NOWELL, 1960). O LPS é uma endotoxina capaz de provocar uma forte resposta inflamatória. O PMA é um ativador principalmente de fagócitos, além de induzir a proliferação de algumas linhagens celulares e ser tóxico em altas concentrações (JORGENSEN et al., 2005).

A Hepatite C frequentemente resulta em danos a diferentes tipos celulares do fígado. Os hepatócitos são suscetíveis à infecção pelo HCV, assim como as células mononucleares do sangue periférico (ZIGNEGO et al., 1992; LERAT et al., 1996). Entretanto, células endoteliais não parecem ser diretamente infectadas por ele, mas sofrem danos também. Desta forma, neste estudo utilizamos três tipos celulares para a avaliação das respostas destas após exposição à proteína E2 recombinante. As células ECV304 e HUVEC foram utilizadas como modelo de estudo de células endoteliais, para avaliar a inflamação nestas células correlacionando com os efeitos que podem ocorrer na veia porta hepática. E a célula SC como modelo de estudo de monócitos/macrófagos, já que a literatura relata que produtos secretados por monócitos/macrófagos ativados induzem um fenótipo inflamatório nos hepatócitos, que pode implicar na persistência da inflamação e na fibrogênese (MELINO et al., 2012).

No ensaio de MTT pudemos analisar se as proteínas recombinantes eram tóxicas às linhagens celulares testadas (ECV304, HUVEC e SC) e em qual concentração isto acontecia. Assim, observamos que nas células ECV304, o estímulo-controle fitohemaglutinina (PHA - 100µg/mL) foi o maior responsável pela morte celular ($71,49 \pm 20,67\%$). Quando avaliamos as células HUVEC dentro deste ensaio, observamos que a concentração de 250µg/mL de E2B foi a que causou a maior morte celular ($69,25 \pm 1,70\%$), sendo que o mesmo foi observado nas células SC ($72,00 \pm 29,55\%$). Entretanto, mesmo expostas a estes estímulos e concentrações, considerou-se que as células estavam viáveis para responder aos outros testes.

O grande problema da infecção pelo HCV são as complicações tardias, como a fibrose, a cirrose e o carcinoma hepatocelular, sendo estas causadas por várias moléculas resultantes da inflamação hepática, como o óxido nítrico (NO), o H₂O₂, mudanças na atividade da arginase, as interleucinas, entre outros, onde alguns deles foram estudados por nós quando as linhagens celulares citadas acima foram expostas às proteínas E2 recombinantes.

O NO é um radical livre inorgânico e uma molécula sinalizadora originalmente identificada como um fator de relaxamento derivado de endotélio (EDRF) ou um vaso-relaxante (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980), que continua a atrair a atenção da comunidade científica, como demonstrado pelos vários artigos publicados anualmente. Altamente difusível e reativo, este composto gasoso encontra-se entre os menores mensageiros biológicos conhecidos (BREDT;

SNYDER, 1992). O NO pode ser sintetizado através da oxidação enzimática da L-arginina, por quatro principais enzimas óxido nítrico sintases (NOSs), a endotelial (eNOS), a neuronal (nNOS), a induzível (iNOS) (constitutivamente ativada e pode ser induzida em altos níveis em resposta a determinados estímulos) e a mitocondrial (mNOS). Diferentes tipos celulares podem apresentar a NOS, dentre elas células endoteliais e macrófagos/monócitos, células estas que foram utilizadas neste estudo. O NO está envolvido em vários mecanismos biológicos e funções fisiológicas. No sistema imune este participa como um componente de defesa. Além destas várias funções fisiológicas, o NO também pode ser tóxico quando sintetizado em excesso. As suas funções dependem da concentração produzida e do local onde é liberado, podendo atuar ainda como broncodilatador, vasodilatador, antimicrobiano e molécula pró-inflamatória. Estudos prévios também descrevem seu potencial contra vírus (STEINERT; CHERNOVA; FORSYTHE, 2010; AMITAI, 2010; BROWN, 2010; CESPUGLIO et al., 2012; OSTROWSKI; STEWART; HAZUCHA, 2012). Além disso, o NO também apresenta um potencial mutagênico, diretamente ou através da formação de moléculas secundárias, e também é capaz de oxidar o DNA, resultando em danos que subsequentemente levam à carcinogênese (KANE et al., 1997).

O HCV frequentemente causa uma doença hepática aguda que se torna crônica e leva à uma inflamação e regeneração hepática que a longo prazo induzem a cirrose e o carcinoma hepático. Os danos hepatocelulares podem resultar de uma resposta do próprio hospedeiro à disseminação viral e de processos iniciados pelo próprio vírus (MIHM; FAYYAZI; RAMADORI, 1997). Assim como qualquer doença inflamatória crônica, a Hepatite C induz o aumento da produção de NO via iNOS (KANE et al., 1997). Sendo que os efeitos tardios da liberação de NO podem ter um importante papel na patogênese do HCV que induz a cirrose (HASSAN et al., 2002).

Em nosso estudo, uma das formas de avaliação da produção de NO em resposta à proteína E2 recombinante, foi pelo método de Griess. Entretanto, não foi possível detectar a sua produção em nenhuma das linhagens testadas com as proteínas recombinantes e com estímulos-controle. Tal fato sugere que o método não é sensível o suficiente para a detecção nestas células. Após um ensaio-piloto com macrófagos murinos pôde-se observar que as proteínas recombinantes desencadearam a produção de NO, detectada pelo método de Griess, e que esta produção é dependente da concentração das proteínas.

O outro método utilizado para verificar a produção de NO nas células HUVEC foi utilizando um analisador de óxido nítrico. Por este método foi possível a detecção da produção do mesmo, induzida pelas concentrações mais altas de E2L quando comparadas ao controle negativo ($p < 0,01$). Pode-se sugerir que a proteína E2L estimula mais as células HUVEC a produzirem NO do que a proteína E2B, e este achado pode estar ligado à glicosilação. Estatisticamente, a maior produção de NO foi obtida quando as células foram estimuladas com LPS.

Vários trabalhos demonstram a detecção de NO em linhagens de células imortalizadas, entretanto os métodos utilizados diferem dos nossos, sendo também muito comum em células endoteliais a quantificação da eNOS ou da iNOS e não do NO em si. O fato de não termos

conseguido detectar o NO pelo método de Griess em nenhuma das linhagens de células utilizadas, apenas nos macrófagos murinos onde o método de Griess é clássico para a dosagem de NO nestas células, assim como utilizado por Maia et al., 2006, deve-se à sua sensibilidade. Outro método utilizado para quantificação do NO nas células HUVEC, descrito em Ladurner et al., 2012, é através da 4,5-diaminofluoresceína-2 (DAF-2), que é uma *probe* fluorescente sensível ao NO.

Não foram encontrados estudos na literatura que correlacionassem a proteína E2 do HCV com a produção de NO por células endoteliais, o que poderia explicar a lesão na veia porta que leva à fibrose e consequentemente à cirrose. Osman et al., 2007 encontrou níveis significativamente aumentados de NO no soro de pacientes portadores de Hepatite C crônica quando comparados com indivíduos não portadores da patologia. Entretanto, relatos sobre os níveis de NO sérico em pacientes com infecções virais crônicas parecem ser conflitantes (AMARO et al., 1994; LAKE-BAKAAR; SORBI; ABERNATHY, 1995). Outros estudos relatam que o aumento da produção de iNOS no tecido hepático não podem ser acuradamente refletidos no soro. Desta forma, discrepâncias nos relatos tornam difícil a interpretação do papel potencial do NO nas infecções virais crônicas (LAKE-BAKAAR; SORBI; MAZZOCCOLI, 2001).

Em patologias virais, assim como a AIDS e a Hepatite C, observa-se um aumento da expressão de transcritos de iNOS e aumento da produção de NO por macrófagos ativados. A iNOS é encontrada nos hepatócitos e no tecido hepático. Biópsias hepáticas de pacientes portadores de Hepatite C crônica apresentam altos níveis de transcritos de iNOS quando comparados com indivíduos não infectados por HCV (LAKE-BAKAAR; SORBI; MAZZOCCOLI, 2001).

Como inicialmente a produção de NO não estava sendo detectada pelo método de Griess, optamos por analisar se estava havendo aumento na atividade da arginase, já que esta é uma enzima envolvida no ciclo da uréia, que catalisa a hidrólise da L-arginina em L-ornitina e uréia e compete com a óxido nítrico sintase (NOS) pelo mesmo substrato (L-arginina), sendo a NOS a catalisadora da formação do NO e da L-citrulina (PALMER et al., 1988). Existem duas isoformas de arginase, a Arg-I e a Arg-II, que são codificadas por diferentes genes (HARAGUCHI et al., 1987; MORRIS et al., 1997). Estudos prévios mostraram que em células endoteliais humanas e murinas, a enzima predominante é a Arg-II (MING et al., 2004; SCALERA et al., 2009), e a inibição desta melhora a função endotelial em modelos de animais portadores de aterosclerose, diabetes e envelhecimento (MING et al., 2004; ROMERO et al., 2008; KIM et al., 2009). Entretanto, um papel para a Arg-II na resposta inflamatória endotelial e no processo de envelhecimento endotelial ainda não foi demonstrado (YEPURI et al., 2012).

Ao analisarmos os resultados obtidos no ensaio de determinação da atividade da arginase nas células avaliadas após exposição aos estímulos, observamos que nas células ECV304 e SC não houve alteração significativa ($p>0,05$) na atividade da arginase frente aos diferentes estímulos (proteínas E2B e E2L, e PHA, LPS e PMA) testados. Bem como, a variação nas concentrações das proteínas recombinantes (250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,8µg/mL) também não foi suficiente

para estimular um aumento ou redução notável na atividade da arginase em relação ao controle negativo. Entretanto, quando os resultados são analisados para as células HUVEC observou-se que existiu uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) na atividade da arginase quando as células são estimuladas com PMA, comparadas a todas as outras amostras, sendo que o PMA parece ter induzido uma maior atividade. Sugere-se que tal fato ocorreu devido a este apresentar-se como um estímulo forte e assim induzir um aumento da produção de arginase.

A infecção pelo HCV está importantemente associada com o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (OKUDA, 2007; TAN et al., 2008), muito embora a natureza desta relação celular e molecular não esteja totalmente esclarecida. Estudos prévios demonstram que as proteínas do core, NS3 e NS5A presentes no HCV tem se mostrado potencialmente envolvidas na hepatocarcinogênese (LEVRERO, 2006; KOIKE, 2007). Estudos *in vitro* utilizando células HepG2 e Huh7 mostraram que o HCV estimula o crescimento destas células e acelera o desenvolvimento de tumores em camundongos (SUN et al., 2004). Estas observações sugerem que o HCV promova a tumorigênese. A Arginase I é uma enzima altamente expressa no fígado que converte a L-arginina à L-ornitina e à uréia (WHEATLEY, 2004). A L-ornitina é um precursor das poliaminas, que promove crescimento celular (WITTE; BARBUL, 2003). Interessantemente, a expressão de Arginase-I encontra-se elevada no soro de pacientes com diversos tipos de câncer e algumas doenças inflamatórias, sugerindo que a arginase possa apresentar um importante papel na patogênese tumoral (MIELCZAREK et al., 2006; POREMBSKA et al., 2003; POLAT et al., 2003; STRAUS; CEPELAK; FESTA, 1992; GOKMEN, 2001; WU et al., 1996; KOCNA et al., 1996). Elevadas concentrações de arginase também foram detectadas no soro de pacientes com cirrose, hepatocarcinoma (CHRZANOWSKA et al., 2007) e doença hepática crônica (IKEMOTO et al., 2001). Diante disso, um possível papel para a elevação da arginase frente à infecção pelo HCV está associada ao carcinoma hepatocelular, sugerindo ainda que o HCV seja capaz de regular a expressão da arginase, e assim estimular a tumorigênese e o hepatocarcinoma (CAO et al., 2009). Entretanto, até o presente não existe na literatura disponível, relatos sobre a influência da proteína E2 do HCV sobre a arginase e consequentemente sobre o carcinoma hepatocelular.

Outro mecanismo bioquímico potencialmente envolvido na patogênese hepática induzida pelo HCV é o *stress* oxidativo (PAROLA; ROBINO, 2001; BRUNO et al., 2009). As espécies reativas de oxigênio (EROs) e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) quando em equilíbrio são importantes para a homeostase fisiológica do hepatócito. A perda deste equilíbrio entre a geração das EROs e as defesas antioxidantes resulta no *stress* oxidativo (SIES, 1985). Vários estudos clínicos e experimentais relatam o envolvimento do dano oxidativo em pacientes portadores de Hepatite C, frequentemente associados com o aumento das defesas antioxidantes. Sendo que o dano induzido pelo *stress* oxidativo nestas condições afeta hepatócitos, endotélio, células de Kupffer e células estreladas (HSC) levando à inflamação, isquemia, apoptose, necrose e regeneração (PAROLA; ROBINO, 2001; DIESEN; KUO, 2010; CAPONE et al., 2012).

O *stress* oxidativo imposto diretamente pelo vírus ou pela resposta imune do hospedeiro à infecção é um mecanismo patogênico importante na doença causada pelo HCV que culmina na

carcinogênese (LIEBER, 1997; FACTOR, et al., 2000). Moléculas oxidantes não destroem somente células-alvo, mas também células adjacentes levando ao dano do DNA (LEWIS; ADAMS, 1987). Pacientes com Hepatite C crônica frequentemente apresentam TNF- α elevado, uma citocina que pode produzir *stress* oxidativo por estimular a liberação das EROs, como o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio (KIZAKI et al., 1993). Além disso, o HCV usa o retículo endoplasmático (RE) da célula hospedeira como sítio primário para a biogênese das glicoproteínas de envelope, o que pode induzir uma resposta oxidativa por parte desta organela, podendo inibir a síntese protéica e retardar o crescimento celular. Mas quando este *stress* é prolongado pode levar a célula à apoptose (KAUFMAN, 1999; BENALI-FURET et al., 2005). Portanto, o HCV induz o dano hepático e o carcinoma hepatocelular por uma combinação de danos às mitocôndrias e ao retículo endoplasmático através da produção de EROs. Estudos prévios relatam que as proteínas do HCV, core e NS3, induzem a liberação de NO causando a quebra da dupla fita do DNA (MACHIDA et al., 2004). É relatado que a NS3 induz as EROs através da NADPH oxidase (BUREAU et al., 2001; THOREN et al., 2004). As proteínas virais também podem diretamente ativar a produção das EROs sem a mediação pelo NO, como demonstrado pela proteína E1 do HCV que não induz NO, mas causa a quebra da dupla fita de DNA, presumivelmente através da produção das EROs (MACHIDA et al., 2004). Estes efeitos combinados das proteínas virais podem sinergisticamente induzir as EROs (FIALKOW et al., 1994). Desta forma, as EROs apresentam um papel crítico na patogênese do HCV.

Moléculas derivadas do *stress* oxidativo são importantes na resposta inflamatória vascular. A indução e ativação de enzimas que participam deste processo em células inflamatórias fornecem a primeira linha de defesa contra patógenos. Baseado nas suas atividades citolíticas, moléculas oxidantes exercem um papel chave no dano ao tecido hepático causando lesões inflamatórias (SAADOUN et al., 2007).

Pensando em outra forma de avaliação do *stress* oxidativo possivelmente causado pela proteína E2 do HCV nas células endoteliais da veia porta hepática e até mesmo nos macrófagos teciduais ou monócitos circulantes, realizou-se o ensaio de QL. As três linhagens celulares, ECV304, HUVEC e SC, foram estimuladas com as proteínas recombinantes (E2B e E2L) e com estímulos-controle, e tentou-se detectar a QL produzida como efeito do *burst* oxidativo celular. Entretanto, esta resposta não foi observada em nenhuma das linhagens, mesmo após a variação de estímulos e concentração destes. Tal fato sugere que as linhagens utilizadas não são capazes de produzir espécies reativas de oxigênio frente aos estímulos testados, por estes não serem capazes de estimulá-las nas condições realizadas.

Estudos prévios mostram que a proteína do core do HCV induz o *stress* oxidativo e significantes mudanças de vários parâmetros oxidativos, incluindo aumento da formação de H₂O₂ e ânions superóxido, que elevam a peroxidação lipídica. Desde que o H₂O₂ mostrou-se como uma molécula sinalizadora do *stress* oxidativo vários estudos foram realizados. Greenwel et al., 2000 observou o efeito da proteína E2 na formação de H₂O₂, sendo que esta aumenta os níveis de H₂O₂ para promover a expressão de fatores relacionados à fibrose levando à fibrogênese no

fígado (MING-JU, 2011).

Em nosso estudo, pudemos observar a produção de H_2O_2 pelas células HUVEC e SC, sendo o mesmo não detectado nas células ECV304, após exposição às proteínas E2 recombinantes e aos estímulos-controle. Resultado este que se encontra em acordo com os achados de Greenwel et al., 2000 e sugerem o envolvimento da proteína E2 do HCV na inflamação produzida na veia porta hepática podendo levar a fibrose.

Uma das principais complicações da infecção pelo HCV à longo prazo é a cirrose, que é um processo progressivo tendo a fibrose como um passo inicial (NEGRO, 2006). Embora, os mecanismos da fibrogênese hepática causada pelo HCV não estejam totalmente esclarecidos ainda, SHIN et al., 2005 descreveu um estudo onde várias moléculas relacionadas à fibrose estavam significativamente aumentadas em co-culturas de células HSC com a proteína do core do HCV. Entretanto, a contribuição das outras proteínas do HCV não foi elucidada ainda. MAZZOCCA et al., 2005 em seu estudo relata que a glicoproteína E2 do HCV se liga à superfície das células HSC e induzem elevação da atividade da metalopeptidase podendo levar à um aumento da penetração de células inflamatórias nos locais de danos teciduais, promovendo assim o processo de fibrogênese (MING-JU, 2011).

Nestes casos, a inflamação é caracterizada pela invasão de leucócitos ativados nos tecidos lesionados, sendo este processo criticamente dependente da expressão de citocinas (BAGGIOLINI, 1998). A infecção direta dos hepatócitos pelo HCV pode causar lesão ao tecido hepático, entretanto, outros mecanismos também podem contribuir para a lesão, incluindo os efeitos tóxicos das proteínas do HCV em células não infectadas. Hepatócitos expostos ao HCV podem produzir efeitos de sinalização pela ligação das proteínas virais à superfície das células, independente da infecção destas ou da replicação viral. Este fenômeno é conhecido como efeito *innocent bystander*, onde as proteínas do envelope viral podem induzir uma disfunção celular ou até a morte por estimular vias específicas de transdução de sinal (HESSELGESSER et al., 1998; KAUL; LIPTON, 1999). Balasubramanian e colaboradores em 2003 relataram em seu estudo, que a proteína E2 do HCV era capaz de estimular vias de sinalização intracelular que levavam à indução da secreção da citocina pró-inflamatória IL-8, e que esta produção era dose-dependente. Concluindo então, que a alta expressão de IL-8 poderia contribuir para a inflamação causada pelo HCV (BALASUBRAMANIAN; GANJU; GROOPMAN, 2003). Nós supomos que a proteína E2 recombinante possa ter causado este efeito nas células endoteliais (HUVEC) analisadas, o que vai de encontro ao estudo de BALASUBRAMANIAN e colaboradores em 2005a, que também detectou a secreção de IL-8 por células HUVEC em resposta à exposição à proteína E2.

A interleucina 8 (IL-8), uma forte molécula pró-inflamatória, foi o primeiro membro identificado da família das citocinas (BAGGIOLINI, 1992). Em tecidos não inflamados normais, os níveis de IL-8 são extremamente baixos ou indetectáveis (KASAHARA et al., 1991; BRASIER et al., 1998). A secreção de IL-8 pode ser consequência direta do contato com patógenos como: vírus (MURAYAMA et al., 1997 ; MASTRONARDE et al., 1998), bactérias (AIHARA et al., 1997 ; HOBIE et al., 1997) e agentes causadores de stress celular (DeFORGE et al., 1993; SONODA et

al., 1997). A IL-8 é um potente quimioatraente (ATTAUR; HARVEY; SIDDIQUI, 1999) que leva à resposta imune, como inflamação por ativação de neutrófilos (VILLARETE; REMICK, 1997; VOLK et al., 1997). Além disso, a IL-8 está envolvida na patogênese de várias doenças, como: artrite reumatóide, psoríase, asma e sepsis (STRIETER et al., 1994). E pode se comportar não somente como uma proteína quimioatraente, mas também como pró-fibrogênica. Sendo que seu nível no plasma ou em fluídos biológicos frequentemente está relacionado com a severidade da patologia (MARTY et al., 1994; MARIE et al., 1997).

No presente trabalho verificamos a produção de IL-8 pelas células HUVEC, quando estas foram expostas às proteínas E2 recombinantes e aos estímulos-controle, mas a mesma resposta não foi observada nas células SC. Akeno et al., 2008 em seu estudo, também descreve um aumento de IL-8 no sobrenadante de cultura de células Huh7.5 e de células primárias de tireóide humana, após exposição à proteína E2 recombinante. O autor atribui tal resultado ao fato da proteína E2 ter se ligado ao receptor de superfície destas células, CD81, resultando em uma cascata de sinalização intracelular estimulando a célula à uma resposta inflamatória secretando IL-8, demonstrando que o HCV pode estimular estes tipos celulares sem infectá-las. Assim como a proteína E2 pode se ligar ao CD81, a proteína E1 também pode (BARTH; LIANG; BAUMERT, 2006) e estudos anteriores demonstraram que a proteína E1 também pode desencadear esta cascata de sinalização intracelular (WACK et al., 2001 ; CROTTA et al., 2002 ; FANG et al., 2006). Acreditamos que tal fato também deva estar acontecendo em nossos achados, porém como as células HUVEC não demonstraram fluorescência quando imunofenotipadas para CD81, a ligação da proteína E2 aos R-LDL pode ser a responsável por esta ativação das vias de sinalização intracelulares.

O fato de não termos detectado a produção de IL-8 nas células SC, após exposição às proteínas E2 recombinantes, pode ser porque estas proteínas não induzam a produção neste tipo celular. Embora, relatos da literatura apontem que após a exposição de monócitos/macrófagos com o HCV observou-se produção de IL-8 por estas células (RADKOWSKI et al., 2004). Desta forma, esta produção pode ter sido induzida por outras proteínas virais, como core e NS3 (CHANG; DOLGANIUC; SZABO, 2007) e não pela E2.

Ainda outros estudos descreveram que as proteínas do HCV (core, E2, NS2, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) podem induzir um aumento na produção de IL-8 em vários tipos celulares, o que resulta na inibição dos efeitos anti-virais do IFN- α (KATO et al., 2000; BALASUBRAMANIAN; GANJU; GROOPMAN, 2003 ; BALASUBRAMANIAN et al., 2005; KADOYA et al., 2005; FIORUCCI et al., 2007; OEM et al., 2008). Assim como em nosso estudo, Balasubramanian et al., 2005 também utilizou as células HUVEC para verificação do aumento da produção de IL-8 nestas células quando expostas à partículas *like* do HCV (HCV-LPs), confirmando os nossos achados.

A IL-8 também é verificada no soro de pacientes portadores de Hepatite C crônica, em níveis elevados quando comparado com soros de indivíduos não infectados (AKBAR et al., 2011; NEUMAN et al., 1999a,b,c; POLYAK et al., 2001a,b). Vários outros estudos confirmam estes achados e descrevem ainda, que várias citocinas inflamatórias mostram-se mais elevadas em

indivíduos infectados pelo HCV do que em indivíduos sem a infecção (MALAGUARNERA et al., 1997; QUIROGA, 1998; NEUMAN et al., 1999a,b,c; ZYLBERBERG et al., 1999).

Vários autores também relatam que pacientes portadores do HCV e com inflamação hepática e fibrose apresentam no soro níveis elevados de IL-8, moléculas de adesão, E-selectina e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (KAPLANSKI et al., 1997; MASUMOTO et al., 1998).

Na literatura também foi relatado, que pacientes portadores de HCV apresentam uma correlação entre o nível de IL-8 no soro e a fibrose hepática (KAPLANSKI et al., 1997), e que a expressão do mRNA da IL-8 estava associada com a inflamação hepática e a fibrose (FUKUDA et al., 1996; SHIMODA et al., 1998; MASUMOTO et al., 1998; MAHMOOD et al., 2002).

Estudos prévios sugerem que a reação inflamatória contra o HCV contribui para a patologia hepática, e que as citocinas regulam a aderência dos linfócitos ao endotélio inflamado por vários mecanismos (BALASUBRAMANIAN et al., 2005). E ainda que, as citocinas com atividade quimiotática para leucócitos também podem ser importantes na patogênese da Hepatite crônica (BAGGIOLINI et al., 1994).

Embora a inflamação crônica do fígado seja devido à presença do HCV, também existem relatos da forte expressão de E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 nas células endoteliais dos sinusóides, que são importantes para o extravazamento dos leucócitos (VOLPES et al., 1992). Entretanto, Balasubramanian e colaboradores em 2005 não encontraram em seu estudo, mudanças significantes na expressão das moléculas inflamatórias ICAM-1, VCAM-1, E-selectina e P-selectina nas células HUVEC após a exposição às proteínas E2.

O alto grau de inflamação portal, peri-portal ou lobular (fibrose centrolobular, colestase e colangiolite granulocítica) são relatadas em pacientes com Hepatite C crônica (DIENES; DREBBER; BOTH, 1999). Sugerindo que a IL-8 secretada em resposta ao estímulo produzido pelas proteínas estruturais do HCV, entre elas a E2, possa ter uma participação direta na inflamação do tecido, sendo esta quando persistente possa juntamente com outras moléculas inflamatórias ou tóxicas às células, aqui já discutidas, levar à fibrose e consequentemente à cirrose, um dos principais problemas da Hepatite C (BALASUBRAMANIAN; GANJU; GROOPMAN, 2003). Acredita-se ainda, que todo este processo inflamatório inicie-se nas células endoteliais da veia porta hepática e com a progressão da doença culmine na cirrose.

Estudos imunohistoquímicos da infecção pelo HCV realizados no fígado de pacientes detectaram IL-8 em infiltrado de células no trato portal, septo fibrótico e nos lóbulos hepáticos (NAPOLI et al., 1994; KOZIEL et al., 1995).

Balasubramanian e colaboradores em 2005, após exporem células HUVEC às proteínas E2 do HCV detectaram a citocina pró-inflamatória IL-8 e inferiram que a liberação desta pelas células ocorria via NF- κ B e que o estímulo das proteínas também induzia apoptose via Fas-Fas-L e ainda ativava a caspase-3. Além disso, os mesmos autores também afirmaram que as proteínas do HCV podem interagir com o endotélio e causar a liberação de mediadores inflamatórios, bem como, induzir a morte celular programada ou apoptose. Sendo que estes eventos podem contribuir para um achado patológico comumente visto em indivíduos portadores de Hepatite C, a

endotelite. Os autores observaram também que a proteína E2 não induzia a produção de outras citocinas inflamatórias, como MCP-1, TNF- α e IFN- γ . E que a produção de IL-8 não contribuía para a indução da apoptose.

Em nosso estudo também observamos a indução de apoptose (precoce e tardia) bem como de necrose (em menor número de células) nas células HUVEC após exposição à várias concentrações das proteínas E2 recombinantes, o que confirma os achados de Balasubramanian e colaboradores em 2005. Em nossos resultados pudemos observar ainda que a proteína glicosilada (E2L) foi a maior indutora tanto de apoptose quanto de necrose, quando comparada a proteína não-glicosilada (E2B), demonstrando assim a influência da glicosilação sob o mecanismo de apoptose.

No presente estudo apresentamos o teste de Anexina V e do Iodeto de propídio (PI) para verificação da morte celular induzida pelas proteínas E2 recombinantes. Utilizamos para isso o teste de marcação das células por anexina V, que é uma técnica destinada à detecção de apoptose em vários tipos celulares, pela dosagem de fosfatidilserina (PS). A PS é predominantemente observada na superfície interna da bicamada lipídica, voltada para o citosol. Nas células no início da apoptose, onde a membrana celular ainda permanece intacta mas sofre uma desorganização, a PS é translocada para a superfície exterior da bicamada. O aparecimento de PS na superfície celular é reconhecido pelos fagócitos, que captam este sinal e removem a célula que sinalizou seu “suicídio” ao ambiente. A anexina V é uma proteína que se liga a fosfolipídeos e possui alta afinidade por PS na presença íons de cálcio. Mudanças na assimetria da membrana, que é analisada através da medição da aderência de Anexina V à membrana celular, podem ser detectadas antes das alterações morfológicas associadas ao início da apoptose e antes da perda da integridade da membrana. Ao conjugar a Anexina V ao FITC (Isotiocianato de fluoresceína) é possível identificar e quantificar as células apoptóticas por citometria de fluxo (KERR et al., 1972; KERR, 2002).

A marcação das células com PI também foi realizada, sendo este um marcador nuclear fluorescente utilizado para distinguir células apoptóticas de células necróticas. O PI é uma molécula que se intercala em qualquer DNA, desde que a membrana celular esteja permeável. Tal propriedade deve-se ao fato de que marcadores de DNA de elevado peso molecular, como o PI, não são passíveis de penetrar na célula intacta em decorrência do seu tamanho, bem como não marcam células apoptóticas sem que estas apresentem alterações na permeabilidade da membrana plasmática, como ocorre nos estágios finais da apoptose. Desse modo, corar células simultaneamente com Anexina V-FITC (fluorescência - verde) e com o corante PI (fluorescência - vermelha) permite a discriminação de células intactas, viáveis (FITC - PI -), no início de apoptose (FITC + PI -) e células tardiamente apoptóticas ou necróticas (FITC + PI +) (KERR et al., 1972; KERR, 2002).

Estudos recentes no campo da infecção pelo HCV têm desvendado vários mecanismos, entre eles o de carcinogênese. Mas os envolvidos com o estabelecimento da infecção crônica e a evasão do sistema imune do hospedeiro ainda precisam ser elucidados, entretanto, a análise de

células mononucleares do sangue periférico e a biópsia de fígado de indivíduos cronicamente infectados pelo vírus, sugerem que a infecção pelo HCV pode ser capaz de induzir apoptose, auxiliando o vírus a evadir-se do sistema imune, mas causando danos ao fígado (HIRAMATSU et al., 1994; PIANKO et al., 2001). Além disso, embora a morte celular programada das células infectadas pelo vírus possa parecer suicida, esta parece ser uma forma de facilitar a disseminação viral (CHIOU et al., 2006). Estudos *in vitro* têm demonstrado que a apoptose pode ser induzida por proteínas virais (KALKERI et al., 2001). Vários estudos independentes sugerem que o HCV, além de mediar efeitos patológicos através de várias das suas atividades multifuncionais (MA et al., 2002; McLAUCHLAN et al., 2000), pode modular a apoptose celular através da proteína do core (RAY et al., 1996; HONDA et al., 2000). Além disso, o envolvimento de outras proteínas do HCV na indução da apoptose ainda não está clara. Diante disso, a proteína E2 do HCV, responsável pela ligação do vírus à célula hospedeira e invasão, pode apresentar potencial para induzir apoptose, uma vez que, esta proteína compartilha características genéticas similares às proteínas de envelope de certos *Flavivirus*, que tem sido reportadas como capazes de induzir apoptose em culturas de células de mamíferos a fim de manter a infecção persistente (AVIRUTNAN et al., 1998; SANTOS et al., 2000 ; PRIKHOD'KO et al., 2002). Embora estudos anteriores tenham indicado que a proteína E2 possa induzir a apoptose em cultura de células de mamíferos, contribuindo assim para a lesão hepática (ZHU et al., 2004) como verificado por nós, outro estudo mostrou que a proteína E2 pode inibir a apoptose a partir da mitocôndria para manter a infecção persistente (LEE et al., 2005).

A apoptose é um mecanismo bem regulado que está sob o controle de várias vias de sinalização, tais como caspase e via mitocondrial (HIRAMATSU et al., 1994; CALABRESE et al., 2000), sendo também relatado o seu envolvimento na patogênese da Hepatite C. Existem evidências que a resposta imune com participação dos linfócitos T citotóxicos, possa estar envolvida na apoptose de hepatócitos de indivíduos infectados com HCV (EMI et al., 1999). Iken e colaboradores em 2006, relataram em seu estudo que as proteínas do core, E1 e E2, podiam aumentar a apoptose de células T ativadas através da regulação de FasL, aumentando a capacidade do fígado de inibir respostas de células T, atenuando respostas anti-virais e facilitando a persistência viral (IKEN et al., 2006; CHIOU et al., 2006). Sendo que a supressão da apoptose por estas proteínas virais pode ainda aumentar o carcinoma hepatocelular em indivíduos neste estágio (KAMEGAYA et al., 2005). Além disso, estudos recentes sugerem que a proteína do core induza a expressão de FasL em células HepG2 (CHIOU et al., 2006).

Portanto, a literatura sugere que o core pode não ser a única proteína viral envolvida na indução da apoptose, sendo que a proteína E2 por possuir semelhança genética com proteínas de envelope do vírus da dengue, que induzem apoptose durante a infecção, possa ter a mesma característica. Chiou e colaboradores em 2006, relataram que a proteína E2 causava a ativação das caspases 3, 8 e 9, induzindo assim a apoptose que era caspase-dependente. Além disso, o processo de apoptose pode estar relacionado com a expressão de proteínas da família Bcl-2, que regula a apoptose através do controle da função mitocondrial (KALKERI et al., 2001; MA et al.,

2002), pois a Bcl-2 pode influenciar a permeabilidade das membranas intracelulares e a liberação do citocromo c das mitocôndrias para controlar a apoptose (McLAUCHLAN et al., 2000).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um potente fator angiogênico que exerce um papel fundamental no desenvolvimento da angiogênese em vários tipos de tumores (TOL; BANDO; KUROI, 2000), incluindo o carcinoma hepatocelular (POON et al., 2001; Ng et al., 2001). O VEGF tem um efeito angiogênico específico em células endoteliais e pode ser estimulado mediante infecção pelo HCV (DVORAK et al., 1992). Além disso, exerce papel na regulação de diversas funções celulares incluindo crescimento celular (NASIMUZZAMAN et al., 2007) e apoptose (HOGLINGER et al., 2007). O VEGF é regulado por condições patológicas (SHWEIKI et al., 1992; STEIN et al., 1995), pelo TNF- α (RYUTO et al., 1996) e pelo TGF- β (JEON et al., 2007). Sendo observado também por Hassan e colaboradores (2009), em amostras de biópsia hepática de pacientes infectados com HCV.

A infecção persistente pelo HCV frequentemente leva à hepatite crônica (ALTER et al., 1989; CHOO et al., 1989) que é caracterizada pelo desenvolvimento de necrose hepatocelular, inflamação e fibrose (ABEL et al., 2006). Com a progressão da doença a fibrose leva à cirrose e ao carcinoma hepatocelular (ABEL et al., 2006). A ocorrência de angiogênese hepática é descrita nas hepatites virais, cirrose hepática auto-imune, cirrose biliar primária e carcinoma hepatocelular (GARCÍA-MONZON et al., 1995; KER et al., 1999). O HCV estimula a síntese e a secreção de VEGF, e o estímulo para isso ocorre via *stress* oxidativo induzido pelo vírus (NASIMUZZAMAN et al., 2007). A angiogênese está implicada no desenvolvimento do câncer por favorecer a progressão, o crescimento e a metástase (ZICHE; GULLINO, 1982; DI CARLO et al., 2002). O carcinoma hepatocelular é um tumor altamente maligno que é caracterizado por uma ativa neovascularização (POON et al., 2004). Hassan e colaboradores em 2009 relataram a indução da angiogênese hepática durante a infecção pelo HCV e sugerem que esta ocorrência possa ser um passo essencial nas fases mais precoces da oncogênese relacionada ao HCV. Muitos estudos relatam a variação no nível de expressão de fatores que regulam a angiogênese (TANAKA et al., 1999; POON et al., 2003). Mas os dados referentes ao papel das proteínas do HCV na regulação dos fatores angiogênicos ainda são escassos, apesar de vários estudos sugerirem um importante papel destas na hepatocarcinogênese (ABE et al., 2012).

É conhecido que a proteína do core e a NS5A, são alvos de um amplo espectro de fatores celulares por estimular várias vias de sinalização na célula (RAY et al., 1995; ERHARDT et al., 2002; HASSAN; GHOZLAN; ABDEL-KADER, 2004; NASIMUZZAMAN et al., 2007), contribuindo assim, para o desenvolvimento da angiogênese hepática, durante a infecção crônica pelo HCV, pela regulação de múltiplas vias, inclusive estimulando a produção de VEGF por uma dessas. Entretanto, os mecanismos moleculares que levam ao desenvolvimento da angiogênese hepática em pacientes infectados com o HCV ainda não são bem conhecidos (HASSAN et al., 2009).

Em nosso estudo, após expor células HUVEC e SC às proteínas E2 recombinantes, E2B e E2L, na concentração de 250 μ g/mL e aos estímulos-controle (PHA, LPS e PMA) observamos que a proteína E2L foi capaz de induzir uma maior produção de VEGF nas células HUVEC quando

comparada à E2B, aos outros estímulos e ao controle negativo ($p<0,01$). As células SC não produziram uma quantidade de VEGF significativa frente aos estímulos das proteínas recombinantes, apenas frente ao PMA ($p<0,05$). Na literatura não encontramos resultados de estímulo da produção de VEGF com a proteína E2 do HCV, mas apenas com a proteína do core e NS5A como descrito acima, portanto, não temos dados para comparação, mas podemos inferir que a proteína E2, assim como o core, é capaz de induzir a produção de VEGF e conseqüentemente a angiogênese.

A aparência das células endoteliais formando estruturas capilares características foi observada no trato portal inflamado de pacientes com Hepatite C (GARCÍA-MONZÓN et al., 1995), sendo que estes mesmos pacientes apresentavam aumento do mRNA do VEGF no fígado e níveis aumentados de VEGF no soro (SHIMODA et al., 1999; MEDINA et al., 2003). A angiogênese pode ser observada na doença hepática crônica e participa do processo fibrogênico (MEDINA et al., 2004). O tecido fibrótico oferece resistência ao fluxo sanguíneo prejudicando a distribuição de oxigênio, assim o estímulo para a angiogênese também pode ser dado por fatores induzidos pela hipóxia e citocinas angiogênicas, como o VEGF e a angiopoietina-2 (Ang-2) (PUGH; RATCLIFFE, 2003; ABE et al., 2012).

O HCV é um vírus de RNA de fita-positiva que é incapaz de integrar seu material genético no genoma da célula hospedeira, além disso, ele não carrega oncogenes no seu genoma, sugerindo que o HCV induza o carcinoma hepatocelular através de uma via indireta, por causar inflamação crônica, morte celular, proliferação e cirrose (HASSAN et al., 2009). O hepatocarcinoma relacionado à presença do HCV no tecido sempre foi descrito em pacientes HCV(+) com cirrose. Entretanto, estudos recentes têm observado a presença de carcinoma hepatocelular em indivíduos infectados com HCV, mas sem cirrose, sugerindo que a indução da angiogênese hepática pela infecção crônica do HCV pode contribuir para o desenvolvimento precoce de células cancerígenas e pode explicar a alta incidência de carcinoma hepatocelular em indivíduos infectados com HCV, mas sem cirrose (HASSAN et al., 2009).

Podemos dizer ainda que as múltiplas diferenças encontradas tanto na ligação às células quanto na resposta celular, às proteínas glicosilada e não-glicosilada, podem estar relacionadas ao fato de que a glicosilação é um fator indispensável ao dobramento (*folding*) desta proteína estrutural (TELLO et al., 2010). Além disso, os diversos resultados onde a proteína glicosilada gerou uma maior resposta nas células quando comparada com a proteína não-glicosilada, pode ser devido à presença da glicosilação na proteína proporcionar à esta uma conformação espacial diferente da não-glicosilada, que ao se ligar mais eficientemente (como um melhor encaixe) ao receptor celular causa uma maior perturbação na membrana da célula hospedeira gerando uma cascata de sinalização mais eficiente. Além disso, a conformação espacial da proteína pode fazer com que esta seja capaz de interagir com outros receptores, como as glicosaminoglicanas (GAGs) que são polissacarídeos lineares expressos na superfície de muitas células, e que atuam como sítios de interação iniciais entre muitos vírus e a célula, que apesar de se apresentarem em abundância, possuem baixa afinidade pelos mesmos (BURLONE; BUDKOWSKA, 2009), mas a

sua interação pode gerar um sinal maior na célula.

6. CONCLUSÕES

Ao término destes estudos, podemos concluir que com o advento da tecnologia do DNA recombinante, sistemas heterólogos são capazes de produzir proteínas recombinantes, similares o suficiente às proteínas nativas, para refletir características bioquímicas e antigênicas, para avaliação em inúmeros testes biológicos e aplicações clínicas. Pois existe uma grande necessidade de desenvolvimento de novas terapias anti-HCV que proporcionem menos efeitos colaterais aos pacientes, além de uma vacina preventiva. Mas para isso é necessário expandir o conhecimento sobre as características estruturais e funcionais das proteínas do HCV.

Em nosso estudo, os ensaios de ligação da proteína E2 às células foram enormemente enriquecidos pela possibilidade de comparar a influência da glicosilação na ligação das proteínas aos receptores celulares, pela utilização das duas formas da mesma proteína, onde pôde-se observar a importância da glicosilação principalmente na ligação ao R-LDL. Pois provavelmente a glicosilação está relacionada à conformação espacial da proteína conferindo-lhe maior afinidade com a molécula de LDL e consequentemente uma maior ligação ao R-LDL.

A utilização de duas linhagens distintas para os testes de ligação aos receptores também foi de grande importância, pois uma delas apresentava CD81 e R-LDL em sua superfície (ECV304) permitindo o estudo de ligação da proteína E2 na presença de ambos e pela utilização de uma célula (HUVEC) que no momento não expressava CD81, proporcionando assim, a análise da ligação no R-LDL independente do CD81. Com este estudo foi possível confirmar o achado que a proteína E2 do HCV interage com o R-LDL na presença de LDL, entretanto, quando este não está presente não é possível a interação com o R-LDL. Pôde-se observar ainda, que na ausência de LDL a proteína E2 pode interagir com o CD81, e que há uma influência estatisticamente significativa da glicosilação nesta ligação. Desta forma, pode-se sugerir que altas taxas de LDL no sangue de indivíduos portadores de Hepatite C podem favorecer a infectividade celular pelo HCV.

Assim, sugere-se que a proteína E2 seja a principal proteína de ancoramento do HCV à célula hospedeira, e que a porta de entrada deste mecanismo seja o R-LDL. Desta forma, espera-se que nossos achados possam contribuir para a elucidação dos mecanismos de invasão celular, relacionados às funções da proteína E2. E que através do nosso estudo e de outros recentes, que as propriedades bioquímicas e imunológicas da proteína E2 possam abrir novas possibilidades em importantes aplicações clínicas, bem como estes mecanismos de interação viral com o R-LDL podem se tornar alvos para o desenvolvimento de novas terapias anti-virais, sendo que estudos deste tipo com um outro alvo potencial e ligante da proteína E2, o CD81, já vem sendo realizados. Estes estudos sugerem que os receptores celulares, assim como o R-LDL, possam ser utilizados como estratégias eficientes para prevenir a infecção pelo HCV, entretanto para isso é necessário um conhecimento maior dos mecanismos de ligação das glicoproteínas de envelope do HCV aos receptores celulares.

Além disso, espera-se que estes resultados possam contribuir para o entendimento dos

mecanismos virais relacionados com a persistência e cronicidade da infecção pelo HCV, relacionados com o prognóstico da doença através dos resultados obtidos através dos ensaios que avaliaram os efeitos causados pela proteína E2 do HCV nos tipos celulares estudados, onde observamos que esta induz a produção de NO, H₂O₂, IL-8 e VEGF nas células HUVEC. Fatores estes ligados à persistência da infecção no órgão e à cronicidade, que culminam com as principais complicações da Hepatite C, que são a cirrose e o hepatocarcinoma, que segundo a literatura tem início na veia porta-hepática. Já que o aumento destas moléculas inflamatórias desencadeado pela exposição às proteínas E2, sugerindo tratar-se do efeito *Innocent Bystander*, pode gerar um *stress* oxidativo nas células, danos ao DNA celular, recrutamento de células inflamatórias do sistema imune, toxicidade às células do tecido hepático, indução de moléculas pró-fibrinogênicas e liberação de citocinas pró-inflamatórias que ao longo do tempo danificam as células hepáticas e adjacentes levando à fibrose do tecido e à morte celular programada que são responsáveis pela falência hepática e até mesmo pela carcinogênese.

Desta forma, estes resultados podem futuramente servir como dados iniciais para novas estratégias de intervenção terapêutica contra a interação das proteínas estruturais do HCV com o endotélio hepático, limitando a infecção e a inflamação, e assim também a patologia causada pela infecção do HCV.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, M.; KOGA, H.; YOSHIDA, T.; MASUDA, H.; IWAMOTO, H.; SAKATA, M.; HANADA, S.; NAKAMURA, T.; TANIGUCHI, E.; KAWAGUCHI, T.; YANO, H.; TORIMURA, T.; UENO, T.; SATA, M. Hepatitis C virus core protein upregulates the expression of vascular endothelial growth factor via the nuclear factor- κ B/hypoxia-inducible factor-1 α axis under hypoxic conditions. **Hepatol. Res.** 42: 591–600, 2012.
- ABEL, M.; SÈNE, D.; POL, S.; BOURLIÈRE, M.; POYNARD, T.; CHARLOTTE, F.; CACOUB, P.; CAILLAT-ZUCMAN, S. Intrahepatic virus-specific IL-10-producing CD8 T cells prevent liver damage during chronic hepatitis C virus infection. **Hepatol.** 44: 1607-1616, 2006.
- AFDHAL, N.H. The natural history of hepatitis. **C. Semin. Liver Dis.**, 24: 3–8, 2004.
- AGNELLO, V.; ÁBEL, G.; ELFAHAL, M.; KNIGHT, G.B.; ZHANG, Q.-X. Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 96: 12766–12771, 1999.
- AGNELLO, V.; CHUNG, R. T.; KAPLAN, L. M. A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia. **N. Engl. J. Med.** 327: 1490 –1495, 1992.
- AHLQUIST, P.; NOUEIRY, A.O.; LEE, W.M.; KUSHNER, D.B.; DYE, B.T. Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. **J. Virol.**, 77: 8181-8186, 2003.
- AIHARA, M.; TSUCHIMOTO, D.; TAKIZAWA, H.; AZUMA, A.; WAKEBE, H.; OHMOTO, Y.; IMAGAWA, K.; KIKUCHI, M.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K. Mechanisms involved in Helicobacter pylori-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. **Infect. Immun.** 65(8): 3218–3224, 1997.
- AKBAR, H.; IDREES, M.; BUTT, S.; AWAN, Z.; SABAR, M.F.; REHAMAN, I.U.; HUSSAIN, A.; SALEEM, S. High baseline interleukine-8 level is an Independent risk factor for the achievement of sustained virological response in chronic HCV patients. **Infect. Genet. Evol.** 11: 1301–1305, 2011.
- AKENO, N.; BLACKARD, J.T.; TOMER, Y. HCV E2 protein binds directly to thyroid cells and induces IL-8 production: A new mechanism for HCV induced thyroid autoimmunity. **J. Autoimmun.** 31: 339–344, 2008.
- ALBECKA, A.; MONTSERRET, R.; KREY, T.; TARR, A.W.; DIESIS, E.; BALL, J.K.; DESCAMPS, V.; DUVERLIE, G.; REY, F.; PENIN, F.; DUBUISSON, J. Identification of new functional regions in hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. **J. Virol.** 85(4): 1777-92, 2011.
- ALTER, H.J.; PURCELL, R.H.; SHIH, J.W.; MELPOLDER, J.C.; HOUGHTON, M.; CHOO, Q.L.; KUO, G. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. **N. Engl. J. Med.** 321: 1494-1500, 1989.
- AMARO, M.J.; BARTOLOME, J.; LOPEZ-FARRE, A.; PARDO, M.; CARRENO, V. Nitric oxide levels are decreased in patients with chronic hepatitis B and C. **Hepatol.** 20(4, part 2):253A, 1994.
- AMITAI, Y. Physiologic role for “inducible” nitric oxide synthase: a new form of astrocytic-neuronal interface. **Glia.** 58: 1775-1781, 2010.
- ARCHER, S. Measurement of NO in biological models. **FASEB J.** 7: 349–360, 1993.
- ATTAUR, R.; HARVEY, K.; SIDDIQUI, R. A. Interleukin-8: An autocrine inflammatory mediator. **Curr. Pharm. Des.** 5(4): 241–253, 1999.
- AVIRUTNAN, P.; MALASIT, P.; SELIGER, B.; BHAKDI, S.; HUSMANN, M. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. **J. Immunol.** 161: 6338–6346, 1998.
- BADIZADEGAN, K.; JONAS, M.M; OTT, M.J.; NELSON, S.P.; PEREZ-ATAYDE, A.R. Histopathology of the liver in children with chronic Hepatitis C viral infection. **Hepatol.**, 28: 1416-1423, 1998.
- BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nature.** 392(6676): 565–568, 1998.
- BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines – CXC and

CC chemokines. **Adv. Immunol.** 55: 97–179, 1994.

- BALASUBRAMANIAN, A.; GANJU, R.K.; GROOPMAN, J.E. Hepatitis C virus and HIV envelope proteins collaboratively mediate interleukin-8 secretion through activation of p38 MAP kinase and SHP2 in hepatocytes. **J. Biol. Chem.** 278, 35755–35766, 2003.

- BALASUBRAMANIAN, A.; MUNSHI, N.; KOZIEL, M.J.; HU, Z.; LIANG, T.J.; GROOPMAN, J.E.; GANJU, R.K. Structural proteins of hepatitis C virus induce interleukin 8 production and apoptosis in human endothelial cells. **J. Gen. Virol.** 86: 3291-3301, 2005.

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

- BARTH, H.; LIANG, T.J.; BAUMERT, T.F. Hepatitis C virus entry: molecular biology and clinical implications. **Hepatol.** 44(3): 527-535, 2006.

- BARTOSCH, B.; COSSET, F.L. Cell entry of hepatitis C virus. **Virol.** 348: 1–12, 2006.

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

- BENALI-FURET, N. L.; CHAMI, M.; HOUEL, L.; DE GIORGI, F.; VERNEJOUL, F.; LAGORCE, D.; BUSCAIL, L.; BARTENSCHLAGER, R.; ICHAS, F.; RIZZUTO, R.; PATERLINI-BRECHOT, P. Hepatitis C virus core triggers apoptosis in liver cells by inducing ER stress and ER calcium depletion. **Oncogen.** 24: 4921–4933, 2005.

- BETSHOLTZ, C.; RAINES, E.W. Platelet-derived growth factor: a key regulator of connective tissue cells in embryogenesis and pathogenesis. **Kidney Int.** 51: 1361, 1997.

- BIAN, T.; ZHOU, Y.; BI, S.; TAN, W.; WANG, Y. HCV envelope protein function is dependent on the peptides preceding the glycoproteins. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 378(1): 118-122, 2009.

- BISCEGLIE, A.M.D. Hepatitis C – virology and future antiviral targets. **Am. J. Med.** 107: 45-48, 1999.

- BLIGHT, K.; GOWANS, E. In situ hybridization and immunohistochemical staining of hepatitis C virus products. **Viral Hepatitis Reviews**, 1: 143-155, 1995.

- BONACORSI, C. Atividade anti-*Helicobacter pylori* e potencial antioxidante de espécies vegetais do Cerrado brasileiro. 2009. 217p. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara.

- BRASIER, A. R.; JAMALUDDIN, M.; CASOLA, A.; DUAN, W.; SHEN, Q.; GAROFALO, R. P. A promoter recruitment mechanism for tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 transcription in type II pulmonary epithelial cells. Dependence on nuclear abundance of Rel A, NF- κ B1, and c-Rel transcription factors. **J. Biol. Chem.** 273(6): 3551–3561, 1998.

- BREDET, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. **Neuron.** 8: 3-11, 1992.

- BROWN, G.C. Nitric oxide and neuronal death. **Nitric Oxide.** 3: 153-165, 2010.

- BROWN, J.; READING, S.J.; JONES, S.; FITCHETT, C.J.; HOWL, J.; MARTIN, A.; LONGLAND, C.L.; MICHELANGELO, F.; DUBROVA, Y.E.; BROWN, C.A. Critical evaluation of ECV304 as a human endothelial cell model defined by genetic analysis and functional responses: a comparison with the human bladder cancer derived epithelial cell line T24/83. **Lab. Invest.** 80(1): 37-45, 2000.

- BRUNO, C.M.; VALENTI, M.; BERTINO, G.; ARDIRI, A.; CONSOLO, M.; MAZZARINO, C.M.; AMOROSO, A.; NERI, S. Altered pattern of circulating matrix metalloproteinases-2, -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in patients with HCV-related chronic hepatitis. Relationship to histological features. **Panminerva Med.** 51:191–196, 2009.

- Bula Kit Imuno-CON Chagas – Wama Diagnóstica

- BUKH, J.; MILLER, R.H.; PURCELL, R.H. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. **Semin. Liver Dis.** 15: 41-63, 1995.
- BUREAU, C.; BERNAD, J.; CHAOUCHE, N.; ORFILA, C.; BERAUD, M.; GONINDARD, C.; ALRIC, L.; VINEL, J.P.; PIPY, B. Nonstructural 3 protein of hepatitis C virus triggers an oxidative burst in human monocytes via activation of NADPH oxidase. **J. Biol. Chem.** 276: 23077–23083, 2001.
- BURKE, K.P.; COX, A.L. Hepatitis C virus evasion of adaptive immune responses: a model for viral persistence. **Immunol. Res.** 47(1-3): 216-227, 2010.
- BURLONE, M.E.; BUDKOWSKA, A. Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. **J. Gen. Virol.** 90(5): 1055-1070, 2009.
- CALABRESE, F.; PONTISSO, P.; PETTENAZZO, E.; BENVEGNI, L.; VARIO, A.; CHEMELLO, L.; ALBERTI, A.; VALENTE, M. Liver cell apoptosis in chronic hepatitis C correlates with histological but not biochemical activity or serum HCV-RNA levels. **Hepatology.** 31: 1153–1159, 2000.
- CAO, W.; SUN, B.; FEITELSON, M.A.; WU, T.; TUR-KASPA, R.; FAN, Q. Hepatitis C Virus Targets Over-Expression of Arginase I in Hepatocarcinogenesis. **Int. J. Cancer.** 124(12): 2886–2892, 2009.
- CAPONE, F.; GUERRIERO, E.; SORICE, A.; MAIO, P.; COLONNA, G.; CASTELLO, G.; COSTANTINI, S. Characterization of metalloproteinases, oxidative status and inflammation levels in the different stages of fibrosis in HCV patients. **Clin. Biochem.** 45: 525–529, 2012.
- CESPUGLIO, R.; AMROUNI, D.; MEILLER, A.; BUGUET, A.; GAUTIER-SAUVIGNÉ, S. Nitric oxide in the regulation of the sleep-wake states. **Sleep Med. Rev.** 16(3): 265-279, 2012.
- CHANG, S.; DOLGANIUC, A.; SZABO, G. Toll-like receptors 1 and 6 are involved in TLR2 mediated macrophage activation by hepatitis C virus core and NS3 proteins. **J. Leukoc. Biol.** 82(3): 479-487, 2007.
- CHIOU, H.L.; HSIEH, Y.S.; HSIEH, M.R.; CHEN, T.Y. HCV E2 may induce apoptosis of Huh-7 cells via a mitochondrial-related caspase pathway. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 345: 453–458, 2006.
- 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-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, 244: 359–362, 1989.
- CHOO, Q.L.; RICHMAN, K.H.; HAN, J.H.; BERGER, K.; LEE, C.; DONG, C.; GALLEGOS, C.; COIT, D.; MEDINA-SELBY, R.; BARR, P.J. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 88: 2451-2455, 1991.
- CHRZANOWSKA, A.; MIELCZAREK-PUTA, M.; SKWAREK, A.; KRAWCZYK, M.; BARANXZYK-KUZMA, A. Serum arginase activity in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. **Wiadomosci Lekarskie.** 60: 215–218, 2007.
- COCQUEREL, L.; MEUNIER, J.C.; PILLEZ, A.; WYCHOWSKY, C.; DUBUISSON, J. A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2. **J. Virol.** 72: 2183–2191, 1998.
- CORRALIZA, I.M.; CAMPO, M.L.; SOLER, G.; MODOLELL, M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. **J. Immunol. Methods.** 174(1-2): 231-235, 1994.
- CROTTA, S.; STILLA, A.; WACK, A.; D'ANDREA, A.; NUTI, S.; D'ORO, U.; MOSCA, M.; FILLIPONI, F.; BRUNETTO, R.M.; BONINO, F.; ABRIGNANI, S.; VALIANTE, N.M. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. **J. Exp. Med.** 195(1): 35-41, 2002.
- DEFORGE, L.E.; PRESTON, A.M.; TAKEUCHI, E.; KENNEY, J.; BOXER, L.A.; REMICK, D.G. Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress. **J. Biol. Chem.** 268(34): 25568–25576, 1993.
- DHAR, I.; DHAR, A.; WU, L.; DESAI, K. Arginine attenuates methylglyoxal- and high glucose-induced endothelial dysfunction and oxidative stress by an endothelial nitric-oxide synthase-independent mechanism. **J Pharmacol Exp Ther.** 342(1): 196-204, 2012.
- DI CARLO, I.; FRAGGETTA, F.; LOMBARDO, R.; AZZARELLO, G.; VASQUEZ, E.; PULEO S. CD34

expression in chronic and neoplastic liver diseases. **Panminerva Med.** 44: 365-367, 2002.

- DIEDRICH, G. How does hepatitis C virus enter cells? **FEBS J.** 273(17): 3871-3885, 2006.
- DIENES, H.P.; DREBBER, U.; BOTH, I.V. Liver biopsy in hepatitis C. **J. Hepatol.** 31: 43-46, 1999.
- DIESEN, D.L.; KUO, P.C. Nitric oxide and redox regulation in the liver. Part I: general considerations and redox biology in hepatitis. **J. Surg. Res.** 162: 95-109, 2010.
- DUBUISSON, J., RICE, C.M. Hepatitis C virus glycoprotein folding: disulfide bond formation and association with calnexin. **J. Virol.** 70(2): 778-786, 1996.
- DUBUISSON, J.; HELLE, F.; COCQUEREL, L. Early steps of the hepatitis C virus life cycle. **Cell. Microbiol.** 10(4): 821-827, 2008.
- DVORAK, H.F.; NAGY, J.A.; BERSE, B.; BROWN, L.F.; YEO, K.T.; YEO, T.K.; DVORAK, A.M.; VAN DE WATER, L.; SIOUSSAT, T.M.; SENGGER, D.R. Vascular permeability factor, fibrin, and the pathogenesis of tumor stroma formation. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 667: 101-111, 1992.
- EMI, K.; NAKAMURA, K.; YUH, K.; SUGYO, S.; SHIJO, H.; KUROKI, M.; TAMURA, K. Magnitude of activity in chronic hepatitis C is influenced by apoptosis of T cells responsible for hepatitis C virus. **J. Gastroenterol. Hepatol.** 14: 1018-1024, 1999.
- ENCKE, J.; PULTLITZ J.Z.; HEINTGES, T.; WANDS, J.R. Total chemical synthesis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus with long oligodeoxynucleotides. **J. Virol. Methods**, 74: 117-121, 1998.
- ENOMOTO, N.; SAKUMA, I.; ASAHINA, Y.; KUROSAKI, M.; MURAKAMI, T.; YAMAMOTO, C.; OGURA, Y.; IZUMI, N.; MARUMO, F.; SATO, C. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. **N. Engl. J. Med.**, 334: 77-81, 1996.
- ERHARDT, A.; HASSAN, M.; HEINTGES, T.; HAUSSINGER, D. Hepatitis C virus core protein induces cell proliferation and activates ERK, JNK, and p38 MAP kinases together with the MAP kinase phosphatase MKP-1 in a HepG2 Tet-Off cell line. **Virol.** 292: 272-284, 2002.
- FACTOR, V. M.; LASKOWSKA, D.; JENSEN, M.R.; WOITACH, J.T.; POPESCU, N.C.; THORGEIRSSON, S.S. Vitamin E reduces chromosomal damage and inhibits hepatic tumor formation in a transgenic mouse model. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 97: 2196-2201, 2000.
- FANG, X.; ZEISEL, M.B.; WILPERT, J.; GISSLER, B.; THIMME, R.; KREUTZ, C.; MAIWALD, T.; TIMMER, J.; KERN, W.V.; DONAUER, J.; GEYER, M.; WALZ, G.; DEPLA, E.; VON WEIZSÄCKER, F.; BLUM, H.E.; BAUMERT, T.F. Host cell responses induced by hepatitis C virus binding. **Hepatol.** 43(6): 1326-1336, 2006.
- FARCI, P.; SHIMODA, A.; COIANA, A.; DIAZ, G.; PEDDIS, G.; MELPOLDER, J.C.; STRAZZERA, A.; CHIEN, D.Y.; MUNOZ, S.J.; BALESTRIERI, A.; PURCELL, R.H.; ALTER, H.J. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. **Science**, 288: 339-344, 2001.
- FARCI, P.; SHIMODA, A.; WONG, D.; CABEZON, T.; GIOANNIS, D.; STRAZZERA, A.; SHIMIZU, Y.; SHAPIRO, M.; ALTER, H. J. & PURCELL, R. H. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 93: 15394-15399, 1996.
- FAVRE, D.; MUELLHAUPT, B. Potential cellular involved in hepatitis C virus entry into cells. **Lipid in Health and Disease**, 19:4:9, 2005.
- FELD, J.J.; HOOFNAGLE, J.H. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. **Nature**, 436: 967-972, 2005.
- FERRI, C. ; GRECO, G.; LONGOMBARDO, P.; PALLA, A.; MORETTI, E.; MARZO, P. V.; FOSELLA, G.; PASERO, S. Antibodies against hepatitis C virus in mixed cryoglobulinemia patients. **Infection.** 6: 551-555, 1991.
- FIALKOW, L.; CHAN, C.K.; ROTIN, D.; GRINSTEIN, S.; DOWNEY, G.P. Activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in neutrophils. Role of oxidants. **J. Biol. Chem.** 269: 31234-

31242, 1994.

- FIORUCCI, M.; BOULANT, S.; FOURNILLIER, A.; ABRAHAM, J.D.; LAVERGNE, J.P.; PARANHOS-BACCALA, G.; INCHAUSPE, G.; BAIN, C.. Expression of the alternative reading frame protein of Hepatitis C virus induces cytokines involved in hepatic injuries. **J. Gen. Virol.** 88: 1149–1162, 2007.
- FLINT, M.; MAIDENS, C.; LOOMIS-PRICE, L.D.; SHOTTON, C.; DUBUISSON, J.; MONK, P.; HIGGINBOTTOM, A.; LEVY, S.; MCKEATING, J.A. Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. **J. Virol.** 73(8): 6235–44, 1999.
- FOURNIER, C.; SUREAU, C.; COSTE, J.; DUCOS, J.; PAGEAUX, G.; LARREY, D.; DOMERGUE, J.; MAUREL, P. In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus. **J. Gen. Virol.** 79: 2367–2374, 1998.
- FUKUDA, R.; ISHIMURA, N.; ISHIHARA, S.; CHOWDHURY, A.; MORLYAMA, N.; NOGAMI, C.; MIYAKE, T.; NIIGAKI, M.; TOKUDA, A.; SATOH, S.; SAKAI, S.; AKAGI, S.; WATANABE, M.; FUKUMOTO, S. Intrahepatic expression of pro-inflammatory cytokine mRNAs and interferon efficacy in chronic hepatitis C. **Liver.** 16: 390–399, 1996.
- FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smoothmuscle by acetylcholine. **Nature.** 288: 373–376, 1980.
- GARCÍA-MONZON, C.; SANCHEZ-MADRID, F.; GARCÍA-BUEY, L.; GARCÍA-ARROYO, A.; GARCÍA-SÁNCHEZ, A.; MORENO-OTERO, R. Vascular adhesion molecule expression in viral chronic hepatitis: evidence of neoangiogenesis in portal tracts. **Gastroenterol.** 108: 231–241, 1995.
- GHANY, M.G.; KLEINER, D.E.; ALTER, H.; DOO, E.; KHOKAR, F.; PROMRAT, K.; HERION, D.; PARK, Y.; LIANG, T.J.; HOOFNAGLE, J.H. Progression of fibrosis in chronic hepatitis C. **Gastroenterol.** 124: 97–104, 2003.
- GIANNINI, C.; BRECHOT, C. Hepatitis C virus biology. **Cell. Death. Differ.**, 10: S27–S38, 2003.
- GOFFARD, A.; CALLENS, N.; BARTOSCH, B.; WYCHOWSKI, C.; COSSET, F.L.; MONTEPELLIER, C.; DUBUISSON, J. Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins. **J. Virol.** 79(13): 8400–8409, 2005.
- GOFFARD, A.; DUBUISSON, J. Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins. **Biochimie**, 85 (3–4): 295–301, 2003.
- GOKMEN, S.S.; AYGIT, A.C.; AYHAN, M.S.; YORULMAZ, F.; GULEN, S. Significance of arginase and ornithine in malignant tumors of the human skin. **J. Lab. Clin. Med.** 137: 340–4, 2001.
- GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytic. Biochem.** 126(1): 131–138, 1982.
- GREENWEL, P.; DOMÍNGUEZ-ROSALES, J.A.; MAVI, G.; RIVAS-ESTILLA, A.M.; ROJKIND, M. Hydrogen peroxide: A link between acetaldehyde-elicited alpha1(I) collagen gene up-regulation and oxidative stress in mouse hepatic stellate cells. **Hepatology.** 31: 109–116, 2000.
- GRIFFIN, S.D.; BEALES, L.P.; CLARKE, D.S.; WORSFOLD, O.; EVANS, S.D.; JAEGER, J.; HARRIS, M.P.; ROWLANDS, D.J. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. **FEBS Lett.**, 535: 34–38, 2003.
- HAHN, T.V.; LINDENBACH, B.D.; BOULLIER, A.; QUEHENBERGER, O.; PAULSON, M.; RICE, C.M.; MCKEATING, J.A. Oxidized low-density lipoprotein inhibits hepatitis C virus cell entry in human hepatoma cells. **Hepatology.** 43(5): 932–942, 2006.
- HARAGUCHI, Y.; TAKIGUCHI, M.; AMAYA, Y.; KAWAMOTO, S.; MATSUDA, I.; MORI, M. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human liver arginase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 84:412–415, 1987.
- HASSAN, M.; GHOZLAN, H.; ABDEL-KADER, O. Activation of RB/E2F signaling pathway is required for

the modulation of hepatitis C virus (HCV) core protein-induced cell growth in liver and non-liver cells. **Cell Signal.** 16: 1375-1385, 2004.

- HASSAN, M.; SELIMOVIC, D.; GHOZLAN, H.; ABDEL-KADER, O. Hepatitis C Virus Core Protein Triggers Hepatic Angiogenesis by a Mechanism Including Multiple Pathways. **Hepatol.** 49(5): 1469-1482, 2009.

- HASSAN, M.I.; KASSIM, S.K.; ALI, H.S.; SAYED, E.A.E.; KHALIFA, A. Evaluation of nitric oxide (NO) levels in hepatitis C virus (HCV) infection: Relationship to schistosomiasis and liver cirrhosis among Egyptian patients. **Disease Markers.** 18: 137-142 137, 2002.

- HELENIUS, A.; AEBI, M. Intracellular functions of N-linked glycans. **Science.** 23;291(5512):2364-2369, 2001.

- Hepatite C: <http://www.aids.gov.br/pagina/hepatite-c>

- HERZ, J.; STRICKLAND, D.K. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. **J. Clin. Invest.**, 108: 779-784, 2001.

- HESSELGESSER, J.; TAUB, D.; BASKER, P.; GREENBERG, M.; HOXIE, J.; KOLSON, D. L.; HORUK, R. Neuronal apoptosis induced by HIV-1 gp120 and the chemokine SDF-1 alpha is mediated by the chemokine receptor CXCR4. **Curr. Biol.** 8(10): 595-598, 1998.

- HIRAMATSU, N.; HAYASHI, N.; KATAYAMA, K.; MOCHIZUKI, K.; KAWANISHI, Y.; KASAHARA, A.; FUSAMOTO, H.; KAMADA, T. Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. **Hepatol.** 19: 1354-1359, 1994.

- HISHIKI, T.; SHIMIZU, Y.; TOBITA, R.; SUGIYAMA, K.; OGAWA, K.; FUNAMI, K.; OHSAKI, Y.; FUJIMOTO, T.; TAKAKU, H.; WAKITA, T.; BAUMERT, T.F.; MIYANARI, Y.; SHIMOTOHNO, K. Infectivity of hepatitis C virus is influenced by association with apolipoprotein E isoforms. **J. Virol.**, 84(22):12048-57, 2010.

- HOBBIE, S.; CHEN, L. M.; DAVIS, R. J.; GALÁN, J. E. Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by Salmonella typhimurium in cultured intestinal epithelial cells. **J. Immunol.** 159(11): 5550-5559, 1997.

- HÖGLINGER, G.U.; BREUNIG, J.J.; DEPBOYLU, C.; ROUAUX, C.; MICHEL, P.P.; ALVAREZ-FISCHER, D.; BOUTILLIER, A.L.; DEGREGORI, J.; OERTEL, W.H.; RAKIC, P.; HIRSCH, E.C.; HUNOT, S. The pRb/E2F cell-cycle pathway mediates cell death in Parkinson's disease. **Proc. Natl. Acad. Sc. Iusa.** 104(9): 3585-3590, 2007.

- HOLLAND, P. V.; BARRERA, J. M.; ERCILLA, M. G.; YOSHIDA, C. F.; WANG, Y.; DE OLIM, G. A.; BETLACH, B.; KURAMOTO, K.; OKAMOTO, H. Genotyping hepatitis C virus isolates from Spain, Brazil, China and Macau by a simplified PCR method. **J. Clin. Microbiol.**, 34: 2372 – 2378, 1996.

- HONDA, M.; KANEKO, S.; SHIMAZAKI, T.; MATSUSHITA, E.; KOBAYASHI, K.; PING, L.H.; ZHANG, H.C.; LEMON, S.M. Hepatitis C virus core protein induces apoptosis and impairs cell-cycle regulation in stably transformed Chinese hamster ovary cells. **Hepatol.** 31: 1351-1359, 2000.

- HONDA, M.; PING, L. H.; RIJNBRAND, R. A.; AMPHLETT, E.; CLARKE, B.; ROWLANDS, D. & LEMON, S. M. Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. **Virol.** 222: 31-42, 1996.

- HONG, H.W.; LEE, S.W.; MYUNG, H. Selection of peptides binding to HCV E2 and inhibiting viral infectivity. **J. Microbiol. Biotechnol.** 20(12): 1769-1771, 2010.

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

- HOUGHTON, M.; ABRIGNANI, S., Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus. **Nature**, 436: 961-966, 2005.

- HÜSSY, P., FAUST, H., WAGNER, J.C., SCHMID, G., MOUS, J., JACOBSEN, H.. Evaluation of hepatitis C virus envelope proteins expressed in E. coli and insect cells for use as tools for antibody screening. **J. Hepatol.** 26(6): 1179-1186, 1997.

- IKEMOTO, M.; TSUNEKAWA, S.; AWANE, M.; FUKUDA, Y.; MURAYAMA, H.; IGARASHI, M.; NAGATA, A.; KASAI, Y.; TOTANI, M. A useful ELISA system for human liver-type arginase, and its utility in diagnosis of liver diseases. **Clin. Biochem.** 34: 455–461, 2001.
- IKEN, K.; HUANG, L.; BEKELE, H.; SCHMIDT, E.V.; KOZIEL, M.J. Apoptosis of activated CD4+ and CD8+ T cells is enhanced by co-culture with hepatocytes expressing hepatitis C virus (HCV) structural proteins through FasL induction. **Virology**. 346: 363–372, 2006.
- JAISWAL, M.; LARUSSO, N.F.; BURGART, L.J.; GORES, G.J. Inflammatory Cytokines Induce DNA damage and Inhibit DNA repair in Cholangiocarcinoma Cells by a Nitric Oxide-dependent Mechanism. **Cancer Res.** 60: 184-190, 2000.
- JEON, S.H.; CHAE, B.C.; KIM, H.A.; SEO, G.Y.; SEO, D.W.; CHUN, G.T.; KIM, N.S.; YIE, S.W.; BYEON, W.H.; EOM, S.H.; HA, K.S.; KIM, Y.M.; KIM, P.H. Mechanisms underlying TGF-beta1-induced expression of VEGF and Flk-1 in mouse macrophages and their implications for angiogenesis. **J. Leukoc. Biol.** 81: 557-566, 2007.
- JORGENSEN, K.; SKREDE, M.; CRUCIANI, V.; MIKALSEN, S.O.; SLIPICEVIC, A.; FLORENES, V.A. Phorbol ester phorbol-12-myristate-13-acetate promotes anchorage-independent growth and survival of melanomas through MEK-independent activation of ERK1/2. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 329(1): 266-274, 2005.
- KADOYA, H.; NAGANO-FUJII, M.; DENG, L.; NAKAZONO, N.; HOTTA, H.. Nonstructural proteins 4A and 4B of hepatitis C virus transactivate the interleukin 8 promoter. **Microbiol. Immunol.** 49: 265–273, 2005.
- KALKERI, G.; KHALAP, N.; AKHTER, S.; GARRY, R.F.; FERMIN, C.D.; DASH, S. Hepatitis C viral proteins affect cell viability and membrane permeability. **Exp. Mol. Pathol.** 71: 194–208, 2001.
- KAMEGAYA, Y.; HIASA, Y.; ZUKERBERG, L.; FOWLER, N.; BLACKARD, J.T.; LIN, W.; CHOE, W.H.; SCHMIDT, E.V.; CHUNG, R.T. Hepatitis C virus acts as a tumor accelerator by blocking apoptosis in a mouse model of hepatocarcinogenesis. **Hepatol.** 41: 660–667, 2005.
- KANE, J.M.; SHEARS, L.L.; HIERHOLZER, C.; AMBS, S.; BILLIAR, T.R.; POSNER, M.C. Chronic Hepatitis C Virus Infection in Humans: Induction of Hepatic Nitric Oxide Synthase and Proposed Mechanisms for Carcinogenesis. **J. Surg. Res.** 69: 321–324, 1997.
- KAPLANSKI, G.; FARNARIER, C.; PAYAN, M.J.; BONGRAND, P.; DURAND, J.M. Increased levels of soluble adhesion molecules in the serum of patients with hepatitis C. Correlation with cytokine concentrations and liver inflammation and fibrosis. **Dig. Dis. Sci.** 42: 2277–2284, 1997.
- KASAHARA, T.; MUKAIDA, N.; YAMASHITA, K.; YAGISAWA, H.; AKAHOSHI, T.; MATSUSHIMA, K. IL-1 and TNF-alpha induction of IL-8 and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) mRNA expression in a human astrocytoma cell line. **Immunol.** 74(1): 60–67, 1991.
- KATO, N. Genome of human hepatitis C virus (HCV): gene organization, sequence diversity, and variation. **Microb. Comp. Genomics**, 5: 129-151, 2000.
- KATO, N.; HIJIKATA, M.; OOTSUYAMA, Y.; NAKAGAWA, M.; OHKOSHI, S.; SUGIMURA, T.; SHIMOTOHNO, K. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 87: 9524–9528, 1990.
- KATO, N.; OOTSUYAMA, Y.; TANAKA, T.; NAKAGAWA, M.; NAKAZAWA, T.; MURAI, K.; OHKOSHI, S.; HIJIKATA, M.; SHIMOTOHNO, K. Marked sequence diversity in the putative envelope proteins of hepatitis C viruses. **Virus Res.**, 22: 107–123, 1992.
- KATO, N.; YOSHIDA, H.; KIOKO, O.; KATO, J.; GOTO, T.; OTSUKA, M.; LAN, K.; MATSUSHIMA, K.; SHIRATORI, Y.; OMATA, M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. **Hepatol.** 32, 405–412, 2000.
- KAUFMAN, R. J. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. **Genes Dev.** 13:1211–1233, 1999.
- KAUL, M.; LIPTON, S.A. Chemokines and activated macrophages in HIV gp120-induced neuronal

apoptosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 96(14): 8212–8216, 1999.

- KER, C.G.; CHEN, H.Y.; JUAN, C.C.; LO, H.W.; SHEN, Y.Y.; CHEN, J.S.; LEE, K.T.; SHEEN, P.C. Role of angiogenesis in hepatitis and hepatocellular carcinoma. **Hepatogastroenterol.** 46(26): 646-650, 1999.

- KERR, J.F. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. **Toxicol.** 181-182:471-474, 2002.

- KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer.** 26(4):239-257, 1972.

- KIM, J.H.; BUGAJ, L.J.; OH, Y.J.; BIVALACQUA, T.J.; RYOO, S.; SOUCY, K.G.; SANTHANAM, L.; WEBB, A.; CAMARA, A.; SIKKA, G.; NYHAN, D.; SHOUKAS, A.A.; ILIES, M.; CHRISTIANSON, D.W.; CHAMPION, H.C.; BERKOWITZ, D.E. Arginase inhibition restores NOS coupling and reverses endothelial dysfunction and vascular stiffness in old rats. **J. Appl. Physiol.** 107, 1249–1257, 2009.

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

- KIZAKI, M.; SAKASHITA, A.; KARMAKAR, A.; LIN, C.W.; KOEFFLER, H.P. Regulation of manganese superoxide dismutase and other antioxidant genes in normal and leukemic hematopoietic cells and their relationship to cytotoxicity by tumor necrosis factor. **Blood.** 82:1142–1150, 1993.

- KOCNA, P.; FRIC, P.; ZAVORAL, M.; PELECH, T. Arginase activity determination. A marker of large bowel mucosa proliferation. **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.** 34: 619–623, 1996.

- KOIKE, K. Hepatitis C virus contributes to hepatocarcinogenesis by modulating metabolic and intracellular signaling pathways. **J. Gastroenterol. Hepatol.** 22(Suppl 1): S108–11, 2007.

- KOZIEL, M.J.; DUDLEY, D.; AFDHAL, N.; GRAKOU, A.; RICE, C.M.; CHOO, Q.L.; HOUGHTON, M.; WALKER, B.D. HLA class I-restricted cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus. Identification of multiple epitopes and characterization of patterns of cytokine release. **J. Clin. Invest.** 96: 2311–2321, 1995.

- LADURNER, A.; ATANASOV, A.G.; HEISS, E.H.; BAUMGARTNER, L.; SCHWAIGER, S.; ROLLINGER, J.M.; STUPPNER, H.; DIRSCH, V.M. 2-(2,4-dihydroxyphenyl)-5-(E)-propenylbenzofuran promotes endothelial nitric oxide synthase activity in human endothelial cells. **Biochem Pharmacol.** 84(6):804-812, 2012.

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

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

- LAKE-BAKAAR, G.; SORBI, D.; ABERNATHY, P. Serum levels of nitric oxide during progression to AIDS in patients with HIV and chronic HCV liver disease: Possible explanation for normal HCV disease severity in HIV disease. **Gastroenterol.** 108:A855, 1995.

- LAKE-BAKAAR, G.; SORBI, D.; MAZZOCCOLI, V. Nitric oxide and chronic HCV and HIV infections. **Dig. Dis. Sci.** 46(5):1072-1076, 2001.

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

- LAUER, G.M.; WALKER, B.D. Hepatitis C virus infection. **NEngl. J. Med.**, 345: 41–52, 2001.

- LAVIE, M.; GOFFARD, A.; DUBUISSON, J. Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer. **Curr. Issues Mol. Biol.** 9(2): 71–86, 2007.

- LAVILLETTE, D.; MORICE, Y.; GERMANIDIS, G.; DONOT, P.; SOULIER, A.; PAGKALOS, E.;

SAKELLARIOU, G.; INTRATOR, L.; BARTOSCH, B.; PAWLOTSKY, J.M.; COSSET, F.L. Human serum facilitates hepatitis C virus infection, and neutralizing responses inversely correlate with viral replication kinetics at the acute phase of hepatitis C virus infection. **J. Virol.**, 79: 6023-6034, 2005.

- LEE, S.H.; KIM, Y.K.; KIM, C.S.; SEOL, S.K.; KIM, J.; CHO, S.; SONG, Y.L.; BARTENSCHLAGER, R.; JANG, S.K. E2 of hepatitis C virus inhibits apoptosis. **J. Immunol.** 175: 8226–8235, 2005.

- LERAT, H.; BERBY, F.; TRABAUD, M.A.; VIDALIN, O.; MAJOR, M.; TREPO, C.; INCHAUSPE, G. Specific detection of hepatitis C virus minus strand RNA in hematopoietic cells. **J. Clin. Invest.** 97: 845–851, 1996.

- LEVRERO, M. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. **Oncogene.** 25: 3834–3847, 2006.

- LEWIS, J. G.; D. O. ADAMS. Inflammation, oxidative DNA damage and carcinogenesis. **Environ. Health Perspect.** 76: 19–27, 1987.

- LIANG, T. J.; REHERMAN, B.; SEEF, L. B.; HOOFNAGLE, J. H. Pathogenesis, natural history, treatment and prevention of hepatitis C. **Ann. Intern. Med.**, 132: 296-3004, 2000.

- LIEBER, C. S. Role of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and nonalcoholic liver diseases. **Adv. Pharmacol.** 38: 601–628, 1997.

- LIN, X.; ZHANG, Y.; BI, S.; LU, J.; ZHAO, H.; TAN, W.; LI, D.; WANG, Y. Hepatitis C virus envelope glycoproteins complementation patterns and the role of the ecto- and transmembrane domains. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 385(2): 257-262, 2009.

- LINDENBACH, B.D.; RICE, C.M., Flaviridae: the viruses and their replication. In: Knipe, D., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*. **Lippincott Williams & Wilkins**. 41, 2001.

- LIU, J.; ZHU, L.; ZHANG, X.; LU, M.; KONG, Y.; WANG, Y.; LI, G. Expression, purification, immunological characterization and application of Escherichia coli-derived hepatitis C virus E2 proteins. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 34(Pt 2): 109-19, 2001.

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

- LORENT, E., BIERAU, H., ENGELBORGH, Y., VERHEYDEN, G., BOSMAN, F. Structural characterisation of the hepatitis C envelope glycoprotein E1 ectodomain derived from a mammalian and a yeast expression system. **Vaccine.** 26(3): 399-410, 2008.

- LORY, J.; ZIMMERMANN, A. Endotheliitis-like changes in chronic hepatitis C. **Histol. Histopathol.**, 12: 359–366, 1997.

- MA, H.C.; KE, C.H.; HSIEH, T.Y.; LO, S.Y. The first hydrophobic domain of the hepatitis C virus E1 protein is important for interaction with the capsid protein. **J. Gen. Virol.** 83: 3085–3092, 2002.

- MACHIDA, K.; CHENG, K.T.; SUNG, V.M.; LEE, K.J.; LEVINE, A.M.; LAI, M.M. Hepatitis C virus infection activates the immunologic (type II) isoform of nitric oxide synthase and thereby enhances DNA damage and mutations of cellular genes. **J. Virol.** 78: 8835–8843, 2004.

- MAEDA, M.F.Y.; SILVA, C.D.; HARIMA, L.S.; SILVA, L.F.F.; CTENAS, B.; ALVES, V.A.F. Vascularização na cirrose hepática: estudo imunoistoquímico baseado em necropsias. **Arq. Gastroenterol.** 45: 38-45, 2008.

- MAHMOOD, S.; SHO, M.; YASUHARA, Y.; KAWANAKA, M.; NIIYAMA, G.; TOGAWA, K.; ITO, T.; TAKAHASHI, N.; KINOSHITA, M.; YAMADA, G. Clinical significance of intrahepatic interleukin-8 in chronic hepatitis C patients. **Hepatol. Res.** 24(4): 413–419, 2002.

- MAIA, D.C.G.; SASSÁ, M.F.; PLACERES, M.C.P.; CARLOS, I.Z. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia.** 161: 11–19, 2006.

- MAILLARD, P.; KRAWCZYNSKI, K.; NITKIEWICZ, J.; BRONNERT, C.; SIDORKIEWICZ, M.; GOUNON, P.; DUBUISSON, J.; FAURE, G.; CRAINIC, R.; BUDKOWSKA, A. Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis

C virus in the serum of infected patients. **J. Virol.**, 75: 8240-8250, 2001.

- MAJOR, M.E.; REHERMANN, B.; FEINSTONE, S.M. Hepatitis C viruses. In: Knipe, D., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*. **Lippincott Williams & Wilkins**, Philadelphia, p.1, 2001.

- MAKRIDES, S.C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiological reviews**, 60: 512-538, 1996.

- MALAGUARNERA, M.; DIFAZIO, I.; ROMEO, M.A.; RESTUCCIA, S.; LAURINO, A.; TROVATO, B.A. Elevation of IL6 levels in patients with chronic hepatitis due to hepatitis C virus. **J. Gastroenterol.** 32: 211–215, 1997.

- Manual *Pichia* expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant proteins – pGAPZ A, B, and C, pGAPZ α A, B, and C. Catalog nos. V200-20 and V205-20 – Invitrogen.

- MARIE, C.; LOSSER, M. R.; FITTING, C.; KERMARREC, N.; PAYEN, D.; CAVAILLON, J. M. Cytokines and soluble cytokine receptors in pleural effusions from septic and nonseptic patients. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 156(5): 1512–1522, 1997.

- MARTINEZ-DONATO, G.; ACOSTA-RIVERO, N.; MORALES-GRILLO, J.; MUSACCHIO, A.; VINA, A.; ALVAREZ, C.; FIGUEROA, N.; GUERRA, I.; GARCIA, J.; VARAS, L.; MUZIO, V.; DUEÑAS-CARRERA, S. Expression and processing of hepatitis C virus structural proteins in *Pichia pastoris* yeast. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 342(2): 625-631, 2006.

- MARTY, C.; MISSET, B.; TAMION, F.; FITTING, C.; CARLET, J.; CAVAILLON, J. M. Circulating interleukin-8 concentrations in patients with multiple organ failure of septic and nonseptic origin. **Crit. Care Med.** 22(4): 673–679, 1994.

- MASTRONARDE, J. G.; MONICK, M. M.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K.; HUNNINGHAKE, G. W. Activator protein-1 is the preferred transcription factor for cooperative interaction with nuclear factor-kappaB in respiratory syncytial virus-induced interleukin-8 gene expression in airway epithelium. **J. Infect. Dis.** 177(5): 1275–1281, 1998.

- MASUMOTO, T.; OHKUBO, K.; YAMAMOTO, K.; NINOMIYA, T.; ABE, M.; AKBAR, S.M.; MICHITAKA, K.; HORIIKE, N.; ONJI, M. Serum IL-8 levels and localization of IL-8 in liver from patients with chronic viral hepatitis. **Hepatogastroenterol.** 45: 1630–1634, 1998.

- MATSUO, E.; TANI, H.; LIM, C.; KOMODA, Y.; OKAMOTO, T.; MIYAMOTO, H.; MORIISHI, K.; YAGI, S.; PATEL, A.H.; MIYAMURA, T.; MATSUURA, Y. Characterization of HCV-like particles produced in a human hepatoma cell line by a recombinant baculovirus. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 340(1): 200-208, 2006.

- MAZZOCCA, A.; SCIAMMETTA, S.C.; CARLONI, V.; COSMI, L.; ANNUNZIATO, F.; HARADA, T.; ABRIGNANI, S.; PINZANI, M. Binding of hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 up-regulates matrix metalloproteinase-2 in human hepatic stellate cells. **J. Biol. Chem.** 280: 11329–11339, 2005.

- McCAFFREY, K.; GOUKLANI, H.; BOO, I.; POUMBOURIOS, P.; DRUMMER, H.E. The variable regions of hepatitis C virus glycoprotein E2 have an essential structural role in glycoprotein assembly and virion infectivity. **J. Gen. Virol.**, 92(Pt 1):112-121, 2011.

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

- MEDINA, J.; ARROYO, A.G.; SÁNCHEZ-MADRID, F.; MORENO-OTERO, R. Angiogenesis in chronic inflammatory liver disease. **Hepatol.** 39(5):1185-1195, 2004.

- MEDINA, J.; CAVEDA, L.; SANZ-CAMENO, P.; ARROYO, A.G.; MARTÍN-VÍLCHEZ, S.; MAJANO, P.L.; GARCÍA-BUEY, L.; SÁNCHEZ-MADRID, F.; MORENO-OTERO, R. Hepatocyte growth factor activates endothelial proangiogenic mechanisms relevant in chronic hepatitis C-associated neoangiogenesis. **J. Hepatol.** 38(5):660-667, 2003.

- MELINO, M.; GADD, V.L.; WALKER, G.V.; SKOEN, R.; BARRIE, H.D.; JOTHIMANI, D.; HORSFALL, L.; JONES, A.; SWEET, M.J.; THOMAS, G.P.; CLOUSTON, A.D.; JONSSON, J.R.; POWELL, E.E. Macrophage

secretory products induce an inflammatory phenotype in hepatocytes. **World J. Gastroenterol.** 18(15): 1732-1744, 2012.

- MEOLA, A.; SBARDELLATI, A.; BRUNI ERCOLE, B.; CERRETANI, M.; PEZZANERA, M.; CECCACCI, A.; VITELLI, A.; LEVY, S.; NICOSIA, A.; TRABONI, C.; MCKEATING, J.; SCARSELLI, E. Binding of hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 does not correlate with species permissiveness to infection. **J. Virol.** 74(13):5933-8, 2000.

- MERZ, A.; LONG, G.; HIET, M.S.; BRÜGGER, B.; CHLANDA, P.; ANDRE, P.; WIELAND, F.; KRIJNSE-LOCKER, J.; BARTENSCHLAGER, R. Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. **J. Biol. Chem.**, 28; 286(4):3018-32, 2011.

- MEULEMAN, P.; HESSELGESSER, J.; PAULSON, M.; VANWOLLEGHEM, T.; DESOMBERE, I.; REISER, H.; LEROUX-ROELS, G. Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection in vivo. **Hepatol.** 48:1761–1768, 2008.

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

- MICHALAK, J.-P.; WYCHOWSKI, C.; CHOUKHI, A.; MEUNIER, J.-C.; UNG, S.; RICE, C.M.; DUBUISSON, J. Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. **J. Gen. Virol.** 78: 2299–2306, 1997.

- MIELCZAREK, M.; CHRZANOWSKA, A.; SCIBIOR, D.; SWAREK, A.; ASHAMISS, F.; LEWANDOWSKA, K.; BARANCZYK-KUZMA, A. Arginase as a useful factor for the diagnosis of colorectal cancer liver metastases. **Intl. J. Biol. Markers.** 21:40–44, 2006.

- MIHM, S.; FAYYAZI, A.; RAMADORI, G. Hepatic expression of inducible nitric oxide synthase transcripts in chronic hepatitis C virus infection: relation to hepatic viral load and liver injury, **Hepatol.** 26: 451–458, 1997.

- MING, X.F.; BARANDIER, C.; VISWAMBHARAN, H.; KWAK, B.R.; MACH, F.; MAZZOLAI, L.; HAYOZ, D.; RUFFIEUX, J.; RUSCONI, S.; MONTANI, J.P.; YANG, Z. Thrombin stimulates human endothelial arginase enzymatic activity via RhoA / ROCK pathway: implications for atherosclerotic endothelial dysfunction. **Circulation.** 110: 3708– 3714, 2004.

- MING-JU, H.; YIH-SHOU, H.; TZY-YEN, C.; HUI-LING, C. Hepatitis C virus E2 protein induce reactive oxygen species (ROS)-related fibrogenesis in the HSC-T6 hepatic stellate cell line. **J. Cell. Biochem.**,112(1): 233-243, 2011.

- MORADPOUR, D.; PENIN, F.; RICE, C.M. Replication of hepatitis C virus. **Nat. Rev. Microbiol.** 5(6): 453-463, 2007.

- MORRIS JR, S.M.; BHAMIDIPATI, D.; KEPKA-LENHART, D. Human type II arginase: sequence analysis and tissue-specific expression. **Gene.** 193: 157–161, 1997.

- MORRIS, S.M. Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. **Br. J. Pharmacol.** 157(6): 922-930, 2009.

- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.** 65(1-2): 55-63, 1983.

- MUNSHI, N.; BALASUBRAMANIAN, A.; KOZIEL, M.; GANJU, R.K.; GROOPMAN, J.E. Hepatitis C and human immunodeficiency virus envelope proteins cooperatively induce hepatocytic apoptosis via an innocent bystander mechanism. **J. Infect. Dis.**188(8): 1192–1204, 2003.

- MURAYAMA, T.; OHARA, Y.; OBUCHI, M.; KHABAR, K.S.A.; HIGASHI, H.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K. Human cytomegalovirus induces interleukin-8 production by a human monocytic cell line, THP-1, through acting concurrently on AP-1- and NF-kappaB-binding sites of the interleukin-8 gene. **J. Virol.** 71(7): 5692–5695, 1997.

- NAHMIAS, Y.; CASALI, M.; BARBE, L.; BERTHIAUME, F.; YARMUSH, M.L. Liver Endothelial Cells Promote R-LDL Expression and the Uptake of HCV-Like Particles in Primary Rat and Human Hepatocytes.

Hepatol. 43: 257-265, 2006.

- NAPOLI, J.; BISHOP, G. A.; MCCAUGHAN, G. W. Increased intrahepatic messenger RNA expression of interleukins 2, 6, and 8 in human cirrhosis. **Gastroenterol.** 107: 789–798, 1994.
- NASIMUZZAMAN, M.; WARIS, G.; MIKOLON, D.; STUPACK, D.G.; SIDDIQUI, A. Hepatitis C virus stabilizes hypoxia-inducible factor 1alpha and stimulates the synthesis of vascular endothelial growth factor. **J. Virol.** 81: 10249-10257, 2007.
- NEGRO, F. Mechanisms and significance of liver steatosis in hepatitis C virus infection. **World J. Gastroenterol.** 12: 6756–6765, 2006.
- NEUMAN, M.G.; BENHAMOU, J.P.; MARTINOT, M.; BOYER, N.; SHEAR, N.H.; MALKIEWICZ, I.; KATZ, G.G.; SUNEJA, A.; SINGH, S.; MARCELLIN, P. Predictors of sustained response to alpha interferon therapy in chronic hepatitis C. **Clin. Biochem.** 32(7): 537–545, 1999(a).
- NEUMAN, M.G.; BENHAMOU, J.P.; SHEAR, N.H. Interleukine 6 normalization during interferon-ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. **J. Hepatol.** 30 (Suppl. 1), 242 PC06/49, 1999(b).
- NEUMAN, M.G.; BENHAMOU, J.P.; SHEAR, N.H. Serum tumor necrosis factor as a predictor of sustain response to alpha-interferon-ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. **J. Hepatol.** 30 (Suppl. 1), 257 PC06/109, 1999(c).
- NEUMANN, A. U.; LAM, N. P.; DAHARI, H.; GRETCH, D. R.; WILEY, T. E.; LAYDEN, T. J. & PERELSON, A. S. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. **Science**, 282: 103-107, 1998.
- Ng, I.O.L.; POON, R.T.; LEE, J.M.; FAN, S.T.; NG, M.; TSO, W.K. Microvessel density, vascular endothelial growth factor and its receptors Flt-1 and Flk-1/KDR in hepatocellular carcinoma. **Am. J. Clin. Pathol.** 116: 838-845, 2001.
- NOWELL, P.C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. **Cancer Res.** 20: 462-466, 1960.
- OEM, J.K.; JACKEL, C.J.; LI, Y.P.; KANG, H.N.; ZHOU, Y.; BABIUK, L.A.; LIU, Q. Hepatitis C virus non-structural protein-2 activates CXCL-8 transcription through NF-kB. **Arch. Virol.** 153: 293–301, 2008.
- OKAMOTO, H.; MUNEKATA, E.; TSUDA, F.; TAKAHASHI, K.; YOTSUMOTO, S.; TANAKA, T.; TACHIBANA, K.; AKAHANE, Y.; SUGAI, Y.; MIYAKAWA, Y. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies against the capsid protein of hepatitis C virus with a synthetic oligopeptide. **Jpn. J. Exp. Med.**, 60: 223-233, 1990.
- OKUDA, H. Hepatocellular carcinoma development in cirrhosis. **Best Prac. Res. Clin. Gastroenterol.** 21: 161–173, 2007.
- ONORI, P.; MORINI, S.; FRANCHITTO, A.; SFERRA, R.; ALVARO, D.; GAUDIO, E. Hepatic microvascular features in experimental cirrhosis: a structural and morphometrical study in CCl4- treated rats. **J. Hepatol.** 33: 555-563, 2000.
- OP DE BEECK, A.; COCQUEREL, L.; DUBUISSON, J. Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins. **J. Gen. Virol.** 82: 2589–2595, 2001.
- OSMAN, H.G.; GABR, O.M.; LOTFY, S.; GABR, S. Serum levels of bcl-2 and cellular oxidative stress in patients with viral hepatitis. **Indian J. Med. Microbiol.** 25(4):323-329, 2007.
- OSTROWSKI, L.E.; STEWART, D.; HAZUCHA, M. Interferon gamma Stimulates Accumulation of Gas Phase Nitric Oxide in Differentiated Cultures of Normal and Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells. **Lung.** 190: 563–571, 2012.
- OWSIANKA, A.; CLAYTON, R.F.; LOOMIS-PRICE, L.D.; MCKEATING, J.A.; PATEL, A.H. Functional analysis of hepatitis C virus E2 glycoproteins and virus-like particles reveals structural dissimilarities between different forms of E2. **J. Gen. Virol.** 82: 1877–1883, 2001.

- PALMER, R.M.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature** 333:664–666, 1988.
- PAROLA, M.; ROBINO, G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. **J. Hepatol.** 35: 297–306, 2001.
- PATEL, A.H.; WOOD, J.; PENIN, F.; DUBUISSON, J.; MCKEATING, J.A. Construction and characterization of chimeric hepatitis C virus E2 glycoproteins: analysis of regions critical for glycoprotein aggregation and CD81 binding. **J. Gen. Virol.** 81: 2873-2883, 2000.
- PAVLOVIC, D.; NEVILLE, D.C.; ARGAUD, O.; BLUMBERG, B.; DWEK, R.A.; FISCHER, W.B.; ZITZMANN, N. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 100: 6104-6108, 2003.
- PENIN, F.; DUBUISSON, J.; REY, F.A.; MORADPOUR, D.; PAWLOTSKY, J.M.; Structural biology of hepatitis C virus. **Hepatol.**, 39: 5–19, 2004.
- PIANKO, S.; PATELLA, S.; OSTAPOWICZ, G.; DESMOND, P.; SIEVERT, W. Fasmediated hepatocyte apoptosis is increased by hepatitis C virus infection and alcohol consumption, and may be associated with hepatic fibrosis: mechanisms of liver cell injury in chronic hepatitis C virus infection. **J. Viral. Hepat.** 8: 406–413, 2001.
- PILERI, P.; UEMATSU, Y.; CAMPAGNOLI, S.; GALLI, G.; FALUGI, F.; PETRACCA, R.; WEINER, A. J.; HOUGHTON, M.; ROSA, D.; GRANDI, G.; ABRIGNANI, S. Binding of hepatitis C virus to CD81. **Science**, 282: 938-941, 1998.
- POLAT, M.F.; TAYSI, S.; POLAT, S.; BOYUK, A.; BAKAN, E. Elevated serum arginase activity levels in patients with breast cancer. **Surg. Today**. 33:655–661, 2003.
- POLYAK, S.J.; KHABAR, K.S.; PASCHAL, D.M.; EZELLE, H.J.; DUVERLIE, G. BARBER, G.N., LEVY, D.E.; MUKAIDA, N.; GRETCH, D.R. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. **J. Virol.** 75(13): 6095–6106, 2001(a).
- POLYAK, S.J.; KHABAR, K.S.; REZEIQ, M.; GRETCH, D.R. Elevated levels of interleukin-8 in serum are associated with hepatitis C virus infection and resistance to interferon therapy. **J. Virol.** 75(13): 6209–6211, 2001(b).
- POON, R.T.; HO, J.W.; TONG, C.S.; LAU, C.; Ng, I.O.; FAN, S.T. Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. **Br. J. Surg.** 91: 1354-1360, 2004.
- POON, R.T.; Ng, I.O.; LAU, C.; YU, W.C.; FAN, S.T.; WONG, J. Correlation of serum basic fibroblast growth factor levels with clinicopathologic features and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma. **Am. J. Surg.** 182: 298-304, 2001.
- POON, R.T.; LAU, C.P.; HO, J.W.; LAU, C.; NG, I.O.; FAN, S.T. Tissue factor expression correlates with tumor angiogenesis and invasiveness in human hepatocellular carcinoma. **Clin. Cancer Res.** 29: 5339-5345, 2003.
- POREMBSKA, Z.; SCIBIOR, D.; LEWANDOWSKA, K.; MALKOWSKI, P. Usefulness of preoperative assay of arginase in pancreatic cancer patients. **Polski Merkuriusz Lekarski.** 15:511–514, 2003.
- POYNARD, T.; BEDOSSA, P.; OPOLON, P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The Obsvirc, Metavir, Clinivir, and Dosvirc groups. **Lancet.** 349: 825–832, 1997.
- PRIKHOD'KO, G.G.; PRIKHOD'KO, E.A.; PLETNEV, A.G.; COHEN, J.I. Langat flavivirus protease NS3 binds caspase-8 and induces apoptosis. **J. Virol.** 76: 5701–5710, 2002.
- PUGH, C.W.; RATCLIFFE, P.J. The von Hippel-Lindau tumor suppressor, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) degradation, and cancer pathogenesis. **Semin. Cancer Biol.**13(1): 83-89, 2003.
- QUIROGA, J.A. Induction of interleukin-12 production in chronic hepatitis C virus infection correlates with the hepatocellular damage. **J. Infect. Dis.** 178: 247–251, 1998.

- RADKOWSKI, M.; BEDNARSKA, A.; HORBAN, A.; STANCZAK, J.; WILKINSON, J.; ADAIR, D.M.; NOWICKI, M.; RAKELA, J.; LASKUS, T. Infection of primary human macrophages with hepatitis C virus in vitro: induction of tumour necrosis factor- α and interleukin 8. **J. Gen. Virol.** 85: 47–59, 2004.
- RAMRATNAM, B.; BONHOEFFER, S.; BINLEY, J.; HURLEY, A.; ZHANG, L. Q.; MITTLER, J. E.; MARKOWITZ, M.; MOORE, J. P.; PERELSON, A. S. & HO, D. D. Rapid production and clearance of HIV-1 and hepatitis C virus assessed by large volume plasma apheresis. **Lancet.** 354: 1782-1785, 1999.
- RATHORE, A.S.; BILBREY, R.E.; STEINMEYER D.E. Optimization of an osmotic shock procedure for isolation of a protein product expressed in *E. coli*. **Biotechnol. Progress.** 19(5): 1541-1546, 2003.
- RAY, R.B.; LAGGING, L.M.; MEYER, K.; STEELE, R.; RAY, R. Transcriptional regulation of cellular and viral promoters by the hepatitis C virus core protein. **Virus Res.** 37: 209-220, 1995.
- RAY, R.B.; MEYER, K.; RAY, R. Suppression of apoptotic cell death by hepatitis C virus core protein, **Virol.** 226: 176–182, 1996.
- REMICK, D.G.; VILLARETE, L. Regulation of cytokine gene expression by reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates. **J. Leuko. Biol.**, 59: 471-475, 1996.
- Revista FAPESP, Setembro 2011, nº187, p16-21.
- RIZZINO, A. Transforming growth factor-beta: multiple effects on cell differentiation and extracellular matrices. **Dev Biol.** 130: 411-422, 1988.
- ROCCASECCA, R.; ANSUINI, H.; VITELLI, A.; MEOLA, A.; SCARSELLI, E.; ACALI, S.; PEZZANERA, M.; ERCOLE, B.B.; MCKEATING, J.; YAGNIK, A.; LAHM, A.; TRAMONTANO, A.; CORTESE, R.; NICOSIA, A. Binding of the hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 is strain specific and is modulated by a complex interplay between hypervariable regions 1 and 2. **J. Virol.** 77(3): 1856-1867, 2003.
- RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, M.; TELLO, D.; YÉLAMOS, B.; GÓMEZ-GUTIÉRREZ, J.; PACHECO, B.; ORTEGA, S.; SERRANO, A.G.; PETERSON, D.L.; GAVILANES, F. Structural properties of the ectodomain of hepatitis C virus E2 envelope protein. **Virus Res.** 139(1): 91-99, 2009.
- ROHLENA, J.; VOLGER, O.L.; BUUL, J.D.V.; HEKKING, L.H.P.; GILS, J.M.V.; BONTA, P.I.; FONTIJN, R.D.; POST, J.A.; HORDIJK, P. L.; HORREVOETS, A.J.G. Endothelial CD81 is a marker of early human atherosclerotic plaques and facilitates monocyte adhesion. **Cardiovascular Research.** 81: 187–196, 2009.
- ROINGEARD, P.; HOURIOUX, C.; BLANCHARD, E.; BRAND, D; AIT-GOUGHOLTE, M. Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. **Biol. Cell.** 96: 103-108, 2004.
- ROMERO, M.J.; PLATT, D.H.; TAWFIK, H.E.; LABAZI, M.; EL-REMESSY, A.B.; BARTOLI, M.; CALDWELL, R.B.; CALDWELL, R.W. Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity. **Circ. Res.** 102: 95–102, 2008.
- ROSA, D.; CAMPAGNOLI, S.; MORETTO, C.; GUENZI, E.; COUSENS, L.; CHIN, M.; DONG, C.; WEINER, A. J.; LAU, J. Y. N.; CHOO, Q. L.; CHIEN, D.; PILERI, P.; HOUGHTON, M. & ABRIGNANI, S. A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. **Proc. Nat. Aca. Sci.** 93: 1759-1763, 1996.
- ROSEMBERG, S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C. **J. Mol. Biol.**, 313: 451-464, 2001.
- RYUTO, M.; ONO, M.; IZUMI, H.; YOSHIDA, S.; WEICH, H.A.; KOHNO, K.; KUWANO, M. Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor α in human glioma cells: possible roles of SP-1. **J. Biol. Chem.** 271(45): 28220-28228, 1996.
- SAADOUN, D.; BIECHE, I.; AUTHIER, F.J.; LAURENDEAU, I.; JAMBOU, F.; PIETTE, J.C.; VIDAUD, M.; MAISONOBE, T.; CACOUB, P. Role of Matrix Metalloproteinases, Proinflammatory Cytokines, and Oxidative Stress–Derived Molecules in Hepatitis C Virus–Associated Mixed Cryoglobulinemia Vasculitis Neuropathy. **Arthritis & Rheumatism.** 56(4) 1315–1324, 2007.
- 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.

- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning**: A laboratory manual. 3rd ed. 2001.
- SANGER F.; NICKLEN S.; COULSON A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 74: 5463-5467, 1977.
- SANTOS, C.N. D.; FRENKIEL, M.P.; COURAGEOT, M.P.; ROCHA, C.F.; VAZEILLE-FALCOZ, M.C.; WIEN, M.W.; REY, F.A.; DEUBEL, V.; DESPRES, P. Determinants in the envelope E protein and viral RNA helicase NS3 that influence the induction of apoptosis in response to infection with dengue type 1 virus. **Virology**. 274: 292–308, 2000.
- SCALERA, F.; CLOSS, E.I.; FLICK, E.; MARTENS-LOBENHOFFER, J.; BOISSEL, J.P.; LENDECKEL, U.; HEIMBURG, A.; BODE-BOGER, S.M. Paradoxical effect of L-arginine: acceleration of endothelial cell senescence. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 386: 650–655, 2009.
- SCARSELLI, E.; ANSUINI, H.; CERINO, R.; ROCCASECCA, R.M.; ACALI, S.; FILOCAMO, G.; TRABONI, C.; NICOSIA, A.; CORTESE, R.; VITELLI, A. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. **EMBO J.** 21: 5017-5025, 2002.
- SCHMIDT, W. N.; STAPLETON, J. T.; LABRECQUE, D. R.; MITROS, F. A.; KIRKEGAARD, K.; PHILLIPS, M. J. P.; BRASHEAR, D. Hepatitis C infection and cryoglobulinemia: analysis of whole blood and plasma HCV RNA concentration and correlation with liver histology. **Hepatology**, 31: 737–744, 2000.
- SEIPP, S.; MUELLER, H.M.; PFAFF, E.; STREMMEL, W.; THEILMANN, L.; GOESER, T. Establishment of persistent hepatitis C virus infection and replication in vitro. **J. Gen. Virol.** 78: 2467–2476, 1997.
- SHIMODA, K.; BEGUM, N. A.; SHIBUTA, K.; MORI, M.; BONKOVSKY, H. L.; BANNER, B. F.; BARNARD, G. F. Interleukin-8 and hIRH (SDF1- α /PBSF) mRNA expression and histological activity index in patients with chronic hepatitis C. **Hepatology**. 28: 108–115, 1998.
- SHIMODA, K.; MORI, M.; SHIBUTA, K.; BANNER, B.F.; BARNARD, G.F. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor mRNA expression in patients with chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma. **Int. J. Oncol.** 14(2): 353-359, 1999.
- SHIN, J.Y.; HUR, W.; WANG, J.S.; JANG, J.W.; KIM, C.W.; BAE, S.H.; JANG, S.K.; YANG, S.H.; SUNG, Y.C.; KWON, O.J.; YOON, S.K. HCV core protein promotes liver fibrogenesis via up-regulation of CTGF with TGF- β 1. **Exp. Mol. Med.** 37: 138–145, 2005.
- SHWEIKI, D.; ITIN, A.; SOFFER, D.; KESHET, E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. **Nature**. 359: 843-845, 1992.
- SIAGRIS, D.; CHRISTOFIDOU, M.; THEOCHARIS, G. J.; PAGONI, N.; PAPADIMITRIOU, C.; LEKKOU, A.; THOMOPOULOS, K.; STARAKIS, I.; TSAMANDAS, A. C.; LABROPOULOU-KARATZA, C. Serum lipid pattern in chronic hepatitis C: histological and virological correlations. **J. Viral. Hepat.** 13: 56-61, 2006.
- SIES, H. Oxidative stress: introductory remarks. **London: Academic Press**; 1985
- SILVA, I.M. Avaliação de estímulos solúveis e particulado no *burst* respiratório de leucócitos polimorfonucleares neutrófilos de exsudato peritoneal estéril de rato (*Ratus albinus norvegicus*) por quimiluminescência dependente de luminol e lucigenina. 2000. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara.
- SIMMONDS, P.; SMITH, D. B.; MCOMISH, F.; YAP, P. L.; KOLBERG, J.; URDEA, M. S.; HOLMES, E. C. Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. **J. Gen. Virol.** 5: 1053–1061, 1994.
- SONODA, Y.; KASAHARA, T.; YAMAGUCHI, Y.; KUNO, K.; MATSUSHIMA, K.; MUKAIDA, N. Stimulation of interleukin-8 production by okadaic acid and vanadate in a human promyelocyte cell line, an HL-60 subline. Possible role of mitogen-activated protein kinase on the okadaic acid-induced NF- κ B activation. **J. Biol. Chem.** 272(24): 15366–15372, 1997.

- SORENSEN, P. H.; MORTENSEN, K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**. 4(1): 1-8, 2005.
- STADHOUDERS, P.H.; COOREMAN, M.P. Chronic hepatitis C virus disease: an evaluation of procedures for diagnosis and treatment. **Neth. J. Med.**, 51: 213-224, 1997.
- STEIN, I.; NEEMAN, M.; SHWEIKI, D.; ITIN, A.; KESHET, E. Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and co-regulation with other ischemia-induced genes. **Mol. Cell. Biol.** 15: 5363-5368, 1995.
- STEINERT, J.R.; CHERNOVA, T.; FORSYTHE, I.D. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. **Neuroscientist**.16: 435-452, 2010.
- STRAUS, B.; CEPELAK, I.; FESTA, G. Arginase, a new marker of mammary carcinoma. **Clin. Chim. Acta**. 210: 5–12, 1992.
- STRIETER, R.M.; KOCH, A.E.; ANTONY, V.B.; FICK, R.B.; STANDIFORD, T.J.; KUNKEL, S.L. The immunopathology of chemotactic cytokines: the role of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1. **J. Lab. Clin. Med.** 123(2): 183–197, 1994.
- STUMPF, M. P. H.; PYBUS, O. G. Genetic diversity and models of viral evolution for the hepatitis C virus. **FEMS Microbiol. Lett.**, 214: 143-152, 2002.
- SUN, B.S.; PAN, J.; CLAYTON, M.M.; LIU, J.; YAN, X.; MATSKEVICH, A.A.; STRAYER, D.S.; GERBER, M.; FEITELSON, M.A. Hepatitis C virus replication in stably transfected HepG2 cells promotes hepatocellular growth and tumorigenesis. **J. Cell. Physiol.** 201: 447–458, 2004.
- TAN, A.; YEH, S.H.; LIU, C.J.; CHEUNG, C.; CHEN, P.J. Viral hepatocarcinogenesis: from infection to cancer. **Liver Intl.** 28: 175–188, 2008.
- TANAKA, S.; MORI, M.; SAKAMOTO, Y.; MAKUUCHI, M.; SUGIMACHI, K.; WANDS, J.R. Biologic significance of angiopoietin-2 expression in human hepatocellular carcinoma. **J. Clin. Invest.** 103: 341-345, 1999.
- TANJI, Y.; KANEKO, T.; SATOH, S.; SHIMOTOHNO K. Phosphorylation of hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS5A. **J. Virol.**, 69: 3980-3986, 1995.
- TAYLOR, D.R.; SHI, S.T.; LAI, M.M. Hepatitis C virus and interferon resistance. **Microbes Infect.**, 2: 1743-1756, 2000.
- TELLO, D.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, M.; YÉLAMOS, B.; GÓMEZ-GUTIÉRREZ, J.; ORTEGA, S.; PACHECO, B.; PETERSON, D.L.; GAVILANES, F. Expression and structural properties of a chimeric protein based on the ectodomains of E1 and E2 hepatitis C virus envelope glycoproteins. **Protein Expr, Purif.** 71(2): 123-131, 2010.
- THOMSON, M.; LIANG, T. J. Molecular biology of hepatitis C virus. *In* T. J. Liang, and J. H. Hoofnagle (ed.), Hepatitis C. **Biomedical Research Reports**. 1-23, 2000.
- THOMSEN, R.; BONK, S.; PROPFE, C.; HEERMANN, K. H.; KOHEL, H. G.; UY, A. Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoproteins. **Med. Microbiol. Immunol.** 181: 293–300, 1992.
- THOREN, F.; ROMERO, A.; LINDH, M.; DAHLGREN, C.; HELLSTRAND, K. A hepatitis C virus-encoded, nonstructural protein (NS3) triggers dysfunction and apoptosis in lymphocytes: role of NADPH oxidase-derived oxygen radicals. **J. Leukoc. Biol.** 76:1180–1186, 2004.
- TOL, M.; BANDO, H.; KUROI, K. The predictive value of angiogenesis for adjuvant therapy in breast cancer. **Breast Cancer**. 7: 311-314, 2000.
- VANCOMPERNOLLE, S.E.; WIZNYCIA, A.V.; RUSH, J.R.; DHANASEKARAN, M.; BAURES, P.W.; TODD, S.C. Small molecule inhibition of hepatitis C virus E2 binding to CD81. **Virol.**, 314: 371–380, 2003.

- VILLARETE, L. H.; REMICK, D. G. Nitric oxide regulation of interleukin-8 gene expression. **Shock**. 7(1): 29–35, 1997.
- VOISSET, C.; DUBUISSON, J. Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. **Biol. Cell**. 96(6): 413–420, 2004.
- VOLK, T.; HENSEL, M.; MADING, K.; EGERER, K.; KOX, W. J. Intracellular Ca^{2+} dependence of nitric oxide mediated enhancement of interleukin-8 secretion in human endothelial cells. **FEBS Lett**. 415(2): 169–172, 1997.
- VOLPES, R.; VAN DEN OORD, J. J.; DESMET, V. J. Vascular adhesion molecules in acute and chronic liver inflammation. **Hepatology**. 15: 269–275, 1992.
- WACK, A.; SOLDAINI, E.; TSENG, C.; NUTI, S.; KLIMPEL, G.; ABRIGNANI, S. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 provides a co-stimulatory signal for human T cells. **Eur. J. Immunol**. 31(1): 166–175, 2001.
- WALD, O.; WEISS, I.D.; GALUN, E.; PELED, A. Chemokines in hepatitis C virus infection: Pathogenesis, prognosis and therapeutics. **Cytok.**, 39: 50–62, 2007.
- WALRAND, S.; VALEIX, S.; RODRIGUEZ, C.; LIGOT, P.; CHASSAGNE, J.; VASSON, M.P. Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. **Clin. Chim. Acta**. 331(1–2): 103–110, 2003.
- WARD, N.L.; HANINEE, A.L. Angiopoietin-1 causes reversible degradation of the portal microcirculation in mice: implications for treatment of liver disease. **Am. J. Pathol**. 165: 889–899, 2004.
- WECK, K. Molecular methods of hepatitis C genotyping. **Expert Rev. Mol. Diagn**. 5: 507–520, 2005.
- WHEATLEY, D.N. Controlling cancer by restricting arginine availability - arginine catabolizing enzymes as anticancer agents. **Anti-Cancer Drugs**. 15: 825–833, 2004.
- WHIDBY, J.; MATEU, G.; SCARBOROUGH, H.; DEMELER, B.; GRAKOU, A.; MARCOTRIGIANO, J. Blocking hepatitis C virus infection with recombinant form of envelope protein 2 ectodomain. **J. Virol.**, 83(21):11078–11089, 2009.
- World Health Organization, 2012 – Hepatitis C - <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>
- WITTE, M.B.; BARBUL, A. Arginine physiology and its implication for wound healing. **Wound Rep. Regen**. 11: 419–423, 2003.
- WU, C.W.; CHUNG, W.W.; CHI, C.W.; KAO, H.L.; LUI, W.Y.; PENG, F.K.; WANG, S.R. Immunohistochemical study of arginase in cancer of the stomach. **Virch. Arch**. 428: 325–331, 1996.
- WÜNSCHMANN, S.; MEDH, J.D.; KLINZMANN, D.; SCHMIDT, W.N.; STAPLETON, J.T. Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. **J. Virol**. 74: 10055–10062, 2000.
- WÜNSCHMANN, S.; MÜLLER, H.M.; STIPP, C.S.; HERNLER, M.E.; STAPLETON, J.T. In vitro interaction between hepatitis c virus (HCV) envelope glycoprotein E2 and serum lipoproteins (LPs) results in enhanced cellular binding of both HCV E2 and LPs. **J. Infect. Dis**. 194: 1058–1067, 2006.
- YAMASHITA, T.; KANEKO, S.; SHIROTA, Y.; QIN, W.; NOMURA, T.; KOBAYASHI, K.; MURAKAMI, S. RNA-dependent RNA polymerase activity of the soluble recombinant hepatitis C virus NS5B protein truncated at the C-terminal region. **J. Biol. Chem**. 273: 15479–15486, 1998.
- YANO, M.; KUMADA, H.; KAGE, M.; IKEDA, K.; SHIMAMATSU, K.; INOUE, O.; HASHIMOTO, E.; LEFKOWITZ, J.H.; LUDWIG, J.; OKUDA, K. The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. **Hepatology**. 23: 1334–1340, 1996.
- YEPURI, G.; VELAGAPUDI, S.; XIONG, Y.; RAJAPAKSE, A.G.; MONTANI, J.P.; MING, X.F.; YANG, Z. Positive crosstalk between arginase-II and S6K1 in vascular endothelial inflammation and aging. **Aging**.

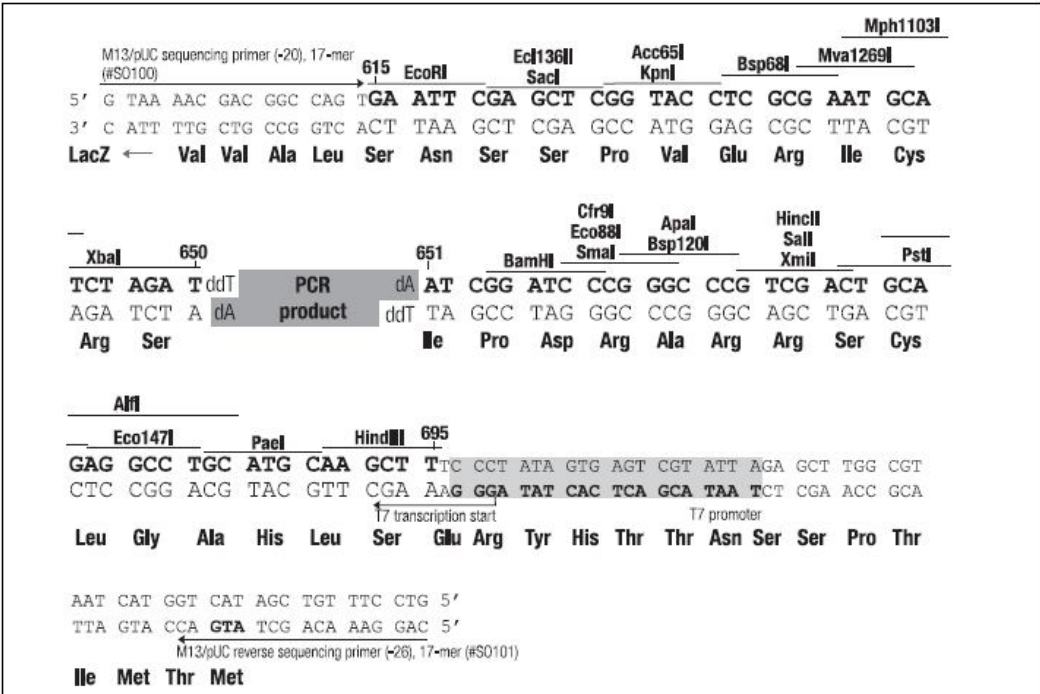
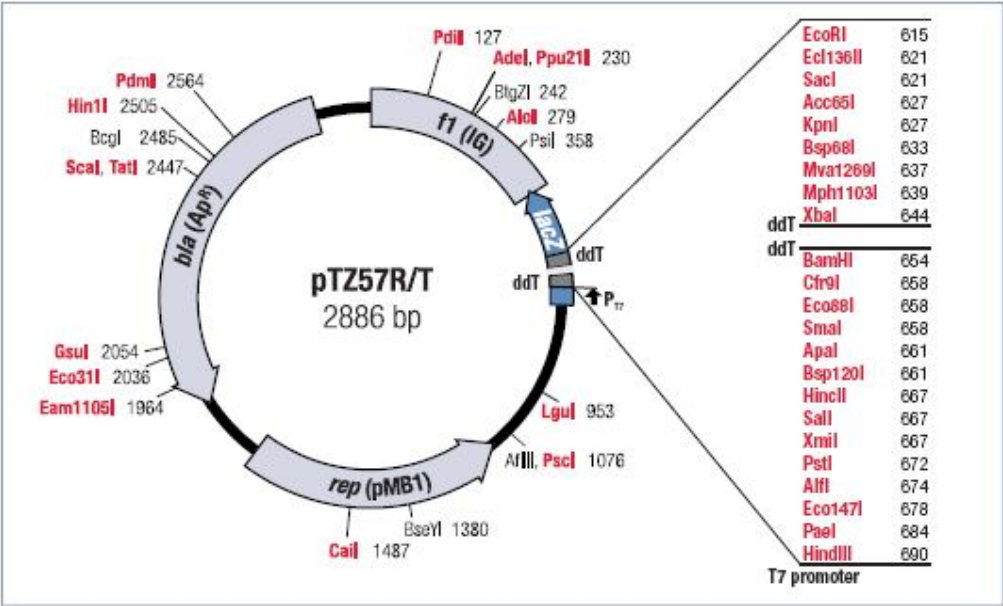
Cell. 2012. *In press*.

- YURKOVA, M.S.; PATEL, A.H.; FEDOROV, A.N. Characterisation of bacterially expressed structural protein E2 of hepatitis C virus. **Protein Expr. Purif.**, 37(1): 119-125, 2004.
- ZEISEL, M.B.; FOFANA, I.; FAFI-KREMER, S.; BAUMERT, T.F. Hepatitis C virus entry into hepatocytes: Molecular mechanisms and targets for antiviral therapies. **J. Hepatol.** 54(3): 566-576, 2011.
- ZEREMISK, M.; PETROVIC, L.M.; TALAL, A.H. The role of chemokines as inflammatory mediators in chronic hepatitis C virus infection. **J. Viral Hepatitis**, 14: 675-687, 2007.
- ZEUZEM, S.; SCHMIDT, J. M.; LEE, J. H.; VON WAGNER, M.; TEUBER, G.; ROTH, W. K. Hepatitis C virus dynamics in vivo: effect of ribavirin and interferon alfa on viral turnover. **Hepatol.**, 28: 245-252, 1998.
- ZHU, L.X.; LIU, J.; XIE, Y.H.; KONG, Y.Y.; YE, Y.; WANG, C.L.; LI, G.D.; WANG, Y.. Expression of hepatitis C virus envelope protein 2 induces apoptosis in cultured mammalian cells. **World J. Gastroenterol.** 10: 2972–2978, 2004.
- ZIBERT, A.; SCHREIER, E.; ROGGENDORF, M. Antibodies in human sera specific to hypervariable region 1 of hepatitis C virus can block viral attachment. **Virol.**, 208: 653-661, 1995.
- ZICHE, M.; GULLINO, P.M. Angiogenesis and neoplastic progression in vitro. **J. Natl. Cancer Inst.** 69: 483-487, 1982.
- ZIGNEGO, A.L.; MACCHIA, D.; MONTI, M.; THIERS, V.; MAZZETTI, M.; FOSCHI, M.; MAGGI, E.; ROMAGNANI, S.; GENTILINI, P.; BRÉCHOT, C. Infection of peripheral mononuclear blood cells by hepatitis C virus. **J. Hepatol.** 15(3): 382–386, 1992.
- ZYLBERBERG, H.; RIMANIOL, A.C.; POL, S.; MASSON, A.; DE GROOTE, D.; BERTHELOT, P.; BACH, J.F.; BRÉCHOT, C.; ZAVALA, F. Soluble tumor necrosis factor receptors in chronic hepatitis C: a correlation with histological fibrosis and activity. **J. Hepatol.** 30(2): 185–191, 1999.
- XIANG, Z.H.; CAI, W.J.; ZHAO, P.; KONG, L.B.; YE, L.B.; WU, Z.H. Purification and application of bacterially expressed chimeric protein E1E2 of hepatitis C virus. **Protein. Expr. Purif.**, 49: 95–101, 2006.
- XIONG, W.-C.; SIMON, S. ECV304 Cells: An Endothelial or Epithelial Model? **J. Biol. Chem.** 286 (41): 21, 2011.

ANEXOS

ANEXO 1

Mapa de restrição do vetor pTZ57R/T.



Mapa de restrição do vetor pET-42a (Novagen).



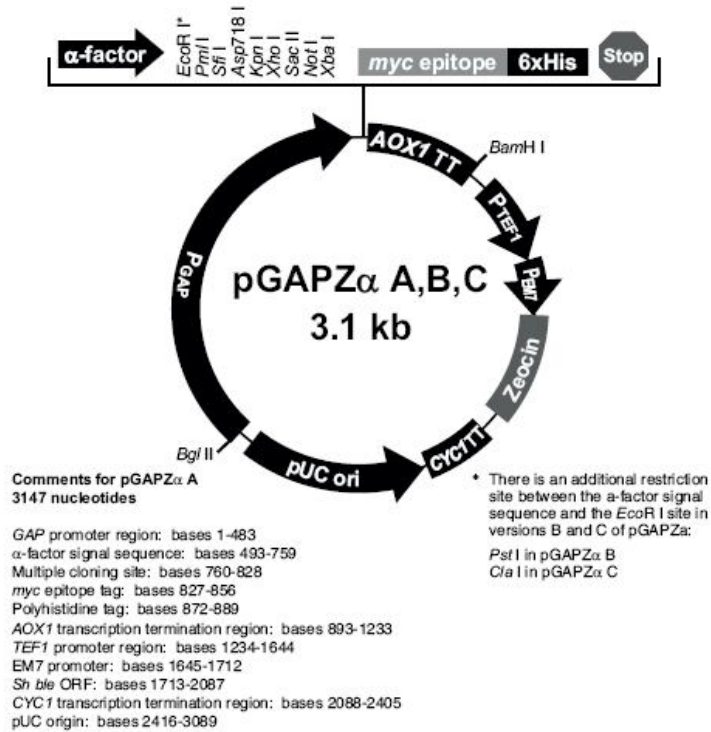
ANEXO 3

Mapa de restrição vetor pGAPZαA.

pGAPZα A, B, and C

Map of pGAPZα A, B, and C

The figure below summarizes the features of pGAPZα A (3147 bp), pGAPZα B (3151 bp), and pGAPZα C (3152 bp) vectors. The complete nucleotide sequences for pGAPZα A, B, and C are available for downloading from our Web site (www.invitrogen.com) or from Technical Service (page 34). Details of the multiple cloning sites are shown on page 15 for pGAPZα A, page 16 for pGAPZα B, and page 17 for pGAPZα C.



Cloning into pGAPZ α , continued

Multiple Cloning Site of pGAPZ α A

Below is the multiple cloning site of pGAPZ α A. Restriction sites are labeled to indicate the cleavage site. The boxed nucleotide indicates the variable region. The multiple cloning site has been confirmed by sequencing and functional testing.

```

361 GATTATTGGA ACCACCAGA ATCGAATATA AAGGCGAAC ACCTTCCCA ATTTGGTTT
                                     pGAP forward priming site
421 CTCCTGACCC AAGACTTTA ATTTAATTT ATTTGTCCTT ATTTCAATCA ATTGAACAAC
                                     pGAP forward priming site
481 TATTTGGAAA CG ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA
      Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala

532 GCA TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG
Ala Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr
       $\alpha$ -factor signal sequence
583 GCA CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT
Ala Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp
634 TTC GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG
Phe Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu

685 TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT
Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser
Xho I* Kex2 signal cleavage EcoRI PstI SfiI
736 CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GC G GAATTCAC GTGGCCCA GCGGCCGCTC TCGGATC
Leu Glu Lys Arg Glu Ala G Glu Ala A
      Ste13 signal cleavage
Asp718 KpnI Xho I Sac II Not I Xba I myc epitope
793 GGTACCTCGA GCGGGGGGGG CCGCCAGCTT TCTA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG
      Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
      polyhistidine tag
851 GAT CTG AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT TGA GTTTAGC CTTA
Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His ***
905 GACATGACTG TTCCTCAGTT CAAGTTGGGC ACTTACGAGA AGACCGSTCT TGCTAGATTC TAAT
      3' AOX1 priming site
969 CAAGAGGATG TCAGAATGCC ATTTGCCCTGA GAGATGCAGG CTTCAATTTT GATACATTTT TATT

1033 TGTAACCTAT ATAGTATAGG ATTTTFTTG TCATTTTGTG TCTCTCTG

```

* The Xho I site upstream of the Kex2 cleavage site is used to clone the gene of interest flush with the Kex2 cleavage site (see page 14).

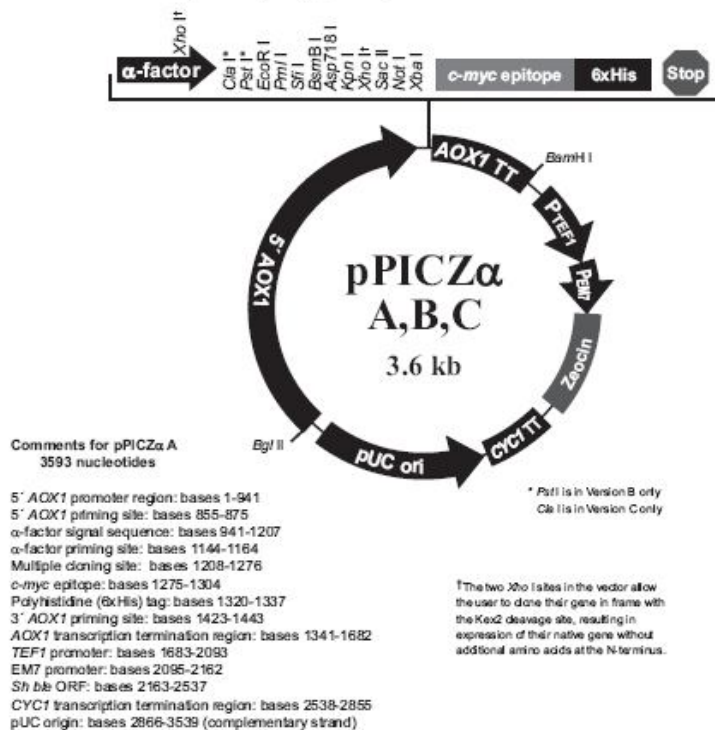
ANEXO 4

Mapa de restrição vetor pPICZαA.

Selecting a *Pichia* Expression Vector, continued

Map of pPICZα A, B, and C

The figure below summarizes the features of the pPICZα A, B, and C vectors. The vector sequences for pPICZα A, B, and C are available for downloading from our website (www.invitrogen.com) or from Technical Support (see page 78). Details of the multiple cloning sites are shown on page 21 for pPICZα A, page 22 for pPICZα B, and page 23 for pPICZα C.



Cloning into pPICZ α

Multiple Cloning Site of pPICZ α A

Below is the multiple cloning site of pPICZ α A. Restriction sites are labeled to indicate the cleavage site. The boxed nucleotide indicates the variable region. The multiple cloning site has been confirmed by sequencing and functional testing. The vector sequence of pPICZ α A is available for downloading from our website (www.invitrogen.com) or from Technical Support (see page 78).

```

      5' end of ADXY mRNA                                5' ADXY priming site
811  AACCTTTT TTTATCATCA TTATTAGCTT ACCTTCATAA TTGCGACTGG TTCCAATTGA

      871  CAAGCTTTTG ATTTTAACGA CTTTAAACGA CAACCTTGAGA AGATCAAAA ACAACTAATT

      931  ATTCGAAACG ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA
           Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala

      983  TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA
           Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala

      1034 CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC
           Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe

      1085 GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG TTT
           Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu Phe

      1136 ATA AAT ACT ACT ATT GGC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT CTC
           Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser Leu

      1187 GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT GAATTCAC GTGGCCCGC CCGGCCGTC TCGGATCGGT
           Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala GAATTC GTGGCCCGC CCGGCCGTC TCGGATCGGT
           Kex2 signal cleavage      EcoRI      PstI      SfiI      BamBI Asp718

      1244 AACTGGAGCC GCGGCGGCC GCCAGTTTC TA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG
           ApeI XhoI      SacII NotI      XbaI      o-myc epitope
           Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu

      1299 GAT CTG AAT AGE GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT TGA GTTGTAGCC
           Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His ***
           polyhistidine tag

      1351 TTAGACATGA CTGTTCTCA GTTCAAGTTG GGCACCTACG AGAAGACCGG TCTTGCTAGA

      1411 TTCTAATCAA GAGGATGTCA GAATGCCATT TGCGTGAGAG ATGCAGGCTT CATTTTTGAT
           3' ADXY priming site
           3' polyadenylation site

      1471 ACITTTTITAT TTGTAACCTA TATAGTATAG GATTTTITTT GTCAITTTGT TTCTTCTOGT

```

*To express your protein with a native N-terminus, you must clone your gene flush with the Kex2 cleavage site. You will need to use PCR and utilize the Xho I site upstream of the Kex2 cleavage site.