

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

**“MÉTODO IMUNOCROMATOGRÁFICO PARA
PESQUISA DO ANTICORPO EM TRIAGEM OU
DIAGNÓSTICO DA HEPATITE C: DESENVOLVIMENTO
E APLICAÇÃO CLÍNICA”**

FLÁVIA REGINA KENFE

ARARAQUARA-SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

**Método Imunocromatográfico para Pesquisa do Anticorpo em
Triagem ou Diagnóstico da Hepatite C: Desenvolvimento e Aplicação
Clínica**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biociências e Biotecnologias Aplicadas à
Farmácia, área de concentração: Imunologia, para
obtenção do Título de Doutor.**

Doutoranda: Flávia Regina Kenfe

Orientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa

Araraquara

2012

Ficha Catalográfica

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

K33m Kenfe, Flávia Regina
 Método imunocromatográfico para pesquisa do anticorpo em triagem ou diagnóstico da hepatite C: desenvolvimento e aplicação clínica / Flávia Regina Kenfe. – Araraquara, 2012
 249 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

 1. Vírus da hepatite C. 2. Proteína core-gst. 3. Proteína e2-gst. 4. Elisa indireto. 5. Teste imunocromatográfico I. Costa, Paulo Inácio da, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

TERMO DE APROVAÇÃO

NOME DO AUTOR: **FLÁVIA REGINA KENFE**

TÍTULO DO TRABALHO: Método imunocromatográfico para pesquisa do anticorpo em triagem ou diagnóstico da hepatite C: Desenvolvimento e aplicação clínica

TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR

PRESIDENTE E ORIENTADOR: **Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa**

INSTITUIÇÃO: Universidade Estadual Paulista – UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – SP, Departamento de Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

SEGUNDO EXAMINADOR: **Profa. Dra. Miriane da Costa Gileno**

INSTITUIÇÃO: Centro Universitário de Araraquara – UNIARA – Departamento de Hematologia Clínica e Análises Clínica.

TERCEIRO EXAMINADOR: **Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues**

INSTITUIÇÃO: Universidade de São Paulo – USP – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – SP, Departamento de Bioquímica e Imunologia.

QUARTO EXAMINADOR: **Profa. Dra. Danielle Cardoso Geraldo Maia**

INSTITUIÇÃO: Universidade Estadual Paulista – UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – SP, Departamento de Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

QUINTO EXAMINADOR: **Profa. Dra. Elisabeth Loshchagin Pizzolitto**

INSTITUIÇÃO: Universidade Estadual Paulista – UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – SP, Departamento de Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Araraquara, 19 de dezembro de 2012.

LOCAL DO DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

Trabalho realizado:

- ❖ Laboratório de Imunologia Clínica - da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP de Araraquara - Departamento de Análises Clínicas, Programa de Biociências e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia, Disciplina de Imunologia Clínica
- ❖ Laboratório de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR

APOIO FINANCEIRO

- ❖ FAPESP (FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO) pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho – Bolsa de Doutorado (Processo: **2008/58612-3**)

Dedico este Trabalho

Aos meus pais Edemilson e Maria Aparecida, que por uma vida de dedicação, amor e trabalho sempre possibilitaram a seus filhos a oportunidade de realizar sonhos e conquistas, mostrando que vale a pena lutar pelos nossos ideais e acreditar que sempre existe uma solução para tudo em nossas vidas.

Ao meu irmão Rodrigo, pela amizade incondicional, mostrando-me que as grandes batalhas da vida são enfrentadas com humildade e amor.

Ao meu esposo Elton, por todo amor a mim dedicado e pelo incentivo em todos os momentos desta minha caminhada.

Amo todos vocês! Obrigada por estarem sempre perto de mim.

Agradecimentos

A Deus, pela sua presença constante na minha vida, pela saúde, pelas pessoas especiais que colocou em minha vida, pelo auxílio nas minhas escolhas e por me confortar nas horas difíceis, deixando meu trilhar mais suave nesta longa jornada.

Ao Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa, meu orientador, pelos importantes ensinamentos, tanto científicos quanto pessoais, pela amizade, apoio, incentivo e pela orientação ao longo de todos estes anos.

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva, pela atenção e ajuda que me concedeu em seu laboratório na Universidade Federal de São Carlos-UFSCAR, contribuindo com o desenvolvimento de parte desta pesquisa.

A Universidade Estadual Paulista - UNESP, programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, laboratório de Imunologia Clínica, pela estrutura física que possibilitou a realização deste trabalho.

A Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR, laboratório de Genética e Evolução, onde parte deste trabalho foi realizada.

Aos professores das disciplinas que cursei durante a realização deste Doutorado, pelo repasse de seus conhecimentos, contribuindo para minha formação acadêmica.

As professoras que participaram da banca de qualificação Profa. Dra. Fernanda de Freitas Aníbal e a Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos, pelas sugestões de grande valia para o aperfeiçoamento deste trabalho.

A Juliana Cristina da Silva pela amizade e companheirismo ao longo de todos estes anos de mestrado e doutorado.

A Ana Carolina Urbaczek pelas nossas discussões científicas e pelo auxílio nos experimentos. Faltam palavras para demonstrar toda a ajuda que me ofereceu!

Aos colegas do laboratório de Imunologia Clínica e a Marisa Polesi, pela ajuda, companheirismo e pelos agradáveis momentos de convivência.

Aos funcionários e aos pós-graduandos do Laboratório de Micologia Clínica - UNESP, pelo auxílio.

Ao Laboratório de Bioquímica Clínica e em especial a Vivian Boter Bergamasco, pelo apoio e ajuda.

Aos funcionários dos laboratórios de Imunologia e Biologia Molecular do Hospital de Américo Brasilienses, pela disposição em me ajudar com envio de amostras sorológicas e kits, contribuindo para a conclusão desta pesquisa.

As secretárias da FUNDECIF: Paula, Daiusca, Sônia, Andreia, Rita e Fran, pela amizade e auxílio.

A FAPESP, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram para a execução desse trabalho, seja pela ajuda ou por uma palavra de amizade!

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE FIGURAS.....	14
LISTA DE TABELAS.....	18
ABREVIATURAS.....	19
RESUMO.....	20
ABSTRACT.....	21
1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1. Agente etiológico.....	23
1.2. Epidemiologia da infecção pelo VHC.....	26
1.3. Transmissão e fatores de riscos.....	28
1.4. Diagnóstico.....	24
1.4.1. Sorológico.....	29
1.4.2. Testes moleculares.....	30
1.4.3. Exames complementares.....	31
1.5. Tratamento da Hepatite viral C.....	34
1.6. Perspectivas da utilização das proteínas <i>core</i> e E2 na detecção do vírus da hepatite C (VHC).....	35
1.7. Teste Imunocromatográfico (teste rápido).....	37
2. OBJETIVOS.....	41
2.1. Objetivo Geral.....	41
2.1. Objetivos Específicos.....	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1. Seleção das amostras.....	44
3.2. Ensaios com o RNA Viral.....	44
3.2.1. Isolamento do RNA Viral.....	44
3.2.2. Extração do RNA Viral.....	44
3.3. Amplificação do gene do <i>core</i> VHC.....	45
3.3.1. Reação de Transcrição Reversa do RNA-VHC.....	45
3.3.2. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	46
3.4. Análise por eletroforese em gel de agarose.....	47
3.5. Purificação do Produto Amplificado.....	47
3.6. Ligação no Vetor pTZ57R/T.....	48

3.7. Preparo de Células Competentes.....	49
3.8. Transformação Bacteriana.....	49
3.9. Seleção de Clones Recombinantes.....	50
3.10. PCR das Colônias.....	51
3.11. Extração Plasmidial.....	51
3.12. Clivagem Enzimática do Vetor pTZ.....	53
3.13. Purificação das Amostras após a Clivagem Enzimática.....	53
3.14. Expressão da proteína core-VHC.....	54
3.14.1. Vetor de Expressão.....	54
3.14.2. Preparo do Vetor pET-42a.....	55
3.14.3. Clivagem Enzimática do pET – 42a.....	56
3.14.4. Ligação dos Produtos Amplificados ao Vetor pET – 42a.....	57
3.14.5. Transformação do pET - 42a com Inserto em Linhagem DH5 α	57
3.14.6. Preparação do Inóculo.....	58
3.14.7. Seleção dos Clones Recombinantes.....	58
3.14.8. Mini-Prep das Colônias que contém o pET - 42a com o Inserto da Proteína do <i>Core</i>	59
3.14.9. Seqüenciamento.....	60
3.14.10. Clivagem Enzimática do pET - 42a com Inserto da Proteína <i>Core</i>	60
3.14.11. Transformação na Linhagem Rosetta.....	61
3.14.12. Preparação do Inóculo.....	61
3.14.13. Indução da expressão gênica.....	62
3.15. Análise das proteínas expressas.....	63
3.15.1. Análise dos tempos de indução por SDS-PAGE.....	63
3.15.2. Análise dos tempos de indução por Western Blot.....	64
3.15.3. Teste de solubilidade.....	66
3.16. Purificação das proteínas expressas.....	67
3.16.1. Purificação protéica por técnica de cromatografia de afinidade em coluna de níquel (Ni-NTA).....	67
3.16.2. Purificação protéica por afinidade com resina de glutathione (procedimento em tubo – Batch Purification).....	68
3.17. Alterações no protocolo de indução para melhora da solubilidade das proteínas e da suas purificações.....	69
3.17.1. Mudança na temperatura de indução (28°C) e no tampão de lise.....	69

3.17.2. Mudança na temperatura de indução (37°C) e no tampão de lise.....	70
3.17.3. Mudanças no tampão de lise – lisozima.....	71
3.17.4. Mudanças nos tempos e temperaturas de indução e no tampão de lise.....	71
3.17.5. Utilização de um novo tampão de lise.....	72
3.17.6. Indução da expressão gênica padronizada.....	74
3.18. Teste de ligação nas resinas de níquel e glutatona.....	76
3.19. Dosagem de proteínas.....	76
3.20. Diálise.....	77
3.21. Purificação em coluna de glutatona utilizando bomba peristáltica.....	78
3.22. Seqüenciamento do vetor pET-42a com o inserto do <i>core</i>	78
3.23. Indução da expressão das proteínas <i>core</i> e E2 recombinantes em larga escala.....	79
3.24. Purificação das proteínas expressas em larga escala, <i>core</i> e E2 fusionadas a GST, por cromatografia de afinidade em resina de glutatona.....	79
3.25. Ensaio biológico com as proteínas <i>core</i> e E2 recombinantes produzidas em bactérias (<i>E. coli</i> linhagem Rosetta).....	80
3.25.1. Imunorreatividade das proteínas <i>core</i> e E2 recombinantes com <i>pool</i> de soros humanos positivos para VHC.....	80
3.25.2. <i>Slot Blot</i>	81
3.26. Cromatografia de afinidade em coluna de glutatona.....	82
3.27. Análise da Imunorreatividade das proteínas <i>core</i> -GST e E2-GST após purificação por coluna GSTrap FF.....	83
3.27.1. <i>Western Blot</i>	83
3.27.2. <i>Slot Blot</i>	84
3.28. Ensaio Imunoenzimático – ELISA.....	85
3.28.1. ELISA de Captura-Sanduiche (Adsorção em microplaca do anticorpo policlonal anti- <i>core</i> -GST).....	86
3.28.2. ELISA de Captura-Sanduiche (Adsorção em microplaca do anticorpo monoclonal anti-GST).....	87
3.28.3. ELISA Indireto (Adsorção em microplaca das proteínas recombinantes <i>core</i> e E2 fusionadas a GST).....	88
3.28.4. ELISA Indireto (Adsorção em microplaca das proteínas recombinantes <i>core</i> e E2 fusionadas a GST juntas).....	89
3.29. Teste Imunocromatográfico.....	90

3.29.1. Teste Imunocromatográfico para detecção de antígenos VHC.....	90
3.29.2. Teste Imunocromatográfico para detecção de anticorpos anti-VHC.....	91
3.29.3. Interpretação dos resultados no teste Imunocromatográfico.....	92
3.30. Desenvolvimento do método Imunocromatográfico.....	94
3.30.1. Conjugação da solução coloidal de ouro com anticorpo policlonal anti-core VHC produzidos em camundongos e em coelhos.....	94
3.30.2. Conjugação da solução coloidal de ouro com proteína A extracelular e com Anti-IgG humana.....	95
3.30.3. Conjugação da solução coloidal de ouro com as proteínas recombinantes do VHC (core e E2).....	96
3.30.4. Avaliação da reação da proteína A com o conjugado core-GST-Ouro coloidal de 20nm.....	97
3.30.5. Avaliação da reação do anticorpo anti-core-GST policlonal com o conjugado core-GST-Ouro coloidal de 20nm.....	98
3.30.6. Montagem do dispositivo imunocromatográfico.....	99
3.30.7. Corte das tiras imunocromatográficas (membranas de nitrocelulose, fibra de vidro e absorvente).....	99
3.30.8. Preparo da área de amostragem.....	99
3.30.9. Preparo e ativação da membrana de nitrocelulose.....	100
3.30.10. Imobilização dos reagentes nas áreas teste e controle.....	100
3.30.11. Aplicação do conjugado na membrana de fibra de vidro.....	101
3.30.12. Montagem do teste imunocromatográfico.....	101
3.30.13. Teste de reatividade do ensaio imunocromatográfico.....	101
3.31. Ensaio para padronização dos métodos diagnósticos para o HCV.....	101
3.31.1. Teste imunocromatográfico 1.....	101
3.31.2. Teste imunocromatográfico 2.....	103
3.31.3. Teste <i>imunoblotting</i> 2.....	104
3.31.4. Teste <i>Imunoblotting</i> 3.....	104
3.31.5. Teste <i>Imunoblotting</i> 4.....	105
3.31.6. Liofilização das proteínas recombinante do VHC (core e E2).....	106
3.31.7. Teste <i>Imunoblotting</i> 5.....	106
3.31.8. <i>Slot Blot</i>	106
3.31.9. Teste <i>Imunoblotting</i> 6.....	107
3.31.10. Teste <i>Imunoblotting</i> 7.....	108

3.31.11. Concentração de proteínas recombinantes pelo método do nitrogênio....	109
3.31.12. Teste <i>Imunoblotting</i> 8.....	109
3.31.13. Teste <i>Imunoblotting</i> padronizado.....	109
3.32. Validação do Teste imunocromatográfico.....	110
3.33. Verificação do desempenho do teste imunocromatográfico através dos índices de sensibilidade, especificidade, concordância, valores preditivo positivo e negativo.....	111
4. RESULTADOS.....	115
4.1. Obtenção do RNA Viral e Amplificação da Região do <i>core-VHC</i>	115
4.2. Análise do Produto Amplificado e Purificado.....	115
4.3. Transformação Bacteriana.....	116
4.4. Análise e Quantificação do Produto da Mini-Prep.....	117
4.5. Clivagem Enzimática do Vetor pTZ.....	118
4.6. Purificação das Amostras após a Clivagem Enzimática.....	118
4.7. Análise do Produto da Mini-Prep do Vetor pET – 42a.....	119
4.8. Clivagem Enzimática do pET - 42a e Purificação.....	120
4.9. Análise do Produto de PCR dos Clones Recombinantes.....	120
4.10. Análise da Extração Plasmidial.....	121
4.11. Seqüenciamento.....	122
4.12. Clivagem Enzimática do pET - 42a com Inserto da Proteína <i>Core</i>	123
4.13. Expressão da proteína de fusão GST- <i>core</i> / VHC.....	124
4.14. Análise das proteínas expressas: <i>core</i> e E2.....	124
4.14.1. Análise dos tempos de indução por SDS.....	124
4.14.2. Análise dos tempos de indução por <i>Western Blot</i>	125
4.15. Teste de solubilidade.....	127
4.16. Purificação protéica por técnica de cromatografia de afinidade em coluna de Níquel (Ni-NTA).....	129
4.17. Purificação protéica por afinidade com resina de Glutathiona (procedimento em tubo – Batch Purification).....	132
4.18 Alterações no protocolo de indução para melhora da solubilidade das proteínas.....	135
4.18.1. Mudança na temperatura de indução (28°C) e no tampão de lise → Utilizando o tampão de lise COM ureia.....	135

4.18.2. MUDANÇA NA TEMPERATURA DE INDUÇÃO (37°C) E NO TAMPÃO DE LISE	137
→ Utilizando o tampão de lise COM ureia.....	
→ Utilizando o tampão de lise SEM ureia.....	140
4.18.3. Mudanças no tampão de lise – Lisozima.....	143
4.18.4. Mudanças nos tempos e temperaturas de indução e no tampão de lise.....	146
4.18.5. Utilização de um novo tampão de lise (tampão TP).....	149
4.19. Indução da expressão gênica padronizada.....	154
4.20. Teste de ligação nas resinas de Níquel e Glutathione.....	157
4.21. Dosagem de proteínas.....	158
4.22. Diálise.....	160
4.23. Purificação em coluna de glutathione utilizando bomba peristáltica.....	163
4.24. Seqüenciamento do vetor pET42a com o inserto do <i>core</i>	164
4.25. Indução e purificação das proteínas recombinantes <i>core</i> e E2 expressas em larga escala.....	166
4.26. Ensaio biológico com as proteínas <i>core</i> e E2 recombinantes produzidas em bactérias (<i>E. coli</i> linhagem Rosetta).....	167
4.26.1. Imunoreatividade das proteínas <i>core</i> e E2 recombinantes com <i>pool</i> de soros humanos positivos para VHC.....	167
4.26.2. <i>Slot Blot</i>	168
4.27. Cromatografia de afinidade em coluna de glutathione (GSTrap FF).....	170
4.28. Análise da Imunoreatividade das proteínas <i>core</i> -GST e E2-GST após purificação por coluna GSTrap FF.....	171
4.28.1. <i>Western Blot</i>	171
4.28.2 <i>Slot Blot</i>	172
4.28.3. Ensaio Imunoenzimático – ELISA.....	173
4.28.3.1. ELISA de Captura-Sanduiche (Adsorção em microplaca do anticorpo policlonal anti- <i>core</i> -GST).....	173
4.28.3.2. ELISA de Captura-Sanduiche (Adsorção em microplaca do anticorpo monoclonal anti-GST).....	174
4.28.3.3. ELISA Indireto (Adsorção em microplaca das proteínas recombinantes <i>core</i> e E2 fusionadas a GST).....	179
4.28.3.4. ELISA Indireto (Adsorção em microplaca das proteínas	180

recombinantes <i>core</i> e E2 fusionadas a GST juntas).....	
4.29. Teste Imunocromatográfico.....	182
4.29.1. Conjugação com ouro coloidal.....	182
4.29.2. Avaliação da reação da proteína A com o conjugado <i>core</i> -GST-Ouro coloidal de 20nm.....	183
4.29.3. Avaliação da reação do anticorpo anti- <i>core</i> -GST policlonal com o conjugado <i>core</i> -GST-Ouro coloidal de 20nm.....	184
4.29.4. Teste de reatividade do ensaio imunocromatográfico.....	184
4.30. Ensaio para padronização dos métodos diagnósticos para o HCV.....	185
4.30.1. Teste imunocromatográfico 1.....	185
4.30.2. Testes de <i>imunoblotting</i>	186
4.30.3. <i>Slot Blot</i>	187
4.30.4. Testes de <i>Imunoblotting</i>	188
4.31. Validação do teste imunocromatográfico desenvolvido.....	193
4.31.1. Desempenho do método imunocromatográfico.....	196
5. DISCUSSÃO.....	198
6. CONCLUSÕES.....	212
7. REFERÊNCIAS.....	216
8. ANEXOS – PREPARO DE SOLUÇÕES E TAMPÕES.....	236

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1: Representação esquemática da organização genômica do VHC.	24
Figura 2: Mapa de restrição do vetor pTZ57R/T.	49
Figura 3: Mapa de restrição do vetor pET-42a.	55
Figura 4: Representação esquemática dos possíveis resultados do Teste Imunocromatográfico.	93
Figura 5: Representação esquemática da montagem típica de um ensaio imunocromatográfico de fluxo lateral.	93
Figura 6: Eletroforese em gel de agarose, mostrando a reação em cadeia pela polimerase para a região codificadora do <i>core</i> de 408 pb.	115
Figura 7: Eletroforese do produto amplificado e purificado.	116
Figura 8: Eletroforese para confirmação das colônias transformantes, que contém o inserto.	117
Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da reação da mini-prep.	117
Figura 10: Eletroforese em gel de agarose, mostrando a banda correspondente ao vetor pTZ e inserto já recortado.	118
Figura 11: Eletroforese do inserto da proteína <i>core</i> digerida e purificada.	119
Figura 12: Perfil eletroforético do produto da mini-prep do pET-42a.	119
Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando a banda referente ao pET - 42a digerido e purificado.	120
Figura 14: Perfil eletroforético dos produtos de PCR de colônias transformantes para verificação da amplificação da sequência correspondente ao inserto <i>core</i> .	121
Figura 15: Perfil eletroforético do produto da mini-prep do pET-42a com o inserto <i>core</i> .	122
Figura 16: Alinhamento da sequência clonada correspondente à região parcial do <i>core</i> VHC de 408 pb.	123

Figura 17: Perfil eletroforético do vetor pET-42a clivado com enzimas de restrição <i>NcoI</i> e <i>BamHI</i> .	123
Figura 18: Análise em gel de poliacrilamida 15% da expressão da proteína <i>core</i> de 408 pb.	124
Figura 19 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% da expressão das proteínas <i>core</i> (a) e E2 (b) (fusionadas com GST e histidina)	125
Figura 20 (a e b): Membrana de nitrocelulose resultante da reação de <i>Western Blot</i> , proteínas <i>core</i> (a) e E2 (b) recombinantes.	126
Figura 21 (a e b): Gel SDS-PAGE 12%, destacando a presença das proteínas <i>core</i> (44kDa) (a) e E2 (63,5kDa) (b) no sobrenadante e no <i>pellet</i> .	127
Figura 22 (a e b): Membrana de nitrocelulose resultante da reação de <i>Western Blot</i> , proteínas <i>core</i> (a) e E2 (b) recombinantes.	128
Figura 23 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da purificação em coluna de resina de níquel das proteínas <i>core</i> (a) e E2 (b) recombinantes fusionadas à histidina	130
Figura 24 (a e b): Membrana de nitrocelulose resultante do ensaio de <i>Western Blot</i> com as proteínas <i>core</i> (44kDa) (a) e E2 (63,5kDa) (b) recombinantes.	131
Figura 25 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da purificação das proteínas <i>core</i> (a) e E2 (b) recombinantes fusionadas à GST por afinidade com resina de glutatona.	132
Figura 26 (a e b): Membrana de nitrocelulose transferida com os gradientes de purificação das proteínas <i>core</i> (a) (44kDa) e E2 (b) (63,5kDa) em coluna de glutatona, resultante do ensaio de <i>Western Blot</i> .	134
Figura 27 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado do teste de solubilidade das proteínas <i>core</i> (44kDa) (a) e E2 (63,5kDa) (b) recombinantes.	135
Figura 28 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da purificação em coluna de resina de níquel, das proteínas <i>core</i> (a) e E2 (b) recombinantes fusionadas à histidina.	136
Figura 29 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado do teste de solubilidade das proteínas <i>core</i> (a) e E2 (b) recombinantes induzidas.	138

Figura 30 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da purificação em coluna de resina de níquel, das proteínas <i>core</i> (a) e E2 (b) recombinantes fusionadas à histidina.	139
Figura 31 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado do teste de solubilidade das proteínas <i>core</i> (a) e E2 (b) recombinantes.	141
Figura 32 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da purificação das proteínas <i>core</i> e E2 recombinantes fusionadas à GST por afinidade com resina de glutathiona.	142
Figura 33 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado dos testes de solubilidade das proteínas <i>core</i> (a) e E2 (b) recombinantes.	143
Figura 34 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da purificação em coluna de resina de níquel das proteínas <i>core</i> (a) e E2 (b) recombinantes	145
Figura 35 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado das induções à 37°C por 3hs e à 30°C por 6hs e da solubilidade das proteínas <i>core</i> (a) e E2 (b) recombinantes.	146
Figura 36 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado das induções à 20°C por 14hs e à 30°C por 14hs, e da solubilidade das proteínas <i>core</i> (a) e E2 (b) recombinantes.	148
Figura 37 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado do teste de solubilidade das proteínas <i>core</i> (a) e E2 (b) recombinantes induzidas à 30°C durante 3h.	149
Figura 38 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da purificação em coluna de resina de níquel das proteínas <i>core</i> (a) e E2 (b) recombinantes.	151
Figura 39 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da purificação em coluna de resina de níquel das proteínas <i>core</i> (a) e E2 (b) recombinantes.	152
Figura 40 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da purificação das proteínas <i>core</i> (a) e E2 (b) recombinantes fusionadas à GST por afinidade com resina de glutathiona.	153
Figura 41 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado do teste de solubilidade das proteínas <i>core</i> (a) e E2 (b) recombinantes.	154

Figura 42 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da purificação das proteínas <i>core</i> (a) e E2 (b) recombinantes fusionadas à GST por afinidade com resina de glutathione.	155
Figura 43 (a e b): Membrana de nitrocelulose transferida com os gradientes de purificação das proteínas <i>core</i> (a) e E2 (b) em resina de glutathione, resultante do ensaio de <i>Western Blot</i> .	156
Figura 44 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado do teste de ligação nas resinas de níquel e glutathione das proteínas <i>core</i> (a) e E2 (b) recombinantes.	157
Figura 45: Curva de calibração do kit <i>Pierce® BCA Protein Assay Kit</i> .	159
Figura 46 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando a presença das proteínas <i>core</i> (a) e E2 (b) recombinantes após a diálise.	161
Figura 47 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da purificação em coluna de resina de níquel das proteínas <i>core</i> (a) e E2 (b) recombinantes	161
Figura 48 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando a proteína eluída 1 (PE1) das proteínas <i>core</i> (a) e E2 (b) recombinantes.	163
Figura 49: Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da purificação da proteína <i>core</i> recombinante fusionada à GST por coluna de glutathione utilizando bomba peristáltica.	164
Figura 50: Tiras de membrana de nitrocelulose transferidas com as proteínas <i>core</i> e E2 recombinantes através de ensaio de <i>western blot</i> .	167
Figura 51: <i>Slot Blot</i> realizado com a proteína recombinante <i>core</i> -GST (a) e proteína GST (b) diluídas em PBS e em série partindo de 100µg/mL.	169
Figura 52: <i>Slot Blot</i> realizado com as proteínas recombinantes <i>core</i> -GST (a) e E2-GST (b) diluídas em PBS e em série partindo de 100µg/mL.	169
Figura 53: Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da purificação da proteína <i>core</i> recombinante fusionada à GST em coluna afinidade a glutathione.	170
Figura 54: Tiras de membrana de nitrocelulose transferidas com as proteínas <i>core</i> e E2 recombinantes através de ensaio de <i>western blot</i> .	171
Figura 55: <i>Slot Blot</i> realizado com as proteínas recombinantes <i>core</i> -GST (a) e E2-GST (b) diluídas em tampão de bloqueio e em série partindo de 50µg/mL e	172

com *pool* de soro controle positivo para o VHC diluído 1:400.

Figura 56: Capacidade de captura da proteína A e sua ligação com anticorpos presentes no *pool* de soro positivo para o VHC e o reconhecimento destes com o conjugado *core*-GST-ouro coloidal. 183

Figura 57: Avaliação da reatividade do anticorpo anti-*core*-GST adsorvido na membrana de nitrocelulose dirigidos contra a proteína recombinante conjugada com ouro coloidal. 184

Figura 58: Teste imunocromatográfico mostrando a reatividade da mistura das proteínas recombinantes na área teste (T) e da proteína A na área controle (C) frente ao *pool* de soro positivo e negativo. 185

Figura 59: *Slot Blot* realizado com as proteínas recombinantes do VHC, *core*-GST (a) e E2-GST (b) e como controle a proteína A recombinante (Sigma®) (c). 187

Figura 60: *Imunoblotting* usando as proteínas *core*-GST, E2-GST liofilizadas e a proteína recombinante *core* PE2. 189

Figura 61: Tiras da membrana de nitrocelulose com adsorção das proteínas recombinantes do VHC e a proteína A. 190

Figura 62: *Imunoblotting* após concentração proteica pelo método do nitrogênio. 191

Figura 63: Resultados obtidos usando as proteínas recombinantes *core*-GST, E2-GST e (*core*+E2)-GST, nas concentrações de 24µg/µL e 17µg/µL respectivamente. 192

Figura 64: Resultados obtidos usando a mistura das proteínas recombinantes (*core*+E2)-GST, nas concentrações de 24µg/µL e 17µg/µL respectivamente e *pool* de soros controles verdadeiros negativos para o VHC e positivo para outras patologias infecciosa e inflamatórias diluídos 1:10. 194

Figura 65: Resultados obtidos usando a mistura das proteínas recombinantes (*core*+E2)-GST, nas concentrações de 24µg/µL e 17µg/µL respectivamente e *pool* de soros controles verdadeiros positivos para o VHC diluídos 1:10, 1:100 e 1:1000. 195

Figura 66: Resultados obtidos usando a mistura das proteínas recombinantes (core+E2)-GST, nas concentrações de 24µg/µL e 17µg/µL respectivamente e pool de soros controles verdadeiros positivos para o VHC com genótipos 1,2,3. 196

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1: Modelo dos índices avaliativos da sensibilidade, especificidade, concordância, valor preditivo, falso-positivo e falso-negativo.	113
Tabela 2: Média e desvio padrão dos valores de absorbância obtidos na reação de ELISA de captura, utilizando anti-core-GST (1:40) e diferentes concentrações das proteínas recombinantes.	174
Tabela 3: Média e desvio padrão dos valores de absorbância obtidos na reação de ELISA de captura, utilizando o anticorpo monoclonal anti-GST (1:5000) e as proteínas recombinantes diluídas em série partindo de 50µg/mL.	175
Tabela 4: Médias e desvio padrão dos valores de absorbâncias obtidos na reação de ELISA de captura utilizando o anticorpo monoclonal anti-GST (1:10000) e diferentes concentrações das proteínas recombinantes.	176
Tabela 5: Médias e desvio padrão dos valores de absorbâncias obtidos na reação de ELISA de captura utilizando o anticorpo monoclonal anti-GST (1:10000) e as proteínas recombinantes nas concentrações de 5µg/mL cada.	177
Tabela 6: Médias e desvio padrão dos valores de absorbâncias obtidos na reação de ELISA de captura utilizando o anticorpo monoclonal anti-GST (1:10000) e as proteínas recombinantes nas concentrações de 1µg/mL cada.	178
Tabela 7: Médias e desvio padrão dos valores de absorbâncias obtidos na reação de ELISA indireto utilizando a proteína recombinante core (A) e a proteína recombinante E2 (B) em diferentes concentrações.	179
Tabela 8: Médias e desvio padrão dos valores de absorbâncias obtidos na reação de ELISA indireto utilizando uma mistura das proteínas recombinantes core e E2 nas concentrações de 2µg/mL.	180
Tabela 9: Médias e desvio padrão dos valores de absorbâncias obtidos na reação de ELISA indireto utilizando uma mistura das proteínas recombinantes core e E2 nas concentrações de 1µg/mL.	181

ABREVIATURAS

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

BSA – Soro Albumina Bovina

c-DNA - DNA fita complementar

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

dNTP – Desoxinucleosídeo Trifosfato

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

g – Velocidade de Sedimentação em Unidade Gravitacional

GST - Glutathione S-Transferase

IgG - Imunoglobulina G

kDa - Kilo Daltons = 1000 Daltons

LB - Luria Bertani - Meio Cultura para Crescimento Bacteriano

M – Molar

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

ORF - Open Reading Frame

PBS - Solução Salina Tamponada Fosfatada

RNA – Ácido Ribonucleico

RNase - Ribonuclease

rpm - Rotação por Minuto

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

UTR - Untranslated Regions

UV – ultraviolet

*Xho*I - Enzima de Restrição Extraída do Microorganismo *Xanthomonas holcicola*

RESUMO

O vírus da hepatite C (VHC) é um vírus envelopado com cerca de 50 a 70 nm de diâmetro, fita positiva de RNA e pertence ao gênero do *Hepacivirus* e à família *Flaviridae*. A detecção e quantificação do antígeno do *core*, proteína do nucleocapsídeo do VHC tem obtido sucesso em muitos ensaios, sendo considerado um marcador da replicação viral, por apresentar uma sequência de aminoácidos altamente conservada, o que lhe confere alta sensibilidade e especificidade. A proteína E2 é uma glicoproteína de envelope do VHC com 11 sítios de glicosilação e a maioria deles estão bem conservados, tornando-a um alvo antigênico. O objetivo deste estudo foi o de desenvolver métodos diagnósticos para o VHC de alta sensibilidade, baixo custo e que pudessem ser utilizados na triagem sorológica. As regiões genômicas que codificam as proteínas *core* (parcial 136 aa) e E2 do VHC foram expressas em *E. coli* da linhagem Rosetta e clonadas no vetor de expressão pET-42a e induzidas por IPTG 0,4mM, produzindo proteínas recombinantes fusionadas a proteína GST (glutathione S-transferase), que foram então purificadas por cromatografia de afinidade. A imunorreatividade foi avaliada por *Western Blot*, *Slot Blot* e os métodos diagnósticos (ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura, indireto, imunoblotting e imunocromatográfico) desenvolvidos e aprimorados. Os métodos desenvolvidos foram mais sensíveis e específicos utilizando a mistura das proteínas recombinantes fusionadas a GST (*core* + E2).

Palavras Chaves:

Vírus Hepatite C, proteína *core*-GST, proteína E2-GST, ELISA captura, ELISA indireto, *immunoblotting*, imunocromatográfico

ABSTRACT

The hepatitis C virus (HCV) is an enveloped virus of about 50 to 70 nm in diameter, positive strand RNA, and belongs to the genus *Hepacivirus* and the family *Flaviridae*. The detection and quantification of the core antigen, HCV nucleocapsid protein, has been successful in many trials and is considered a marker of viral replication, since it presents a sequence of highly conserved amino acids, giving it high sensitivity and specificity. The E2 protein is an envelope glycoprotein of HCV with 11 glycosylation sites, most of these well-conserved, making it a target antigen. The aim of this study was to develop high sensitivity, low cost diagnostic methods for HCV which could be used for serological screening. The genomic regions encoding the core (part 136 aa) and E2 proteins of HCV were expressed in *E. coli* Rosetta strain, cloned in expression vector pET-42a, and induced with 0.4 mM IPTG, producing recombinant proteins fused to GST protein (glutathione S-transferase), which were then purified by affinity chromatography. The immunoreactivity was assessed by Western blot, Slot Blot and the developed and improved diagnostic methods (enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) capture and indirect, immunoblotting and immunochromatographic). The methods developed were more sensitive and specific using the mixture of the recombinant proteins fused to GST (core + E2).

Keywords:

Hepatitis C virus, GST-core protein, GST-E2 protein, capture ELISA, indirect ELISA, immunoblotting, immunochromatographic

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Agente etiológico

O vírus da hepatite C (VHC) é um vírus RNA da família *Flaviviridae*, foi inicialmente isolado no soro de uma pessoa com hepatite não-A e não-B, por CHOO et al., 1989. Em 1992, foi desenvolvido o primeiro teste para identificação do anticorpo contra o VHC (anti-VHC), proporcionando maior segurança em transfusões sanguíneas (LAUER, WALKER, 2001).

É um vírus envelopado com cerca de 50 a 70 nm de diâmetro, fita positiva de RNA e pertence ao gênero do *Hepacivirus* e à família *Flaviridae* (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 e exibe uma significativa variabilidade genética, como resultado de mutações espontâneas que ocorrem durante a replicação viral (TAYLOR et al., 2000). As regiões 5' e 3'-UTR flanqueiam uma única sequência codificadora conhecida como *ORF (Open Reading Frame)* (TAYLOR et al., 2000) que codifica uma poliproteína precursora de aproximadamente 3010 resíduos de aminoácidos que é clivada via mecanismos de sinalização do hospedeiro e proteases virais, gerando cerca de 10 diferentes proteínas estruturais (*core*, E1 e E2) e não estruturais (NS2, NS3A, NS3B, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) além da proteína P7 (ENCKE et al., 1998; BARTENSCHLAGER, LOHMANN, 2000; PENIN et al., 2004), todas essenciais para a infectividade e com diferentes funções (CHOO et al., 1989; LINDENBACH, RICE, 2005) como demonstra a Figura 1.

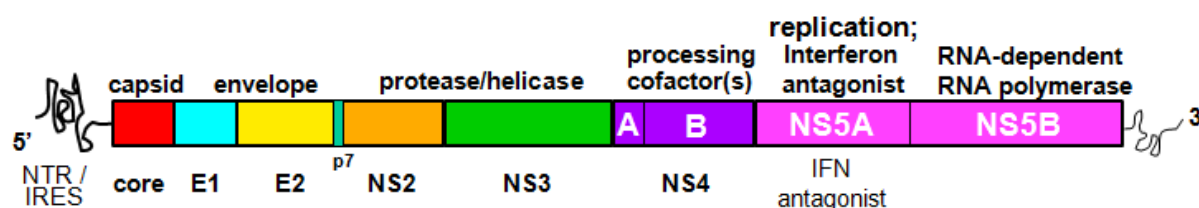


Figura 1: Representação esquemática da organização genômica do VHC. (http://depts.washington.edu/galelab/hep_c.html).

A região estrutural consiste de três genes: o *core* (codifica proteínas do nucleocapsídeo), o E1 e o E2 (que codificam proteínas do envelope) (STADHOUDERS e COOREMAN, 1997). O *core* é uma proteína fortemente básica, sendo o principal constituinte do nucleocapsídeo e, além disso, parece estar associada a diversas funções, como modulação da transcrição gênica, proliferação, morte sinalização celular, podendo interferir com metabolismo lipídico e suprimir a resposta imune do hospedeiro via mecanismos ainda não conhecidos (McLAUCHLAN, 2000; LAI e WARE, 2000; KATO, 2000). Estudos demonstram que as duas glicoproteínas de envelope (E1 e E2) apresentam função fundamental em diferentes etapas do ciclo de replicação do VHC, atuando de forma essencial para entrada, ligação ao receptor e fusão com a membrana da célula hospedeira (BARTENSCHLAGER e LOHMANN, 2000; BARTOSCH et al., 2003). A proteína de envelope E2 apresenta regiões de extrema hipervariabilidade (HVR1 e HVR2) que dentre suas funções facilitam a evasão do sistema imune (KATO et al., 2001).

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 do NS3 constituem a

protease NS2-3 que catalisa a clivagem do sítio NS2-NS3 (BARTENSCHLAGER, LOHMANN, 2000). A NS3 é uma molécula bifuncional: possui uma extremidade amino-terminal, uma serina protease e na carboxi-terminal atividades nucleotídeo-trifosfatase (NTPase) e helicase, essenciais para tradução e replicação do VHC (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 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), sua função no ciclo viral do VHC 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).

O processo de replicação do VHC ocorre no citoplasma do hepatócito e não é diretamente citopático. Sua taxa de replicação pode ser bastante elevada, variando entre 10^{10} a 10^{12} vírions por dia, com meia-vida viral estimada de 2 a 3 horas (NEUMANN, et al., 1998).

O VHC é classificado em seis principais genótipos (designados de 1 a 6), diversos subtipos e cerca de 100 diferentes cepas, com base na heterogeneidade da sequência genômica (BUKH et al., 1995). Os genótipos 1, 2 e 3 têm distribuição mundial: entre eles, os genótipos 1a e 1b são os mais comuns, representando 60% das infecções no mundo (GLOBAL, 1999). No Brasil, são encontrados, principalmente, os

genótipos 1a, 1b, 2a, 2b e 3, com predominância do genótipo 1 (CAMPIOTTO et al., 2005; FOCACCIA et al., 2004).

As frequentes mutações espontâneas do VHC que ocorrem durante a replicação viral e os numerosos subtipos virais são alguns dos obstáculos para o desenvolvimento de uma vacina eficaz (BUKH et al., 1995).

Estudos recentes em modelos pré-clínicos e em pacientes infectados com o VHC demonstram que o vírus tem desenvolvido múltiplas estratégias para “escapar” da resposta imune do hospedeiro, incluindo evasão dos anticorpos neutralizantes e disseminação viral por transmissão célula-célula (ZEISEL et al., 2010). Embora o VHC induza a produção de anticorpos e a resposta de células T, é capaz de se evadir do sistema imune e em 85% dos casos 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., 2010).

1.2. Epidemiologia da infecção pelo VHC

Desde a descoberta do HVC, em 1989 por Choo e col, a hepatite C passou a ganhar especial relevância entre as causas de doença hepática crônica no mundo (MARTINS et al., 2011). Os diferentes cenários epidemiológicos e os fatores associados à infecção advêm, em grande medida, de estudos de soroprevalência realizados com doadores de sangue, populações específicas, estudos-sentinela e, menos frequentemente, de pesquisas de base populacional. Na ausência destes, médias ponderadas têm sido empregadas para estimar a prevalência da hepatite C e subsidiar ações de prevenção e controle.

Estima-se que aproximadamente 3% da população mundial estejam infectados pelo vírus da hepatite C (VHC), o que representa cerca de 180 milhões de indivíduos com infecção crônica e sob risco de desenvolver as complicações da doença (WHO, 2012). De acordo com a OMS, o Brasil é considerado um país de endemicidade intermediária para hepatite C, com prevalência da infecção situada entre 2,5% e 10% (WHO, 2012). Entretanto, estudos de base populacional e com doadores de sangue revelam prevalências inferiores às estimadas, colocando o Brasil como de baixa endemicidade. Um estudo de base populacional, realizado apenas na cidade de São Paulo, revelou 1,42% (IC95% 0,70-2,12) de portadores de anti-VHC (Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções, 2011).

De acordo com dados do Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais (BRASIL, 2012), os casos confirmados de hepatite C, entre 1999 e 2011, registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), perfazem um total de 82.041. Em relação ao gênero, foram confirmados 49.291 casos de hepatite C no sexo masculino e 32.734 casos no sexo feminino, com razão de sexos (M:F) evoluindo de 2,2:1 em 1999 para 1,5:1 em 2011.

Em relação à provável via de transmissão dos casos notificados, observa-se que as maiores proporções de casos estão relacionadas ao uso de drogas (30%), à transfusão de sangue e/ou hemoderivados (27,3%) e à transmissão sexual (16,8%), com elevado percentual de ignorados (43%).

Diante do exposto, ressalta-se que a reunião dos estudos epidemiológicos e os dados dos sistemas de informação devem ser utilizados na compreensão do cenário de ocorrência da hepatite C no país, subsidiando a elaboração de intervenções individuais e coletivas com a finalidade de reduzir a infecção na população.

1.3. Transmissão e fatores de riscos

A transmissão do VHC ocorre pelo contato com sangue infectado em virtude de exposição percutânea, transfusão de sangue e/ou hemoderivados e transplantes de doadores infectados. Atualmente, destacam-se como importantes formas de transmissão do VHC o compartilhamento de equipamentos para uso de drogas, confecção de tatuagens e colocação de *piercing*, além de objetos de uso pessoal, tais como lâminas de barbear ou depilar, escovas de dente e instrumentos para pedicure/manicure.

O VHC é transmitido de forma menos eficiente por exposição de mucosas ou contato com fluidos corporais. A transmissão sexual ocorre principalmente em pessoas com múltiplas parcerias e com práticas sexuais desprotegidas. A coexistência de alguma doença sexualmente transmissível (DST), incluindo o HIV, constitui relevante facilitador para a transmissão (VHPB, 2005).

A transmissão vertical do VHC é menos frequente quando comparada à da hepatite B e ocorre em cerca de 5% dos bebês nascidos de mães portadoras do VHC com carga viral elevada. O risco de transmissão é aproximadamente quatro vezes maior em crianças nascidas de mulheres coinfectadas com VHC e HIV (BRASIL, 2008).

Segundo a OMS 2011, o aconselhamento é uma das principais medidas de redução de riscos e tem entre seus objetivos fornecer informações atualizadas ao paciente, utilizando linguagem acessível. Permite o reconhecimento de vulnerabilidades individuais e sociais, proporciona apoio emocional e avalia a capacidade do paciente em aderir ao tratamento e às medidas de prevenção, além de estabelecer estratégias individualizadas para reforçar práticas de prevenção.

1.4. Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo VHC consiste em testes sorológicos para a detecção de anticorpos anti-VHC e testes moleculares, que detectam e quantificam o RNA do vírus da hepatite C (RNA-VHC). Também podem ser realizados exames complementares, tais como biópsia do fígado e dosagens enzimáticas.

1.4.1. Testes Sorológicos

A técnica de ELISA, por ser um método de fácil execução é muito utilizada para detecção de anticorpos anti-VHC no plasma ou no soro como triagem em bancos de sangue e também em laboratório de análises clínicas. Este método chega a atingir uma sensibilidade de até 97%, porém serve apenas para indicar exposição prévia ao vírus e tem a desvantagem de resultados falso positivos, devido a ligações inespecíficas entre imunoglobulinas presentes no soro ou plasma e contaminantes das preparações antigênicas dos kits ou regiões não específicas dos antígenos recombinantes. Resultados falso negativos também ocorrem quando o diagnóstico é realizado no período de janela imunológica ou em casos de imunossupressão e imunodeficiência, em virtude da diminuição ou ausência da produção de anticorpos. Nesses casos, o diagnóstico deverá ser realizado por meio de testes moleculares (BATTS, LUDWIG, 1995).

Para complementar o diagnóstico sorológico e avaliar possíveis resultados falso-positivos do teste ELISA, pode ser utilizada modificações da técnica de Western Blot, como o RIBA (Imuno-blot recombinante) também para a detecção de anticorpos. Neste caso, a especificidade é alta, porém a sensibilidade é mais baixa que no teste

ELISA. No entanto, com um teste RIBA positivo, é confirmada a reatividade anti-VHC específica. Porém sendo estes testes indeterminados ou negativos, com o teste ELISA inicialmente positivo, surge um problema, pois o paciente pode estar num período antes da soroconversão ou ainda, não possuir uma resposta suficiente de anticorpos, como por exemplo em pacientes transplantados. Por este motivo, estes testes têm tido indicações cada vez mais limitadas na prática clínica. Atualmente, frente a um resultado de anti-VHC positivo por ELISA, a avaliação custo benefício do fluxograma sugere a realização da pesquisa do RNA-VHC qualitativa (PCR-HCV qualitativo), pois este comprova a presença de viremia atual, confirmando a infecção (AC&T CIENTÍFICA®).

1.4.2. Testes moleculares

- Testes de detecção de ácidos nucleicos

São testes de amplificação de ácidos nucleicos, denominados VHC-RNA, que permitem detectar o RNA viral de todos os genótipos e subtipos descritos do VHC. Esses testes podem ser qualitativos, quando apenas detectam a presença do RNA viral, ou quantitativos, quando quantificam o RNA viral (NAINAN, et al., 2006). Servem para confirmar o diagnóstico da hepatite C, para caracterizar transmissão vertical, acidentes com materiais biológicos e avaliar a resposta virológica.

As técnicas mais empregadas para esta finalidade são: reação em cadeia da polimerase (PCR), PCR em tempo real (RT-PCR), amplificação mediada por transcrição (TMA) e DNA ramificado (b-DNA). Além da detecção e da quantificação do genoma viral, pode-se realizar ainda a sua caracterização, o que permite a classificação dos diferentes genótipos e subtipos do VHC (AC&T CIENTÍFICA®). A mais recente metodologia aplicada na triagem de doadores de sangue é a metodologia NAT (Nucleic

Acid Amplification Test). O teste NAT utiliza a técnica de biologia molecular chamada PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para amplificar e detectar o RNA 8 viral presente no plasma do indivíduo infectado, sendo assim mais sensível que o teste sorológico, visto que pequenos níveis de RNA viral podem ser detectados logo no início da infecção, reduzindo o período da janela imunológica (Dodd et al, 2002 e Kucirka et al, 2011). A metodologia NAT é capaz de detectar mais de um tipo de RNA viral na mesma reação e é obrigatória para a triagem de doadores de sangue em vários países. Alguns kits utilizados para esse diagnóstico são capazes de detectar dois vírus HIV e HCV e outros podem detectar simultaneamente os vírus HBV, HCV e HIV.

- Teste de genotipagem

O exame de genotipagem do VHC utiliza testes moleculares baseados em amplificação do RNA viral, capazes de identificar os diversos genótipos, subtipos e populações mistas do VHC. A caracterização genotípica complementa a avaliação clínico-laboratorial na definição da estratégia de tratamento da hepatite crônica (GERMER et al.,1999).

1.4.3. Exames complementares

- Biópsia hepática

É um procedimento invasivo, que na maior parte das situações é essencial para estadiamento da hepatite crônica e para definição da necessidade de tratamento (SCHEUER et al., 1991). A hepatite C aguda caracteriza-se pela presença predominante das alterações necroinflamatórias no parênquima, em contraposição com a hepatite crônica, na qual a inflamação é predominantemente portal (BEDOSSA,

POYNARD, 1996). O diagnóstico histológico da hepatite C crônica baseia-se na presença de infiltrado inflamatório portal predominantemente linfocitário, geralmente com número variável de plasmócitos e histiócitos, acompanhada por grau variável de atividade periportal (atividade de interface ou necrose em saca-bocados), atividade parenquimatosa (lobular) e fibrose (ISHAK, et al., 1995).

- Aminotransferases (transaminases)

A aspartato aminotransferase (AST/TGO) e a alanino aminotransferase (ALT/TGP) são marcadores de agressão hepatocelular. Na forma aguda, principalmente a ALT/TGP pode atingir valores até 25 a 100 vezes acima do normal, embora alguns pacientes apresentem níveis bem mais baixos. Na forma crônica, na maioria das vezes, elas não ultrapassam quinze vezes o valor normal; em indivíduos assintomáticos, pode ser o único exame laboratorial sugestivo de dano hepático (BRASIL, 2009).

- Bilirrubinas

Pode haver aumento tanto da fração não conjugada (indireta) quanto da conjugada (direta), sendo predominante esta última. Pode ser detectada precocemente na urina e antes mesmo do surgimento da icterícia (BRASIL, 2009).

- Proteínas séricas

Normalmente, não se alteram nas formas agudas. Nas hepatites crônicas e cirrose, a albumina apresenta diminuição acentuada e progressiva (BRASIL, 2009).

- Fosfatase alcalina

Pouco se altera, exceto nas formas colestáticas, quando se apresenta em níveis elevados (BRASIL, 2009).

- Gama-glutamilttransferase (GGT)

É a enzima mais relacionada aos fenômenos colestáticos. Ocorre elevação discreta, exceto nas formas colestáticas (BRASIL, 2009).

- Atividade de protrombina

Essa prova sofre pouca alteração na forma aguda. Na forma crônica, o aumento do tempo de protrombina indica deterioração da função hepática (BRASIL, 2009).

- Alfafetoproteína

De forma geral, sua presença em valores elevados ou progressivamente crescentes em pacientes portadores de hepatite crônica indica o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (CHC), sendo por isso utilizada para *screening* do mesmo (BRASIL, 2009).

- Hemograma

A leucopenia é habitual na forma aguda; entretanto, muitos casos cursam sem alteração no leucograma. A plaquetopenia pode ocorrer na infecção crônica (BRASIL, 2009).

1.5. Tratamento da Hepatite viral C

O tratamento na fase aguda da infecção pelo VHC tem como objetivo reduzir o risco de progressão para hepatite crônica (WEDEMEYER et al., 2004). A detecção precoce da infecção aguda, sintomática ou não, vem sendo considerada uma importante medida de controle do VHC, a ser incorporada na prática clínica (COREY et al., 2002). O início tardio da terapia associa-se à menor resposta virológica sustentada (RVS). Quando a infecção é tratada precocemente, as taxas de RVS alcançam valores superiores a 80% e, em algumas situações, próximos de 98% (WEDEMEYER, MANNS, 2002).

O tratamento na fase crônica tem como objetivo controlar a progressão da doença hepática por meio da inibição da replicação viral. De forma geral, a redução da atividade inflamatória impede a evolução para cirrose e carcinoma hepatocelular (REDDY et al., 2001).

Vários esquemas terapêuticos têm sido propostos e avaliados para o tratamento da hepatite C, independente do genótipo viral (POYNARD et al., 2002).

- monoterapia com interferon (IFN) convencional alfa-2a ou alfa-2b, em dose diária de indução por via subcutânea.
- IFN convencional alfa-2a ou alfa-2b, 3 vezes por semana, associado a ribavirina (RBV) por via oral.

Não existe nenhuma medida específica eficaz para a redução do risco de infecção pelo vírus da hepatite C após exposição ocupacional. A única forma de reduzir o risco é a prevenção do próprio acidente.

1.6. Perspectivas da utilização das proteínas *core* e E2 na detecção do vírus da hepatite C (VHC)

A proteína *core* é formada por uma estrutura α -helicoidal que apresenta uma seqüência de aminoácidos altamente conservada entre os diferentes isolados do VHC sendo utilizada como importante alvo antigênico em vários testes diagnósticos comerciais para a detecção de anticorpos anti-VHC (KATO et al., 1990; OKAMOTO et al., 1990; CHOO et al., 1991). É altamente antigênica, induz resposta celular e humoral específica e provavelmente, desempenha um papel fundamental na patogênese da infecção por VHC (LAI, WARE, 2000; NELSON et al., 1997). A detecção e quantificação do antígeno *core*, proteína de nucleocapsídeo do VHC, tem obtido sucesso em muitos ensaios, sendo considerado um específico marcador da replicação viral, apresentando alta sensibilidade (JOLIVET-REYNAUD et al., 1998; LOPES et al., 2000; PETERSON et al., 2000; BOUVIER-ALIAS et al., 2002). A detecção da proteína *core*-VHC, em indivíduos sob tratamento com interferon-alfa e ribavirina, tem sido útil no monitoramento da eficácia de protocolos terapêuticos (BOUVIER-ALIAS et al., 2002; MAYNARD et al., 2003).

A proteína E2 é uma glicoproteína de envelope do VHC e apresenta um ectodomínio na região N-terminal e um domínio transmembrana na região C-terminal. Esta proteína possui 11 sítios de glicosilação e a maioria deles estão bem conservados, dessa forma, torna-se um bom alvo para o desenvolvimento de moléculas antivirais e também um alvo antigênico (FABIANI, 2007). É responsável pela ligação do vírus na célula alvo e os anticorpos para esta região são neutralizantes (SABO et al., 2011). A proteína E2 vem sendo considerada como a principal candidata para uma vacina anti-VHC já que já foi observada a produção de anticorpos anti-E2 neutralizantes do vírus e

anticorpos específicos para epítomos da região HVR1 inibindo a ligação da E2 às células bloqueando assim a infectividade do VHC tanto *in vivo* como *in vitro* (BARTOSCH, COSSET, 2006; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al. 2009).

Fundamentado na importância do desenvolvimento de um teste rápido, direto e indireto, específico para determinação da infecção pelo VHC, considerando as limitações dos testes ELISA e biologia molecular, realizamos a pesquisa para o desenvolvimento de um método imunocromatográfico que venha auxiliar tanto o diagnóstico da infecção aguda (pesquisa de antígenos circulantes e anticorpos) como no seguimento clínico-laboratorial do estadiamento crônico; podendo ser usado em laboratórios Clínicos ou triagem de doadores de sangue/componentes, clínicas, unidades básicas de saúde, serviço de atendimento especializado-SAE, hospitais e centro de testagem e acolhimento-CTA.

Considerando-se que:

- 1) O mercado nacional não disponibiliza nenhum método imunocromatográfico com detecção conjunta de antígenos (*core* e E2) e anticorpos;
- 2) Os reagentes produzidos durante o desenvolvimento desta técnica para diagnóstico (Ex: conjugado-ouro coloidal e/ou micro-esferas de látex coloridas e anticorpos monoclonais) também poderão ser comercializados, uma vez que estes produtos não são disponíveis em empresas brasileiras;
- 3) O método proposto será mais adequado à realidade brasileira, pois terá tecnologia nacional, podendo reduzir custos em relação a reagentes importados e será padronizado a partir de vírus que circulam no Brasil, favorecendo aumento da especificidade e sensibilidade para triagem e diagnóstico no país.

Desta forma, esta pesquisa envolve uma nova tecnologia, utilizando as frações antigênicas (*core* e E2) do VHC, o que confere uma alta sensibilidade e especificidade podendo ser aplicado no monitoramento de pacientes em hemodiálise, em trabalhadores da área da saúde expostos aos acidentes ocupacionais com pacientes infectados pelo VHC, onde há a preocupação de uma detecção precoce, em Laboratórios Clínicos, unidades básicas de saúde e hospitais.

1.7. Teste Imunocromatográfico (teste rápido)

Os testes de diagnóstico rápido têm sido fabricados em grande escala nos últimos anos e se tornaram bastante aceitos para o uso no diagnóstico e triagem de doenças infecciosas, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (LIN et al., 2008).

Um teste rápido pode ser definido como um ensaio simples e barato, baseado em membrana, que provê evidência visual da presença de um analito em uma amostra líquida, podendo ser finalizado em alguns minutos (CHANDLER, GURMIN, ROBINSON, 2000).

Também chamado de ensaio da fita ou de fluxo lateral, a técnica utiliza as propriedades da reação antígeno-anticorpo para a rápida detecção do analito (JIN et al., 2005).

Normalmente, a fase estacionária é constituída de um anticorpo ou antígeno quimicamente ligado a um suporte. A passagem da amostra contendo analitos, que sejam antígenos ou anticorpos da fase estacionária, ou vice versa, permite que haja uma associação antígeno-anticorpo, funcionando como uma extração por fase sólida (AQUINO NETO e NUNES, 2003).

Na fase móvel um ligante fixado na matriz sólida interage com um analito de natureza biológica como anticorpos, enzimas e receptores. Essa ligação pode ser por simples complexação, pela formação de ligações covalentes, pela associação enzima substrato ou pela formação de estruturas terciárias (AQUINO NETO e NUNES, 2003).

Neste tipo de ensaio, a amostra biológica migra como um líquido através da superfície de uma membrana de nitrocelulose que é o substrato base ou transportador do teste rápido por ação de capilaridade do meio (VAN DEN BROCK et al., 2006).

Para a maioria dos testes de fluxo lateral, dois tipos de partículas têm sido comumente usados como marcadores para formar o sinal visual, látex e o ouro coloidal, sendo que as nanopartículas de ouro, menores que as de látex, tem sido as mais escolhidas para o desenvolvimento da maioria dos ensaios de imunocromatografia (CARNEY, et al., 2006).

A área do conjugado contém partículas de ouro coloidal que formam o sinal visual, adsorvidas com antígeno ou anticorpo específico para o analito que está sendo pesquisado. A área do conjugado, contendo o conjugado seco é presa na membrana de nitrocelulose e quando a amostra é aplicada ela passa pela área do conjugado, re-hidratando o ouro, formando um complexo que se move pela membrana em direção a partícula de captura onde ela foi imobilizada, produzindo um sinal na forma de linha ou de um círculo vermelho. A segunda linha ou círculo controle também é formada por excesso de conjugado, indicando que o teste está finalizado e a reação está funcionando (CHANDLER, GURMIN, ROBINSON, 2000)

Os testes de diagnóstico rápido empregam esta tecnologia para detecção qualitativa e quantitativa de muitas moléculas alvo (VAN DEN BROEK et al., 2006), incluindo antígenos, anticorpos, hormônios, citocinas, receptores de células

(FERREIRA, ÁVILA, 2001), haptenos, resíduos de drogas, e mais recentemente ácidos nucléicos, oligonucleotídeos e marcadores sanguíneos (ZHANG, GUO, WANG, 2009; VOLKOV et al., 2009), tendo sido empregado em uma variedade de ensaios.

A exatidão e praticidade são características que fazem dos testes imunocromatográficos, métodos de imensa utilidade para a saúde pública (MATHUR, SAMANTARAY, CHAUHAN, 2005), sendo usados no diagnóstico sorológico de muitas doenças infecciosas (KRAJAEJUN et al., 2009).

A técnica de fluxo lateral por imunocromatografia combina diversos benefícios, incluindo formato, facilidade de uso, custo rentável, tempo de ensaio curto, onde a leitura é subjetiva e os resultados aparecem rapidamente após a adição da amostra e além de tudo, oferece alta sensibilidade e especificidade (KRAJAEJUN, et al., 2009).

Em nosso trabalho, o sistema de imunocromatografia para detecção destes antígenos (*core* e E2) do VHC baseia-se no princípio da imunocaptura, onde dois anticorpos ligam epítomos distintos: anticorpo de detecção que liga complexo antígeno-anticorpo conjugado ao gerador de sinal (comumente utilizados são as partículas de látex ou ouro coloidal) e anticorpo de captura, imobilizado na superfície sólida para controle do teste (NILSSON et al., 1995; LAITINEN e VUENTO, 1996; PAEK et al., 1999). Este sistema é bastante simples para leitura e o sinal colorimétrico gerado na imunocromatografia pode ser estimado qualitativa ou semi-quantitativamente.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é desenvolver o método imunocromatográfico de alta sensibilidade e especificidade para detecção conjunta de antígenos circulantes e anticorpos associados ao VHC, contribuindo assim para o diagnóstico da hepatite C em fase de pré-soroconversão, diminuir a possibilidade de resultados falso negativos em casos de infecção recente, e auxiliar no monitoramento da terapêutica com imunomodulador (Interferon) e/ou antiviral (Ribavirina).

2.2. Objetivos Específicos

- a) Isolamento viral e obtenção do seu RNA;
- b) Síntese do cDNA do VHC através de transcrição reversa;
- c) Amplificação do gene da proteína de nucleocapsídeo do VHC (*core*) e da proteína estrutural do envelope do VHC (E2), através de PCR;
- d) Clonagem e transformação em bactérias *E.coli*;
- e) Indução da expressão gênica e análise das proteínas *core* e E2 por SDS-PAGE;
- f) Purificação das proteínas por afinidade com resina de glutationa e por coluna de resina de níquel;
- g) *Western blot* para a confirmação da expressão das proteínas;

- h) Reatividade das proteínas *core* e E2 recombinantes com *pool* de soros humanos positivos para HCV;
- i) Indução da expressão das proteínas *core* e E2 recombinantes em larga escala;
- j) Purificação das proteínas expressas em larga escala, *core* e E2 fusionadas a GST, por cromatografia de afinidade em resina de glutationa;
- k) Purificação da proteína *core*-GST por cromatografia de afinidade em coluna de glutationa (GSTrap FF);
- l) *Western Blot* das proteínas *core*-GST e E2-GST;
- m) *Slot Blot*;
- n) Ensaio Imunoenzimático de captura-sanduiche e indireto – Elisa;
- o) *Immunoblotting*;
- p) Desenvolvimento e padronização do método imunocromatográfico;
- q) Teste de reatividade do ensaio imunocromatográfico;
- r) Validação e cálculo da sensibilidade e especificidade do método imunocromatográfico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Seleção das amostras

O material utilizado, *pool* de soros positivos para o VHC e negativo para outras doenças infecciosas e inflamatórias, genótipos 1a, mais prevalente no Brasil, foi obtido a partir de material enviado ao Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP/Araraquara, pertencente ao NAC (Núcleo de Atendimento a Comunidade). A detecção do RNA viral foi realizada através do Teste Qualitativo AMPLICOR® Hepatitis C Virus Test, version 2.0 (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA). Este material foi genotipado utilizando o método comercial INNO – LiPA HCV II (Innogenetics, Bélgica).

3.2. Ensaios com o RNA Viral

3.2.1. Isolamento do RNA Viral

O ensaio foi realizado em microtubos (*DNase* e *RNase free*). Foram adicionados 1 mL do material genotipado e 50µL de *Bead Suspend* do kit VERSANT® HCV RNA 3.0 Assay (bDNA) (Siemens), em seguida, agitado em vórtex por 10 segundos e centrifugado a 14.000 rpm durante 1 minuto a 4° C. Posteriormente, 1.030µL de sobrenadante foram descartados. O restante foi novamente agitado em vórtex por 10 minutos e rapidamente congelado a uma temperatura de – 80°C durante 30 minutos. Decorrido esse período, 120µL de tampão TE pH 8,0 foi adicionado e utilizado para extrair o RNA viral.

3.2.2. Extração do RNA Viral

Para extrair o RNA viral foi utilizado o kit QIAGEN efetuado conforme as especificações do fabricante (QIAamp RNA Mini Kit Hand, QIAGEN).

Em tubo de microcentrífuga foram adicionados 560µL do tampão de lise (AVL-Carrier RNA Mix), 140µL do precipitado ressuspendido e agitado por 15 segundos em vórtex, para em seguida, incubar por 10 minutos a 25°C. Foram adicionados 560µL de etanol 100% a esta solução e o tubo agitado em vórtex por 15 segundos. Uma parte dessa mistura (630 µL) foi transferida para uma coluna (QIAamp spin column) acoplada ao tubo de microcentrífuga de 2 mL e centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto. O filtrado foi descartado e repetiu-se o procedimento com a solução restante. À coluna foram adicionados 500µL do tampão de lavagem (AW1) e centrifugou-se 8.000 rpm por 1 minuto, descartando o filtrado. O processo foi repetido utilizando 500µL do tampão de lavagem (AW2) com centrifugação de 14.000 rpm durante 3 minutos. A coluna foi colocada em tubo limpo de 1,5 mL e 60µL de tampão de eluição (AVE), à temperatura ambiente, foram adicionados à coluna. O tubo foi incubado durante 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto. O RNA viral extraído é estável por aproximadamente um ano quando estocado a – 80°C.

3.3. Amplificação do gene correspondente a região do *core* VHC

3.3.1. Reação de Transcrição Reversa do RNA-VHC

A síntese do cDNA do VHC, da região parcial com 408pb, foi realizada utilizando a enzima SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen – Life

Technologies), em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf), conforme especificações do fabricante.

Em um microtubo livre de DNases e RNases foram adicionados 0,2µL do primer anti-sense do transcrito do *core* (VHCC-AI SR) (8,88 µg/µmole) (Invitrogen – Life Technologies), 10µL de RNA isolado, 1µL de dNTP mix 10mM e 1,8µL água Milli-Q nuclease free. Os tubos foram aquecidos a 65°C durante 5 minutos, rapidamente centrifugados e resfriados no gelo com sequente adição de 4,0µL de 5x first strand buffer (Tris – HCl pH 8,3 250mM; KCl 375mM; MgCl₂ 15mM), 1µL de DTT 0,1M (Dithiothreitol), 1µL de RNase OUT (Invitrogen - Life Technologies). Após essa etapa, os tubos foram homogeneizados e incubados a 42°C durante 2 minutos. Transcorrido esse tempo, adicionou-se à reação 1µL da enzima transcriptase reversa (SuperScript™ III Reverse Transcriptase 200U, Invitrogen – Life Technologies) com incubação a 55°C durante 60 minutos e em seguida aquecida a 70°C por 15 minutos para inativação da enzima.

3.3.2. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Em um microtubo livre de DNases e RNases foram adicionados 5µL de cDNA, 5µL de tampão de PCR 10x (sem MgCl₂), 1,5µL de MgCl₂ 50mM, 8µL da mistura de dNTP (1,25 mM), 1µL de primer sense VHCC-S SR (9,14 µg/µmole) (5' cca tgg cac ata tga gca caa atc cta aac 3') (Invitrogen – Life Technologies), 1µL de primer anti-sense (VHCC-AI SR) (8,88 µg/µmole) (5' ttg gat cct tag tac ccc atg agg tcg gc 3') (Invitrogen – Life Technologies), 0,5µL de enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen – Life Technologies) (5U/µL) e 28µL de água nuclease free.

A mistura de reação foi submetida a 35 ciclos térmicos no termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf) com as seguintes temperaturas e tempo: 94°C por 4 minutos, 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto para anelamento e 72°C por 75 segundos e 10 minutos à 72°C.

Neste produto obtido foi adicionado sítios de restrição para as enzimas Nco I e Bam HI para, posteriormente, ser clivado e clonado no vetor de expressão pET – 42a, na orientação correta.

3.4. Análise por eletroforese em gel de agarose

A agarose foi solubilizada em tampão TBE 1X (solução estoque 10X - Tris 1M/Ácido bórico 0,9M/ EDTA 10mM pH 8,3) em quantidade dependente da concentração requerida. Após completa solubilização, a agarose foi adicionada em suporte acrílico e resfriada até a polimerização. O gel foi coberto com tampão TBE 1X. 10µL da amostra amplificada foi aplicada aos poços do gel e a migração eletroforética ocorreu a 100 V por 40 minutos. O gel foi corado em solução de brometo de etídio 0,5mg/mL e visualizado sob um transluminador de luz ultra-violeta (UV) (BioRad) e o produto amplificado foi detectado como um fragmento único correspondente ao transcrito do *core* (408 pb).

3.5. Purificação do Produto Amplificado

A purificação foi realizada com o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), conforme especificação do fabricante.

Em um microtubo livre de DNase e RNase foi adicionado 30 μ L do produto de PCR e 30 μ L de Membrane Binding Solution. Essa solução foi transferida para a mini-coluna e incubada por 1 minuto à temperatura ambiente. O conjunto de coluna acoplado ao tubo de coleta foi centrifugado a 14.000 rpm durante 1 minuto. O filtrado resultante do tubo de coleta foi descartado e 700 μ L de Membrane Wash Solution (diluída em etanol) foram adicionados e novamente se repetiu o processo de centrifugação. Esse processo de lavagem foi repetido com 500 μ L de tampão, seguido por uma centrifugação de 14.000 rpm durante 5 minutos. A seguir o tampão foi descartado. Outra centrifugação, a 14.000 rpm por 1 minuto, foi efetuada para retirada do excesso da solução presente na coluna e esta foi colocada em um tubo limpo. Diretamente sobre a coluna foram adicionados 35 μ L de água livre de nuclease e novamente centrifugada a 14.000 rpm por 1 minuto em temperatura ambiente.

O produto amplificado e purificado foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 1%, como descrito no item 3.4 de Material e Métodos, e quantificado pelo espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop).

3.6. Ligação no Vetor pTZ57R/T

O produto amplificado e purificado foi inserido no vetor de clonagem pTZ57R/T, utilizando o kit InsTAcloneTM PCR Cloning Kit (Fermentas - Life Sciences).

Em um microtubo livre de DNase e RNase foram adicionados 4,5 μ L de água nuclease free, 1 μ L de pTZ57R/T (50ng/ μ L), 2,5 μ L de produto de PCR (20ng/ μ L), 1 μ L de tampão e 1 μ L de T4 DNA ligase. Essa solução foi homogeneizada delicadamente e incubada à temperatura ambiente durante 1 hora.

A Figura 2 mostra o mapa de restrição do vetor de clonagem pTZ57R/T.

Restriction Map of Vector pTZ57R/T

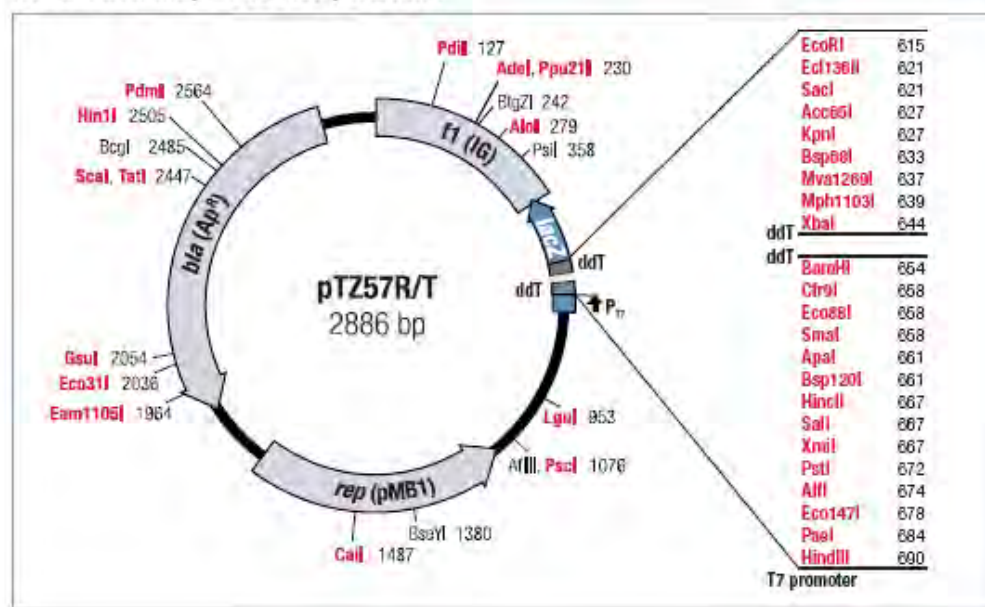


Figura 2: Mapa de restrição do vetor pTZ57R/T (Fermentas).

3.7. Preparo de Células Competentes

Seguindo o protocolo descrito por Sambrook et al, 1989, as células bacterianas foram preparadas com cloreto de cálcio (CaCl_2).

À suspensão bacteriana competente foram adicionados 15% de glicerol e estocada a -80°C .

3.8. Transformação Bacteriana

Uma alíquota da reação de ligação foi usada para transformar bactérias competentes *Escherichia coli*, da linhagem DH5 α , pelo método de choque térmico. A preparação das células competentes para transformação através do tratamento com

cloreto de cálcio (CaCl_2), foi realizada segundo o protocolo de Mendel e Higa (SAMBROOK et al, 1989).

Para realizar a transformação 200 μL da suspensão de células hospedeiras DH5 α competentes foram mantidas no gelo até o descongelamento e adicionou-se 7 μL do produto de ligação e incubou por 5 minutos no gelo e imediatamente após, foi colocado em banho-maria a 42°C por 90 segundos logo em seguida colocadas no gelo por 1 minuto para ocorrer o choque térmico. Em seguida, adicionou-se 800 μL de meio LB sem antibiótico (1% triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl) líquido, incubou-se por 45 minutos a 37°C, sob agitação no aparelho shaker a 300 rpm. Posteriormente 200 μL das bactérias transformadas foram plaqueadas sob condições estéreis. Para uma placa, foi utilizado 15 mL de meio LB Agar (1% triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl, 1,5% de ágar), 15 μL de antibiótico ampicilina (100mg/mL), 50 μL de IPTG (INVITROGEN) e 40 μL X-gal (USB). As placas foram incubadas a 37°C durante 16 horas.

3.9. Seleção de Clones Recombinantes

Em um tubo Falcon estéril foram adicionados 5 mL de meio LB e 5 μL de ampicilina (100mg/mL). Em microtubo estéril foram adicionados 300 μL do meio LB (meio de crescimento bacteriano) com ampicilina. Em seguida, 3 colônias da cor branca (que contém o inserto) foram selecionadas. Com o auxílio de um palito, estas colônias foram “picadas” e este foi inserido no tubo contendo meio LB e ampicilina. Estes tubos foram colocados sob agitação no *shaker* por 6 horas a 300 rpm, numa temperatura de 37°C.

3.10. PCR das Colônias

As colônias obtidas em suspensão foram analisadas por PCR para verificar a presença de clones recombinantes.

Em microtubo livre de DNase e RNase a PCR foi realizada utilizando 1µL da suspensão celular, 14,25µL de água DNase e RNase free, 4µL de dNTP (1,25mM), 2,5µL de tampão de PCR 10x, 0,75µL de MgCl₂ (50mM), 1µL de primer anti-sense M13R (Fermentas - Life Sciences) (10pM/µL), 1µL de primer sense M13F (Fermentas - Life Sciences) (10pM/µL) e 0,5µL de enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen – Life Technologies) (5U/µL).

A mistura de reação foi submetida a 95°C por 2 minutos (desnaturação inicial) e em seguida, 35 ciclos no termociclador *GeneAmp 2400 (Perkin Elmer)* com as seguintes temperaturas e tempo: 94°C por 30 segundos para desnaturação, 55°C por 30 segundos para anelamento e 72°C por 1 minuto para extensão e mais 5 minutos a 72°C para completa extensão. Ao final da reação as amostras foram armazenadas à -20°C.

O produto amplificado foi analisado em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo 0,5 mg/mL numa tensão de 100 V durante 40 minutos e visualizado em um transluminador de ultravioleta, para confirmar a presença do inserto.

3.11. Extração Plasmidial

Esta técnica é realizada pelo método mini-prep e utiliza o kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN).

As colônias contendo o gene de interesse foram repicadas em 5 mL de meio LB, 5μL de antibiótico ampicilina (100mg/mL) (GIBCO) e incubadas no shaker a 37°C sob rotação de 250 rpm overnight.

A cultura foi centrifugada a 4.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento de células bacterianas foi ressuspenso em 250μL de tampão P1. Após a adição de 250μL da solução P2 o tubo foi homogeneizado gentilmente. O DNA bacteriano e o vetor plasmidial foram liberados devido à lise bacteriana. Em seguida, foi adicionado 350μL de tampão N3 (tampão neutralizante) e novamente inverteu-se o tubo gentilmente. Posteriormente, o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante foi aplicado em uma coluna acoplada a um tubo de coleta e centrifugado por 1 minuto à 13.000 rpm. O filtrado foi descartado e a coluna foi lavada com 750μL de tampão PE e novamente o conjunto foi centrifugado por 1 minuto à 13.000 rpm. Este passo foi repetido mais uma vez e só então a coluna foi acoplada em um microtubo livre de *DNase* e *RNase* e o DNA foi eluído da coluna adicionando-se 50μL de água estéril. A solução foi incubada em temperatura ambiente durante 60 segundos e centrifugada por 1 minuto a 13.000 rpm. A amostra foi armazenada em freezer a -20°C.

O produto da reação da mini-prep foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 1%, sendo que a corrida ocorreu durante 15 minutos a uma tensão de 100 volts (V) e foi quantificado pelo espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop).

3.12. Clivagem Enzimática do Vetor pTZ

O vetor pTZ contendo o inserto correspondente à proteína *core* com os sítios de restrição foi clivado com as enzimas *Nco* I e *Bam* HI (*Fermentas*), seguindo orientações do fabricante.

Em microtubos foram adicionados 8µL da amostra, 12µL de tampão Tango 2X, 2µL da enzima *Nco* I (10U/µL), 2µL da enzima *Bam* HI (10U/µL) e 36µL de água Milli-Q estéril completando um volume final de 60µL. Em seguida, foi rapidamente centrifugada e colocada em banho-maria durante 3 horas a 37°C.

Para comprovar a clivagem enzimática, foi realizada a eletroforese em gel de agarose, sendo que esta corrida ocorreu a 100 V durante aproximadamente 60 minutos. O gel foi levado a um transluminador UV e o produto de clivagem enzimática foi observado como dois fragmentos correspondentes ao tamanho do vetor pTZ e o outro ao tamanho do inserto, conforme estimado pelo padrão de pares de bases de 1 Kb. A banda correspondente ao inserto foi recordada do gel, pesada e colocada em um microtubo estéril.

3.13. Purificação das Amostras após a Clivagem Enzimática

A purificação da banda correspondente ao inserto da proteína *core* já digerido pelas enzimas de restrição realizou-se utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). No microtubo que continha a banda do gel recortada foi adicionado 450µL de Membrane Binding Solution, rapidamente homogeneizado e em seguida, incubado em agitador durante 5 minutos a 65°C e 300 rpm até a completa dissolução do gel. Uma mini-coluna foi acoplada a um tubo coletor e aplicado o gel

dissolvido, a partir desta etapa, o protocolo segue como já descrito no item 3.5 de Material e Métodos. Foi realizada a análise e a quantificação do produto purificado, através de eletroforese em gel de agarose 1% e quantificado pelo espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop).

3.14. Expressão da proteína core-VHC

3.14.1. Vetor de Expressão

Vários vetores de expressão encontram-se disponíveis no mercado para a expressão heteróloga de proteínas em *Escherichia coli*. Os mais referidos são da série pET, cuja expressão está sob controle do promotor de transcrição $\phi 10$ e dos sinais de iniciação de tradução s10 da proteína do gene 10 do bacteriófago T7. A grande vantagem deste vetor é que o inserto clonado é transcrito pela RNA polimerase do bacteriófago T7, que é muito seletiva e ativa, sendo capaz de alongar cadeias de RNA aproximadamente cinco vezes mais rápido que a RNA polimerase de *E. coli*. Alguns vetores da série pET apresentam o promotor T7-lac, colocando a expressão da proteína sob controle lac e reduzindo portanto o *background* de expressão da proteína alvo na ausência de IPTG (pET SYSTEM MANUAL, 2002). Além disso, ele permite a clonagem e a expressão do gene de interesse em fusão com a proteína GST (Glutathione S-Transferase) na porção N-terminal da proteína (o que posteriormente facilitará a purificação da proteína de interesse), e seleção com o antibiótico kanamicina (pET SYSTEM MANUAL, 2002).

A Figura 3 demonstra o mapa de restrição do vetor pET-42a.

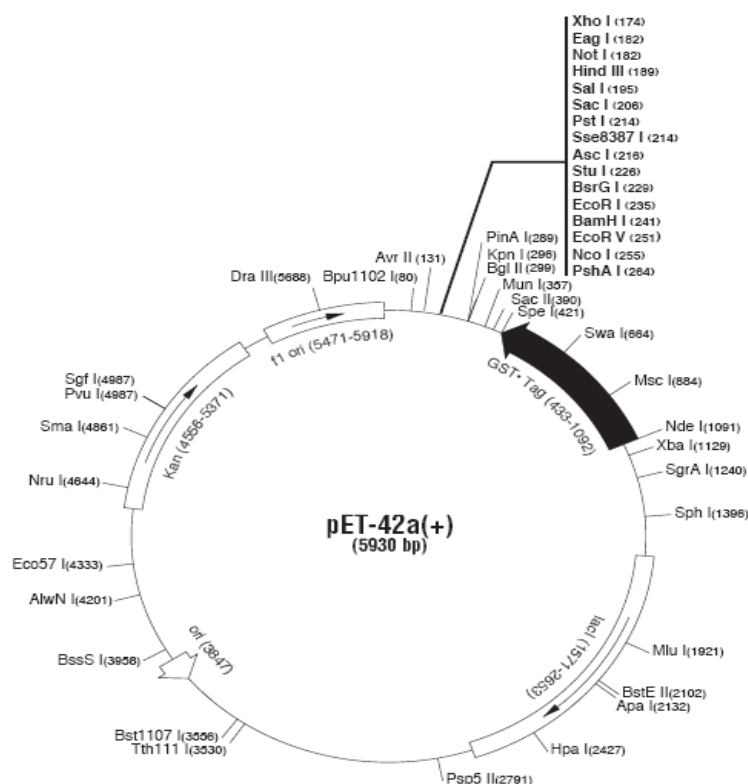


Figura 3: Mapa de restrição do vetor pET-42a (Novagen).

3.14.2. Preparo do Vetor pET-42a

Um inóculo de bactérias *Escherichia coli*/DH5α competentes, tratadas com CaCl_2 e portadoras do vetor pET - 42a, foi preparado em um tubo estéril com 5 mL de meio LB e 5 μL de kanamicina (25mg/mL) (USB). Nesta solução foi mergulhado um palito e este foi agitado para que ficasse impregnado de bactérias e posteriormente colocado em um tubo com meio de cultura e antibiótico. Em seguida, levado ao *shaker* sob agitação de 250 rpm e uma temperatura de 37°C *overnight*. Decorrido esse período, o tubo foi centrifugado a 4.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado e seguiu-se o protocolo de extração do DNA plasmidial bacteriano através da técnica de

mini-prep utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN), já descrito no item 3.11 de Material e Métodos.

Para analisar a qualidade do produto da mini-prep foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1%, como descrito no item 3.4 de Material e Métodos. A corrida ocorreu durante cerca de 15 minutos a uma tensão de 100 V. Ao final, o gel foi levado a um transluminador de luz ultra-violeta (UV) (BioRad). Foram consideradas as amostras que apresentaram produtos de amplificação com 5.930 pares de bases, correspondente ao vetor de expressão pET-42a.

A quantificação da concentração de pET - 42a foi realizada no aparelho nanodrop.

3.14.3. Clivagem Enzimática do pET - 42a

O vetor pET - 42a foi clivado com as enzimas de restrição *Nco* I e *Bam* HI, seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante.

Em um microtubo estéril, foram adicionados 70µL de pET - 42a, 20µL de tampão Tango 2x, 4µL de água Milli-Q estéril, 3µL da enzima *Nco* I (10U/µL) (*Fermentas*) e 3µL da enzima *Bam* HI (10U/µL) (*Fermentas*), homogeneizada e incubada em banho-maria a 37°C durante 3 horas.

Após este período, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% conforme protocolo descrito no item 3.4 de Material e Métodos. A corrida ocorreu em 30 minutos a uma tensão de 100 V. Ao final, o gel foi levado a um transluminador de luz ultra-violeta (UV) (BioRad) e os produtos da clivagem foram observados. Sendo o tamanho do produto estimado pelo padrão de 1Kb em um dos poços do gel. A banda

correspondente ao pET - 42a foi recordada do gel, pesada e colocada em um microtubo estéril. A banda do pET - 42a foi purificada como descrito no item 3.13 de Material e Métodos, utilizando-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA).

O material foi analisado e quantificado por eletroforese em gel de agarose 1% e espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop), respectivamente.

3.14.4. Ligação dos Produtos Amplificados ao Vetor pET - 42a

Os produtos amplificados para o transcrito do *core* (408 pb) e já clivados com as enzimas *Nco* I e *Bam* HI, foram ligados ao vetor de expressão pET - 42a (5.930 pb). A concentração de inserto utilizada na reação de ligação foi calculada seguindo-se a proporção:

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

Em um microtubo estéril foram adicionados: 3µL de inserto *core* digerido e purificado, 8µL de vetor pET - 42a digerido e purificado, 1,5µL de tampão da enzima 10x, 1,2µL de T4 DNA ligase (*New England Biolabs*) e 1,3µL de água Milli-Q autoclavada. A solução foi gentilmente homogeneizada e incubada à 16°C *overnight*.

3.14.5. Transformação do pET - 42a com Inserto em Linhagem DH5α

Em um microtubo estéril foram adicionados 200µL de suspensão de células bacterianas *Escherichia coli*/DH5α competentes e tratadas, 5µL do produto de ligação. Em seguida, foi gentilmente homogeneizado e realizado choque térmico por 90 segundo a 42°C e imediatamente após foi colocado durante 1 minuto no gelo. Após

este período, foi adicionado 800µL de meio de cultura líquido LB sem antibiótico e incubado sob agitação no aparelho *shaker* a 300 rpm durante 45 minutos a 37°C. Posteriormente, as bactérias transformadas foram plaqueadas, sendo que para confecção de cada placa utilizou-se: 15 mL de meio LB ágar e 15µL de kanamicina (25mg/mL). A placa permaneceu aberta dentro do fluxo laminar e próxima ao bico de Bunsen. Após solidificação, 200µL do produto de transformação foi plaqueado e incubado em estufa a 37°C *overnight*.

3.14.6. Preparação do Inóculo

Dando seguimento, em 6 tubos cônicos de 50mL estéreis foram adicionados: 5 mL de meio LB e 5µL de kanamicina (25mg/mL) (*USB*), e o tubo foi homogeneizado. Da placa foram escolhidas 6 colônias, sendo que cada uma delas foram “picadas” com o auxílio de um palito e estes foram mergulhados em tubos contendo meio e antibiótico. Os tubos foram colocados no aparelho *shaker* sob agitação de 300 rpm à 37°C *overnight*.

3.14.7. Seleção dos Clones Recombinantes

A seleção dos clones recombinantes foi efetuada utilizando uma reação de PCR. Para cada reação, utilizou-se um microtubo livre de DNase e RNase e a eles foram adicionados: 5µL de tampão de PCR 10x (sem MgCl₂), 1,5µL de MgCl₂ (50mM), 1µL de dNTP mix (10mM), 1µL de primer sense VHCC-S SR (9,14 µg/µmole) (5' cca tgg cac ata tga gca caa atc cta aac 3') (Invitrogen – Life Technologies), 1µL de primer anti-sense (VHCC-AI SR) (8,88 µg/µmole) (5' ttg gat cct tag tac ccc atg agg tcg gc 3')

(Invitrogen – Life Technologies), 0,5µL de enzima Taq DNA polimerase (*Invitrogen – Life Technologies*) (5U/µL), 39µL de água *DNase* e *RNase free* e 1µL de suspensão celular.

As reações foram submetidas a 94°C por 4 minutos para desnaturação inicial e 35 ciclos térmicos no termociclador *GeneAmp 2400* (*Perkin Elmer*) com as seguintes temperaturas e tempo: 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto para anelamento e 72°C por 75 segundos, 10 minutos à 72°C. Ao final da reação as amostras foram mantidas no termociclador à 4°C. O produto amplificado foi analisado em gel de agarose a 1%, como descrito no item 3.4 de Material e Métodos, sendo que a corrida ocorreu em uma tensão de 100 V durante 40 minutos e após esse período, foi visualizado em um transluminador de ultravioleta (BioRad).

3.14.8. Mini-Prep das Colônias que contém o pET - 42a com o Inseto da Proteína do Core

Com as reações positivas das PCRs para o inserto duas foram escolhidas, e do inóculo foi realizada uma mini-prep, como descrito no item IV – 14. Para analisar a qualidade do produto da mini-prep, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1%. A corrida ocorreu em 15 minutos sob uma tensão de 100 V. O gel foi levado a um transluminador de luz ultravioleta (BioRad) e os produtos da reação de mini-prep foram observados como um fragmento único correspondente ao tamanho da sequência do vetor pET - 42a acrescida do fragmento da proteína do *core*. A quantificação da concentração do pET - 42a acrescido do inserto foi realizada no aparelho nanodrop.

3.14.9. Seqüenciamento

Os vetores construídos durante este trabalho foram seqüenciados para confirmação da seqüência e orientação correta dos fragmentos inseridos, através do método de terminação da cadeia de seqüenciamento de DNA (SANGER et al., 1977), em seqüenciador automático “Megabace”, utilizando o kit “DYEnamic ET dye terminator kit (MegaBACE)”, conforme instruções do fabricante.

3.14.10. Clivagem Enzimática do pET - 42a com Inseto da Proteína Core

O pET - 42a com o inserto *core* foi clivado com as enzimas de restrição *Nco* I e *Bam* HI, através do protocolo estabelecido pelo fabricante, para a verificação da inserção da seqüência da proteína *core* no vetor pET - 42a.

Em um microtubo estéril foram adicionados: 15µL do produto da mini-prep, 0,4µL de água Milli-Q estéril, 4µL de tampão Tango 2x, 0,3µL da enzima *Nco* I (10U/µL) (*Fermentas - Life Sciences*), 0,3µL da enzima *Bam* HI (10U/µL) (*Fermentas - Life Sciences*). Em seguida, a mistura foi homogeneizada e incubada a uma temperatura de 37°C durante 3 horas. Decorrido esse período, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1%, conforme descrito no item 3.4 de Material e Métodos. A corrida ocorreu em 30 minutos a uma tensão de 100 V. Posteriormente o gel foi levado a um transluminador de luz ultravioleta e o produto de clivagem enzimática foi observado como dois fragmentos, um correspondente ao tamanho da seqüência do vetor pET - 42a (6Kb) e o outro ao tamanho da proteína *core* (408 pb).

3.14.11. Transformação na Linhagem Rosetta

Em um microtubo estéril foram adicionados 200µL de suspensão de células bacterianas competentes (*E. coli*) linhagem Rosetta e 1µL do produto da mini-prep (pET - 42a com o inserto *core*) (50µg/µL). O tubo foi gentilmente homogeneizado e em seguida, foi realizado o choque térmico por 90 segundos a 42°C e imediatamente após foi colocado em gelo durante 1 minuto. Posteriormente foi adicionado 800 µL de meio de cultura líquido sem antibiótico e novamente incubado sob agitação em *shaker* a 200 rpm em uma temperatura de 37°C durante 45 minutos. Posteriormente, as bactérias transformadas foram plaqueadas, sendo que para confecção de cada placa utilizou-se: 15 mL de meio LB ágar, 15 µL de kanamicina (25mg/mL) e 15µL de cloranfenicol (25µg/mL) (USB). A placa permaneceu aberta dentro do fluxo laminar e próxima ao bico de Bunsen. Após solidificação, 200 µL do produto de transformação foi plaqueado e novamente a placa foi mantida próxima ao bico de Bunsen para secagem e posteriormente incubado em estufa a 37°C *overnight*.

3.14.12. Preparação do Inóculo

Decorrido o período de incubação, foram adicionados em tubo cônico estéril 5 mL de meio LB, 5 µL de kanamicina (25µg/mL) (USB), 5 µL de cloranfenicol (25µg/mL) (USB) e homogeneizado. Na placa em que a bactérias transformadas foram cultivadas, uma dessas colônias foi “picada” com o auxílio de um palito e este foi inserido dentro de um tubo contendo meio e antibiótico e em seguida, colocado sob agitação em *shaker* a 250 rpm, em temperatura de 37°C *overnight*.

3.14.13. Indução da expressão gênica

Segundo metodologia descrita por Sambrook et al., 2001, sob condições assépticas, foram adicionados à um erlemmeyer de 250mL autoclavado: 40mL de meio LB (USB) (anexo), 40μL de kanamicina (25mg/mL) (USB), 40μL de cloranfenicol (25mg/mL) (USB) e 800μL do inóculo crescido por uma noite, como descrito no item 3.14.12 de Material e Métodos. O frasco foi colocado no *shaker* (*Excella E24 Incubator Shaker Series - New Brunswick Scientific*) a 300rpm e a 37°C, até atingir a densidade óptica (D.O.) de 0,600 a 600nm, aproximadamente após 1h e 30 minutos, então 2mL do conteúdo do frasco foi retirado e lido no espectrofotômetro (*Spectronic® Genesys™* 2) a 600nm, sendo este considerado o ponto/tempo zero da indução. Nesta D.O. foi coletado 1mL da cultura não induzida (controle negativo) e armazenado em um tubo de microcentrífuga do tipo *Eppendorf* de 1,5mL estéril.

A alíquota foi centrifugada por 1 minuto à 13.000 rpm (17.900 g), o sobrenadante foi descartado por inversão e a boca do tubo foi seca em papel absorvente para eliminar o meio de cultura. Foram adicionados ao tubo 20μL de água Milli-Q autoclavada e este levado ao vórtex (*Agitador de tubos AP56 – Phoenix*) rapidamente, adicionou-se então 10μL de tampão de amostra 3x (625mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 2%, glicerol 87%, azul de bromofenol 0,5% e β-mercaptoetanol 5%) (anexo) e a amostra foi imediatamente guardada em freezer -20°C. Nos tempos subseqüentes foi realizado o mesmo procedimento com a amostra induzida, sendo que foi adicionado 40μL de água Milli-Q autoclavada e 20μL de tampão de amostra 3x.

Após retirar a alíquota correspondente ao tempo zero, sobrando no frasco 37mL, foram adicionados 74μL de IPTG 200mM (*Invitrogen*) (concentração final:

0,4mM) à cultura, para que a indução fosse iniciada. A cultura foi induzida durante 4 horas a 30°C em *shaker* (*Excella E24 Incubator Shaker Series - New Brunswick Scientific*) a 300rpm, coletando-se uma alíquota de 1mL da cultura induzida em intervalos de 1, 2, 3 e 4 horas, e o protocolo de centrifugação descrito acima foi realizado para cada uma delas.

3.15. Análise das proteínas expressas

3.15.1. Análise dos tempos de indução por SDS-PAGE

A metodologia da expressão da proteína E2-VHC foi realizada em conjunto com a aluna Ana Carolina Urbaczek, pois a expressão desta era parte de seu trabalho de pesquisa. Foi realizada da mesma maneira que a proteína *core*-VHC, porém está descrita na Tese de Doutorado: Ana Carolina Urbaczek, 2012. A partir da expressão das proteínas recombinantes *core* e E2 fusionadas a GST, começamos a avaliar estas proteínas pelos métodos descritos abaixo e estas foram utilizadas nos ensaios biológicos.

Para a avaliação do melhor tempo de indução da cultura de bactérias *E. coli* linhagem Rosetta transformadas com o plasmídeo, que possuía o inserto correspondente à sequência codificadora para as proteínas *core* e E2 do VHC, foi realizado um ensaio de indução de 4hs, sendo que em intervalos de 1h em 1h foram retirados 1mL de cultura em indução. Esta, foi centrifugada à 13.000rpm durante 1min, o sobrenadante foi descartado e ao precipitado bacteriano obtido de cada intervalo de tempo (1h, 2hs, 3hs e 4hs após o início da indução com IPTG) foi adicionado tampão de amostra 3x (anexo) (na proporção de 1 parte de tampão para 2 de precipitado) e aquecido a 100°C durante 15 minutos, sendo posteriormente analisado em gel SDS-

PAGE 12%, para a detecção da expressão proteica conforme a metodologia descrita por Sambrook et al, 2001.

Para tal análise, foi confeccionado um gel de poliacrilamida 12% (anexo) contendo gel de resolução com 10% de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) pH 8,8 e gel de empilhamento a 5% pH 6,8, segundo o método descrito por Laemmli et al., 1970. Foram aplicados nos poços do gel 7µL de um marcador de massa molecular (*Protein Marker Broad Range (2 - 212 kDa) - Biolabs*) e 5µL das alíquotas processadas dos diferentes tempos de indução. A eletroforese foi realizada à temperatura ambiente em cuba de eletroforese Mini-Protean® Tetra Cell (BioRad) em placas de mini-gel (10x8cm) aplicando-se 120V durante aproximadamente 1 hora e 40 minutos. O tampão da cuba constituiu-se de Tris 0,125M, glicina 0,96M, SDS 0,1% pH 8,3 (anexo).

Após a corrida eletroforética, o gel foi imerso em solução de *Coomassie Blue* (anexo), e deixado sob agitação em plataforma durante 15 minutos, para coloração das proteínas, e descorado em solução de ácido acético 7% (anexo) para a revelação das bandas correspondentes às proteínas *core* e E2 (44kDa e 63,5kDa).

3.15.2. Análise dos tempos de indução por Western Blot

Para o teste de detecção das proteínas *core* e E2 através da sua cauda de histidina, foi realizado um ensaio de *Western Blot* dos precipitados bacterianos provenientes dos diferentes tempos após o início da indução com IPTG (1h, 2hs, 3hs e 4hs). 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*).

Os precipitados bacterianos em tampão de amostra foram fervidos por 15min e em seguida aplicados no gel de poliacrilamida 12%, fazendo-se em duplicata de géis, pois um foi utilizado para a transferência na membrana e o outro como “espelho” desta. Prosseguiu-se a eletroforese como descrito no item 3.15.1 de Material e Métodos, sendo aplicada uma voltagem inicial de 100V durante 20min e em seguida uma voltagem de 120V por aproximadamente 1h e 20 minutos.

Após a eletroforese, um dos géis, o que foi chamado de “espelho”, foi imerso em solução de *Coomassie Blue* (anexo), e deixado sob agitação em plataforma durante 15 minutos. O outro gel obtido foi mergulhado por 5min em tampão de transferência (Tris 200mM, glicina 50mM, metanol 15%) (anexo), juntamente com as esponjas e papéis filtro do sistema de transferência de proteínas e a membrana de PDVF (*PVDF Transfer Membrane 0,45 μ M – Thermo Scientific*) (que havia ficado por 5min em metanol) (tamanho de 8,5cm x 6,0cm). 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 150V (150mA) por 2hs, 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%) (anexo), para a visualização das bandas transferidas. As bandas de interesse transferidas 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. O bloqueio dos sítios livres na membrana foi realizado com solução de bloqueio (anexo)

contendo TBS (Tris 0,05M, NaCl 0,15M, pH 8,0) (anexo) e 0,05% leite desnatado por 12-18h, em geladeira à 4°C. Após esse período, a membrana foi lavada com TBS por 4 vezes de cinco minutos 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 TBS.

Decorrido este tempo a membrana foi lavada novamente com TBS por 4 vezes de cinco minutos cada sob agitação suave 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 lavada com TBS por 4 vezes de cinco minutos cada 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 15 minutos). A membrana foi lavada com água destilada para interromper a reação e então seca entre folhas de papel filtro e fotografadas no fotodocumentador com mesa de luz UV (*Biorad - software Quantity One 4.6.5*).

3.15.3. Teste de solubilidade

Ao final da indução, a cultura induzida foi vertida em um tubo de centrifugação e centrifugada 5.000rpm por 10 minutos à 4°C (centrífuga: *Sorvall High Speed Centrifuge – RC 5C PLUS*). Em seguida, o sobrenadante foi totalmente descartado e o sedimento celular (*pellet*) guardado em freezer a -20°C ou utilizado imediatamente.

O *pellet* foi ressuspensionado em 5mL de tampão de lise (100mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 50mM NaH₂PO₄, pH8,0) (anexo) e descongelado sob agitação manual em gelo até a sua total dissolução. O conteúdo do tubo foi vertido em um Falcon de 50mL cortado

ao meio e levado ao sonicador (*Sonic Dismembrator*) em banho de gelo. As amostras foram sonicadas por 6 minutos com intervalos de 30 segundos e então centrifugadas à 13.000rpm por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi filtrado, em filtro MILLEX® HV Durapore® PVDF Membrane 0,45µm, e armazenado em gelo, sendo que uma alíquota de 60µL foi retirada e adicionado de 30µL de tampão de amostra 3x (anexo) e guardada em freezer a -20°C. O *pellet* foi ressuspendido em 5mL de tampão de lise e agitado no vórtex para dissolução, sendo que da mesma forma que com o sobrenadante uma alíquota de 60µL do *pellet* foi retirada, adicionada de 30µL de tampão de amostra 3x e guardada em freezer a -20°C. Estas alíquotas foram analisadas, em gel de SDS-PAGE 12% (anexo) e por ensaio de *western blot*, como descrito no item 3.15.2 de Material e Métodos, quanto à solubilidade das proteínas *core* e E2 recombinantes.

3.16. Purificação das proteínas expressas

3.16.1. Purificação protéica por técnica de cromatografia de afinidade em coluna de níquel (Ni-NTA)

Para a purificação das proteínas *core* e E2 recombinantes fusionadas à cauda de histidina, foi utilizado o protocolo fornecido pelo fabricante da resina (*Ni-NTA Superflow*, *Qiagen*), sendo assim utilizada uma coluna de Ni-NTA (com 3mL de resina), previamente carregada com sulfato de níquel 0,1M e equilibrada com 15mL de tampão de lise (100mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 50mM NaH₂PO₄, pH8,0) (anexo) (ou seja, 5x o volume de resina). À coluna foi aplicado o sobrenadante filtrado, como descrito no item 3.15.3 de Material e Métodos, que foi coletado em tubo tipo Falcon, em banho de gelo, após a passagem pela coluna e identificado como “eluato”. Em seguida, foram

adicionados à coluna 9mL (ou seja, 3x o volume da resina) de tampão de lise para a lavagem da coluna, o produto desta lavagem foi coletado ao final da passagem e identificado como “lavagem”. A seguir, as proteínas foram eluídas da coluna utilizando gradientes de 10, 25, 50, 75, 100 e 250mM de tampão de lise com imidazol (anexo), que foram coletados em banho de gelo após a passagem pela coluna. De cada amostra obtida foi retirada uma alíquota de 60µL que foi adicionada de 30µL de tampão de amostra 3x. Estas alíquotas foram aquecidas à 100°C por 15min e analisadas em SDS-PAGE 12% e por ensaio de *western blot*, segundo metodologia descrita no item 3.15.2 de Material e Métodos.

3.16.2. Purificação protéica por afinidade com resina de glutathione (procedimento em tubo – Batch Purification)

Para a purificação das proteínas *core* e E2 recombinantes, fusionadas ao GST, foi utilizado um sistema de tubo (do tipo Falcon de 15mL) com 1mL da resina *Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare)*, de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante da mesma (técnica *Batch Purification*).

O sobrenadante, resultante do processo de sonicação e filtração, descrito no item 3.15.3 de Material e Métodos, foi aplicado no tubo de Falcon com a resina, previamente equilibrada com 5mL de tampão PBS 1x (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄, pH7,4) (anexo), homogeneizado e incubado por 30min à temperatura ambiente, sob agitação suave em plataforma.

O tubo foi então centrifugado à 500 *g* (1715rpm) por 5min, e o sobrenadante foi retirado cuidadosamente com a pipeta e armazenado em um tubo do tipo Falcon,

denominado “eluato”. Em seguida, a resina foi lavada com 5mL de PBS pH7,3, homogeneizada e novamente centrifugada à 500 *g* por 5 min, o sobrenadante foi retirado e nomeado “lavagem 1”. Este mesmo procedimento foi realizado mais 2 vezes, sendo então obtidos a “lavagem 2” e a “lavagem 3”. As frações das proteínas eluídas 1, 2 e 3 foram obtidas adicionando-se ao tubo 500µl de tampão de eluição (50mM Tris HCl, 10mM Glutathione reduzida, pH 8,0) (anexo) e levado à plataforma sob leve agitação em temperatura ambiente por 10 minutos, em seguida o tubo foi centrifugado à 500 *g* por 5min, sendo o primeiro sobrenadante resultante deste procedimento identificado como “proteína eluída 1”, e os resultantes da execução de mais duas vezes deste procedimento como “proteína eluída 2” e “proteína eluída 3”.

As amostras foram armazenadas em freezer -20°C até o momento do uso. Sendo em alguns casos, antes da utilização das proteínas nos passos posteriores, necessário realizar mais uma centrifugação de 500 *g* por 5min, para a retirada superficial do sobrenadante, pois observava-se a presença de resina no fundo do tubo. Posteriormente, todas as amostras foram analisadas em SDS-PAGE 12% e por ensaio de *western blot*, conforme descrito no item 3.15.2 de Material e Métodos, para verificação da fração na qual estavam presentes as proteínas de interesse.

3.17. Alterações no protocolo de indução para melhora da solubilidade das proteínas e das suas purificações

3.17.1. Mudança na temperatura de indução (28°C) e no tampão de lise

Como parte das proteínas *core* e E2 recombinantes encontravam-se no *pellet*, algumas alterações no protocolo citado no item 3.14.13 de Material e Métodos, foram realizadas na tentativa de melhorar a solubilidade e a sua purificação.

Uma destas alterações foi iniciar o crescimento do inóculo pré-indução à 37°C sob agitação de 300rpm em *shaker*, e quando a D.O. de 0,6 em 600nm foi atingida foi adicionado IPTG até a concentração de 0,4mM, e então os frascos com a cultura de bactérias recombinantes foi levado novamente ao *shaker* à temperatura de 28°C e 300rpm por 3hs. As amostras foram submetidas à um novo teste de solubilidade, como descrito no item 3.15.3 de Material e Métodos, e as proteínas foram então purificadas pelo método de purificação em coluna de níquel, item 3.16.1 de Material e Métodos, utilizando tampão de lise com 0,5mM de uréia (anexo) . As proteínas também foram purificadas por resina de glutathione com afinidade por GST, item 3.16.2 de Material e Métodos, e em seguida analisadas em gel SDS-PAGE 12% como descrito no item 3.15.1 de Material e Métodos.

3.17.2. Mudança na temperatura de indução (37°C) e no tampão de lise

A outra alteração realizada no protocolo descrito no item 3.14.13 de Material e Métodos, foi iniciar o crescimento do inóculo pré-indução à 37°C sob agitação de 300rpm em *shaker*, e quando a D.O. de 0,6 em 600nm foi atingida, adicionou-se IPTG até a concentração de 0,4mM, e então os frascos com a cultura de bactérias recombinantes foi levado novamente ao *shaker* à temperatura de 37°C e 300rpm por 3hs. As amostras foram submetidas à um novo teste de solubilidade, como descrito no item 3.15.3., e as proteínas foram então purificadas pelo método de purificação por coluna de níquel, item 3.16.1 de Material e Métodos, utilizando tampão de lise com 0,5mM de uréia (anexo) e por resina de glutathione com afinidade por GST utilizando tampão de lise sem uréia (anexo), conforme descrito no item 3.16.2 de Material e Métodos, e em seguida analisadas em gel SDS-PAGE 12% como descrito no item

3.15.1 de Material e Métodos.

3.17.3. Mudanças no tampão de lise – lisozima

Foi realizada uma indução nas mesmas condições descritas no item 3.14.13 de Material e Métodos, (30°C – 300rpm), sendo que para ressuspender o *pellet* como descrito no teste de solubilidade item 3.15.3. de Material e Métodos, foi utilizado um tampão de lise contendo uréia [0,5mM], lisozima [0,2mg/mL], NaCl [150mM], Tris [10mM] e NaH₂PO₄ [50mM] (anexo). Foram adicionados ao *pellet*, descongelado em gelo, 5mL de tampão. Os tubos foram agitados em gelo até a sua dissolução e deixados em repouso, sob as mesmas condições, por 40min. A amostra foi então sonicada por 8min, na tentativa de clareá-la. As amostras foram purificadas por coluna de níquel, conforme descrito no item 3.16.1 de Material e Métodos e analisadas em gel SDS-PAGE 12% como descrito no item 3.15.1.

3.17.4. Mudanças nos tempos e temperaturas de indução e no tampão de lise

Novamente foram realizadas várias induções como descrito inicialmente no item 3.14.13 de Material e Métodos, mas em cada uma delas alterou-se a temperatura e o tempo de indução para:

- 37°C, 250rpm, 3hs
- 30°C, 250rpm, 6hs
- 20°C, 250rpm, 14hs
- 30°C, 250rpm, 14hs

A indução foi realizada por um maior número de horas, a uma temperatura

menor (20°C) e em rotação mais baixa na tentativa de favorecer a formação e o enovelamento da proteína.

Para ressuspender e sonicar o *pellet*, como no item 3.15.3 de Material e Métodos, foi utilizado um tampão de lise contendo: uréia [0,5mM], lisozima [0,2mg/mL], NaCl [200mM], Tris [10mM] e NaH₂PO₄ [50mM] (anexo). Foram adicionados 10mL de tampão ao *pellet*, descongelado em gelo, e os tubos foram agitados sob baixa temperatura até a sua dissolução e deixados em repouso, sob as mesmas condições, por 60min, em seguida a amostra foi sonicada por 4min. Uma alíquota de 60µL de cada amostra, de sobrenadante e *pellet*, foram adicionadas de 30µL de tampão de amostra 3x (anexo) e alíquotas dos tempos de indução (T0, T3, T6 e T14) foram centrifugadas à 13.000rpm durante 1min., o sobrenadante foi descartado e ao precipitado bacteriano obtido de cada intervalo foi adicionado de tampão de amostra 3x (anexo) (na proporção de 1 parte de tampão para 2 de precipitado). As amostras foram guardadas em freezer a -20°C até o momento do uso, quando foram então aquecidas a 100°C durante 15min e analisadas por gel SDS-PAGE 12% como descrito no item 3.15.1 de Material e Métodos.

3.17.5. Utilização de um novo tampão de lise

Foram realizada uma indução de 3hs como descrito no item 3.14.13 de Material e Métodos, em um volume de 100mL, mas a temperatura de indução foi alterada para 30°C e manteve-se a agitação em 300rpm. Ao final, as culturas induzidas foram vertidas em um tubo de centrifugação e centrifugadas à 5.000rpm por 10min à 4°C (centrífuga: *Sorvall High Speed Centrifuge – RC 5C PLUS*). Em seguida, os sobrenadantes foram totalmente descartados e adicionou-se, aos *pellets*, 20mL do

tampão de lavagem STE (10mM Tris HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA) (anexo). Os tubos foram centrifugados à 8.890rpm (12.000 *g*), por 2min e à 4°C. Após a centrifugação os sobrenadantes foram descartados e repetiu-se a lavagem com centrifugação por mais uma vez. Ao final da segunda lavagem os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* foram congelados até o dia seguinte.

No dia seguinte, foi adicionado aos *pellets* 10mL de tampão de lise TP (4mg/mL lisozima, 2% Triton X-100, 1,5% N-laurylsarcosine, 5mM DTT) (anexo). Os tubos foram colocados em banho de gelo e incubados sob agitação lenta por 30min. As amostras foram sonicadas por 6min, com intervalos de 30seg e então centrifugadas à 13.000rpm por 10 minutos à 4°C. Uma alíquota de 60µL dos sobrenadantes foi retirada e adicionada de 30µL de tampão de amostra 3x (anexo) e guardadas em freezer a -20°C. O resto do sobrenadante foi filtrado, em filtro MILLEX® HV Durapore® PVDF Membrane 0,45µm, e armazenado em gelo, sendo que uma alíquota de 60µL foi retirada e adicionada de 30µL de tampão de amostra 3x (anexo) e guardada em freezer a -20°C. Em paralelo foi realizada uma indução como descrito anteriormente nos itens 3.1. e 3.2.1., sem utilizar este novo tampão, mas a temperatura de indução foi alterada para 30°C e manteve-se a agitação em 300rpm, para se comparar a eficiência do novo tampão de lise. Esta indução foi realizada como controle da nova indução.

As amostras induzidas à 30°C e processadas com o novo tampão e controle da nova indução (usando tampão de lise sem uréia), foram purificadas pelo método de purificação por coluna de níquel, onde o sobrenadante foi adicionado à coluna com resina e deixado agitando levemente em plataforma, à temperatura ambiente por 15min, decorrido este procedimento deixou-se a resina precipitar naturalmente e então,

deu-se prosseguimento ao processo de purificação como descrito no item 3.16.1 de Material e Métodos. As proteínas provenientes da indução à 30°C com o novo tampão e aquelas provenientes do controle da nova indução, foram purificadas por resina de glutationa com afinidade por GST, conforme descrito no item 3.16.2 de Material e Métodos, e analisadas em gel SDS-PAGE 12% como descrito no item 3.15.1 de Material e Métodos.

3.17.6. Indução da expressão gênica padronizada

Segundo metodologia descrita por Sambrook et al., 2001 e algumas alterações, foi realizada à indução. Primeiramente, as bactérias *E. coli* da linhagem Rosetta foram transformadas e plaqueadas, como descrito no item 3.8 de Material e Métodos. Em seguida, um volume de 10mL de inóculo foi preparado conforme descrito no item 3.14.6 de Material e Métodos, crescido por uma noite em *shaker* (*Excella E24 Incubator Shaker Series - New Brunswick Scientific*) a 250rpm e a 37°C. No dia seguinte, foi realizada uma diluição na proporção de 1:50 deste inóculo em meio LB estéril (200mL de meio LB (*USB*), 200μL de kanamicina (25mg/mL) (*USB*), 40μL de cloranfenicol (25mg/mL) (*USB*) e 4mL de inóculo crescido por uma noite) e colocado em frasco erlemmeyer de 1L (para favorecer a oxigenação da cultura) autoclavado.

O frasco foi colocado no *shaker* à 300rpm e à 37°C, até atingir a densidade óptica (D.O.) de 0,600 a 600nm, aproximadamente após 1h e 30 minutos, então 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 1 minuto à 13.000 rpm (17.900 *g*), o sobrenadante foi descartado por inversão e a boca do tubo foi seca em papel absorvente para eliminar o meio de cultura. Foram adicionados ao tubo 20μL de água Milli-Q autoclavada e este levado ao vórtex (*Agitador de tubos AP56 – Phoenix*) rapidamente, adicionou-se então 10μL de tampão de amostra 3x (625mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 2%, glicerol 87%, azul de bromofenol 0,5% e β-mercaptoetanol 5%) (anexo) e a amostra foi imediatamente guardada em freezer -20°C.

Foi então, adicionado à cultura IPTG (*Invitrogen*) para uma concentração final de 0,4mM, iniciando-se assim a indução. A cultura foi induzida durante 3 horas a 37°C em *shaker* (*Excella E24 Incubator Shaker Series - New Brunswick Scientific*) a 300rpm. Ao final da indução, foi coletada uma alíquota de 1mL da cultura induzida foi processada de acordo com o protocolo de centrifugação descrito acima e foi adicionado 40μL de água Milli-Q autoclavada e 20μL de tampão de amostra 3x.

A cultura induzida foi vertida em um tubo de centrifugação e centrifugada 5.000rpm por 10 minutos à 4°C (centrífuga: *Sorvall High Speed Centrifuge – RC 5C PLUS*). Em seguida, o sobrenadante foi totalmente descartado e o sedimento celular (*pellet*) guardado em freezer a -20°C ou utilizado imediatamente.

O *pellet* foi ressuspendido em 10mL de tampão de lise (100mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 50mM NaH₂PO₄, pH8,0) (anexo) e descongelado sob agitação manual em gelo até a sua total dissolução. As amostras foram então levadas ao sonicador (*Sonic Dismembrator*) em banho de gelo e sonicadas por 4min com intervalos de 30seg e centrifugadas à 13.000rpm por 10min à 4°C. O sobrenadante foi filtrado, em filtro

MILLEX[®] HV Durapore[®] PVDF Membrane 0,45µm, e armazenado em gelo, sendo que uma alíquota de 60µL foi retirada e adicionada de 30µL de tampão de amostra 3x (anexo) e guardada em freezer a -20°C. O *pellet* foi ressuspendido em 10mL de tampão de lise e agitado no vórtex para dissolução, sendo que da mesma forma que com o sobrenadante uma alíquota de 60µL do *pellet* foi retirada, adicionada de 30µL de tampão de amostra 3x e guardada em freezer a -20°C.

3.18. Teste de ligação nas resinas de níquel e glutathiona

Foi adicionado, em tubos separados, 100µL de resina de níquel e de glutathiona. As resinas foram centrifugadas à 13.000rpm por 1min e o sobrenadante foi descartado. À cada uma foi adicionado 200µL de tampão MTPBS (150mM NaCl, 16mM Na₂HPO₄, 4mM NaH₂PO₄) (anexo), para a lavagem da resina, e então centrifugou-se 13.000rpm por 30seg e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se às resinas 150µL de sobrenadante e incubou-se sob temperatura ambiente e agitação suave em plataforma, durante 15min. As resinas foram então lavadas 6x com 200µL de tampão MTPBS gelado, e ao final foram adicionados 50µL de tampão de amostra 3x (anexo). As amostras foram analisadas em gel SDS-PAGE 12% como descrito no item 3.15.1 de Material e Métodos.

3.19. Dosagem de proteínas

As proteínas eluídas foram 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.

3.20. Diálise

O sobrenadante filtrado resultante do processo descrito no item 3.15.3 de Material e Métodos, e de uma indução à 37°C – 300rpm – 3h como descrito no item 3.17.6, foi dialisado segundo metodologia descrita por Sambrook et al., 2001 com algumas modificações. O sobrenadante (10mL), foi vertido dentro de uma membrana para diálise (*SnakeSkin[®] Pleated Dialysis Tubing – 7.000 MWCO – 22mm x 35 feet dry diameter, PIERCE*) presa com prendedores plásticos nas extremidades, formando um saquinho. A membrana com o sobrenadante foi mergulhada em um béquer contendo 2L de PBS pH 8,0, e deixada sob agitação dentro da geladeira (4°C) por 2hs. Decorrido este tempo o tampão foi trocado e o béquer foi mantido nas mesmas condições por 3hs. O tampão foi ainda trocado mais uma vez e aguardou-se 3hs. Ao final das 8hs de diálise, o sobrenadante dialisado foi retirado da membrana e armazenado em tubo tipo Falcon, à temperatura de -20°C. O material dialisado foi analisado por SDS-PAGE 12%.

O sobrenadante foi purificado em coluna de níquel, como descrito no item 3.16.1 de Material e Métodos, para verificar se a diálise melhorava a afinidade da proteína pela resina. Em seguida, as amostras resultantes do processo de purificação foram analisadas em SDS-PAGE 12%, segundo metodologia descrita no item 3.15.1 de Material e Métodos.

Realizou-se uma nova indução à 37°C – 300rpm – 3h e o sobrenadante foi purificado por afinidade com resina de glutathione, como descrito no item 3.16.2. As proteínas eluída 1 (que apresentavam a banda mais forte no gel SDS-PAGE 12%) foram dialisadas nas mesmas condições acima descritas, mas trocando-se o tampão de

hora em hora até atingir 4hs, a amostra foi filtrada em filtro *MILLEX[®] HV Durapore[®] PVDF Membrane 0,45 μ m*, e quantificada usando o kit *Pierce[®] BCA Protein Assay Kit*, conforme instruções do fabricante. As amostras foram analisadas em SDS-PAGE 12%, conforme descrito no item 3.15.1 de Material e Métodos.

3.21. Purificação em coluna de glutatona utilizando bomba peristáltica

Foi realizada uma indução conforme descrito no item 3.17.6 de Material e Métodos. O sobrenadante (9mL) resultante foi purificado em uma coluna contendo 3mL de resina ligante de glutatona com o auxílio de uma bomba peristáltica (*Pharmacia Biotech Pump P-1*) na velocidade de 3mL/min. Após a passagem do sobrenadante, o resultante foi coletado em tubos contidos no coletor (*Pharmacia Biotech – RediFrac*), em seguida foi passado tampão PBS pH 7,3 (anexo) para lavagem, até que o resultante da coluna estivesse transparente. Então, foi passado 10mL de tampão de eluição (anexo) e o produto da passagem foi coletado. Ao final, a coluna foi lavada com PBS pH 7,3 e as primeiras lavagens foram guardadas para análise da presença de proteínas. As amostras foram adicionadas de tampão de amostra 3x e analisadas em SDS-PAGE 12% (anexo).

3.22. Seqüenciamento do vetor pET-42a com o inserto do core

O vetor pET-42a foi seqüenciado para confirmação da seqüência e orientação correta dos fragmentos inseridos, através do método de terminação da cadeia (SANGER et al., 1977). Para isto foi utilizado o kit “DYEnamic[™] ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit” (MegaBACE[™])” (*GE Healthcare*) conforme

orientação do fabricante. As condições de amplificação foram: 1 ciclo inicial de 96°C durante 2 minutos seguidos por 30 ciclos de 95°C durante 20 segundos, 50°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 minuto e 15 segundos. 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*).

3.23. Indução da expressão das proteínas *core* e E2 recombinantes em larga escala

Foi realizada a indução da expressão das proteínas do VHC (*core* e E2) fusionadas a GST em larga escala e repetidas vezes. Essas induções ocorreram seguindo a metodologia padronizada descrita no item 3.17.6 de Material e Métodos.

3.24. Purificação das proteínas expressas em larga escala, *core* e E2 fusionadas a GST, por cromatografia de afinidade em resina de glutathione

As proteínas foram purificadas por afinidade com resina de glutathione, como descrito no item 3.16.2 de Material e Métodos.

3.25. Ensaio biológico com as proteínas *core* e E2 recombinantes produzidas em bactérias (*E. coli* linhagem Rosetta)

3.25.1. Imunorreatividade das proteínas *core* e E2 recombinantes com *pool* de soros humanos positivos para VHC

Para o teste de reatividade das proteínas *core* e E2 recombinantes com um *pool* de soros humanos positivos para VHC, foi realizado um ensaio de *Western Blot*.

Inicialmente, para preparar a membrana que iria ser transferida com as proteínas *core* e E2, foram aplicados em vários poços do gel de poliacrilamida 12%, 15µL de “proteína eluída 1” na concentração de 1182µg/mL obtida através do processo de purificação por coluna de glutationa como descrito no item 3.16.2 de Material e Métodos. As proteínas foram transferidas para a membrana pelo método de *western blot*, item 3.15.2 de Material e Métodos, sendo que após o bloqueio de 18 horas com solução de bloqueio (anexo) contendo TBS (Tris 0,05M, NaCl 0,15M, pH 8,0) (anexo) e 5% de leite desnatado, em geladeira à 4°C, a membrana foi seca entre folhas de papel filtro e colocada em estufa à 37°C para secar durante 40min. A membrana de nitrocelulose, contendo as proteínas recombinantes transferidas, foi cuidadosamente cortada em tiras que foram identificadas e guardadas em tubo do tipo Falcon seco (em estufa) e vedado com *parafilm* (para evitar umidade), à temperatura de 4°C até o momento do uso.

As tiras foram 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 adicionado 2mL de solução de bloqueio, preparada segundo instruções do kit, um

pool de soros humanos positivos para VHC diluído 1:20. À uma das tiras foi adicionado um *pool* de soros humanos negativos para VHC e outras doenças infecciosas testadas (submetidos à rotina sorológica para Chagas, Sífilis, Hepatites B e C, HIV-1/2 e HTLV (Vírus Linfotrópico de Células T Humana)), na diluição 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 durante 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 biotinilada) diluído 1:1000 no tampão de bloqueio, que ficou incubando durante 1h sob temperatura ambiente e sob suave agitação em plataforma. As tiras foram então lavadas 3 vezes como já descrito acima e então incubadas com 2mL de conjugado 2, durante 1h sob agitação lenta em plataforma à temperatura ambiente. As tiras foram lavadas 3 vezes, e reveladas com 2mL de solução reveladora. Após o aparecimento das bandas as tiras foram lavadas 1 vez com solução de lavagem e então secas em papel filtro e fotografadas.

3.25.2. Slot Blot

Realizado como requisito na padronização do teste imunocromatográfico e confirmatório da reatividade das proteínas *core* fusionada a GST, E2 fusionada a GST e GST em diferentes concentrações, realizamos dois ensaios de *Slot Blot*. O primeiro utilizando *core*-GST e GST e o segundo utilizando *core*-GST e E2-GST. Todos os procedimentos utilizados para obtenção das proteínas de fusão *core*-GST e E2-GST, foram aplicados para produção da proteína GST, que foi utilizada como um controle.

Primeiramente, a membrana de nitrocelulose Nytran (SCHLEICHER & SCHUELL) foi cortada em um tamanho apropriado e equilibrada em tampão TBS (Tris

0,05 M, NaCl 0,15 M; pH 8,0) (anexo) por 30 minutos. A seguir, a membrana foi aplicada em um sistema *Hybri Slot™ Manifold* (Gibco BRL – Life Technologies). Em seguida, foi aplicado 100µL por cavidade das proteínas purificadas e diluídas em série em tampão PBS (NaCl 140mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ 10M, KH₂PO₄; pH 7,3) (anexo) partindo de uma concentração inicial de 100µg/mL. Estas proteínas foram transferidas para a membrana com o auxílio de uma bomba a vácuo acoplada ao sistema. Após a transferência, a membrana foi lavada com TBS/Tween-20 (Tris 0,05M, NaCl 0,15M; pH 8,0, 0,05% Tween 20) (anexo) e bloqueada com esta mesma solução contendo 5% de leite em pó desnatado (anexo) por 1 hora em temperatura ambiente e sob agitação. Em seguida a membrana foi lavada por 5 vezes durante 5 minutos cada com TBS/Tween-20 e incubada com diluição 1:200 do *pool* de soro positivo para VHC em solução de bloqueio. Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, sob agitação a membrana foi lavada com TBS/Tween-20 por 5 vezes durante 5 minutos cada, e então incubada com o anticorpo anti-IgG humano conjugado com peroxidase (Sigma), diluído 1:10000 em solução de bloqueio, durante 1 hora à temperatura ambiente e, posteriormente lavada com TBS/Tween-20 por 5 vezes durante 5 minutos cada. A revelação da reação foi obtida pela adição dos substratos da enzima: diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio (5mg de diaminobenzidina e 150µL de peróxido de hidrogênio 30% em 30mL de PBS pH 7,3).

3.26. Cromatografia de afinidade em coluna de glutathiona

Foi utilizada a coluna GSTrap FF (GE Healthcare®) que contém o ligante glutathiona acoplado a agarose 4%. As colunas podem ser operadas com uma seringa, bomba peristáltica ou em sistema de cromatografia líquida como o ÄKTA.

Foi realizada uma indução conforme descrito no item 3.17.6 de Material e Métodos. O sobrenadante resultante foi filtrado e aplicado na coluna GStap FF previamente equilibrada com 5 volumes de tampão PBS (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄ pH7,3) (anexo). Depois de passar o extrato protéico, a coluna foi lavada com 5 volumes de PBS. Aplicou-se então um gradiente contínuo do tampão de eluição (50mM Tris-HCl, 10mM Glutathione Reduzida, pH8,0) (anexo). Este procedimento foi realizado manualmente utilizando seringa e aplicando um fluxo constante de 3mL por minuto, e as frações das proteínas eluídas foram analisadas em SDS-PAGE 12%.

3.27 Análise da Imunorreatividade das proteínas *core*-GST e E2-GST após purificação por coluna GStap FF

3.27.1. Western Blot

Foram aplicados em vários poços do gel de poliacrilamida 12%, 15µL de proteína recombinante E2 “P.E.1” purificada por afinidade em resina de glutathione e 15µL da proteína recombinante *core* “P.E.3” obtida através do processo de purificação por coluna GStap FF (GE Healthcare) como descrito no item 3.26 de Material e Métodos. As proteínas foram transferidas para a membrana pelo método de *western blot*. O bloqueio dos sítios livres na membrana foi realizado com solução de 5% de leite em pó desnatado em TBS/Tween 20 (anexo) por 18 horas a 4°C. Em seguida a membrana foi lavada com TBS/Tween-20 e adicionado *pool* de soro positivo para o VHC diluído 1:400 em solução de bloqueio. À uma das tiras foi adicionado um *pool* de soros humanos negativos para VHC e outras doenças infecciosas testadas (submetidos

à rotina sorológica para Chagas, Sífilis, Hepatites B e C, HIV-1/2 e HTLV (Vírus Linfotrópico de Células T Humana)), diluídos 1:400 na solução de bloqueio. Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, a membrana foi lavada com TBS/Tween-20 por 5 vezes durante 5 minutos cada, e então incubada com o anticorpo anti-IgG humana conjugado com peroxidase, diluído 1:10000 em solução de bloqueio, durante 1 hora à temperatura ambiente e, posteriormente lavada com TBS/Tween 20 por 5 vezes durante 10 minutos cada. A revelação da reação foi obtida pela adição dos substratos da enzima: diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio (6mg de diaminobenzidina e 10µL de peróxido de hidrogênio 30% em 10mL de Tris-HCl 0,05 M; pH 8,0) (anexo). Após o aparecimento das bandas as tiras foram lavadas 1 vez e então secas em papel filtro e fotografadas.

3.27.2. Slot Blot

Com a finalidade de obter a menor concentração de reatividade das proteínas *core*-GST e E2-GST em diferentes concentrações e avaliar se após purificação da proteína *core* recombinante em coluna de glutathione GSTrap FF (GE Healthcare®) houve melhora na imunorreação, realizamos novamente a técnica de *Slot Blot* com algumas modificações da técnica descrita no item 3.25.2 de Material e Métodos. A membrana de nitrocelulose Nytran (SCHLEICHER & SCHUELL®) foi cortada em um tamanho apropriado e equilibrada em tampão TBS pH 8,0) (anexo) por 30 minutos. A seguir, a membrana foi aplicada em um sistema *Hybri Slot*TM *Manifold* (Gibco BRL – Life Technologies) e diferentes concentrações das proteínas recombinantes *core* e E2 purificadas por coluna GSTrap FF e por resina de afinidade a glutathione,

respectivamente e diluídas em série em tampão de bloqueio (TBS/Tween-20 e 5% de leite em pó desnatado (anexo), partindo de 50µg/mL, foram aplicadas num volume de 100µL por cavidade, sendo então transferidas para a membrana de nitrocelulose com o auxílio de uma bomba de vácuo acoplada ao sistema. A aplicação do vácuo sob a membrana aumenta a adsorção das proteínas na membrana. Após a adsorção, a membrana foi lavada com TBS/Tween-20 e bloqueada com esta mesma solução contendo 5% de leite em pó desnatado por 18 horas a 4°C e sob agitação suave. Em seguida a membrana foi lavada por 5 vezes durante 5 minutos cada com TBS/Tween-20 e incubada com diluição 1:400 do *pool* de soro positivo para VHC em solução de bloqueio. Após 1 hora e 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, sob agitação suave, a membrana foi lavada com TBS/Tween-20 por 5 vezes durante 5 minutos cada, e incubada com o anticorpo anti-IgG humano conjugado com peroxidase (Sigma®), diluído 1:5000 em solução de bloqueio, durante 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente e sob agitação suave, posteriormente a membrana foi lavada com TBS/Tween-20 por 5 vezes durante 5 minutos cada. A revelação da reação foi obtida pela adição dos substratos da enzima: diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio (5mg de diaminobenzidina e 150µL de peróxido de hidrogênio 30% em 30mL de PBS pH 7,3) durante 15 minutos em temperatura ambiente e sob agitação constante. Em seguida, a membrana foi lavada por 3 vezes com água destilada e seca entre papel de filtro.

3.28. Ensaio Imunoenzimático – ELISA

A reatividade das proteínas recombinantes *core*-GST e E2-GST com anticorpos presentes no *pool* de soro controle positivos para o VHC foi verificada em microplacas de poliestireno através do teste imunoenzimático (ELISA) pelo método

direto e indireto. Foi utilizado $n=3$ *pool* de soros, sendo cada *pool* formado por 3 soros provenientes do controle interno.

Este método foi utilizado para adequar as melhores concentrações das proteínas recombinantes e dos anticorpos e para o aprimoramento do método ELISA direto e indireto, desenvolvido pelo Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, com sensibilidade igual a 100% e especificidade de 87,5% (Dissertação de Mestrado: KENFE, 2008).

3.28.1. ELISA de Captura-Sanduiche (Adsorção em microplaca do anticorpo policlonal anti-*core*-GST)

Primeiramente realizou-se uma diluição 1:40 do anticorpo anti-*core*-GST policlonal (produzido em camundongo em outros trabalhos realizados anteriormente em nosso laboratório) em tampão carbonato/bicarbonato 1M pH 9,6 (anexo) e 100µl dessa diluição foram aplicados em *wells* da microplaca de poliestireno e incubados por 18 horas a 4°C. Após esse período, realizou-se o processo de lavagem manual, com PBS / Tween 20 0,05% (anexo) por 3 vezes e em seguida, adicionou-se 100µl da solução de bloqueio contendo (solução tampão PBS pH 7,3 / Tween 20 0,05% / 5% leite em pó desnatado) (anexo) por 2 horas em temperatura ambiente. Em sequência, foram aplicados 100µl da proteína *core*-GST diluída em série partindo de 50µg/mL em solução de bloqueio e incubados por 1 hora a 37°C. Novamente se repetiu a lavagem e 100µl do *pool* de soro controle positivo para o VHC diluído 1:40 em solução de bloqueio foi aplicado e incubado durante 1 hora a 37°C. Em seguida, realizou-se a lavagem e 100µl do conjugado anti-IgG humano marcado com peroxidase (Sigma®) diluído 1:10000 em tampão de bloqueio foi adicionado e incubado durante 1 hora a 37°C. Após a

incubação, foi repetido o procedimento de lavagem e aplicado 100µl de solução substrato peróxido de uréia e tetrametilbenzidina e incubado por 20 minutos, protegido da luminosidade. Em seguida, 100µl de ácido sulfúrico 1 molL⁻¹ foram adicionados para interromper a reação e a leitura foi realizada em espectrofotômetro com absorbância de 450nm (Multiskan Ascent – Labsystems - THERMOLABSYSTEMS).

3.28.2. ELISA de Captura-Sanduiche (Adsorção em microplaca do anticorpo monoclonal anti-GST)

A microplaca de poliestireno foi sensibilizada por 18 horas a 4°C com 100µl do anticorpo monoclonal anti-GST (PHARMACIA BIOTECH®) diluídos 1:5000 em tampão carbonato/bicarbonato 1M pH 9,6. Após este período, foi realizada a lavagem manual com PBS-Tween 20 por 3 vezes e então 100µl da solução de bloqueio (PBS pH 7,5 / Tween 20 0,05% / 5% de leite em pó desnatado) foram aplicados e incubados por 2 horas em temperatura ambiente. As proteínas recombinantes *core*-GST e E2-GST foram utilizadas partindo de uma concentração inicial de 50µg/mL e diluídas em série em solução de bloqueio e incubadas por 1 hora a 37°C. Posteriormente, 100µl da diluição 1:40 do *pool* de soro controle positivo para VHC foram adicionados e incubados durante 1 hora a 37°C. Decorrido esse tempo, 100µl do conjugado anti-IgG humano marcado com peroxidase (Sigma®) diluído 1:10000 foram aplicados e incubados por 1 hora a 37°C. Em seguida, a solução substrato peróxido de uréia e tetrametilbenzidina 1:1 foi aplicada e após 20 minutos em temperatura ambiente e na ausência de luz, adicionou-se 100µl de ácido sulfúrico 1 molL⁻¹ para interromper a reação. A leitura

espectrofotométrica foi realizada em absorvância de 450nm. Entre cada etapa, a microplaca foi lavada manualmente por 3 vezes, com PBS pH 7,3 / Tween 20 0,05%.

Outro ensaio foi realizado, utilizando o anticorpo monoclonal anti-GST diluído 1:10000 em tampão carbonato/bicarbonato 1M pH 9,6 e as proteínas recombinantes *core* e E2 nas concentrações de 20µg/mL, 12µg/mL, 5µg/mL e 1µg/mL. Também foi utilizado nestes ensaios *pool* de soros controles positivos para o VHC, ASO (anti estreptolisina O), Chagas, Sífilis, Hepatite B e auto anticorpos contra antígenos intracelulares (FAN), diluídos 1:200 em solução de bloqueio e as lavagens foram realizadas em lavadora de microplaca (Lavadora Multiwash II Tricontinent).

O mesmo ensaio foi repetido utilizando o anticorpo monoclonal anti-GST diluído 1:10000 em tampão carbonato/bicarbonato 1M pH 9,6 e as proteínas *core* e E2 recombinantes juntas, ou seja, nas concentrações de 5µg/mL da proteína *core*-GST e 5µg/mL da proteína E2-GST. Estas foram misturadas, homogeneizadas e aplicadas juntas em cada *well* da microplaca. O ensaio prosseguiu como descrito acima.

Novamente esta mesma metodologia foi realizada, utilizando a mistura das proteínas recombinantes nas concentrações de 1µg/mL cada e com uma diluição do *pool* de soros controles de 1:400 em tampão de bloqueio, afim de eliminar uma reatividade inespecífica.

3.28.3. ELISA Indireto (Adsorção em microplaca das proteínas recombinantes *core* e E2 fusionadas a GST)

Foram aplicados na microplaca de poliestireno 100µl das proteínas *core*-GST e E2-GST nas concentrações de 20µg/mL, 12µg/mL, 5µg/mL e 1µg/mL e então incubados por 18 horas a 4°C. Após esse período, foi realizado a lavagem automática,

em lavadora de microplaca, com PBS pH 7,3 / Tween 20 0,05% e aplicado 100µl da solução de bloqueio (solução tampão PBS pH 7,3 / 5% leite em pó desnatado) e incubados durante 2 horas em temperatura ambiente. Decorrido esse período, o processo de lavagem foi repetido por 3 vezes. Foram adicionados 100µl do *pool* de soro humano não reagente e *pool* de soro humano positivo para VHC, *pool* de soro positivo para hepatite B, ASO, FAN, Chagas e Sífilis diluídos 1:200 em tampão de bloqueio e incubados por 1 hora a 37°C. Outro procedimento de lavagem e em seguida, foram aplicados 100µl de conjugado anti-IgG humano marcado com peroxidase (Sigma®) diluídos 1:10.000 em tampão de bloqueio e incubados por 1 hora a 37°C. Novamente foi realizada a lavagem e aplicado 100µl de solução substrato peróxido de uréia e tetrametilbenzidina 1:1 e incubados por 20 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Para interromper a reação, 100µl de ácido sulfúrico 1 molL⁻¹ foram aplicados e a leitura espectrofotométrica foi realizada em absorbância de 450nm.

3.28.4. ELISA Indireto (Adsorção em microplaca das proteínas recombinantes *core* e E2 fusionadas a GST juntas)

Foram adsorvidos à microplaca de poliestireno por 18 horas a 4°C, 100µl da mistura das proteínas *core*-GST e E2-GST nas concentrações de 2µg/mL de cada proteína recombinante. Estas foram diluídas em tampão carbonato/bicarbonato 1M pH 9,6. Após este período, 100µl de bloqueio (PBS pH 7,3 / leite em pó desnatado 5%) foram adicionados e incubados por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, 100µl do *pool* de soro humano controle negativo e positivo para VHC e *pool* de soro controle positivo para hepatite B, ASO, FAN, Chagas e Sífilis diluídos 1:200 em tampão

de bloqueio contendo PBS pH 7,3 / Tween 20 0,05% / leite em pó desnatado 5% foram adicionados e incubados por 1 hora a 37°C. O conjugado anti-IgG humano marcado com peroxidase (Sigma®) diluído 1:10.000 em tampão de bloqueio foi adicionado e incubado por 1 hora a 37°C. Decorrido este tempo, 100µl da solução substrato peróxido de uréia e tetrametilbenzidina na proporção 1:1 foram aplicados e após 20 minutos adicionou-se 100µl de ácido sulfúrico 1 mol L⁻¹ para que a reação fosse interrompida. A leitura espectrofotométrica foi realizada em comprimento de onda de 450nm.

Entre cada etapa descrita, realizou-se o procedimento de lavagem automática, com PBS pH 7,5 / Tween 20 0,05%, (Lavadora Multiwash II Tricontinent).

O mesmo ensaio foi repetido utilizando uma diluição 1:400 do *pool* de soros e as proteínas recombinantes nas concentrações de 1µg/mL cada, com a finalidade de eliminar uma reatividade cruzada.

3.29. Teste Imunocromatográfico

Os anticorpos policlonais utilizados para o teste imunocromatográfico devem apresentar alta especificidade e sensibilidade para o antígeno, estar na forma purificada e ser dialisado no tampão fosfato (Na₂HPO₄ 10mM pH 7,5), segundo Mikawa (Tese de Doutorado, 2006).

3.29.1. Teste Imunocromatográfico para detecção de antígenos VHC

Este ensaio visa à detecção de partículas virais do VHC pela captura de antígenos presentes na amostra sorológica em um anticorpo fixado na membrana, formando uma ponte com um segundo anticorpo ligado a partícula colorida (ouro

coloidal), ou seja, a detecção tem como alvo antígenos do VHC, que somente ocorre na fase aguda da infecção ou em imunossuprimidos. Para a reação são necessários dois anticorpos para promover a captura da partícula, onde um dos anticorpos está fixado à membrana e o outro está conjugado à partícula de ouro. Há necessidade do antígeno VHC (*core*-GST e E2-GST) para constituir a faixa controle do teste.

3.29.2. Teste Imunocromatográfico para detecção de anticorpos anti-VHC

Há dois métodos de detecção de anticorpos, sendo que as duas opções são baseadas no tipo de ligante fixado na partícula de ouro coloidal.

Na primeira opção, as partículas de ouro são recobertas com um ligante específico para a porção Fc dos anticorpos, ou seja, a proteína A. Para que a reação se efetive, a membrana deve ter seqüencialmente fixado em sua estrutura antígenos do VHC (*core*-GST e E2-GST) num segmento e logo a seguir a IgG humana como controle de migração da reação. As proteínas recombinantes (*core* e E2) do VHC são impregnadas na região teste da membrana de nitrocelulose e a IgG humana impregnada na região controle. O complexo proteína A-ouro coloidal impregnado na área do conjugado desloca-se por cromatografia ao longo da membrana para as regiões teste e controle.

Na segunda opção, as proteínas recombinantes (*core* e E2) são conjugadas com as partículas de ouro coloidal e se ligam a anticorpos específicos presentes na amostra sorológica e migram na membrana, para se encontrar com ligantes de IgG, como a proteína A, em concentração suficiente para se ligar a toda a IgG da amostra. Na tira imunocromatográfica, é fixada uma quantidade de proteína A capaz de capturar os anticorpos presentes na amostra sorológica. Para o controle, anticorpos anti-VHC

(anti-core e anti-E2) são impregnados na região controle. As proteínas recombinantes (core e E2) conjugadas com ouro coloidal, ligam-se ao anticorpo específico presente na amostra sorológica. O complexo antígeno-ouro coloidal impregnado na área do conjugado desloca-se por cromatografia ao longo da membrana para as regiões teste e controle da reação no início do teste quando o *pool* de soros foi aplicado, ocorrendo a reação antígeno-anticorpo.

3.29.3. Interpretação dos resultados no teste Imunocromatográfico

A reação positiva ocorre quando duas linhas são visíveis, sendo uma linha na região controle (C) e uma linha na região teste (T). A intensidade de cor da linha teste (T) poderá variar de acordo com a concentração de antígeno ou anticorpo que está se procurando na amostra sorológica. Porém, qualquer intensidade de cor na linha teste (T) indica resultado positivo.

A reação negativa se dá quando somente uma linha é visível na região (C), não sendo observada linha na região teste.

Reação inválida é quando a linha controle (C) não é evidenciada, portanto deve-se repetir o ensaio.

A Figura 4 demonstra a interpretação dos resultados, podendo ele ser positivo, negativo ou inválido.

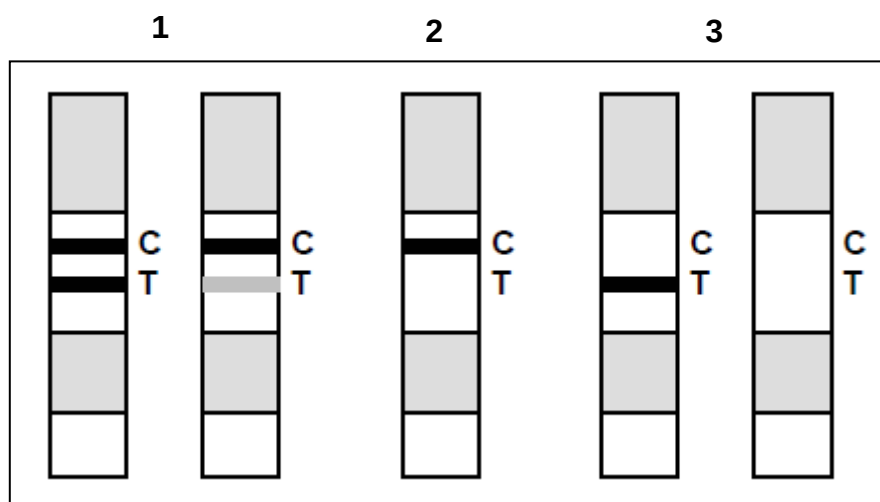


Figura 4: Representação esquemática dos possíveis resultados do Teste Imunocromatográfico. 1: Resultado Positivo. 2: Resultado Negativo. 3: Resultado Inválido. Figura extraída de Whatman®.

Na Figura 5, podemos entender como é montado o teste imunocromatográfico.

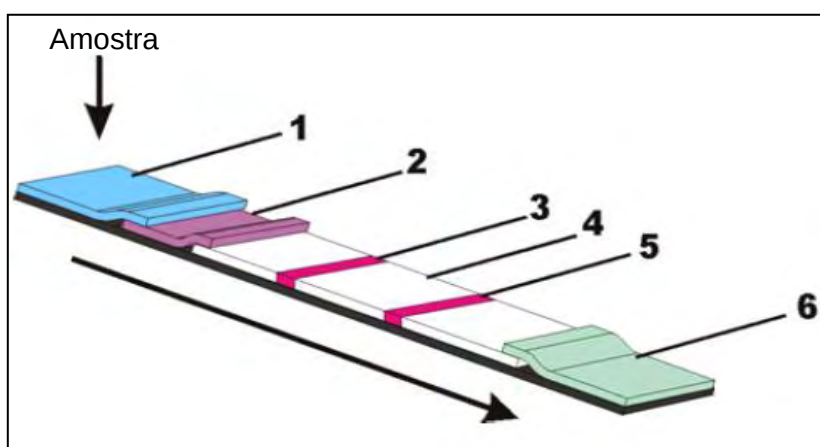


Figura 5: Representação esquemática da montagem típica de um ensaio imunocromatográfico de fluxo lateral. 1: local para aplicação da amostra. 2: área do conjugado (membrana de fibra de vidro). 3: linha teste. 4: membrana de nitrocelulose. 5: linha controle. 6: membrana absorvente. Figura extraída de Whatman®.

3.30. Desenvolvimento do método Imunocromatográfico

3.30.1. Conjugação da solução coloidal de ouro com anticorpo policlonal anti-core VHC produzidos em camundongos e em coelhos

A conjugação com partículas de ouro coloidal (20nm colloidal gold - Sigma®) ocorre por adsorção física e sob condições ótimas de pH e concentração ideal dos anticorpos.

Seguindo o protocolo estabelecido por Mikawa (Tese de Doutorado, 2006), a concentração ideal do anticorpo policlonal anti-core-GST produzido em camundongo é de 150µg/mL e do anticorpo policlonal anti-core-GST produzido em coelho é de 300µg/mL.

O pH 7,0 foi determinado como ótimo para a conjugação com as partículas de ouro coloidal.

A partir destas condições padronizadas, realizamos a metodologia. Em tubos do tipo Eppendorf, adicionou-se 200µL da solução coloidal de ouro e o pH foi ajustado para 7,0 pela adição de Na₂CO₃ 0,1M (anexo) e em seguida, aplicou-se em cada Eppendorf 20µL do anticorpo policlonal anti-core-GST de camundongo e coelho, nas concentrações de 150µg/mL e 300µg/mL, respectivamente e incubou-se em temperatura ambiente por 1 hora. Decorrido este período, foi adicionado 25µL de solução Tris-HCl 0,1M pH 7,6 contendo 10% de BSA (anexo) para o bloqueio das superfícies residuais das partículas de ouro coloidal e incubado por 30 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, estes tubos contendo o conjugado (ouro-anticorpo), foram centrifugados em 10000g a 4°C durante 30 minutos e em seguida, o sobrenadante foi descartado e acrescentado 1000µL de tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,6 contendo 0,5% de caseína (anexo) para a lavagem e retirada dos anticorpos não

ligados. Novamente foram centrifugados em 10000g a 4°C por 30 minutos. Após remover o sobrenadante, o volume final foi ajustado para 15µL com Tris-HCl 0,1M pH 7,6 contendo 0,5% de caseína e o conjugado preparado foi armazenado a 4°C até o momento do uso.

Paralelo a este ensaio, foi realizado em microplaca o monitoramento da variação de coloração da solução em duas absorbâncias 540nm e 620nm. Em microplaca foi adicionado 20µL dos anticorpos policlonais anti-core-GST produzidos em camundongos e em coelhos e 100µL do ouro coloidal pH 7,0. Esta mistura foi deixada reagir por 15 minutos e em seguida, foi adicionado 15µL de solução salina 10% e nova incubação de 15 minutos. Decorrido este período, foi realizada a leitura em leitora de microplaca (Multiskan Ascent – Labsystems - THERMOLABSYSTEMS).

3.30.2. Conjugação da solução coloidal de ouro com proteína A extracelular e com Anti-IgG humana

A proteína A extracelular recombinante (Sigma®) foi dissolvida conforme orientação do fabricante e distribuída em alíquotas.

Sob condições ótimas de pH e concentração, foram realizados os procedimentos para a formação do conjugado proteína A-ouro coloidal e Anti-IgG humana-ouro coloidal.

Em tubos do tipo Eppendorf, foi adicionado 200µL da solução coloidal de ouro e o pH foi ajustado para 7,0 pela adição de Na₂CO₃ 0,1M e em seguida, foi aplicado 20µL da proteína A na concentração de 10µg e 20µL do anticorpo anti-IgG humana na concentração de 250µg/mL, permanecendo por 1 hora em temperatura ambiente. A seguir, foi adicionado 25µL da solução Tris-HCl 0,1M pH 7,6 contendo 10% de BSA

para o bloqueio das superfícies residuais das partículas de ouro coloidal e incubado por 30 minutos em temperatura ambiente. Após este período, o tubo foi centrifugado a 10000g por 30 minutos a 4°C em ultracentrifuga refrigerada. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e aplicado 1000µL do tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,6 contendo 0,5% de caseína para a lavagem e novamente foi centrifugado a 10000g por 30 minutos a 4°C. Em seguida, o *pellet* foi ressuspensão em 15µL de tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,6 contendo 0,5% de caseína e armazenado a 4°C até o momento do uso.

Paralelo a este ensaio, foi realizado em microplaca o monitoramento da variação de coloração da solução em duas absorbâncias 540nm e 620nm. Em microplaca foi adicionado 20µL da proteína A extracelular e 100µL do ouro coloidal pH 7,0, assim como para a anti-IgG humana. Esta mistura foi deixada reagir por 15 minutos e em seguida, foi adicionado 15µL de solução salina 10% e nova incubação de 15 minutos. Decorrido este período, foi realizada a leitura em leitora de microplaca (Multiskan Ascent – Labsystems - THERMOLABSYSTEMS).

3.30.3. Conjugação da solução coloidal de ouro com as proteínas recombinantes do VHC (*core* e E2)

As proteínas recombinantes *core* e E2, foram conjugadas por adsorção física às partículas de ouro coloidal de 20nm.

A conjugação ocorreu em tubos de microcentrífuga, onde foram adicionados 200µL da solução de ouro coloidal 20nm e o pH ajustado para 7,0 com a adição de Na₂CO₃ 0,1M, e em seguida, adicionou-se 20µL da proteína *core*-GST e em outro tubo 20µL da proteína E2-GST, nas concentrações de 100µg/mL e deixados em temperatura ambiente 1 hora. A seguir, foi adicionado em cada tubo 25µL da solução Tris-HCl 0,1M

pH 7,6 contendo 10% de BSA para a ligação em eventuais sítios livres do ouro coloidal e nova incubação a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, o conjugado obtido foi centrifugado a 10000g por 30 minutos a 4°C e após este período foi descartado os sobrenadantes e adicionado 1000µL de tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,6 contendo 0,5% de caseína para a lavagem e novamente centrifugado em microcentrífuga refrigerada a 4°C por 30 minutos a 10000g. Finalmente, os sobrenadantes foram descartados e o volume final foi ajustado para 15µL com tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,6 contendo 0,5% de caseína. Os produtos foram armazenados a 4°C até o momento do uso.

Paralelo a este ensaio, foi realizado em microplaca o monitoramento da variação de coloração da solução em duas absorbâncias 540nm e 620nm. Em microplaca foi adicionado 20µL de cada proteína recombinante (*core* e E2) e 100µL do ouro coloidal pH 7,0. Esta mistura foi deixada reagir por 15 minutos e em seguida, foi adicionado 15µL de solução salina 10% e nova incubação de 15 minutos. Decorrido este período, foi realizada a leitura em leitora de microplaca (Multiskan Ascent – Labsystems - THERMOLABSYSTEMS).

3.30.4. Avaliação da reação da proteína A com o conjugado *core*-GST-Ouro coloidal de 20nm

Para a padronização da reação teste que será utilizada no ensaio imunocromatográfico, foi realizado o *imunoblot*, utilizando os reagentes fixados em membranas de nitrocelulose. A membrana foi equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,4 por 30 minutos. Em seguida, foi aplicado em duplicata 1,5µL da proteína A nas concentrações de 10 e 5 µg/µL, permanecendo durante 15 minutos. A seguir, foi

realizada a lavagem por 3 vezes de 5 minutos com Tris-HCl pH 7,4 e Tween 20 0,05% e o bloqueio da membrana com Tris-HCl 0,1M, Tween 20 0,05% e BSA 2% por 2 horas com agitação constante e nova lavagem com Tris-HCL pH 7,4 e Tween 20 0,05%. Em seguida, foi aplicado *pool* de soro positivo e negativo para VHC diluído 1:100 em solução de bloqueio por 1 hora em temperatura ambiente com agitação constante e suave. Decorrido este período, a membrana foi novamente lavada e incubada por 2 horas com o conjugado *core*-GST-Ouro coloidal. Em seguida, a membrana foi lavada com água destilada e seca entre papel de filtro.

3.30.5. Avaliação da reação do anticorpo anti-*core*-GST policlonal com o conjugado *core*-GST-Ouro coloidal de 20nm

Para a padronização da reação teste que será utilizada no ensaio imunocromatográfico, foi realizado o *imunoblot*, utilizando os reagentes fixados em membranas de nitrocelulose. A membrana foi ativada com tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,4 por 30 minutos. Em seguida, foi aplicado 1,5µL do anticorpo anti-*core*-GST policlonal nas concentrações pré padronizadas em trabalhos anteriores em nosso laboratório de 2,5 e 1,0mg/mL, ficando em contato com a membrana por 15 minutos. Após este período, foi realizada a lavagem com Tris-HCl pH 7,4 e Tween 20 0,05% e a seguir a membrana foi bloqueada com Tris-HCl pH 7,4, Tween 20 0,05% e BSA 2% por 2 horas com agitação constante. Em seguida, foram feitas 3 lavagens e a membrana foi reagida com o conjugado *core*-GST-Ouro coloidal e incubada por 2 horas. Em seguida, a membrana foi lavada com água destilada e seca entre papel de filtro.

3.30.6. Montagem do dispositivo imunocromatográfico

Após padronizadas as concentrações e realizada as conjugações com ouro coloidal (20nm colloidal gold - Sigma®) foi montado o teste imunocromatográfico linear, utilizando a membrana de nitrocelulose HF120 (Millipore®) que constitui a tira reagente propriamente dita, a membrana de fibra de vidro que constitui a área do conjugado e a membrana de celulose que compõe a área de amostragem e absorvente, sendo estas duas últimas membranas gentilmente fornecidas pela Millipore®. A membrana de nitrocelulose HF 120 é denominada de alto fluxo, cuja velocidade do fluxo é de 120 segundos a cada 4 centímetros, ou seja, 30 segundos por centímetro.

3.30.7. Corte das tiras imunocromatográficas (membranas de nitrocelulose, fibra de vidro e absorvente)

As tiras originais de nitrocelulose de 30 centímetros da Millipore® foram cortadas em tirinhas de 5 mm com o auxílio de um estilete e armazenadas em temperatura ambiente até o momento do uso. A membrana de celulose foi laminada em áreas de 5 mm X 15 mm. A membrana de fibra de vidro que compõe a área do conjugado, foi cortada no tamanho de 5 mm X 3 mm, sendo (Altura X Comprimento).

3.30.8. Preparo da área de amostragem

A área de amostragem onde é aplicada a amostra do *pool* de soro foi previamente tratada com Tween 20 0,005% a fim de diminuir as reações inespecíficas. As tiras já cortadas foram colocadas nesta solução por 15 minutos e a seguir, foram secas em temperatura ambiente por 18 horas.

3.30.9. Preparo e ativação da membrana de nitrocelulose

Antes dos cortes, a membrana de nitrocelulose foi ativada com solução Tris-HCl 0,1M pH 7,6 com glicerol 0,4% por 15 minutos com agitação constante, afim de otimizar a absorção no momento da aplicação dos reagentes. Após este período, as membranas foram lavadas com Na_2HPO_4 0,01M pH 7,5 e então colocadas na estufa a 37°C por 18 horas para total secagem.

3.30.10. Imobilização dos reagentes nas áreas teste e controle

As membranas de nitrocelulose foram adsorvidas com dois reagentes: para a área teste foi utilizada a mistura das proteínas core-GST e E2-GST, nas concentrações de 2,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 1,7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, respectivamente e para a área controle foi utilizada a proteína A extracelular recombinante (Sigma®) na concentração de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Os reagentes foram aplicados a 20 mm (proteína A) e a 30 mm (mistura das proteínas recombinantes) da extremidade inferior da fita imunocromatográfica, respectivamente. Assim, nas membranas previamente tratadas, foram adsorvidos 1,5 μL dos reagentes preparados na hora da aplicação contendo 5% de etanol para facilitar a aplicação e obter uma absorção homogênea e delimitada. As membranas foram secas em estufa a 37°C por 2 horas. Decorrido este período, foram bloqueadas pela imersão das tiras em solução Tris-HCl 0,1M pH 7,6 contendo 2% de BSA por 15 minutos com agitação constante e em temperatura ambiente. Após este período as tiras foram lavadas por 3 vezes com tampão Na_2HPO_4 0,01M pH 7,5 e 1 vez com Tris-HCL com 0,4% de glicerol. As tiras de nitrocelulose foram secas em estufa a 37°C por 2 horas e após este período armazenadas em frascos fechados na geladeira até o momento do uso.

3.30.11. Aplicação do conjugado na membrana de fibra de vidro

O conjugado anti-IgG humana com ouro coloidal 20nm, descrito no item 3.30.2 de Material e Métodos, foi adsorvido na membrana de fibra de vidro através da aplicação de 10µL, sendo esta quantidade suficiente para inundar o sistema. Após a adição, a membrana de fibra de vidro foi seca em temperatura ambiente por 4 horas. Após este período, armazenar em geladeira até o momento do uso.

3.30.12. Montagem do teste imunocromatográfico

Após as membranas cortadas e tratadas, os reagentes adsorvidos, o conjugado preparado e colocado na área do conjugado, as membranas de celulose foram sobrepostas a de nitrocelulose e assim, o teste rápido foi montado.

3.30.13. Teste de reatividade do ensaio imunocromatográfico

Após a montagem e sobreposição das membranas, estas foram fixadas em uma folha em branco para que ficassem imobilizadas no momento da aplicação do *pool* de soro positivo e negativo para o VHC. Foi aplicado 150µL da amostra sorológica e aguardado a corrida por endosmose.

3.31. Ensaio para padronização dos métodos diagnósticos para o VHC

3.31.1. Teste imunocromatográfico 1

As membranas de nitrocelulose, fibra de vidro e celulose (Millipore®) foram cortadas previamente conforme descrito no item 3.30.7 de Material e Métodos. A membrana de nitrocelulose foi tratada com Tris-HCl durante 15 minutos, lavada com Na₂HPO₄ e seca por 18 horas a 37°C. Na membrana de fibra de vidro foi aplicado o

conjugado anti-IgG marcado com peroxidase e em outra membrana de fibra de vidro, aplicado o anti-IgG marcado com biotina, ambos pertencentes ao kit de Western Blot, diluídos 1:1000 em tampão PBS e foram secas em temperatura ambiente por 4 horas. Já a membrana de celulose foi tratada com Tween 20 0,005% durante 15 minutos e seca em estufa a 37°C por 18 horas. Após os períodos de incubações, foi aplicado na membrana de nitrocelulose, na área teste (T) 1µL da mistura das proteínas recombinantes do VHC *core* e E2, nas concentrações de 2,4µg/µL e 1,7µg/µL respectivamente e na área controle (C) foi utilizada a proteína A extracelular recombinante (Sigma®) na concentração de 5µg/µL e seca a 37°C. Após 2 horas foi realizado o bloqueio dos sítios livres com Tris-HCl e 2% de BSA por 20 minutos em temperatura ambiente e sob agitação constante. Decorrido este período, as membranas de nitrocelulose foram lavadas com Tris-HCl contendo 0,4% de glicerol e secas por 2 horas a 37°C. Em seguida, foi realizada a montagem e sobreposição das membranas e aplicado 120µL de soro controle positivo para o VHC puro, diluído 1:10 e 1:100 na membrana de celulose. Após a migração cromatográfica que ocorreu em 12 minutos, as membranas foram mergulhadas nos substratos correspondentes aos conjugados adsorvidos nas membranas de fibra de vidro, ou seja, a membrana que continha o conjugado anti-IgG marcado com peroxidase foi mergulhada no substrato B (solução peróxido de hidrogênio 0,02% em tampão citrato) e a membrana com o anti-IgG conjugado com biotina, foi mergulhada no substrato A (solução 4-cloro-1-naftol em álcool) do kit Western Blot (Sigma®).

3.31.2. Teste imunocromatográfico 2

O ensaio foi realizado seguindo a metodologia descrita no item 3.31.1 de Material e Métodos com algumas alterações, tais como, na membrana de fibra de vidro, foi aplicado 30µL do anticorpo anti-IgG conjugado com peroxidase (Sigma®) diluído 1:1000 em PBS e após ter sido seca durante 2 horas a 37°C, foi realizada a montagem e sobreposição das membranas, sendo que na membrana de nitrocelulose, após tratada foi adsorvido 1µL na área teste (T) da mistura das proteínas recombinantes *core* e E2 e 1µL na área controle (C) da proteína A extracelular (Sigma®) e a membrana de celulose seca por 18 horas a 37°C após tratamento com Tween 20 0,005%. Decorrido os 15 minutos após a aplicação do *pool* de soros positivos para o VHC puro na área apropriada, ou seja, na membrana de celulose, as membranas foram imersas no substrato DAB (5mg) com 150µL de peróxido de hidrogênio e 30mL de PBS e aguardado o aparecimento das bandas nas áreas testes e controle.

Paralelo ao ensaio descrito acima, foi realizado outro teste, semelhante ao método de *immunoblotting*, utilizando somente a membrana de nitrocelulose. Na área teste (T) foi usado 1µL da mistura das proteínas fusionadas a GST, *core* e E2 e para o controle da reação, foi utilizado a proteína A extracelular recombinante (Sigma®), nas concentrações de 2,4µg/µL, 1,7µg/µL e 5µg/µL respectivamente. Após tratamento, adsorção das proteínas recombinantes, bloqueio e lavagens, as membranas de nitrocelulose foram mergulhadas no *pool* de soros positivos para o VHC diluídos 1:10 em PBS e deixadas sobre agitação constante por 40 minutos. Em seguida, foi lavada com PBS e Tween 20 0,05% e imersas no anticorpo anti-IgG marcado com peroxidase (Sigma®) diluído 1:1000 em PBS, durante 40 minutos. Decorrido este tempo, foi realizada a lavagem e as membranas foram mergulhadas no substrato DAB (5mg) com

150µL de peróxido de hidrogênio e 30mL de PBS e aguardado o aparecimento das bandas nas áreas testes e controle.

3.31.3. Teste *imunoblotting* 2

Em membranas de nitrocelulose (Millipore®) foram aplicados 1,5µL da mistura das proteínas recombinantes *core* e E2 na área teste (T) e 1µL da proteína A extracelular recombinante na área controle (C) e deixadas secar em estufa a 37°C. Após 2 horas, foi realizado o bloqueio com Tris-HCl 0,1M pH 7,6 e 2% de BSA durante 30 minutos. Decorrido este tempo, foram lavadas com Na₂HPO₄ por 3X de 5 minutos e 1X com Tris-HCl e deixadas secar por 2 horas em temperatura ambiente. As membranas foram imersas no *pool* de soros positivos para o VHC diluído 1:10 em solução de bloqueio por 1 hora em temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, foram lavadas com Tris-HCl e Tween 20 0,05% por 3X de 5 minutos e imersas na solução contendo anticorpo anti-IgG marcado com peroxidase (Sigma®) diluído 1:1000 em solução de bloqueio e deixadas sob agitação por 1 hora. Novamente foi realizada a lavagem e mergulhadas no substrato DAB (5mg) com 150µL de peróxido de hidrogênio e 30mL de PBS e aguardado o aparecimento das bandas nas áreas testes e controle.

3.31.4. Teste *Imunoblotting* 3

Em membranas de nitrocelulose (Millipore®) já tratadas, foram adsorvidas as proteínas recombinantes do VHC, *core* e E2 em diferentes eluições (*core*: PE3 armazenada a -20°C, PE3 armazenada a -80°C e PE2 armazenada a -20°C) e (E2: PE1 armazenada a -20°C) e a proteínas A extracelular (Sigma®) para controle e foram secas por 2 horas a 37°C. Foi realizado o bloqueio com Tris-HCl 0,1M pH 7,6 e 2% de

BSA durante 30 minutos. Em seguida, foi feita a lavagem e deixado secar por 4 horas. Decorrido este período, as membranas foram mergulhadas no soro controle positivo do kit (ORTHO HCV 3.0 ELISA ver marca) diluído 1:10 e deixadas sob agitação por 1 hora em temperatura ambiente. Após foram lavadas e imersas na solução contendo anticorpo anti-IgG marcado com peroxidase (Sigma®) diluído 1:1000 em solução de bloqueio e deixadas sob agitação por 1 hora. Novamente foram lavadas e mergulhadas no substrato DAB (5mg) com 150µL de peróxido de hidrogênio e 30mL de PBS.

3.31.5. Teste *Imunoblotting* 4

Este ensaio foi realizado utilizando membranas de nitrocelulose (Millipore®) previamente cortadas e a folha de nitrocelulose Nytran (SCHLEICHER & SCHUELL) cortada nas mesmas proporções da anterior. Foram utilizados 3µL das proteínas recombinantes na área teste (T) *core* e E2 nas seguintes eluições: (*core*: PE3 armazenada a -20°C, PE3 armazenada a -80°C e PE2 armazenada a -20°C) e (E2: PE1 armazenada a -20°C) e na área controle (C) a proteína A extracelular recombinante (Sigma®). Estas membranas foram secas a 37°C por 2 horas e o bloqueio foi realizado com Tris-HCl 0,1M pH 7,6 e 2% de BSA durante 30 minutos e em seguida, foi feita a lavagem. As tiras de nitrocelulose foram imersas em *pool* de soros positivos testados por ELISA, com absorbâncias estouradas, diluídos 1:10 em solução de bloqueio e permaneceram sob agitação por 1 hora em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, foi realizada a lavagem e foram imersas em uma solução contendo o anticorpo anti-IgG conjugado com peroxidase (Sigma®) diluído 1:1000 em bloqueio e deixadas em agitação por 1 hora. Após a lavagem foram mergulhadas no substrato DAB (5mg)

com 150µL de peróxido de hidrogênio e 30mL de PBS e aguardado o aparecimento das bandas, em torno de 2 minutos.

3.31.6. Liofilização das proteínas recombinante do VHC (*core* e E2)

Na tentativa de concentrar as proteínas recombinantes e melhorar a imunorreatividade quando adsorvidas em membranas de nitrocelulose, foi realizada a liofilização das proteínas recombinantes nas eluições (*core*: PE3) e (E2: PE2), sendo estas eluições que apresentavam maior concentração proteica. As proteínas recombinantes *core* e E2 foram congeladas a -35°C e em seguida, colocadas no liofilizador (Thermo Electron Corporation – Modulyod Freeze Dryer) por 20 horas em uma temperatura de -51°C e vácuo -1mbar. As proteínas liofilizadas foram ressuspensas em 100µL de água Mili-Q, concentrando 10X.

3.31.7. Teste *Imunoblotting* 5

Outro ensaio foi realizado utilizando a membrana de nitrocelulose (Millipore®) com as proteínas recombinantes adsorvidas, *core* e E2 liofilizadas, além da proteína A (Sigma®) como controle. O procedimento foi semelhante ao item 3.31.5 de Material e Métodos, com somente uma alteração, após o bloqueio com Tris-HCl 0,1M pH 7,6 e 2% de BSA durante 30 minutos, as membranas foram secas por 18 horas.

3.31.8. *Slot Blot*

Frente às dificuldades encontradas com os resultados dos ensaios anteriores, foi realizado um novo ensaio de *Slot Blot*, com a finalidade de confirmar a reatividade das proteínas *core* e E2 fusionada a GST. A membrana de nitrocelulose Nytran

(SCHLEICHER & SCHUELL) foi cortada em um tamanho apropriado para o sistema *Hybri SlotTM Manifold* (Gibco BRL – Life Technologies) e hidratada com PBS 10 minutos antes de aplicar as proteínas recombinantes do VHC, *core* e E2, em diferentes eluições e liofilizadas, sendo: (*core*: PE2 e PE3 e PE3 liofilizada) e (E2: PE1 e PE2 liofilizada), para controle, foi utilizada a proteína A extracelular (Sigma®). Foram aplicados 10µL de cada uma dessas proteínas diretamente na membrana de nitrocelulose e em seguida acionado o vácuo acoplado ao sistema, até a completa absorção. Após a lavagem com TBS/Tween-20 (Tris 0,05M, NaCl 0,15M; pH 8,0, 0,05% Tween 20 0,05%) a membrana foi bloqueada com esta mesma solução acrescida de BSA 5% por 2 horas em temperatura ambiente e sob agitação. Decorrido este período, a membrana foi seca por 18 horas a 37°C. No dia seguinte, foi hidratada com TBS/Tween-20 e mergulhada no *pool* de soro VHC positivo diluído 1:10 em solução de bloqueio com BSA a 2%. Após 1 hora em temperatura ambiente e sob agitação, foi lavada com TBS/Tween-20 por 3X de 5 minutos cada e adicionado o anticorpo anti-IgG conjugado com peroxidase diluído 1:1000 em solução de bloqueio por 1 hora. A membrana foi novamente lavada e imersa no substrato DAB (5mg) com 150µL de peróxido de hidrogênio e 30mL de PBS e aguardado o aparecimento das bandas.

3.31.9. Teste *Imunoblotting* 6

O mesmo procedimento dos ensaios de *imunoblotting* anteriores foi novamente realizado utilizando a proteína *core* eluída PE2 armazenada a -20°C e as proteínas recombinantes liofilizadas (*core* PE3, E2 PE2), com alteração da quantidade de proteínas aplicadas nas membranas de nitrocelulose, sendo 8,5µL de cada proteína, aplicados com cautela, para que as proteínas não extravasassem na nitrocelulose, ou

seja, uma concentração de 20,40µg/µL da proteína *core*-GST e tendo em vista que as proteínas liofilizadas foram concentradas 10X, estando em uma concentração de 204µg/µL e 144,5µg/µL, respectivamente. O *pool* de soros positivos e negativo para o VHC foi diluído 1:10 em solução de bloqueio. Uma tira de nitrocelulose contendo as proteínas recombinantes adsorvidas e a proteína A extracelular (Sigma®) foi utilizada como controle, aplicando o *pool* de soro negativo para o VHC. A reação prosseguiu-se como descrito anteriormente.

3.31.10. Teste *Imunoblotting* 7

Em tiras de nitrocelulose já cortadas e tratadas previamente, foram aplicados 8,5µL das proteínas *core* e E2 fusionadas a GST, sendo (*core*: PE3 liofilizada e PE2,) e (E2: PE2 liofilizada e PE1), além da proteína A extracelular recombinante (Sigma®). As membranas de nitrocelulose foram secas em estufa a 37°C por 2 horas e após lavagem, foi realizado o bloqueio com Tris-HCl 0,1M pH 7,6 e 2% de BSA durante 40 minutos. Em seguida, foram lavadas e imersas no *pool* de soros positivos para o VHC diluídos 1: 10 em solução de bloqueio acrescido de Tween 20 0,005%. Após 1 hora de agitação em temperatura ambiente, as membranas foram lavadas e imersas em solução de bloqueio contendo o anticorpo anti-IgG conjugado com peroxidase diluído 1:300 e foram deixadas em agitação por 1 hora. Decorrido este período, foram novamente lavadas com Tris-HCl e Tween 20 0,05% por 3X de 5 minutos cada e mergulhadas no substrato DAB (5mg) com 150µL de peróxido de hidrogênio e 30mL de PBS e aguardado o aparecimento das bandas em torno de 3 minutos.

3.31.11. Concentração de proteínas recombinantes pelo método do nitrogênio

As proteínas recombinantes *core*-GST (mistura da PE2 e PE3) num volume total de 1,5mL e E2-GST (PE2) num volume de 1,0mL, foram descongeladas em gelo e transferidas para tubos Falcon de 50mL. Estas proteínas foram submetidas a um fluxo contínuo de nitrogênio, de modo que este fluxo proporcionasse um atrito na superfície do fluido proteico, alterando a tensão superficial. Este atrito provocado pelo nitrogênio favorece a evaporação da solução em que a proteína se encontra, promovendo assim, a concentração proteica. Ao final de 90 minutos, as proteínas recombinantes *core* e E2 estavam concentradas e foram ressuspensas em água Mili-Q com 150μL e 100μL respectivamente, concentrando em 10X.

3.31.12. Teste *Imunoblotting* 8

O mesmo procedimento do ensaio de *imunoblotting* item 3.31.10 de Material e Métodos foi realizado aplicando-se 1,5μL de cada proteína recombinante, das concentradas pelo método do nitrogênio, das proteínas liofilizadas (*core* PE3 e E2 PE2) e as eluídas (*core* PE2 e PE3) e (E2 PE1 e PE2). Para controle foi utilizada a proteína a extracelular recombinante (Sigma®).

3.31.13. Teste *Imunoblotting* padronizado

As proteínas recombinantes *core*-GST e E2-GST foram aderidas na tira de nitrocelulose HF120 Millipore®, previamente cortada em 0,5cm, aplicando-se 1μL de cada proteína concentradas pelo método de nitrogênio, nas concentrações de 24μg/μL e 17μg/μL, respectivamente, 1μL da mistura das duas proteínas juntas (*core* + E2) na área teste (T), e 1μL em duplicata de proteína A extracelular recombinante (Sigma-

Aldrich®) na concentração de 5µg/µL na área controle (C) e deixado secar durante 2 horas a 37°C e depois bloqueado com Tris-HCl e BSA 2% por 40 minutos e lavado por 3X com Na₂HPO₄ e por 1X com Tris-HCl e deixado secar a 37°C. Após 20 horas, as tiras foram imersas em soro controle positivo para o VHC diluído 1:10 em solução de bloqueio durante 1 hora e lavada com Tris-HCl e Tween 20 0,05% por 3X. Em seguida, as tiras foram imersas em solução de bloqueio contendo anticorpo anti-IgG conjugado com peroxidase diluído 1:300 durante 1 hora e novamente lavadas. As tiras foram imersas no substrato diaminobenzidina (5mg) com 150µL de H₂O₂ e 30mL de PBS e as bandas tornaram-se visíveis nas áreas teste e controle. O mesmo método foi realizado utilizando soro controle negativo para o VHC.

3.32. Validação do Teste imunocromatográfico

Após definidas as concentrações e quantidades das proteínas recombinantes, do conjugado e as diluições dos soros controles, avaliamos se havia reatividade inespecífica com *pool* de soros controles verdadeiros negativos para o VHC e positivos para outras doenças infecciosas e inflamatórias, tais como: HIV (n=5), HBV (n=5), ASO (n=5), Chagas (n=5), Sífilis (n=5), Rubéola (n=5) e fator reumatoide (n=5), diluídos 1:10 em solução de bloqueio e comprovados por ELISA comercial (Ortho-Clinical Diagnostic®) e PCR qualitativo (Roche®). Também foram avaliados soros controles verdadeiros positivos para o VHC diluídos 1:10 (n=5), 1:100 (n=5) e 1:1000 (n=5) em solução de bloqueio e *pool* de soros controles (n=3) dos genótipos 1, 2 e 3 do VHC. As proteínas recombinantes (*core* e E2) foram adsorvidas juntas na área teste das membranas de nitrocelulose (Millipore®), sendo aplicado 1µL de cada proteína nas concentrações de 24µg/µL e 17µg/µL respectivamente e 1µL da IgG humana (Sigma®)

na concentração de 50µg/µL na área controle e deixado secar durante 2 horas a 37°C e após este período foram bloqueadas com Tris-HCl e BSA 2% por 1 hora e lavadas por 3X com Na₂HPO₄ e por 1X com Tris-HCl e deixado secar a 37°C por 20 horas. Na membrana de fibra de vidro foi aplicado 10µL da proteína A, na concentração de 5µg/µL, conjugada com o ouro coloidal (20nm), sendo essa quantidade suficiente para inundar a membrana. A fibra de vidro foi seca em temperatura ambiente por 4 horas e armazenada em geladeira até o momento do uso. Após a montagem e sobreposição das membranas de nitrocelulose, fibra de vidro e celulose (amostragem e absorvente), o teste rápido para o VHC foi criado. Na membrana de celulose (área de amostragem) já tratada previamente com solução de Tween 20 0,005% foi aplicado 150µL do *pool* de soros controles positivos para o VHC diluídos em solução de bloqueio 1:10 (padronizado), 1:100 e 1:1000 para comparar com os resultados de absorbâncias obtido pelo ELISA comercial (Ortho-Clinical Diagnostic®), *pool* de soros controles positivos para o VHC com genótipos 1, 2 e 3 e *pool* de soros controles negativos para o VHC e positivos para outras doenças infecciosas e inflamatórias e aguardado a corrida cromatográfica por capilaridade.

3.33. Verificação do desempenho do teste imunocromatográfico através dos índices de sensibilidade, especificidade, concordância, valores preditivo positivo e negativo

A eficiência comparativa do ensaio imunocromatográfico proposto com as técnicas empregadas foi estabelecida mediante os índices avaliadores relativos de sensibilidade (**Sr**), especificidade (**Er**), concordância (**c**), valores preditivos positivos (**Vp+**) e negativos (**Vp-**), falsos positivos e negativos (**F+** e **F-**) de acordo com os

procedimentos descritos por Buck e Gart (1966), Galen e Gambino (1975) e Griner e colaboradores (1981). Adotando este protocolo, a acurácia, desempenho e determinação de eficiência relativa do novo teste desenvolvido serão calculados. Os cálculos foram aplicados aos resultados obtidos do ELISA comercial (Ortho-Clinical Diagnostic®) PCR qualitativo (Roche®) e os obtidos pelo imunocromatográfico desenvolvido.

De acordo com os autores citados acima pode-se definir:

Sensibilidade: como a capacidade de um teste de revelar casos positivos numa população de portadores de afecções, e sua limitação se traduz nos resultados falsos negativos encontrados em doentes.

Especificidade: como a capacidade de um teste de fornecer resultados negativos em indivíduos não portadores de afecções, e sua limitação se traduz nos resultados falsos positivos encontrados nos não doentes.

Concordância: como a proporção de concordância global dos resultados positivos e negativos obtidos no teste, em relação ao soro de indivíduos comprovadamente doentes e não doentes.

Valor preditivo: do resultado positivo ou negativo como a probabilidade de resultado positivo corresponder realmente a um indivíduo doente e um negativo a um não doente.

O modelo preconizado pelos autores pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1: Modelo dos índices avaliativos da sensibilidade, especificidade, concordância, valor preditivo, falso-positivo e falso-negativo.

Teste de Referência	Teste em estudo		Total
	Reagente	Não Reagente	
Reagente	a	b	a+b
Não Reagente	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	a+b+c+d

Onde: $Sr = a/a+b$
 $F+ = c/c+d$

$Er = d/c+d$
 $F- = b/a+b$

$Vp+ = a/a+c$
 $C = a+d/a+b+c+d$

$Vp- = d/b+d$

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção do RNA Viral e Amplificação da Região do *core*-VHC

O *pool* de soros referentes ao genotipo 1a foi submetido à extração do RNA viral e as alíquotas foram devidamente identificadas e armazenadas em freezer -80°C para obtenção do cDNA correspondente ao transcrito do *core* viral. A extração do RNA viral foi realizada com sucesso, utilizando o kit QIAamp RNA Mini Kit Hand (QIAGEN). O produto amplificado apresentou o tamanho esperado (408 pb) quando analisado em gel de agarose, como demonstrado na Figura 6, canaleta 3. A sequência da região do *core* de 408 pb está registrada no “Blastn GenBank” – NCBI – AF 333324.

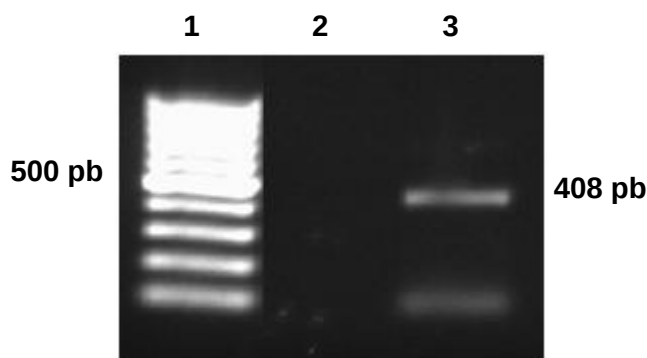


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando a reação em cadeia pela polimerase para a região codificadora do *core* de 408 pb. O padrão de 100 pares de bases está representado na canaleta 1, com indicação de 500 pb. Na canaleta 2 está o controle negativo de contaminação de reagentes. Na canaleta 3 está demonstrado a sequência correspondente ao *core* (408pb). O gel de agarose foi corado com brometo de etídio 0,5mg/mL.

4.2. Análise do Produto Amplificado e Purificado

Resultado satisfatório foi alcançado utilizando o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). O produto foi quantificado em espectrofotômetro ND-1000

(NanoDrop) e apresentou 20 ng/ μ L de concentração. A Figura 7 mostra o resultado da eletroforese em gel de agarose 1%.

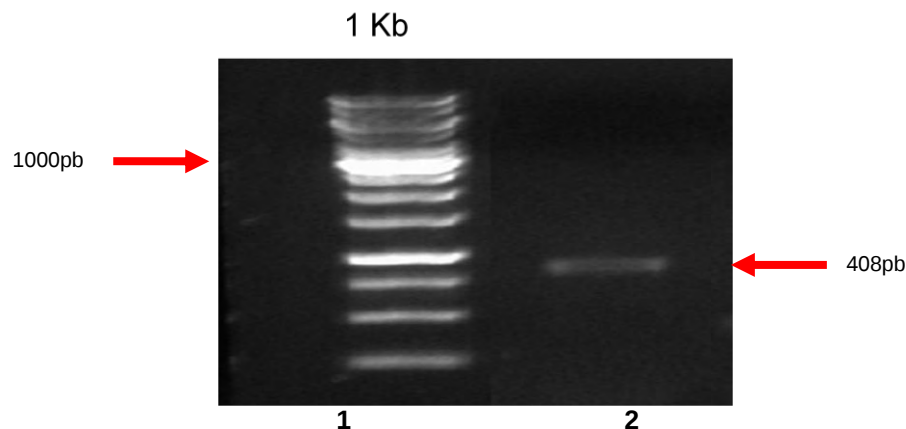


Figura 7: Perfil eletroforético do produto de PCR purificado (canaleta 2) em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5mg/mL, tampão TAE e tensão de 100V. Canaleta 1: Marcador do número de pares de bases (1Kb).

4.3. Transformação Bacteriana

Foram utilizadas bactérias competentes e tratadas com cloreto de cálcio, da linhagem *Escherichia coli*/DH5 α . Foi realizada uma PCR para verificar a presença de clones recombinantes e a partir dessa, foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1%. A Figura 8 mostra que houve transformação, pois a banda está com aproximadamente 500 pb.

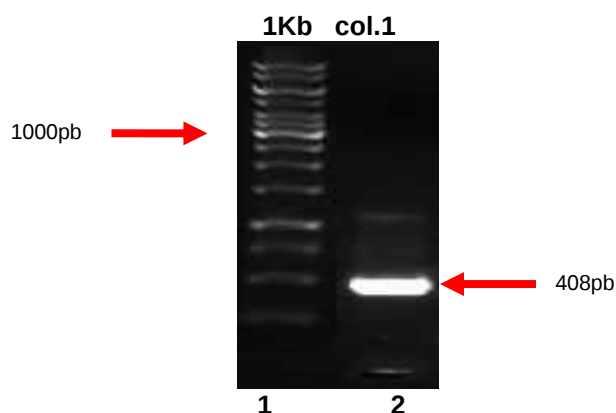


Figura 8: Eletroforese para confirmação das colônias recombinantes, ou seja, as colônias que contém o vetor e o inserto, na canaleta 2. Na canaleta 1 está o padrão de número de pares de bases de 1 Kb.

4.4. Análise e Quantificação do Produto da Mini-Prep

A extração plasmidial aconteceu utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN), conforme descrito no item 3.11 de Materiais e Métodos. O produto da reação da mini-prep foi analisado através de eletroforese como mostra a Figura 9, representado na canaleta 2 e quantificado em espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop), apresentando 489,0 ng/ μ L de concentração.

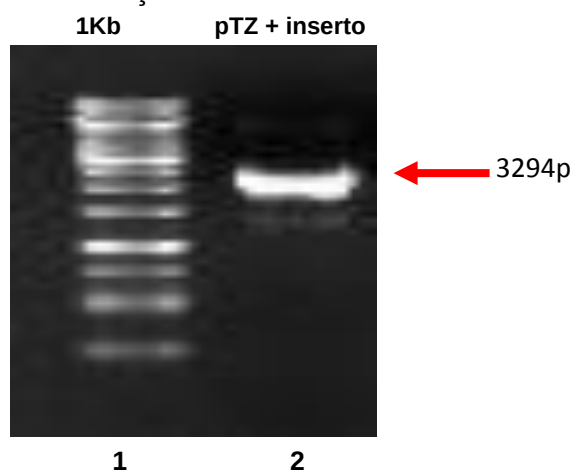


Figura 9: Perfil eletroforético do DNA plasmidial extraído da colônia recombinante através de mini-prep (canaleta 2), demonstrando o tamanho esperado, ou seja, 2886pb (vetor pTZ) + 408pb (core). Canaleta 1: Marcador do número de pares de bases (1Kb).

4.5. Clivagem Enzimática do Vetor pTZ

Conforme descrito no item 3.12 de Materiais e Métodos, o vetor pTZ contendo o inserto correspondente ao *core* com os sítios de restrição foi clivado com as enzimas *Nco* I e *Bam* HI. A Figura 10 demonstra o inserto de 408 pb recortado para posterior utilização.

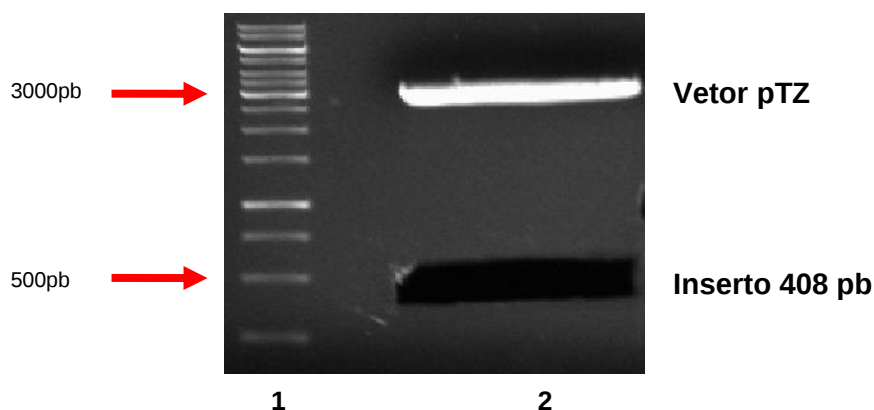


Figura 10: Perfil eletroforético do vetor pTZ, clivado com enzimas de restrição (*Nco* I e *Bam* HI), em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5mg/mL, tampão TAE, tensão 100V. Canaleta 1: Marcador do número de pares de bases (1Kb). Canaleta 2: banda correspondente ao vetor pTZ (aproximadamente 3Kb) e local de excisão da banda correspondente ao inserto *core* (aproximadamente 500pb).

4.6. Purificação das Amostras após a Clivagem Enzimática

A banda referente ao inserto da proteína do *core* digerida, foi purificada pelo kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). A Figura 11 demonstra uma eletroforese em gel de agarose 1%, sendo que a banda correspondente encontra-se na canaleta 2, apresentando o tamanho esperado. A concentração foi de 30 ng/μL.

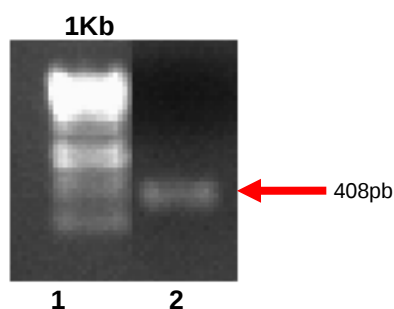


Figura 11: Perfil eletroforético do inserto *core* digerido do vetor pTZ, com enzimas de restrição NcoI e Bam HI, e purificado (canaleta 2) em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5mg/mL, tampão TAE e tensão 100V. Canaleta 1: Marcador do número de pares de bases (1Kb).

4.7. Análise do Produto da Mini-Prep do Vetor pET - 42a

O DNA plasmidial bacteriano foi extraído pela técnica de mini-prep, utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN). O produto da mini-prep foi quantificado e apresentou 20 ng/μL de concentração.

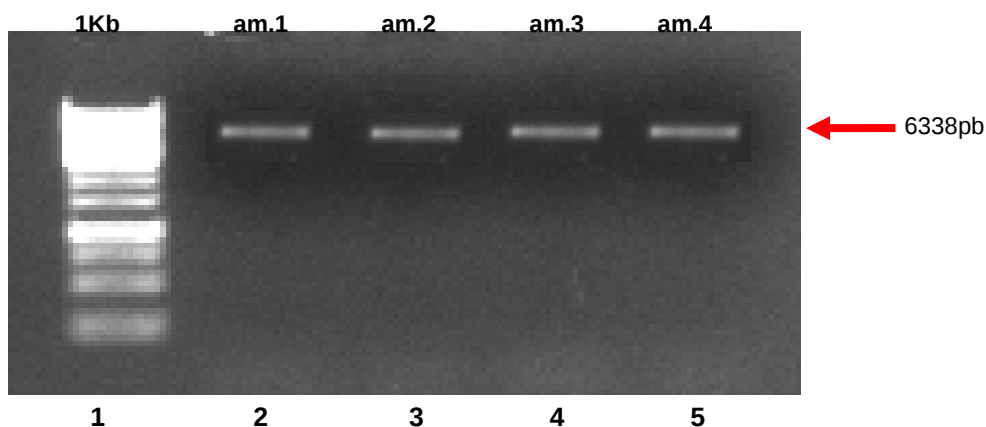


Figura 12: Perfil eletroforético do produto da mini-prep do pET-42a = 5930pb + 408pb inserto *core* (canaletas 2, 3, 4 e 5) em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5mg/mL, tampão TAE e tensão de 100V. Canaleta 1: Marcador do número de pares de bases (1Kb).

4.8. Clivagem Enzimática do pET - 42a e Purificação

As enzimas de restrição *Nco* I e *Bam* HI foram utilizadas para o procedimento de clivagem do pET - 42a, conforme descrito no item 3.14.3 de Materiais e Métodos, e a banda correspondente ao pET - 42a foi purificada com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA). O material foi analisado por eletroforese como apresentado na Figura 13 e a concentração foi de 20ng/μL.

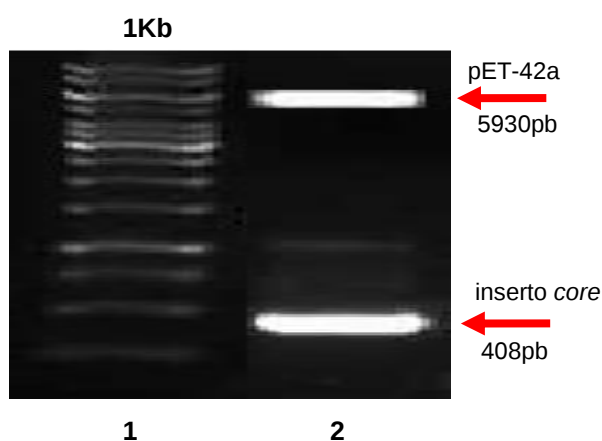


Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando na canaleta 2 a banda referente ao pET - 42a (5930pb) digerido e purificado e a banda referente ao inserto *core* de 408pb. Na canaleta 1 está o marcador do número de pares de bases (1Kb).

4.9. Análise do Produto de PCR dos Clones Recombinantes

Utilizou-se o padrão de pares de bases de 1Kb, 1 controle negativo e 6 colônias recombinantes. Estão representados nas canaletas respectivamente. O resultado apresentou-se satisfatório, com o tamanho de banda esperado de 408pb.

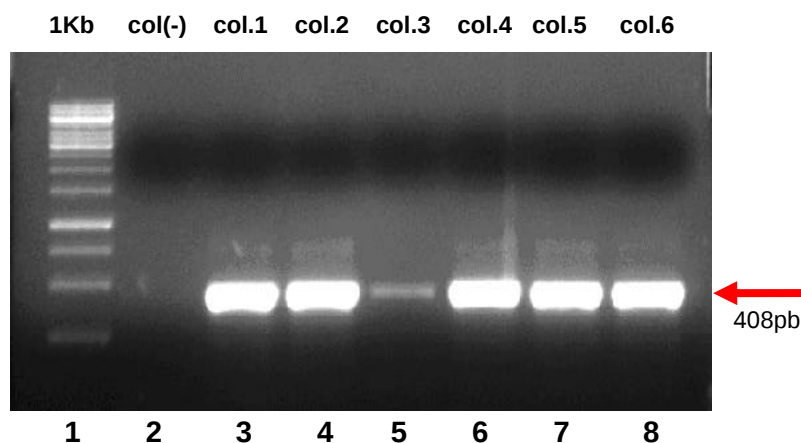


Figura 14: Perfil eletroforético dos produtos de PCR de colônias transformantes para verificação da amplificação da seqüência correspondente ao inserto *core* (408pb) em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5mg/mL, tampão TAE e tensão de 100V. Canaleta 1: Marcador do número de pares de bases (1Kb). Canaleta 2: controle de contaminação de reagentes da PCR. Canaletas 3 a 8: colônias transformadas.

4.10. Análise da Extração Plasmidial

Foram escolhidas duas colônias que contém o pET - 42a com o inserto da proteína do *core*, sendo que para cada uma das colônias foram feitas 3 reações para aumentar o rendimento e em seguida, realizada uma mini-prep, utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN). O resultado pode ser observado na Figura 15, nas canaletas 2, 3 e 4.

O material foi quantificado no aparelho nanodrop e sua concentração foi de 50 ng/ μ L.

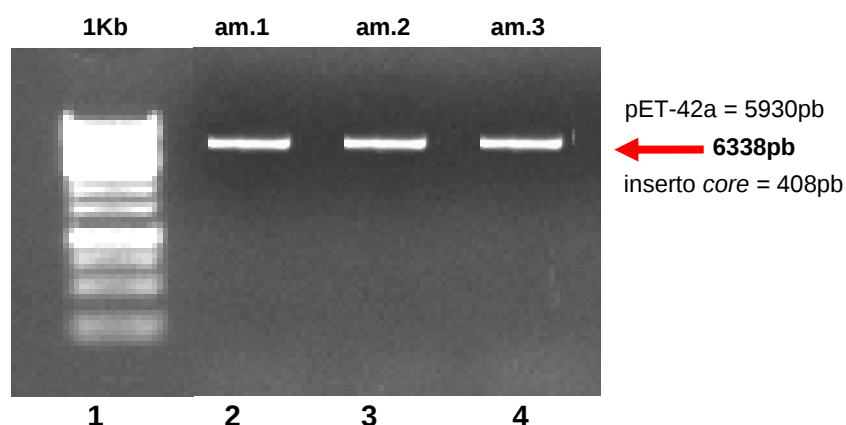


Figura 15: Perfil eletroforético do produto da mini-prep do pET-42a com o inserto *core* (canaletas 2, 3 e 4) em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5mg/mL, tampão TAE e tensão de 100V. Canaleta 1: Marcador do número de pares de bases (1Kb).

4.11. Seqüenciamento do produto clonado

O vetor pET-42a recombinante, ou seja, acrescido do inserto *core*, foi seqüenciado para análise da seqüência do inserto e orientação deste.

A seqüência obtida foi comparada com a disponível no “Blastn GenBank” – NCBI, AF 333324, conforme demonstrado na Figura 16.

```

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

AF 33324: 402 gacgttaagttcccgggcggtggtcagatcgttggtggagtttacctgttgccgcgcag 461
               |||
core 408: 61 gacgtcaagttcccgggcggtggtcagatcgttggtggagtttacctgttgccgcgcag 120

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

AF 33324: 522 aggcgacaacctatccccaaggtcgccggcccgagggtaggacctgggctcagcccg 581
               |||
core 408: 181 cggcgacaacctatccccaaggtcgtcggcccgagggcagggcctgggctcagcccg 240

AF 33324: 582 tacccttgccctctatggcaacgagggtaggggtgggcaggatggctcctgtcaccc 641
               |||
core 408: 241 tacccttgccctctatggcaatgagggcatgggtgggcaggatggctcctgtcacct 300

AF 33324: 642 cg-tggctctcggcctagttggggcccccacagaccccgcgtaggtcgcgtaatttggg 700
               ||
core 408: 301 cgcggtctctcggcctagttngggcccccactgaccccgcggtangtcgcgtaatttggg 360

AF 33324: 701 taaggatcatcgatacccttacatgcggcttcgcccacatcatggggta 748
               |||
core 408: 361 taaagtcatcgntaccctcacatgcgggttcgcccacatcatggggta 408

```

Figura 16: Alinhamento da sequência de aminoácidos clonada correspondente à região parcial do core VHC de 408 pb.

4.12. Clivagem Enzimática do pET - 42a com Inseto da Proteína Core

O pET - 42a com o inserto *core* foi clivado com as enzimas de restrição *Nco* I e *Bam* HI. A Figura 17 está representando na canaleta 2 o resultado desta digestão enzimática.

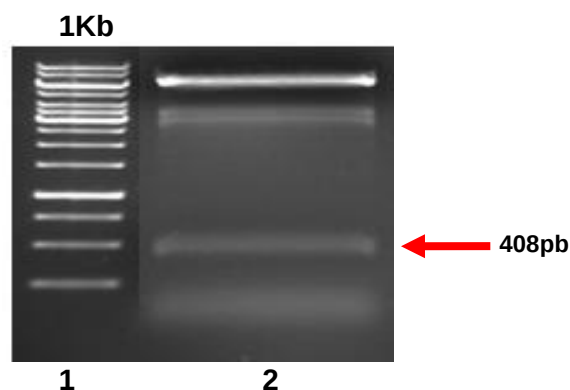


Figura 17: Perfil eletroforético do vetor pET-42a clivado com enzimas de restrição *Nco*I e *Bam*HI, em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5mg/mL, tampão TAE e tensão

de 100V. Canaleta 1: Marcador do número de pares de bases (1Kb). Canaleta 2: banda correspondente ao vetor pET-42a (aproximadamente 6Kb) e banda correspondente ao inserto *core* aproximadamente 500pb).

4.13. Expressão da proteína de fusão GST-*core*/VHC

O conteúdo protéico dos clones induzidos foi analisado em gel de poliacrilamida 15%. A expressão do gene *core* (408 pb) no vetor pET-42a forneceu proteínas na região esperada de 44 kDa, conforme demonstrado na Figura 18.

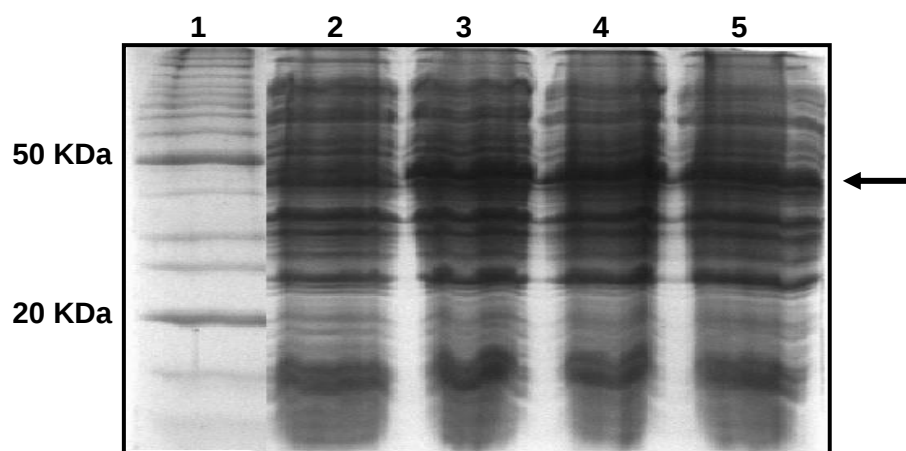


Figura 18: Análise em gel de poliacrilamida 15% da expressão da proteína *core* de 408 pb. A seta indica a proteína expressa na região de 44 kDa. Sendo, **1:** marcador de peso molecular (KDa); **2:** ponto zero; **3:** 1 hora de indução; **4:** 2 horas de indução; **5:** 3 horas de indução com IPTG a 37°C.

4.14. Análise das proteínas expressas: *core* e E2-GST

4.14.1. Análise dos tempos de indução por SDS-PAGE

A Figura 19 (a e b) apresenta o gel SDS-PAGE 12% como resultado da expressão das proteínas *core* e E2 recombinantes, em bactéria *E. coli* linhagem Rosetta, como descrito no item 3.15.1 de Materiais e Métodos.

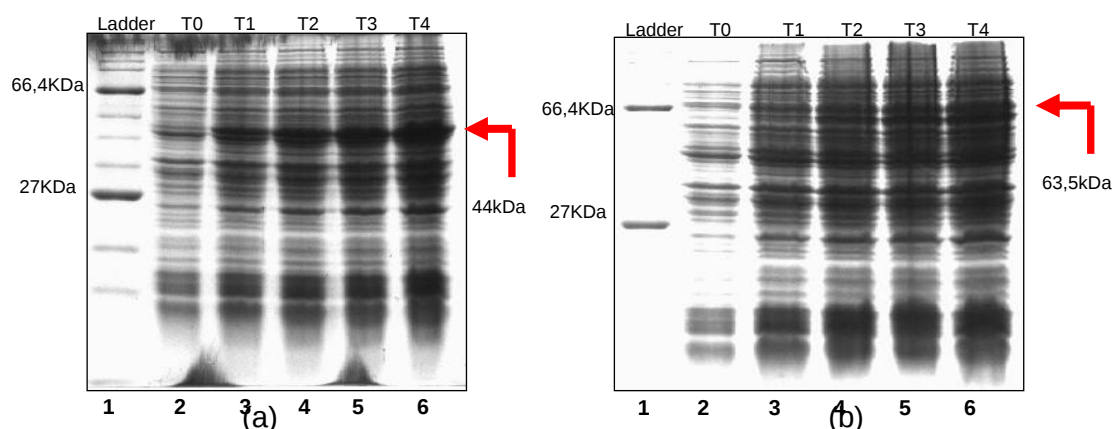


Figura 19 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% da expressão das proteínas *core* (a) e E2 (b) (fusionadas com GST e histidina), antes e depois da indução com IPTG 0,4mM, à temperatura de 30°C – 300rpm. Na primeira canaleta encontra-se o marcador de massa molecular - *Protein Marker Broad Range* (2 - 212 kDa) - *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. As setas indicam as bandas de aproximadamente 44 kDa (*core*) e de 63,5kDa (E2), observadas em T1, T2, T3 e T4.

Analisando os tempos de indução (1h, 2h, 3h e 4h) podemos observar que a expressão das proteínas *core* e E2 recombinantes foi semelhante nos tempos de 3h e 4h, portanto o tempo de indução foi padronizado para 3h.

4.14.2. Análise dos tempos de indução por *Western Blot*

A Figura 20 (a e b) apresenta a membrana resultante do ensaio de Western Blot para avaliação dos tempos de indução da expressão das proteínas *core* e E2 recombinantes, em bactéria *E. coli* linhagem Rosetta, utilizando anticorpos primários anti-his tag e anticorpos secundários anti-IgG marcados com fosfatase alcalina e

revelada com solução reveladora (1-Step™ NBT/BCIP – Pierce) assim como descrito no item 3.15.2 de Materiais e Métodos.

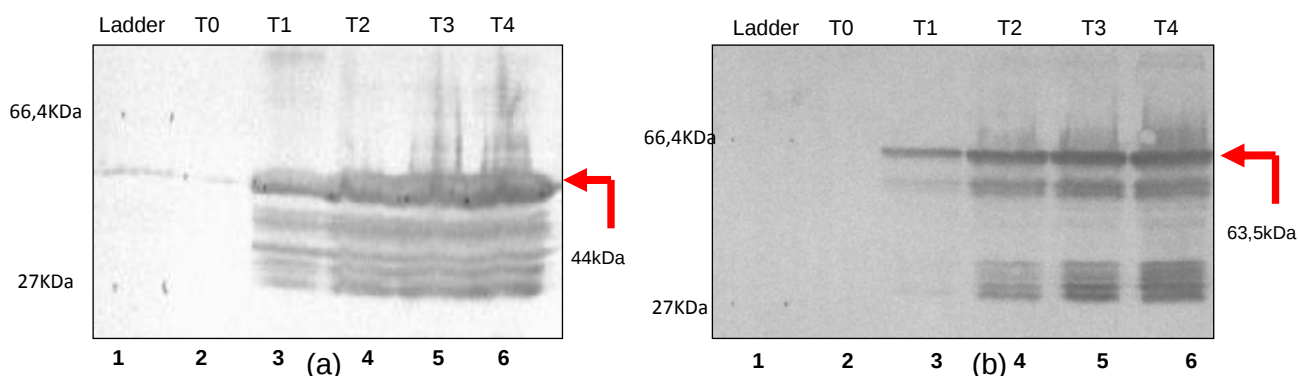


Figura 20 (a e b): Membrana de nitrocelulose PDVF (*PVDF Transfer Membrane 0,45 μ M – Thermo Scientific*), resultante da reação de *Western Blot*, transferida com o precipitado bacteriano dos diferentes tempos de indução das proteínas *core* (a) e E2 (b) recombinantes (1h, 2h, 3h e 4h) com IPTG 0,4mM, 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. As setas indicam as bandas referentes às proteínas *core* (a) com aproximadamente 44kDa e E2 com aproximadamente 63,5KDa, observadas em T1, T2, T3 e T4.

Na Figura 20 (a e b) podemos observar a revelação das bandas correspondentes às proteínas *core* e E2 recombinantes expressas 1, 2, 3 e 4h após o início da indução com IPTG. As bandas apresentam o peso molecular esperado de 44kDa para a proteína *core* e de 63,5KDa para a proteína E2 e a revelação mostra que o anticorpo anti-his tag foi capaz de reagir com a cauda de histidina das proteínas recombinantes e assim com os anticorpos secundários anti-IgG marcados com fosfatase alcalina. No tempo zero (T0), ou seja, antes do início da indução, não é

possível observar as bandas correspondentes às proteínas *core* e E2. Desta forma, pode-se supor que realmente são as proteínas de interesse.

4.15. Teste de solubilidade

Após a sonicação e a centrifugação da cultura induzida à 30°C – 300rpm, uma alíquota das respectivas frações solúveis (sobrenadante) e insolúveis (*pellet*) foram analisadas em gel SDS-PAGE 12%. A purificação das proteínas *core* e E2 recombinantes (fusionadas à proteína histidina) em coluna de resina de níquel (*NI-NTA Superflow Qiagen*) foi realizada conforme descrito em Materiais e Métodos item 3.15.3. A Figura 21 (a e b) apresenta o resultado do SDS-PAGE para análise da solubilidade das proteínas *core* e E2 recombinantes.

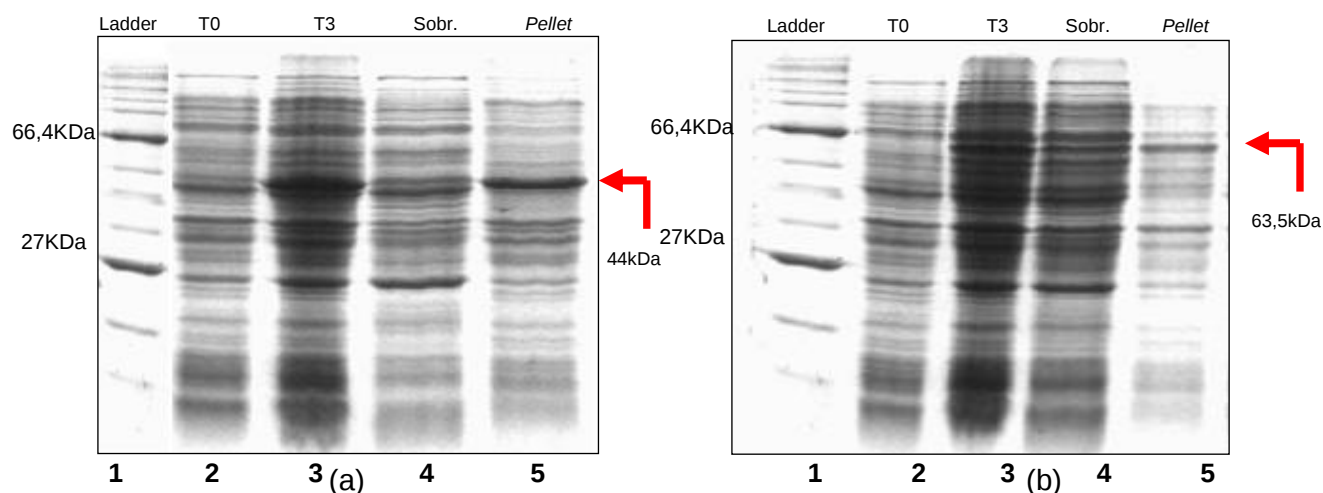


Figura 21 (a e b): Gel SDS-PAGE 12%, destacando pelas setas, a presença das proteínas *core* (44kDa) (a) e E2 (63,5KDa) (b) no sobrenadante e no *pellet* da cultura induzida à 30°C – 300rpm, durante 3h. Na canaleta 1 encontra-se o marcador de massa molecular - *Protein Marker Broad Range (2 - 212 kDa) – Biolabs*, na canaleta 2 (T0) o tempo anterior à adição de IPTG, ou seja, antes do início da indução, na canaleta 3 (T3) a amostra da cultura após 3h do início da indução e a presença das bandas correspondentes ao peso molecular das proteínas *core* e E2, assim como no sobrenadante e no *pellet*. O gel foi corado com Coomassie blue.

A Figura 21 (a e b) mostra a presença das proteínas *core* e E2 recombinantes tanto no sobrenadante (canaleta 4) quanto no *pellet* (canaleta 5), em proporções semelhantes, desta forma existe proteína na forma solúvel no sobrenadante. Mas como esta proteína presente no *pellet* poderia ser aproveitada também, fez-se necessário realizar várias mudanças no protocolo tanto de indução como de solubilização para tentar fazer com que ela se tornasse mais solúvel.

Também foi realizado um ensaio de Western blot, como descrito em Materiais e Métodos no item 3.15.2, para análise da presença das proteínas *core* e E2 recombinantes no sobrenadante e no *pellet*. Na Figura 22 (a e b) podemos observar a reação de Western Blot destacando a reatividade das proteínas *core* e E2 recombinantes com o anticorpo anti-his tag, o que confirma que as bandas presumíveis para tais proteínas na figura anterior, correspondem à de interesse.

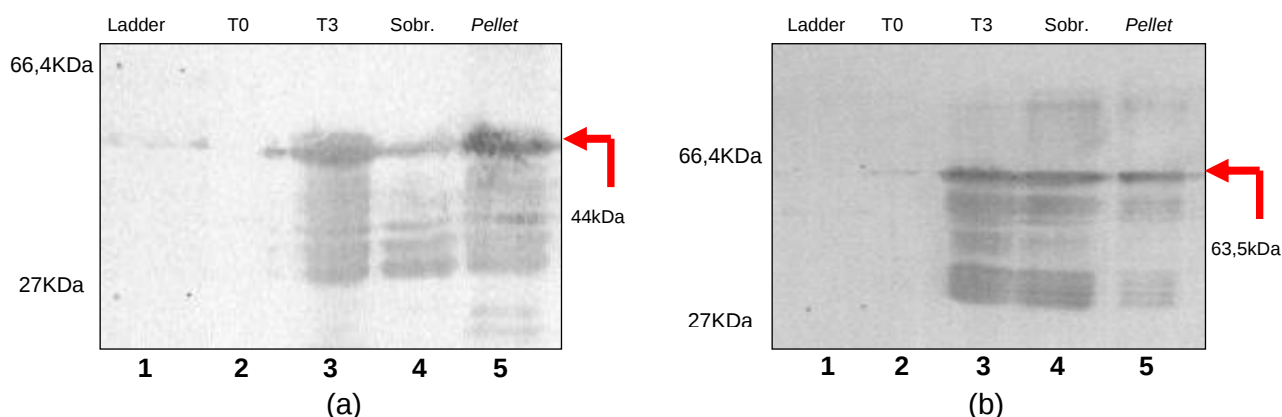


Figura 22 (a e b): Membrana de nitrocelulose PDVF (*PVDF Transfer Membrane 0,45 μ M* – *Thermo Scientific*), resultante da reação de *Western Blot*, transferida com o precipitado bacteriano antes do início da indução (T0) e 3h (T3) após o início da indução com IPTG 0,4mM, à temperatura de 30°C – 300rpm. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *Protein Marker Broad Range (2 - 212 kDa)* - *Biolabs*. Canaleta 2: T0 - antes da indução. Canaleta 3: T3 - 3h após a indução. Canaleta 4: sobrenadante e canaleta 5: *pellet*. As setas indicam as bandas de

aproximadamente 44kDa referente a proteína *core* (a) e 63,5KDa referente a proteína E2 (b) observadas em T3, sobrenadante e *pellet*.

Ao analisar a Figura 22 (a e b), observamos as bandas correspondentes às proteínas *core* e E2 recombinantes após 3h de indução da cultura de bactérias portadoras do vetor pET42a recombinante contendo os insertos correspondente às sequencias de tais proteínas. As mesmas bandas são observadas tanto no *pellet* como no sobrenadante, mostrando que parte das proteínas ainda estão insolúveis (no *pellet*).

4.16. Purificação protéica por técnica de cromatografia de afinidade em coluna de Níquel (Ni-NTA)

O sobrenadante (indução 30°C – 300rpm) resultante do processo de sonicação após ser filtrado, foi purificado em coluna de resina de níquel (*Ni-NTA Superflow Qiagen*) como descrito no item 3.16.1 de Materiais e Métodos. Os gradientes resultantes deste processo foram analisados por SDS-PAGE 12%, sendo o resultado apresentado na Figura 23 (a e b).

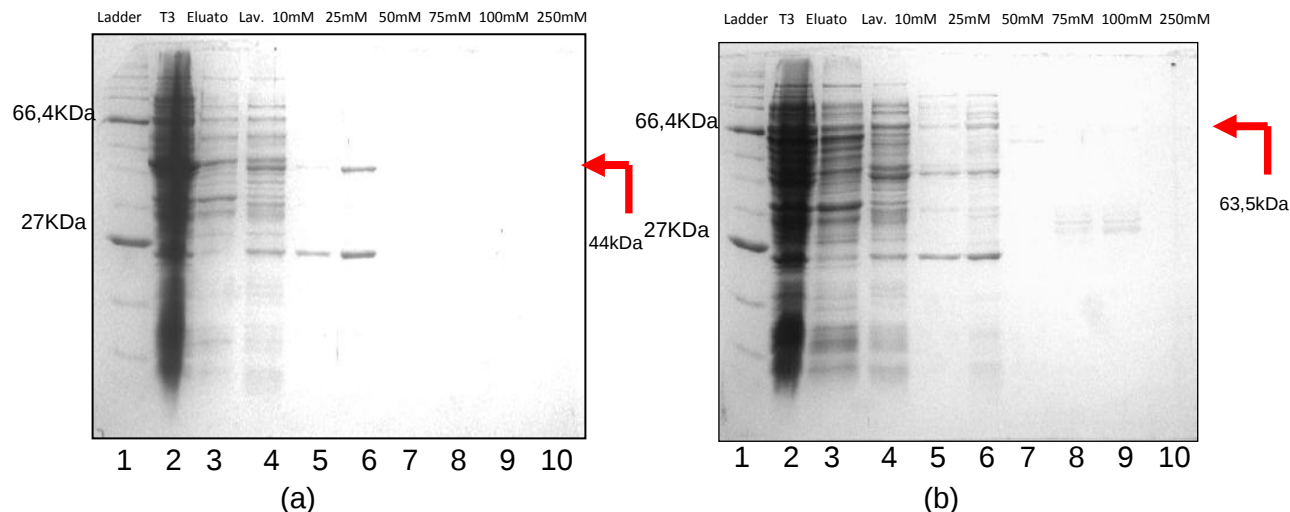


Figura 23 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da purificação em coluna de resina de níquel (*NI-NTA Superflow Qiagen*), das proteínas *core* (a) e E2 (b) recombinantes fusionadas à histidina (induzida à 30°C – 300rpm) em diferentes gradientes de purificação. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *Protein Marker Broad Range (2 - 212 kDa) - Biolabs*. Canaleta 2: T3 - 3h após a indução; canaleta 3: Eluato; canaleta 4: lavagem; canaleta 5: gradiente de purificação 10mM; canaleta 6: gradiente de purificação 25mM; canaleta 7: gradiente de purificação 50mM; canaleta 8: gradiente de purificação 75mM; canaleta 9: gradiente de purificação 100mM; canaleta 10: gradiente de purificação 250mM. As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas *core* (a) com aproximadamente 44kDa e E2 (b) com aproximadamente 63,5KDa.

Após analisar a Figura 23 (a e b), podemos observar que no eluato ainda existe a presença das bandas das proteínas *core* e E2, demonstrando que estas não se ligaram totalmente à resina. Nos gradientes não observa-se a presença da banda, o que permite inferir que a proteína não foi eficientemente purificada. O resultado sugere que a indução à 30°C não produziu uma boa quantidade das proteínas *core* e E2 e, o pouco que foi produzido não foi capaz de se ligar à resina, sendo eliminado no eluato.

Foi realizado um ensaio de *Western Blot* para confirmação de que as proteínas *core* e E2 recombinantes não haviam sido purificadas eficientemente por este

método. A Figura 24 (a e b) apresenta a membrana de nitrocelulose resultante deste ensaio.

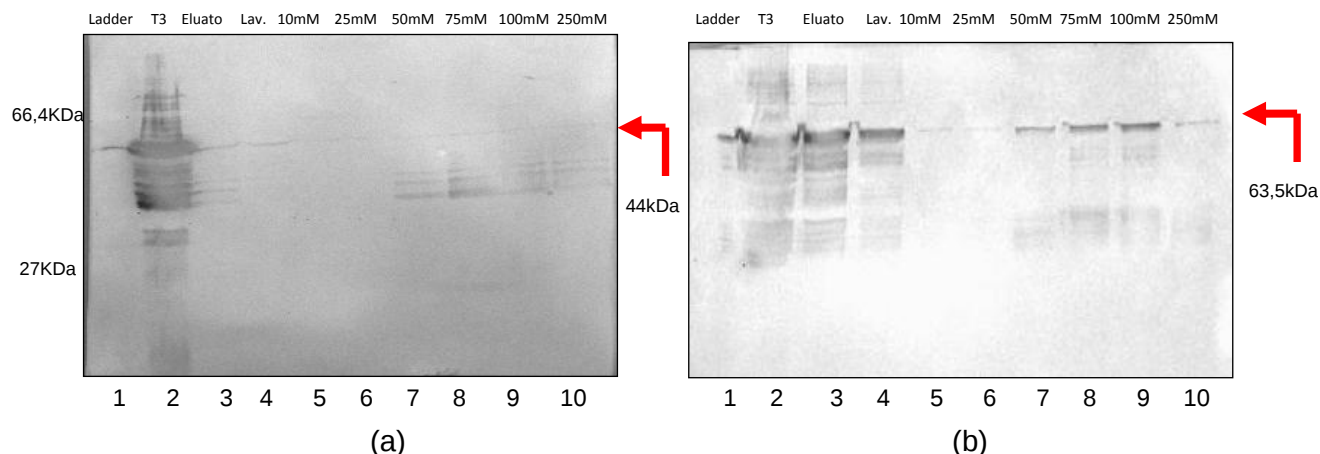


Figura 24 (a e b): Membrana de nitrocelulose resultante do ensaio de *Western Blot* sendo possível a observação das bandas correspondentes das proteínas *core* (44kDa) (a) e E2 (63,5kDa) (b) recombinantes (indução: 30°C – 300rpm) nos diferentes gradientes de purificação em coluna de níquel, conforme demonstrado pelas setas. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *Protein Marker Broad Range (2 - 212 kDa) - Biolabs*. Canaleta 2: T3 - 3h após a indução; canaleta 3: Eluato; canaleta 4: lavagem; canaleta 5: gradiente de purificação 10mM; canaleta 6: gradiente de purificação 25mM; canaleta 7: gradiente de purificação 50mM; canaleta 8: gradiente de purificação 75mM; canaleta 9: gradiente de purificação 100mM; canaleta 10: gradiente de purificação 250mM.

Após analisar as membranas de nitrocelulose resultante do ensaio de *Western blot* como descrito em Materiais e Métodos no item 3.15.2, é possível observar a presença das proteínas com peso molecular 44kDa e 63,5kDa, sendo estas reagentes com os anticorpos anti-his tag em praticamente todos os gradientes, mas em menor concentração no gradientes de 10, 25 e 250mM. Os resultados sugerem que se trata realmente das proteínas *core* e E2 recombinantes, devido ao seu peso molecular e à sua reatividade com anticorpos anti-his tag. Mas o método de purificação não foi muito eficiente, apresentando um baixo rendimento, sendo que no gel as bandas nem

podem ser visualizadas, e apenas observadas no ensaio de *Western blot*, devido à maior sensibilidade.

4.17. Purificação protéica por afinidade com resina de Glutathione (procedimento em tubo – Batch Purification)

Após o procedimento de purificação das proteínas *core* e E2 recombinantes fusionadas à proteína GST em coluna de glutathione como descrito em Materiais e Métodos no item 3.16.2, podemos observar na Figura 25 (a e b) o resultado desta purificação em gel SDS-PAGE 12%.

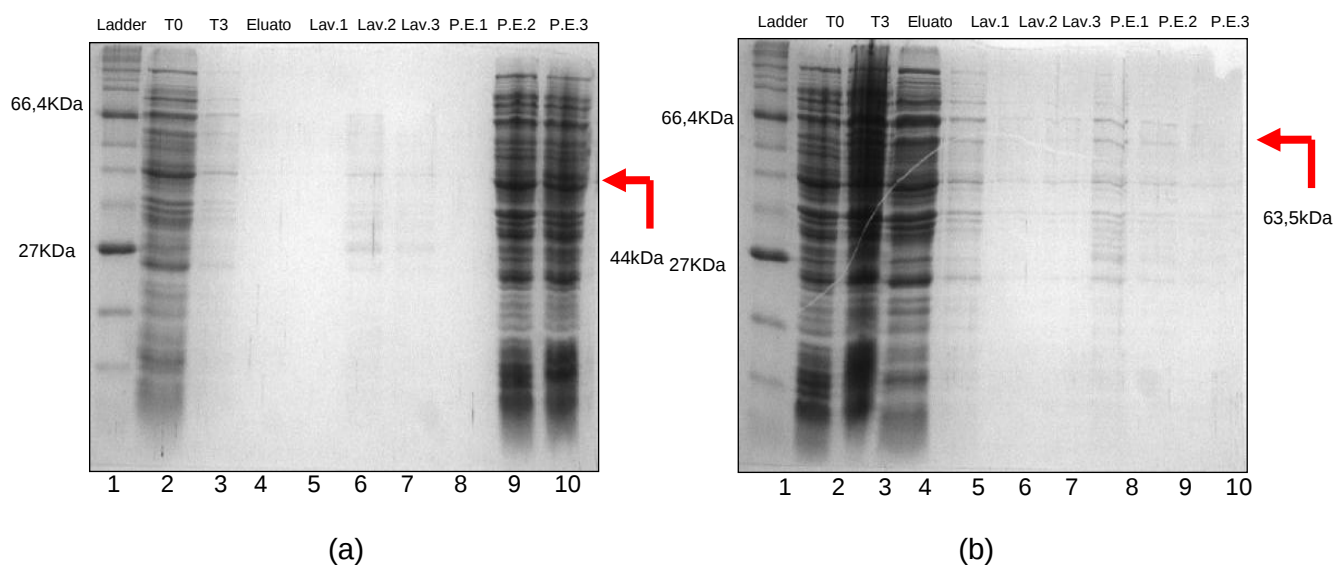


Figura 25 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da purificação das proteínas *core* (a) e E2 (b) recombinantes fusionadas à GST por afinidade com resina de glutathione, em diferentes gradientes de purificação. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *Protein Marker Broad Range* (2 - 212 kDa) - *Biolabs*. Canaleta 2: T0: tempo zero (antes do início da indução). Canaleta 3: T3 - 3h após 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. As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas *core* e E2 de aproximadamente 44kDa e 63,5KDa, respectivamente.

Na Figura 25 (a e b) podemos observar, com destaque para as proteínas eluídas, uma banda correspondente ao peso molecular de 44 kDa e 63,5KDa, o que indica ser as proteínas *core* e E2 recombinantes. A banda referente a proteína *core* não pode ser observada na fração da proteína eluída 1 (PE1), porém nas frações das proteínas eluídas 2 (PE2) e 3 (PE3), pode-se observar a presença da banda de 44kDa, o que sugere maior concentração da proteína *core* nessas frações. A banda referente a proteína E2 apresenta-se mais visível, mesmo que ainda muito suave, na fração da proteína eluída 1 (PE1), mas uma banda mais fraca na mesma posição também pode ser observada na proteína eluída 2 (PE2) e na proteína eluída 3 (PE3). Mostrando que a fração PE1 apresenta a maior concentração desta proteína. Os resultados sugerem que estas bandas apresentem-se muito claras devido ao fato de que grande quantidade de proteína não se ligou à resina, sendo assim eliminada no eluato, e o pouco que restou também não foi eficientemente purificada pois existem várias bandas contaminantes.

Mediante estes resultados, realizou-se uma reação de *Western blot* com todos os gradientes da purificação por coluna de glutatona para verificar se as bandas com peso molecular de 44kDa e 63,5KDa correspondiam realmente às proteínas *core* e E2 respectivamente e se elas estavam presentes nos gradientes onde não se observava a banda no gel de poliacrilamida 12%. As fotos das membranas de nitrocelulose transferidas com as alíquotas das purificações das proteínas *core* e E2 estão apresentadas na Figura 26 (a e b).

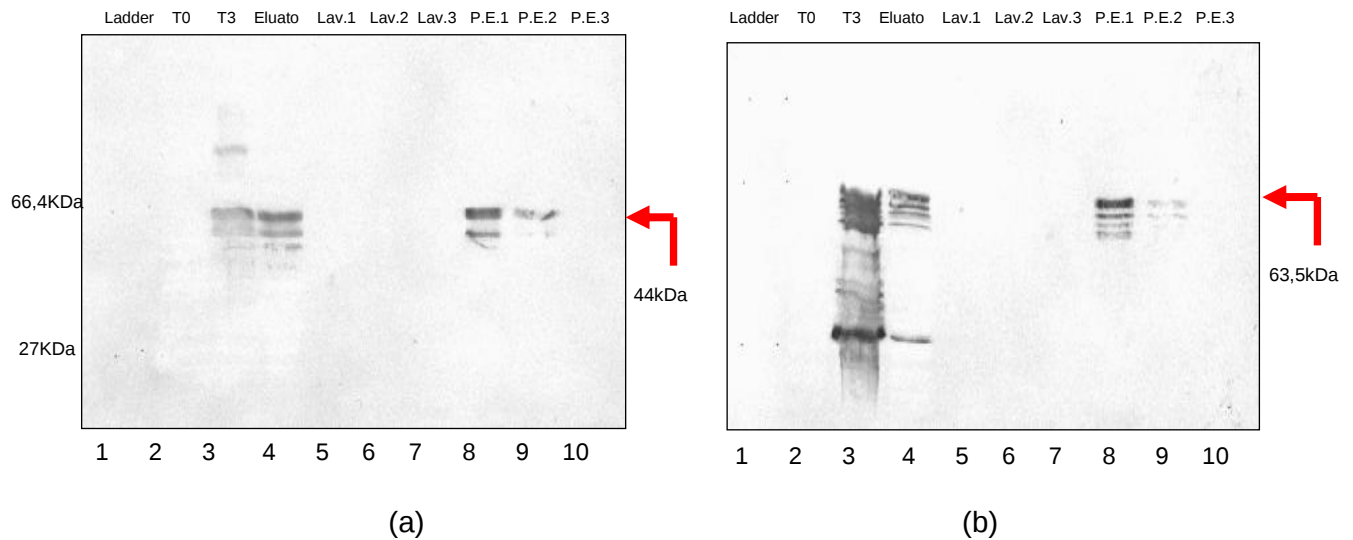


Figura 26 (a e b): Membrana de nitrocelulose transferida com os gradientes de purificação das proteínas *core* (a) (44kDa) e E2 (b) (63,5kDa) em coluna de glutationa, resultante do ensaio de *Western Blot*. Proteínas resultantes da indução à 30°C – 300rpm. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *Protein Marker Broad Range* (2 - 212 kDa) - *Biolabs*. Canaleta 2: T0: tempo zero (antes do início da indução). Canaleta 3: T3 - 3h após 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. As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas *core* e E2 de aproximadamente 44kDa e 63,5kDa respectivamente.

Após a análise da Figura 26 (a e b) podemos observar a presença das proteínas *core* e E2 em T3, Eluato, PE1 e PE2, pois existe uma marcação na altura de 44kDa e de 63,5kDa o que corresponde às referidas proteínas. A análise da membrana também nos permite dizer que as bandas de pesos moleculares inferiores à 44kDa e 63,5kDa e purificadas juntamente com a proteína de fusão GST-*core* e GST-E2 são decorrentes de um processo de degradação das proteínas de interesse.

4.18 Alterações no protocolo de indução para melhora da solubilidade das proteínas

4.18.1. Mudança na temperatura de indução (28°C) e no tampão de lise

→ Utilizando o tampão de lise COM uréia

O protocolo de indução citado no item 3.14.13 de Materiais e Métodos, foi alterado para melhorar a solubilidade das proteínas *core* e E2 recombinantes e as suas purificações. A temperatura de indução foi modificada para 28°C e utilizou-se para a sonicação, como descrito no item 3.15.3 de Materiais e Métodos, um tampão de lise contendo 0,5mM de uréia.

A Figura 27 (a e b) apresenta os resultados em SDS-PAGE 12% obtidos após as alterações citadas acima.

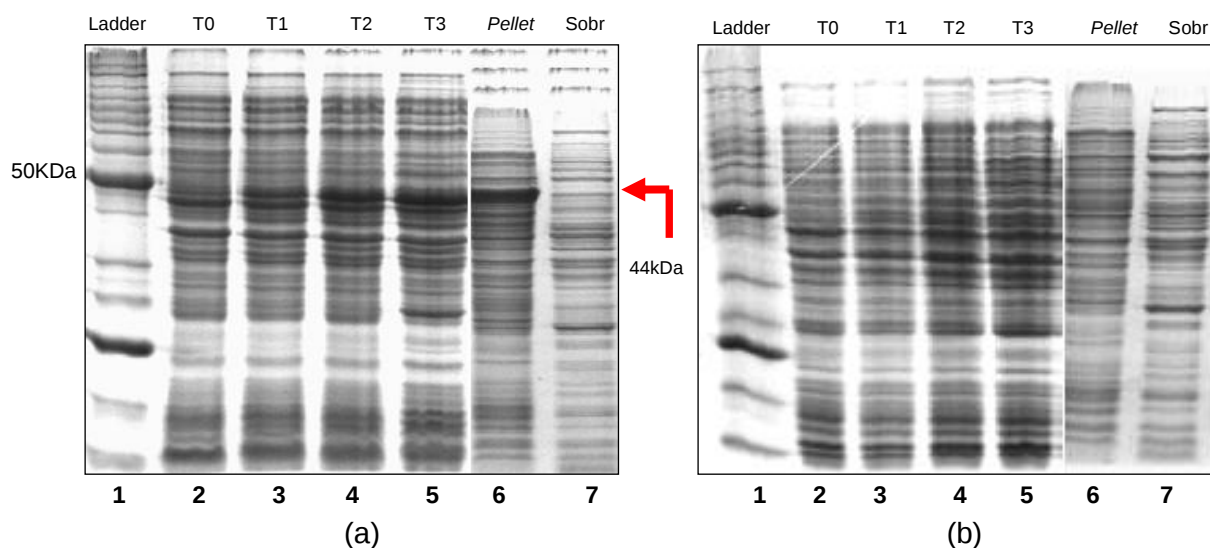


Figura 27 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado do teste de solubilidade das proteínas *core* (44kDa) (a) e E2 (63,5kDa) (b) recombinantes induzidas à 28°C por 3h e sonificadas com tampão de lise com uréia 0,5mM. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *BenchMark™ Protein Ladder* (10 - 220 kDa) - *Invitrogen*. Canaleta 2: T0 – tempo zero (antes do início da indução). Canaleta 3: T1 – 1h após o início da indução. Canaleta 4: T2– 2h após o início da indução. Canaleta 5: T3– 3h após o início da indução. Canaleta 6: *Pellet*. Canaleta 7: Sobrenadante.

Após analisar a Figura 27 (a), é possível observar a presença da banda correspondente ao *core* (44KDa), nos tempos de indução de 1 à 3 e no *pellet*, mas no sobrenadante não é possível observar tal presença, o que demonstra que as alterações de temperatura no protocolo não foram eficientes para melhorar a solubilidade da proteína *core*, pois ela se apresenta totalmente no *pellet*, ou seja, insolúvel.

Após analisar a Figura 27 (b), não podemos observar a presença da banda correspondente à proteína E2 recombinante (63,5KDa). Demonstrando que as alterações de temperatura no protocolo não foram eficientes para melhorar indução da proteína E2 recombinante, já que esta não foi expressa.

Em seguida, os sobrenadantes filtrados foram purificados pelo método de purificação em coluna de níquel, como no item 3.16.1 de Materiais e Métodos, e mostrado no gel SDS-PAGE 12% da Figura 28 (a e b).

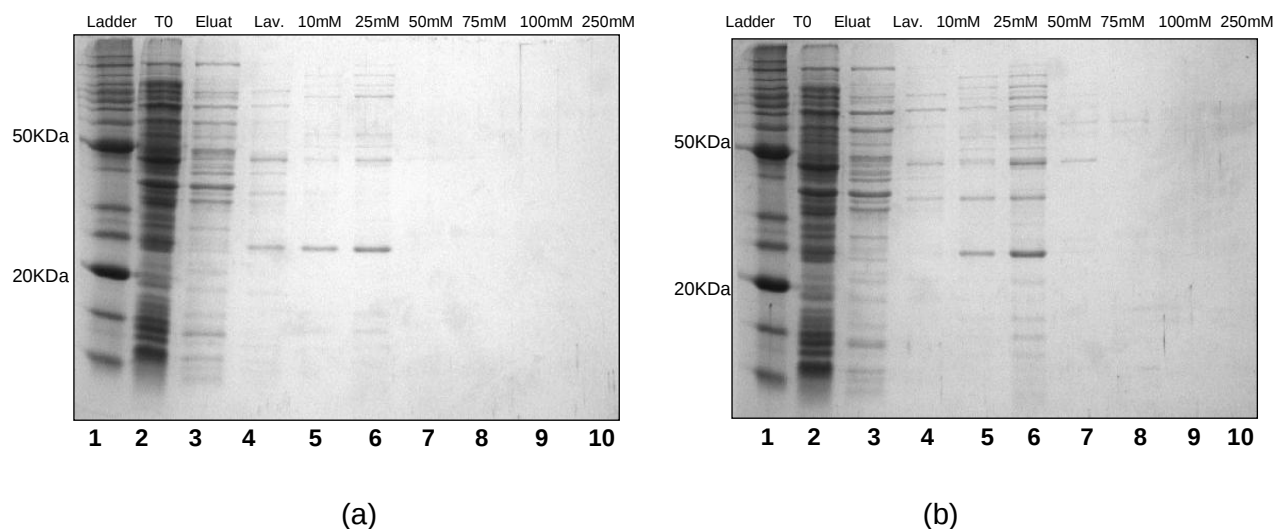


Figura 28 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da purificação em coluna de resina de níquel (*NI-NTA Superflow Qiagen*), das proteínas *core* (a) e E2 (b) recombinantes fusionadas à histidina induzidas à 28°C por 3h e sonicadas com tampão de lise com uréia 0,5mM, em diferentes gradientes de purificação. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *BenchMark™ Protein Ladder* (10 - 220 kDa) - *Invitrogen*. Canaleta 2: T0 – tempo zero (antes do

início da indução). Canaleta 3: Eluato. Canaleta 4: lavagem. Canaleta 5: gradiente de purificação 10mM. Canaleta 6: gradiente de purificação 25mM. Canaleta 7: gradiente de purificação 50mM. Canaleta 8: gradiente de purificação 75mM. Canaleta 9: gradiente de purificação 100mM. Canaleta 10: gradiente de purificação 250mM.

Após analisar a Figura 28 (a e b), não foi possível observar a presença das bandas correspondentes nem ao *core* (44kDa) e nem à proteína E2 (63,5kDa) recombinantes.

Estes resultados demonstram que a alteração de temperatura (de 30°C para 28°C) no protocolo não foi eficiente para melhorar indução e assim o rendimento das proteínas *core* e E2 recombinantes, já que estas não foram expressas.

4.18.2. MUDANÇA NA TEMPERATURA DE INDUÇÃO (37°C) E NO TAMPÃO DE LISE

→ Utilizando o tampão de lise COM uréia

O protocolo de indução descrito em Materiais e Métodos - item 3.14.13, foi alterado para melhorar a solubilidade e a purificação das proteínas *core* e E2 recombinantes, a temperatura de indução foi modificada para 37°C e utilizou-se para a sonicação, como descrito no item 3.15.3 de Materiais e Métodos, um tampão de lise contendo 0,5mM de uréia.

A Figura 29 (a e b) apresenta os resultados em SDS-PAGE 12% obtidos após as alterações citadas acima.

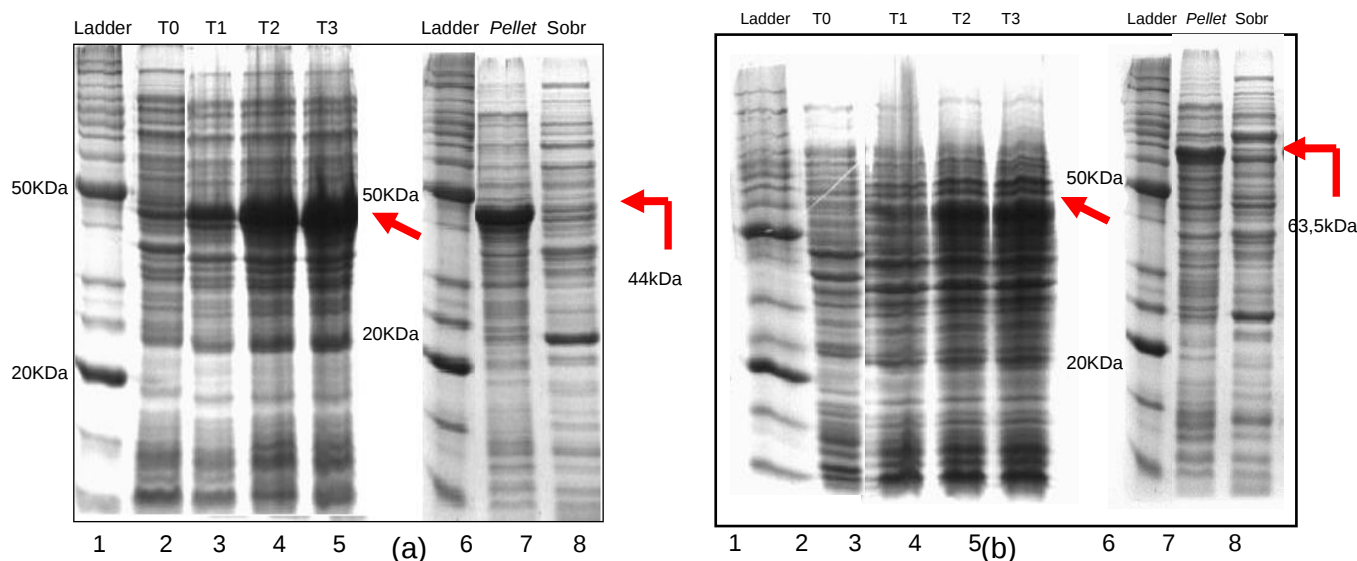


Figura 29 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado do teste de solubilidade das proteínas *core* (a) e E2 (b) recombinantes induzidas à 37°C durante 3h e sonicadas com tampão de lise com uréia 0,5mM. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *BenchMark™ Protein Ladder* (10 - 220 kDa) - *Invitrogen*. Canaleta 2: T0 – tempo zero (antes do início da indução). Canaleta 3: T1 – 1h após o início da indução. Canaleta 4: T2– 2h após o início da indução. Canaleta 5: T3– 3h após o início da indução. Canaleta 6: *Pellet*. Canaleta 7: *Sobrenadante*. As setas indicam as bandas correspondentes à proteína *core* e E2 de aproximadamente 44kDa e 63,5kDa, respectivamente.

Após analisar a Figura 29 (a e b), podemos observar a presença das bandas correspondentes às proteínas *core* e E2 recombinantes 1, 2 e 3h após o início da indução, com maior intensidade em 3h. Podemos visualizar nas canaletas 7 (a e b), uma banda bem espessa correspondente às proteínas de interesses, o que demonstra que praticamente toda a proteína expressa encontra-se no *pellet*, ou seja, está insolúvel, já que no sobrenadante (canaleta 8) a quantidade de proteína solúvel é praticamente inexistente. Isto demonstra que a alteração da temperatura de indução foi eficiente para melhorar a expressão mas não a solubilidade das proteínas *core* e E2 recombinantes, e que nem a sonicação com tampão de lise contendo uréia 0,5mM

melhorou a solubilidade.

Em seguida, o sobrenadante filtrado foi purificado pelo método de purificação em coluna de níquel, como no item 3.16.1 de Materiais e Métodos e mostrado no gel SDS-PAGE 12% da Figura 30 (a e b).

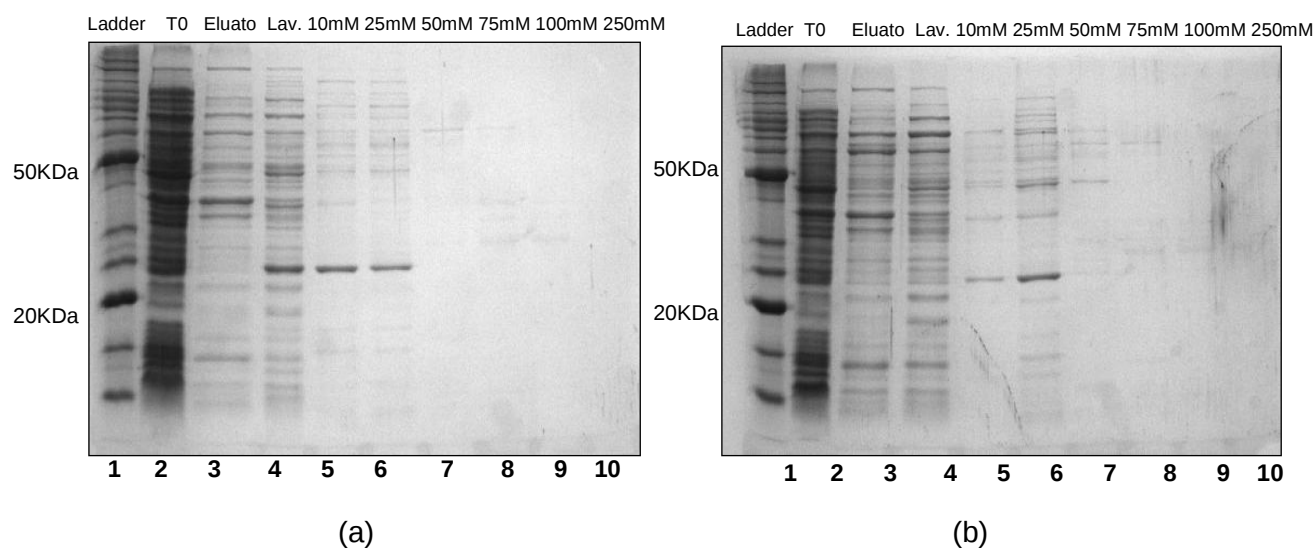


Figura 30 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da purificação em coluna de resina de níquel (*NI-NTA Superflow Qiagen*), das proteínas *core* (a) e *E2* (b) recombinantes fusionadas à histidina induzida à 37°C por 3h e sonicadas com tampão de lise com uréia 0,5mM, em diferentes gradientes de purificação. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *BenchMark™ Protein Ladder* (10 - 220 kDa) - *Invitrogen*. Canaleta 2: T0 – tempo zero (antes do início da indução). Canaleta 3: Eluato. Canaleta 4: lavagem. Canaleta 5: gradiente de purificação 10mM. Canaleta 6: gradiente de purificação 25mM. Canaleta 7: gradiente de purificação 50mM. Canaleta 8: gradiente de purificação 75mM. Canaleta 9: gradiente de purificação 100mM. Canaleta 10: gradiente de purificação 250mM.

Ao analisar a Figura 30 (a e b), não foi possível observar a presença das bandas correspondentes ao *core* (Figura 30 a) (44KDa) nem à proteína *E2* (63,5KDa) (Figura 30 b) recombinantes nos gradientes de purificação, demonstrando que o método de purificação em coluna de resina de níquel não foi eficiente para purificar tais

proteínas recombinantes fusionadas à cauda de histidina e à proteína GST.

Estes resultados demonstram que a alteração de temperatura (de 30°C para 37°C) do protocolo foi eficiente para melhorar a indução das proteínas *core* e E2 recombinantes, já que esta foi expressa em maior concentração e tanto a temperatura de indução como o tampão de lise contendo uréia 0,5mM não melhoraram a sua solubilidade.

→ Utilizando o tampão de lise SEM uréia

O protocolo de indução descrito no item 3.14.13 de Materiais e Métodos, teve sua temperatura de indução alterada para 37°C a fim de melhorar o rendimento da expressão das proteínas *core* e E2 recombinantes, a solubilidade e a sua purificação, sendo que para o procedimento de sonicação, como descrito em Materiais e Métodos, item 3.15.3, foi utilizado um tampão de lise sem uréia.

A Figura 31 (a e b) apresenta os resultados em SDS-PAGE 12% obtidos para a verificação da solubilidade das proteínas *core* e E2 recombinantes, após ser induzida à 37°C e sonicadas com tampão de lise sem uréia.

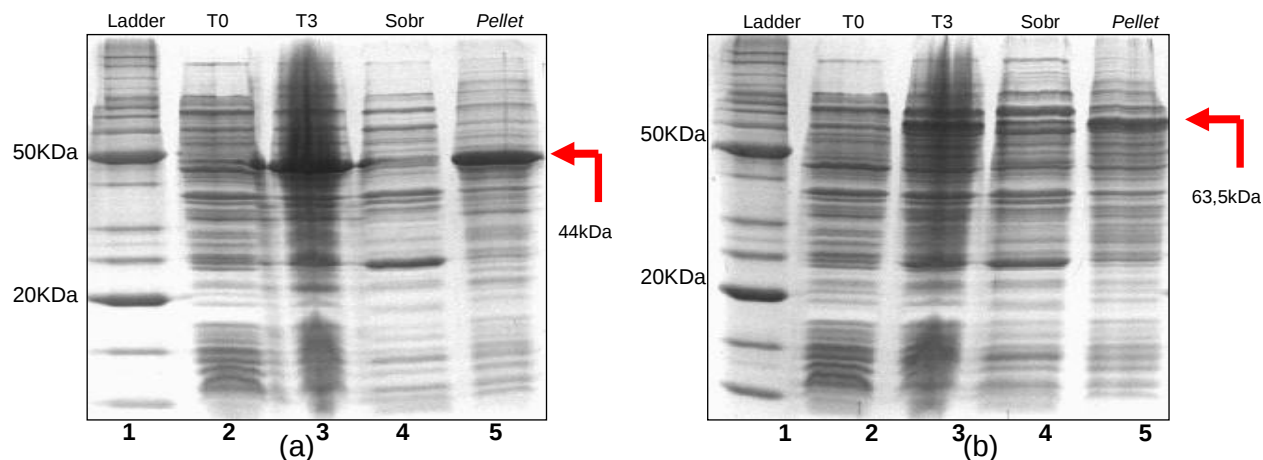


Figura 31 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado do teste de solubilidade das proteínas *core* (a) e E2 (b) recombinantes induzidas à 37°C durante 3h e sonicadas com tampão de lise sem uréia. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *BenchMark™ Protein Ladder* (10 - 220 kDa) - *Invitrogen*. Canaleta 2: T0 – tempo zero (antes do início da indução). Canaleta 3: T3 – 3h após o início da indução. Canaleta 4: Sobrenadante. Canaleta 5: *Pellet*: As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas *core* (a) e E2 (b) de aproximadamente 44kDa e 63,5kDa, respectivamente.

Analizando a Figura 31 (a e b), podemos observar a presença das bandas correspondentes às proteínas *core* e E2 recombinantes 3h após o início da indução (canaleta 3). No *pellet* (canaleta 5) observa-se uma banda espessa correspondente às proteínas de interesse, demonstrando que esta encontra-se praticamente em sua totalidade nesta fração quando comparada com o sobrenadante (canaleta 4), cuja quantidade de proteína solúvel é muito pequena, desta forma as proteínas apresentam-se insolúveis. Isto demonstra que a alteração no tampão de lise e na temperatura de indução não foram eficientes para melhorar a solubilidade das proteínas *core* e E2 recombinantes.

O sobrenadante filtrado foi purificado pelo método de purificação por afinidade com resina de glutationa, utilizando as proteínas fusionadas ao GST, como descrito no

item 3.16.2 de Materiais e Métodos. O resultado é apresentado no gel SDS-PAGE 12% da Figura 32 (a e b).

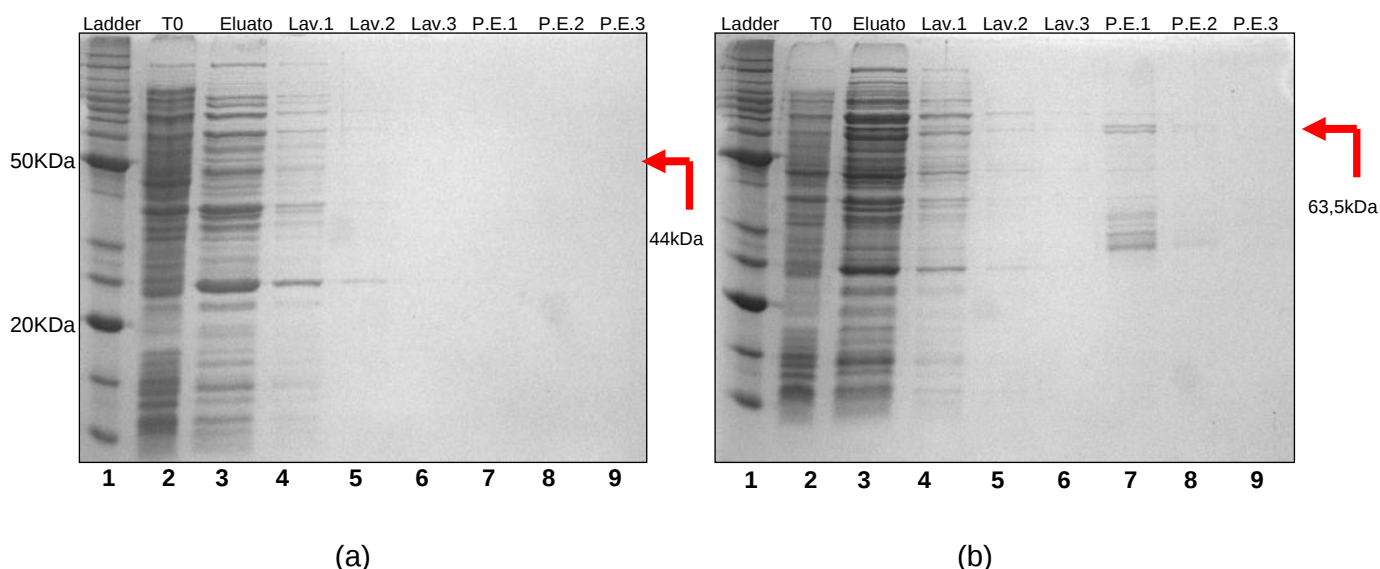


Figura 32 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da purificação das proteínas *core* e E2 recombinantes fusionadas à GST por afinidade com resina de glutationa, em diferentes gradientes de purificação, após indução à 37°C e sonicação com tampão de lise sem uréia. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *BenchMark™ Protein Ladder* (10 - 220 kDa) - *Invitrogen*. Canaleta 2: T0: tempo zero (antes do início da indução). Canaleta 3: Eluato. Canaleta 4: lavagem 1. Canaleta 5: lavagem 2. Canaleta 6: lavagem 3. Canaleta 7: proteína eluída 1. Canaleta 8: proteína eluída 2. Canaleta 9: proteína eluída 3. As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas *core* (a) e E2 (b) de aproximadamente 44KDa e 63,5KDa, respectivamente.

Analisando a Figura 32 (a e b), é possível observar, uma banda espessa na posição correspondente ao peso molecular das proteínas *core* (44kDa) e E2 (63,5KDa), recombinantes, sendo que para a E2, esta mesma banda também pode ser observada na lavagem 1 e na proteína eluída 1 (PE1) e a proteína *core* só pode ser observada na lavagem 1. Estes resultados indicam que existe uma perda de proteínas no eluato, pois

estas não estão se ligando adequadamente à resina, sobrando assim uma pequena quantidade para ser purificada. A presença das proteínas na lavagem 1, também indica perda. A banda presente em PE1 indica que este é o melhor gradiente de purificação, para a proteína E2, apesar de observar-se bandas resultantes de um processo de degradação das proteínas de interesse.

4.18.3. Mudanças no tampão de lise – Lisozima

Foi realizada uma indução nas mesmas condições descritas no item 3.14.13 de Materiais e Métodos (30°C – 300rpm), e o *pellet* foi ressuspendido e sonificado com um tampão de lise contendo uréia [0,5mM], lisozima [0,2mg/mL], NaCl [150mM], Tris [10mM] e NaH₂PO₄ [50mM].

A Figura 33 (a e b) apresenta os resultados em gel SDS-PAGE 12% obtidos para a verificação da solubilidade das proteínas *core* e E2 recombinantes, nesta nova condição de temperatura e tampão.

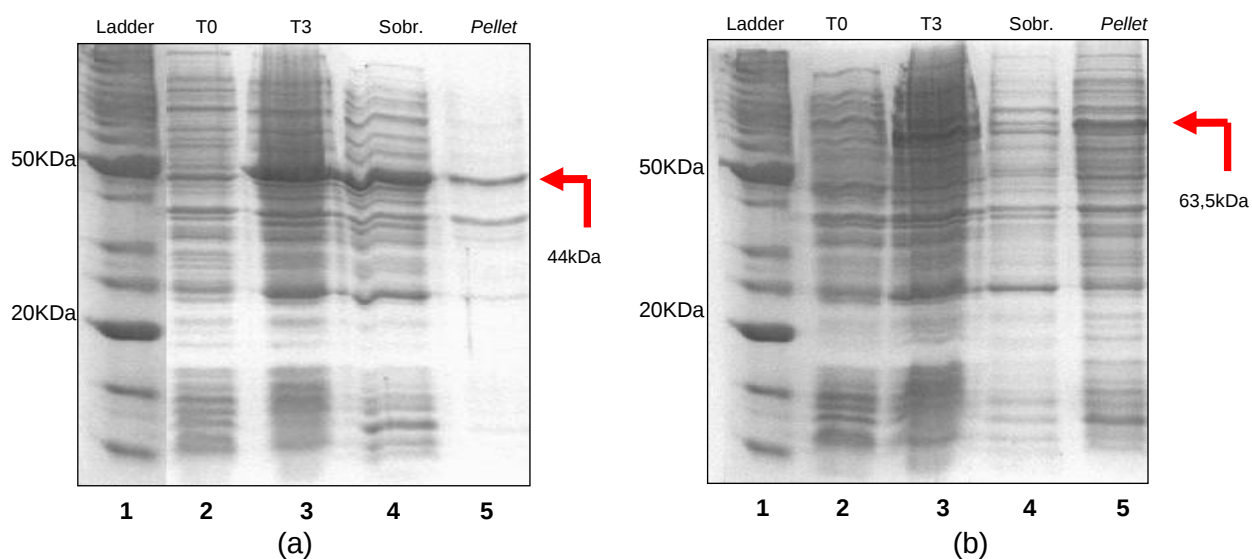


Figura 33 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado dos testes de solubilidade das proteínas *core* (a) e E2 (b) recombinantes induzidas à 30°C durante 3h e sonicadas com

tampão de lise contendo uréia [0,5mM], lisozima [0,2mg/mL], NaCl [150mM], Tris [10mM] e NaH_2PO_4 [50mM]. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *BenchMark™ Protein Ladder* (10 - 220 kDa) - *Invitrogen*. Canaleta 2: T0 – tempo zero (antes do início da indução). Canaleta 3: T3 – 3h após o início da indução. Canaleta 4: Sobrenadante. Canaleta 5: *Pellet*. As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas *core* e E2 de aproximadamente 44kDa e 63,5KDa, respectivamente.

Analisando a Figura 33 (a e b), podemos observar a presença das bandas correspondente às proteínas *core* e E2 recombinantes 3h após o início da indução (canaleta 3). No *pellet* da proteína E2 (canaleta 5) (b) observa-se uma banda espessa correspondente à proteína de interesse, demonstrando que esta encontra-se praticamente em sua totalidade nesta fração quando comparada com o sobrenadante (canaleta 4), cuja quantidade de proteína solúvel é muito pequena, desta forma ela apresenta-se insolúvel. Isto demonstra que a alteração no tampão de lise não foi capaz de melhorar a solubilidade da proteína E2 recombinante. Ao analisar a Figura 33 (a) observa-se uma banda referente a proteína *core* no sobrenadante (canaleta 4) e no *pellet* (canaleta 5), sugerindo que as novas condições favoreceram a solubilidade da proteína *core*.

As amostras foram purificadas por coluna de níquel, conforme descrito no item 3.16.1 de Materiais e Métodos, e analisadas em gel SDS-PAGE 12% como mostra a Figura 34 (a e b).

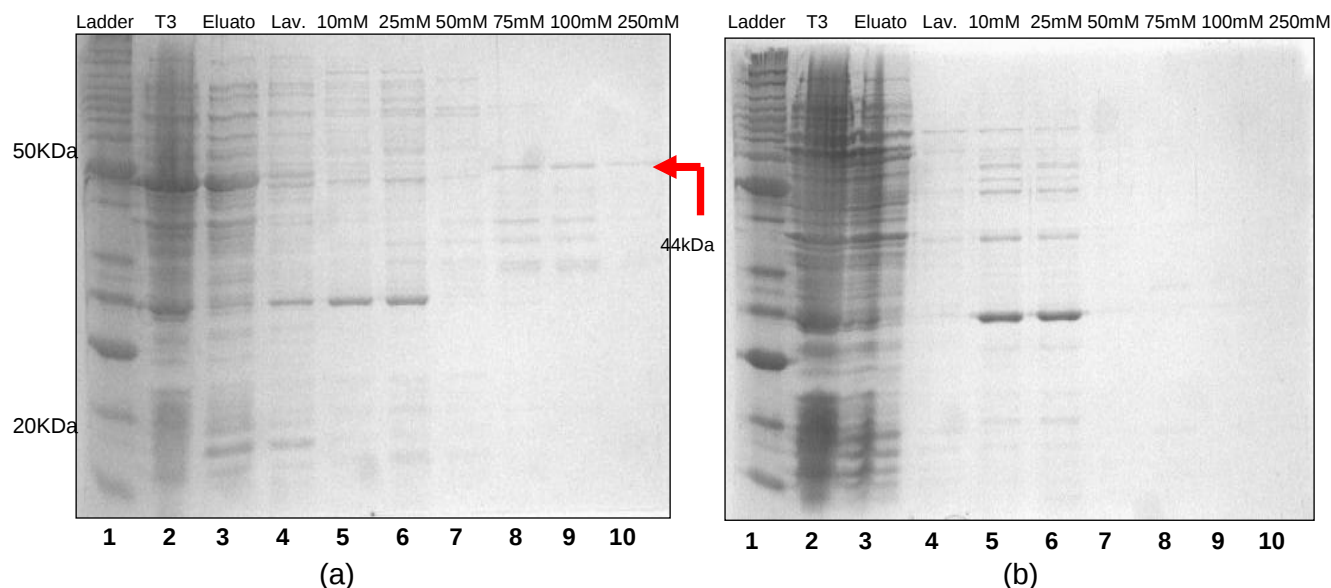


Figura 34 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da purificação em coluna de resina de níquel (*NI-NTA Superflow Qiagen*), das proteínas *core* (a) e E2 (b) recombinantes induzidas à 30°C por 3h e sonicadas com tampão de lise contendo uréia [0,5mM], lisozima [0,2mg/mL], NaCl [150mM], Tris [10mM] e NaH₂PO₄ [50mM], em diferentes gradientes de purificação. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *BenchMark™ Protein Ladder* (10 - 220 kDa) - *Invitrogen*. Canaleta 2: T3 – 3h após o início da indução. Canaleta 3: Eluato. Canaleta 4: lavagem. Canaleta 5: gradiente de purificação 10mM. Canaleta 6: gradiente de purificação 25mM. Canaleta 7: gradiente de purificação 50mM. Canaleta 8: gradiente de purificação 75mM. Canaleta 9: gradiente de purificação 100mM. Canaleta 10: gradiente de purificação 250mM. A seta indica a banda correspondente à proteína *core* de aproximadamente 44kDa.

Ao analisar a Figura 34 (a), podemos observar a presença da banda referente a proteína *core* (a) recombinante principalmente nos gradientes de purificação 75, 100 e 250mM, porem em baixa concentração devido a aparência de sua banda. Observa-se também que não há a presença da banda correspondente à proteína E2 recombinante Figura 34 (b) nos gradientes de purificação, demonstrando que o método de purificação em coluna de resina de níquel não foi eficiente para purificar a proteína E2 recombinante fusionada à cauda de histidina e à proteína GST.

Estes resultados demonstram que as alterações do protocolo não foram eficientes para melhorar indução da solubilidade e o processo de purificação para a proteína E2 recombinante, e nem o rendimento do *core*.

4.18.4. Mudanças nos tempos e temperaturas de indução e no tampão de lise

Foram realizadas várias induções como descrito no item 3.14.13 de Materiais e Métodos, mas em cada uma delas alterou-se a temperatura e o tempo de indução para: 37°C, 250rpm, 3hs; 30°C, 250rpm, 6hs; 20°C, 250rpm, 16hs e 30°C, 250rpm, 16hs.

A Figura 35 (a e b) mostra o gel SDS-PAGE 12% que avalia a temperatura de indução e a solubilidade das proteínas *core* e E2 recombinantes à 37°C por 3h e à 30°C por 6h.

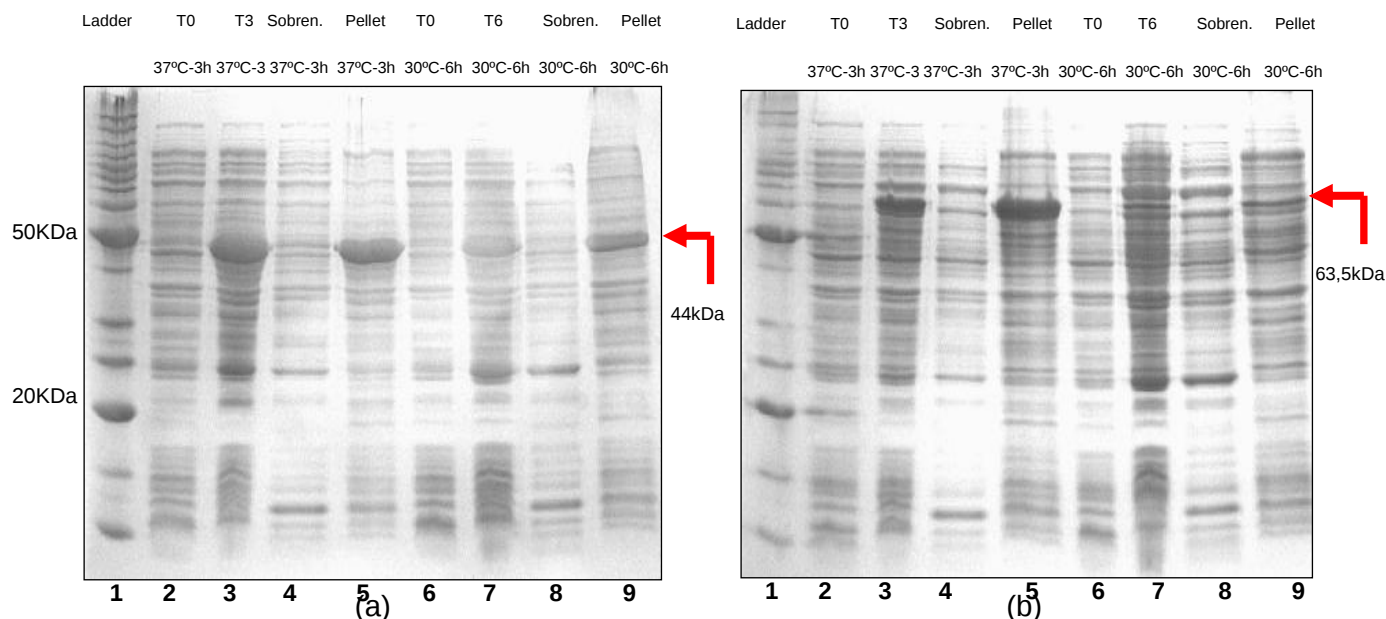


Figura 35 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado das induções à 37°C por 3hs e à 30°C por 6hs, e da solubilidade das proteínas *core* (a) e E2 (b) recombinantes nessas condições e sonicadas com tampão de lise sem uréia. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *BenchMark™ Protein Ladder* (10 - 220 kDa) - *Invitrogen*. Canaleta 2: T0 – tempo antes do início da indução à 37°C – 3h. Canaleta 3: T3 – 3hs após o início da indução à 37°C –

3h. Canaleta 4: sobrenadante da indução à 37°C – 3h. Canaleta 5: *pellet* da indução à 37°C – 3h. Canaleta 6: T0 – tempo antes do início da indução à 30°C – 6h. Canaleta 7: T6 – 6hs após o início da indução à 30°C – 6h. Canaleta 8: sobrenadante da indução à 30°C – 6h. Canaleta 9: *pellet* da indução à 30°C – 6h. As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas *core* (a) e E2 (b) de aproximadamente 44kDa e 63,5kDa respectivamente.

Ao analisar a Figura 35 (a e b), podemos observar que a indução realizada à 37°C por 3hs, apresenta uma banda em T3 (canaleta 3), na altura de 44kDa correspondente a proteína *core* (a) e na altura de 63,5kDa correspondente à proteína E2 (b) recombinantes, demonstrando que nestas condições as proteínas foram expressas. Quanto à avaliação da solubilidade nestas condições, observa-se uma banda mais forte na fração correspondente ao *pellet* (canaleta 5) (a e b), demonstrando a insolubilidade destas proteínas. Ao realizarmos a mesma análise para a indução à 30°C por 6hs, podemos observar em T6 (canaleta 7) uma banda forte na altura esperada para a proteína de interesse (a) demonstrando a expressão da proteína *core* (44kDa) e uma banda muito fina na altura esperada para a proteína E2 (b), demonstrando uma expressão muito sutil desta proteína nestas condições, assim como também se observa uma banda com características muito semelhantes na canaleta 9 (a e b), correspondente ao *pellet*, onde as proteínas encontram-se insolúveis.

A Figura 36 (a e b) apresenta o gel SDS-PAGE 12% que avalia a temperatura de indução e a solubilidade das proteínas *core* e E2 recombinantes à 37°C por 3h e à 30°C por 6h.

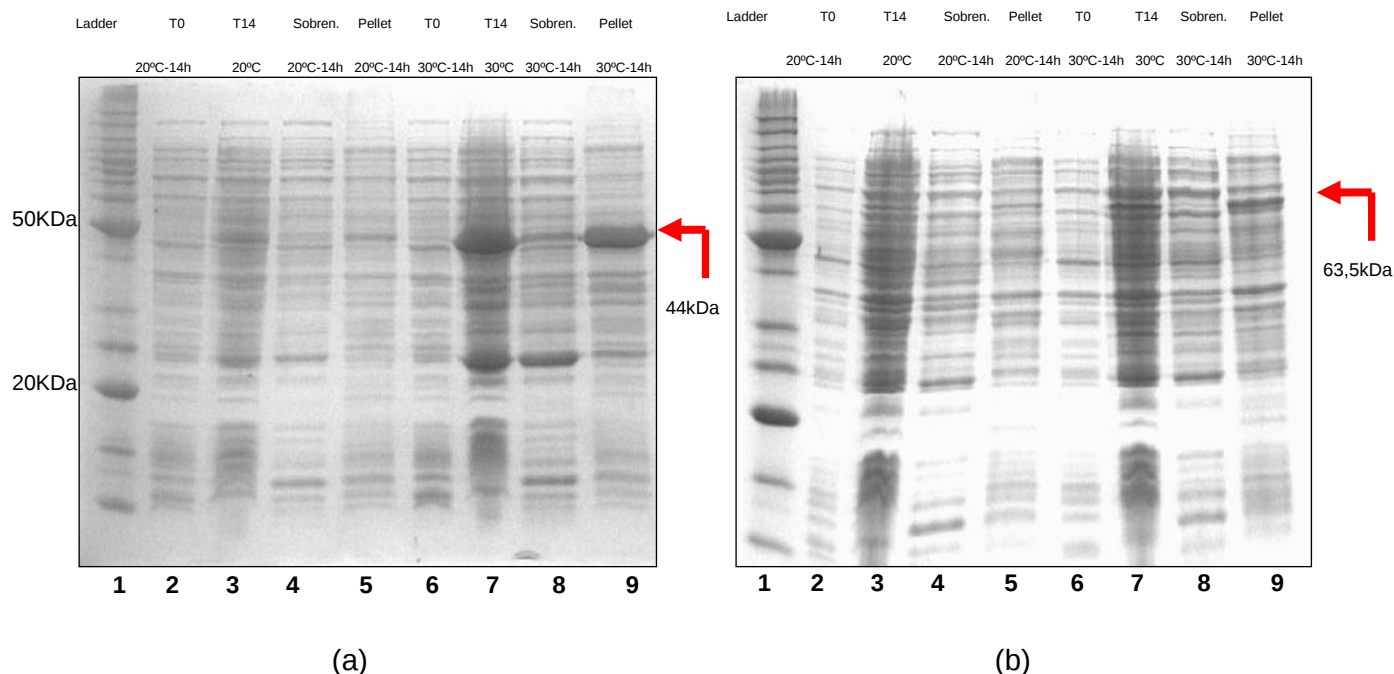


Figura 36 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado das induções à 20°C por 14hs e à 30°C por 14hs, e da solubilidade das proteínas *core* (a) e E2 (b) recombinantes nessas condições e sonicadas com tampão de lise sem uréia. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *BenchMark™ Protein Ladder* (10 - 220 kDa) - *Invitrogen*. Canaleta 2: T0 – tempo antes do início da indução à 20°C – 14h. Canaleta 3: T14 – 14hs após o início da indução à 20°C – 14h. Canaleta 4: sobrenadante da indução à 20°C – 14h. Canaleta 5: *pellet* da indução à 20°C – 14h. Canaleta 6: T0 – tempo antes do início da indução à 30°C – 14h. Canaleta 7: T14 – 14hs após o início da indução à 30°C – 14h. Canaleta 8: sobrenadante da indução à 30°C – 14h. Canaleta 9: *pellet* da indução à 30°C – 14h. As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas *core* e E2 de aproximadamente 44kDa e 63,5KDa, respectivamente.

Analisando a Figura 36 (a e b), podemos observar que a indução realizada à 20°C por 14h, apresenta uma banda em T3 (canaleta 3) (a e b) muito sutil, na altura de 44kDa correspondente à proteína *core* e na altura de 63,5KDa correspondente à proteína E2 recombinantes, que não estão presentes em T0 (canaleta 2). Uma banda com as mesmas características é observada no *pellet* (canaleta 5). Com a indução realizada à 30°C por 14hs, observa-se a mesma situação descrita para a indução à

20°C por 14hs, demonstrando que essas duas temperaturas não produzem uma expressão das proteínas *core* e E2 recombinantes satisfatória.

Assim a indução à temperatura de 37°C apresenta um melhor rendimento da expressão das proteínas de interesse.

4.18.5. Utilização de um novo tampão de lise (tampão TP)

Na tentativa de melhorar a solubilidade das proteínas *core* e E2 recombinantes, foi realizada uma indução nas mesmas condições descritas no item 3.14.13 de Materiais e Métodos (30°C – 300rpm), e o *pellet* foi ressuspendido e sonificado com um tampão de lise contendo 4mg/mL lisozima, 2% Triton X-100, 1,5% N-laurylsarcosine, 5mM DTT, chamado de tampão TP. A Figura 37 (a e b) apresenta no gel SDS-PAGE 12%, o resultado da análise da solubilidade.

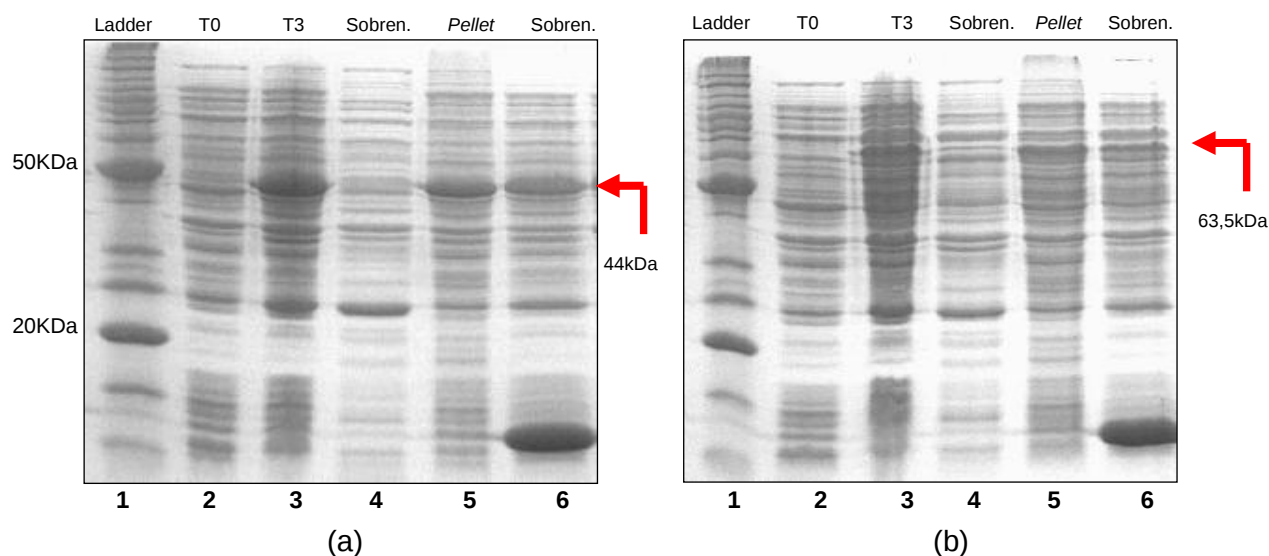


Figura 37 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado do teste de solubilidade das proteínas *core* (a) e E2 (b) recombinantes induzidas à 30°C durante 3h. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *BenchMark™ Protein Ladder* (10 - 220 kDa) - *Invitrogen*. Canaleta 2: T0 – tempo zero (antes do início da indução). Canaleta 3: T3 – 3h após o início da indução. Canaleta

4: Sobrenadante 1 (amostra sonicada com tampão de lise sem uréia). Canaleta 5: *Pellet* 1 (amostra sonicada com tampão de lise sem uréia). Canaleta 6: Sobrenadante 2 (amostra sonicada com tampão de lise contendo 4mg/mL lisozima, 2% Triton X-100, 1,5% N-laurysarcosine, 5mM DTT). As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas *core* e E2 de aproximadamente 44kDa e 63,5KDa, respectivamente.

A Figura 37 (a e b), mostra a comparação entre a sonicação com o tampão de lise sem uréia (canaletas 4 e 5) e o tampão TP (canaleta 6). Na canaleta 3 (a e b) podemos observar a presença das bandas correspondentes às proteínas *core* (44kDa) e E2 (63,5KDa) recombinantes após 3h de indução. Quando o material é sonicado com o tampão de lise sem uréia as proteínas *core* e E2 apresentam-se insolúveis (banda no *pellet*, canaleta 5), mas quando é sonicado com o tampão TP as proteínas tornam-se solúveis, como podemos observar as bandas no sobrenadante (canaleta 6), além do mais após o processo de sonicação e centrifugação não se obtém *pellet*, apenas sobrenadante.

Como controle deste novo tampão TP, foi realizada uma indução à 30°C, como descrito no item 3.14.13 de Materiais e Métodos, o material foi sonicado com tampão de lise sem uréia e em seguida purificado pelo método de purificação em coluna de resina de níquel (*NI-NTA Superflow Qiagen*), como pode ser observado na Figura 38 (a e b), do gel SDS-PAGE 12%.

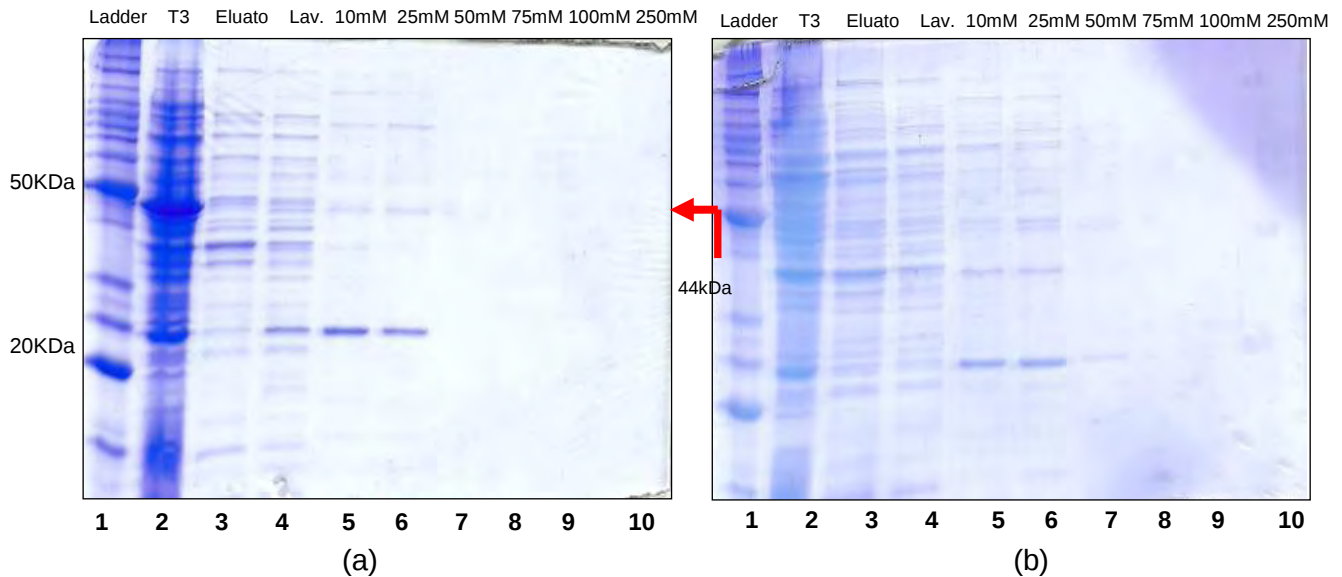


Figura 38 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da purificação em coluna de resina de níquel (*NI-NTA Superflow Qiagen*), das proteínas *core* (a) e E2 (b) recombinantes induzidas à 30°C por 3h e sonicadas com tampão de lise sem uréia. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *BenchMark™ Protein Ladder (10 - 220 kDa) - Invitrogen*. Canaleta 2: T3 – 3h após o início da indução. Canaleta 3: Eluato. Canaleta 4: lavagem. Canaleta 5: gradiente de purificação 10mM. Canaleta 6: gradiente de purificação 25mM. Canaleta 7: gradiente de purificação 50mM. Canaleta 8: gradiente de purificação 75mM. Canaleta 9: gradiente de purificação 100mM. Canaleta 10: gradiente de purificação 250mM. A seta indica a banda correspondente à proteína *core* de aproximadamente 44kDa.

Ao analisar a Figura 38 (a), podemos observar a presença da banda de 44kDa referente a proteína *core* (a) recombinante até o gradiente de purificação 25mM. Observa-se na Figura 38 (b), que não há a presença da banda correspondente à proteína E2 recombinante de 63,5KDa nos gradientes de purificação, demonstrando que o método de purificação em coluna de resina de níquel não foi eficiente para purificar a proteína E2 recombinante nem o *core* já que o processo não apresentou um resultado satisfatório.

A Figura 39 (a e b) mostra o resultado no gel SDS-PAGE 12%, da indução realizada à 30°C, como descrito no item 3.14.13 de Materiais e Métodos, quando o material foi sonificado com o tampão TP (contendo 4mg/mL lisozima, 2% Triton X-100, 1,5% N-laurylsarcosine, 5mM DTT) e em seguida purificado pelo método de purificação em coluna de resina de níquel (*NI-NTA Superflow Qiagen*).

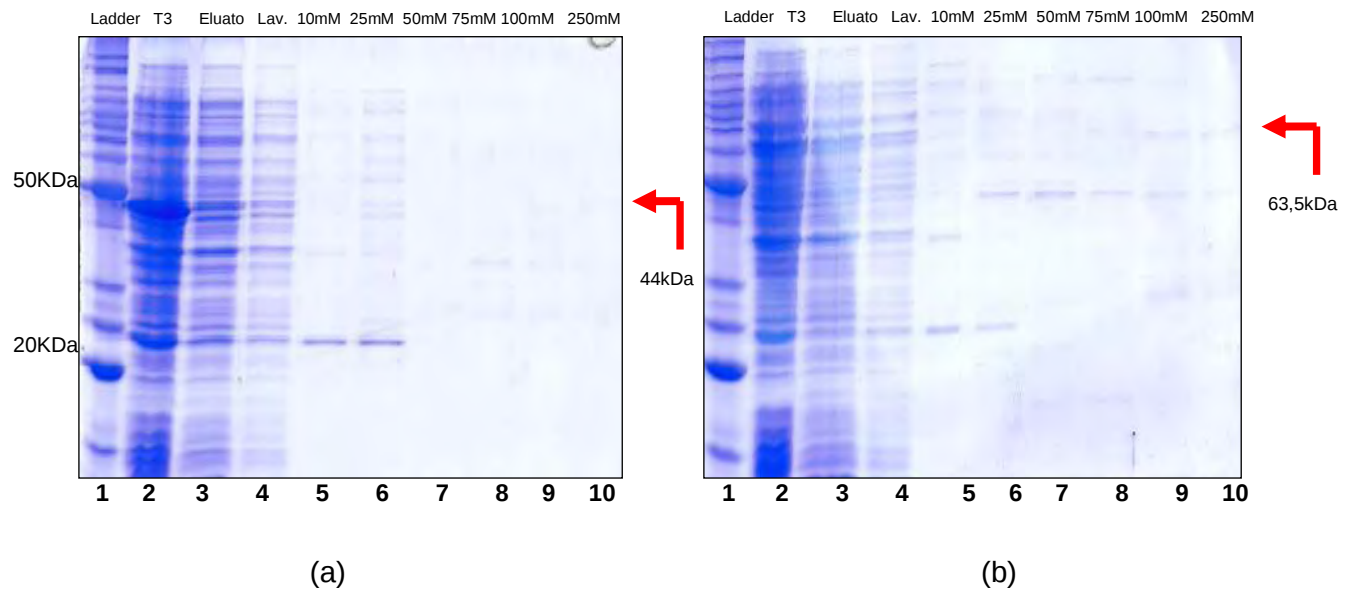


Figura 39 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da purificação em coluna de resina de níquel (*NI-NTA Superflow Qiagen*), das proteínas *core* (a) e *E2* (b) recombinantes induzidas à 30°C por 3h e sonificadas com tampão TP. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *BenchMark™ Protein Ladder* (10 - 220 kDa) - *Invitrogen*. Canaleta 2: T3 – 3h após o início da indução. Canaleta 3: Eluato. Canaleta 4: lavagem. Canaleta 5: gradiente de purificação 10mM. Canaleta 6: gradiente de purificação 25mM. Canaleta 7: gradiente de purificação 50mM. Canaleta 8: gradiente de purificação 75mM. Canaleta 9: gradiente de purificação 100mM. Canaleta 10: gradiente de purificação 250mM. As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas *core* e *E2* de aproximadamente 44kDa e 63,5kDa, respectivamente.

Ao analisar a Figura 39 (a e b), podemos observar bandas, mesmo que muito fracas, de aproximadamente 44kDa (a) e 63,5kDa (b) nos gradientes de 100 e 250mM, indicando que houve purificação.

A Figura 40 (a e b), mostra o resultado no gel SDS-PAGE 12%, da indução realizada à 30°C, como descrito no item 3.14.13 de Materiais e Métodos, quando o material foi sonificado com o tampão TP (contendo 4mg/mL lisozima, 2% Triton X-100, 1,5% N-laurylsarcosine, 5mM DTT) e em seguida purificado pelo método de purificação por afinidade com resina de glutationa, utilizando as proteínas fusionadas ao GST, como descrito no item 3.16.2 de Materiais e Métodos.

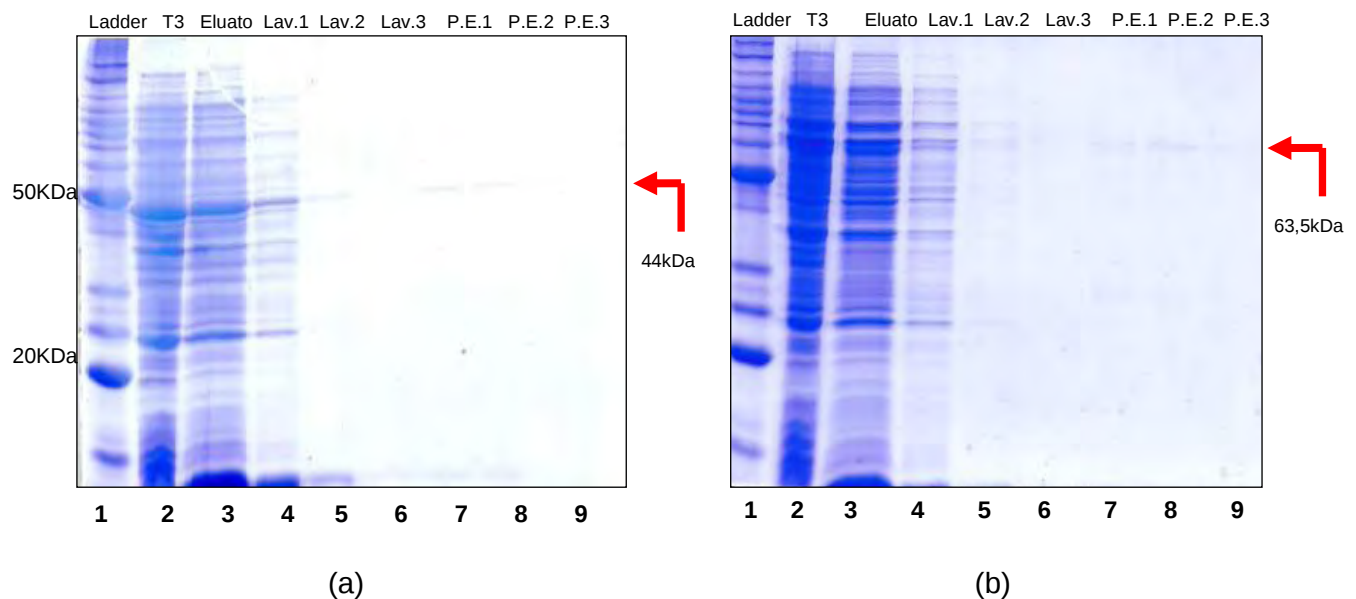


Figura 40 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da purificação das proteínas *core* (a) e E2 (b) recombinantes fusionadas à GST por afinidade com resina de glutationa, em diferentes gradientes de purificação, após indução à 30°C e sonicação com tampão TP. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *BenchMark™ Protein Ladder* (10 - 220 kDa) - *Invitrogen*. Canaleta 2: T3: 3hs após o início da indução. Canaleta 3: Eluato. Canaleta 4: lavagem 1. Canaleta 5: lavagem 2. Canaleta 6: lavagem 3. Canaleta 7: proteína eluída 1. Canaleta 8: proteína eluída 2. Canaleta 9: proteína eluída 3. As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas *core* e E2 de aproximadamente 44kDa e 63,5KDa, respectivamente.

Ao analisar a Figura 40 (a e b), podemos observar bandas, mesmo que muito fracas, de aproximadamente 44kDa (a) e 63,5KDa (b) nos gradientes das PE1 e PE2, indicando que houve purificação.

4.19. Indução da expressão gênica padronizada

Após algumas alterações no protocolo inicial, o ensaio de indução da expressão das proteínas *core* e E2 recombinantes foi padronizado como descrito no item 3.17.6 de Materiais e Métodos.

A Figura 41 (a e b) mostra a solubilidade das proteínas *core* e E2 recombinantes com o novo protocolo padronizado.

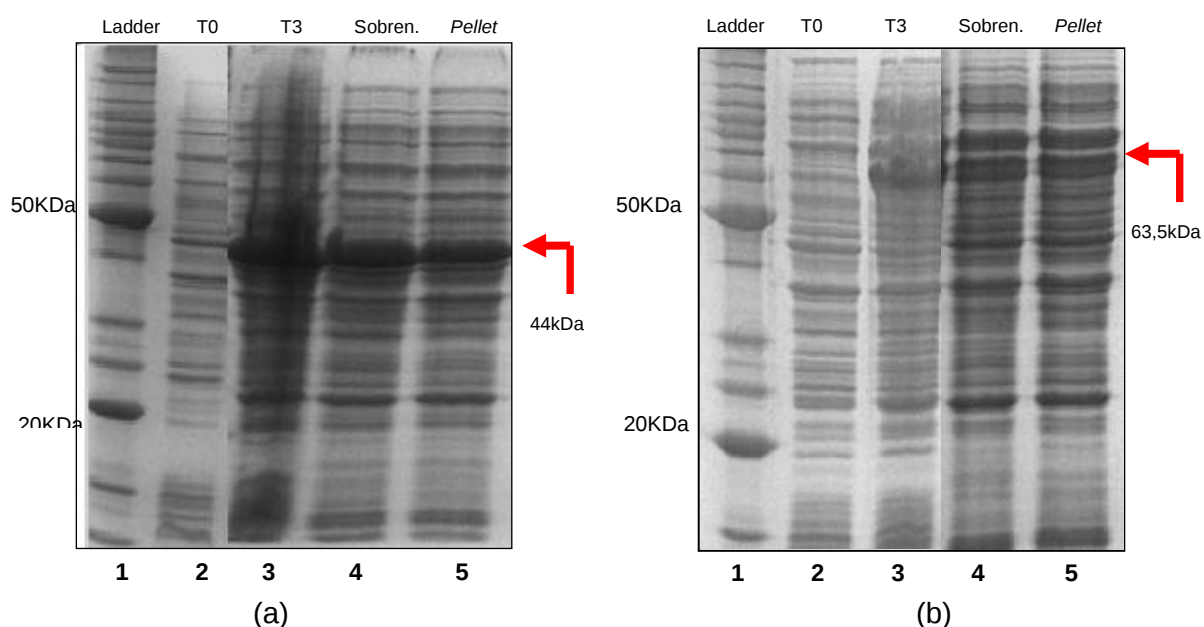


Figura 41 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado do teste de solubilidade das proteínas *core* (a) e E2 (b) recombinantes induzidas à 37°C durante 3h e sonicadas com tampão de lise sem uréia. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *BenchMark™ Protein Ladder* (10 - 220 kDa) - *Invitrogen*. Canaleta 2: T0 – tempo zero (antes do início da indução). Canaleta 3: T3 – 3h após o início da indução. Canaleta 4: Sobrenadante. Canaleta 5: *Pellet*: As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas *core* e E2 de aproximadamente 44kDa e 63,5KDa, respectivamente.

Ao analisar a Figura 41 (a e b), podemos observar a canaleta 3 e concluímos que à temperatura de 37°C e 300rpm durante 3h houve uma boa expressão das proteínas *core* e E2 recombinantes. Ao aumentarmos a quantidade de tampão de lise

sem uréia, para sonicar as amostras, para 10mL podemos observar um aumento na solubilidade das proteínas de interesse (canaleta 4 – sobrenadante) (a e b), apesar de o *pellet* (canaleta 5) (a e b) ainda apresentar grande quantidade de proteínas insolúveis.

A amostra foi purificada por afinidade com resina de glutationa e o resultado é apresentado na Figura 42 (a e b).

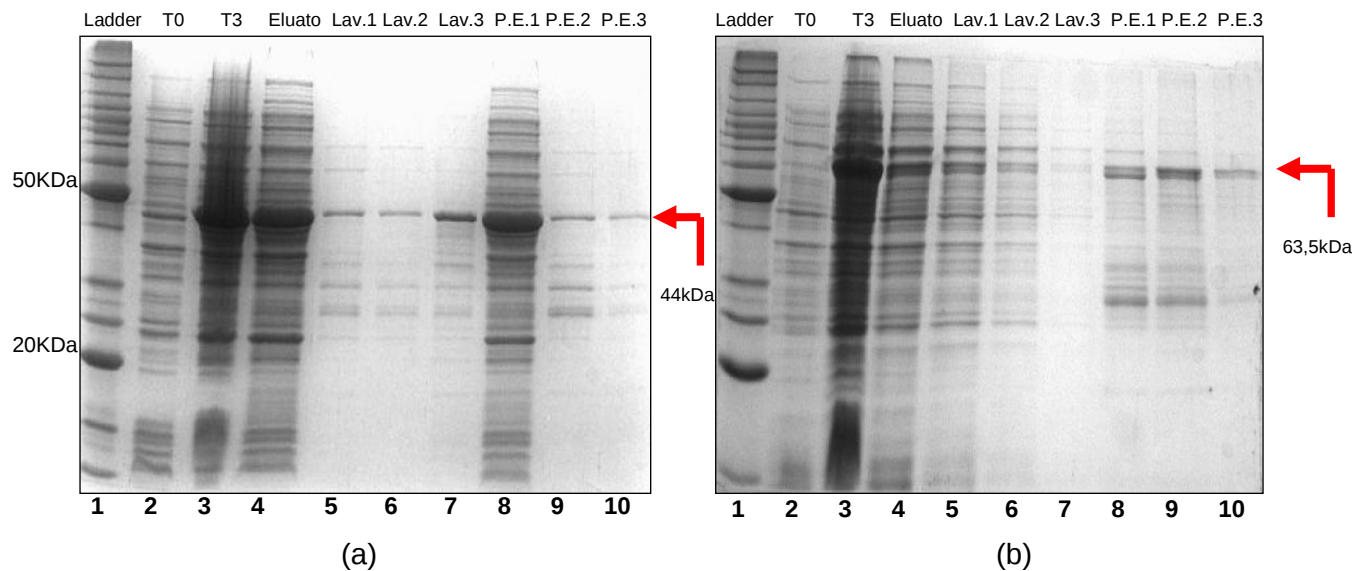


Figura 42 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da purificação das proteínas *core* (a) e E2 (b) recombinantes fusionadas à GST por afinidade com resina de glutationa, em diferentes gradientes de purificação, após indução padronizada à 37°C – 300rpm por 3h, e sonicação com tampão de lise sem uréia. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *BenchMark™ Protein Ladder* (10 - 220 kDa) - *Invitrogen*. Canaleta 2: T0 – tempo zero. Canaleta 3: T3: 3hs 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. As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas *core* e E2 de aproximadamente 44kDa e 63,5KDa, respectivamente.

Na Figura 42 (a e b) podemos observar, uma banda correspondente ao peso molecular de 44kDa (a) e 63,5KDa (b) nas proteínas eluídas 1, 2 e 3, indicando ser as proteínas *core* e E2 recombinantes purificadas. Estas frações citadas apresentam não

somente as bandas correspondente às proteínas de interesse mas também outras contaminantes, demonstrando que a purificação não foi eficiente o suficiente para obter-se apenas as proteínas *core* e E2. Também pode-se observar que parte das proteínas expressas foram perdidas 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 glutatona para verificar se as bandas com peso molecular de 44kDa e 63,5kDa correspondiam realmente às proteínas *core* e E2 recombinantes. A membrana de nitrocelulose transferida com as alíquotas da purificação das proteínas *core* e E2 estão apresentadas na Figura 43 (a e b).

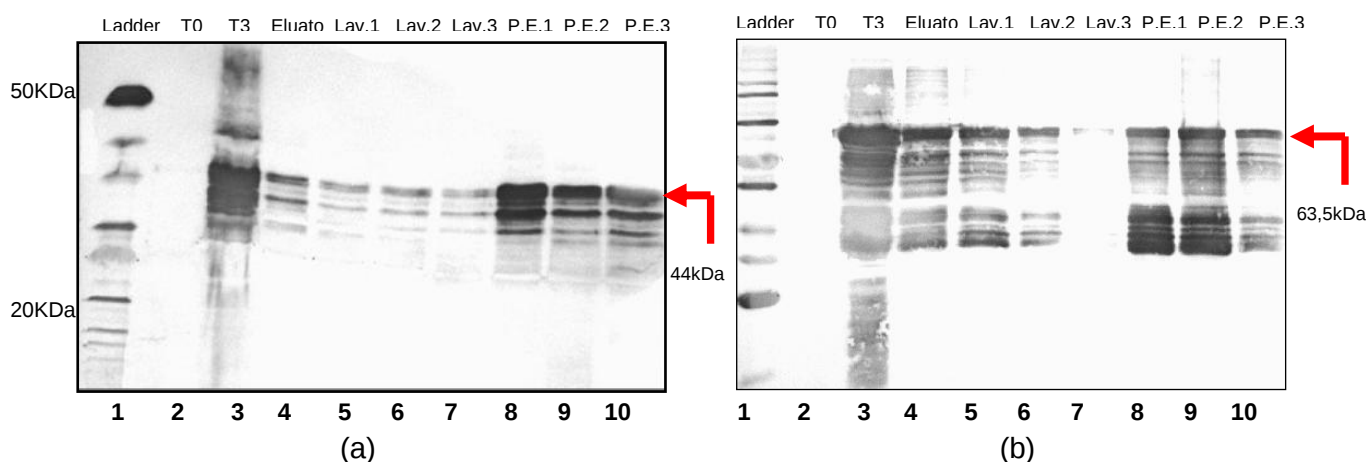


Figura 43 (a e b): Membrana de nitrocelulose transferida com os gradientes de purificação das proteínas *core* (a) e E2 (b) em resina de glutatona, resultante do ensaio de *Western Blot*. Proteínas resultantes da indução à 30°C – 300rpm – 3h. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *BenchMark™ Protein 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. As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas *core* e E2 de aproximadamente 44kDa e 63,5kDa, respectivamente.

Ao analisar a Figura 43 (a e b) podemos observar a presença das proteínas *core* e E2 em todas as canaletas com exceção de T0, pois existe uma marcação na altura de 44kDa e de 63,5kDa o que corresponde às proteínas de interesses. A análise das membranas também nos permite dizer que as bandas de pesos moleculares inferiores à 44kDa e 63,5kDa e purificadas juntamente com as proteínas de fusão GST-*core* e GST-E2 são decorrentes de um processo de degradação das proteínas em questão.

4.20. Teste de ligação nas resinas de Níquel e Glutaciona

Como muita proteína estava sendo perdida no eluato e nas lavagens pelo fato de parecer que elas não estavam se ligando à resina de purificação (níquel, foi realizado um teste de ligação a estas resinas, como mostra a Figura 44 (a e b).

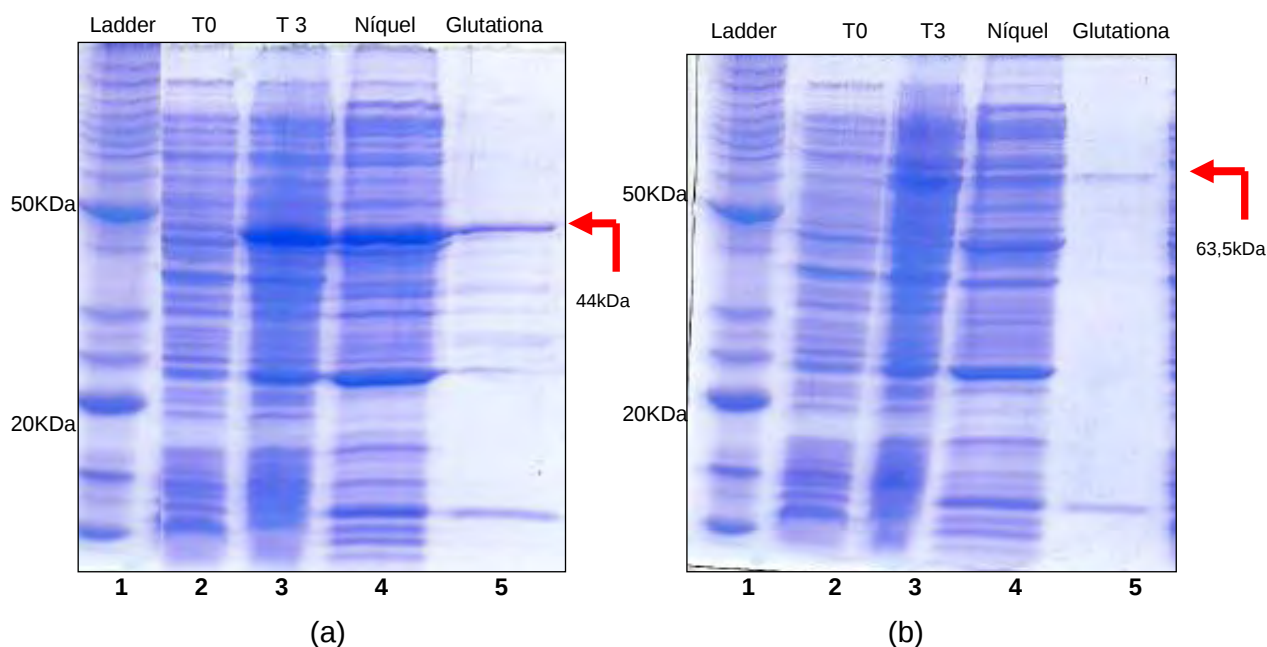


Figura 44 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado do teste de ligação nas resinas de níquel (canaleta 4) e glutaciona (canaleta 5). As proteínas *core* (a) e E2 (b) recombinantes foram induzidas à 37°C – 300rpm por 3h, e sonicadas com tampão de lise sem uréia. Canaleta

1: marcador de massa molecular - *BenchMark™ Protein Ladder (10 - 220 kDa)* - Invitrogen. Canaleta 2: T0 – tempo zero. Canaleta 3: T3: 3hs após o início da indução. Canaleta 4 (a e b): resina de níquel + proteínas *core* e E2. Canaleta 5 (a e b): resina de glutatona + proteínas *core* e E2. As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas *core* e E2 de aproximadamente 44kDa e 63,5KDa, respectivamente.

Analizando a Figura 44 (a e b) é possível observar que a proteína *core* se ligou com mais intensidade às duas resinas quando comparada com a proteína E2.

4.21. Dosagem de proteínas

As frações das proteínas *core* e E2 recombinantes resultantes do processo de purificação em coluna de resina de níquel que apresentaram uma banda mais forte no gel SDS-PAGE 12% foram quantificadas usando o kit Pierce® BCA Protein Assay Kit, conforme descrito no item 3.19 de Materiais e Métodos.

A Figura 45 apresenta a curva de calibração do kit para cálculo da concentração de proteína presente nas amostras.

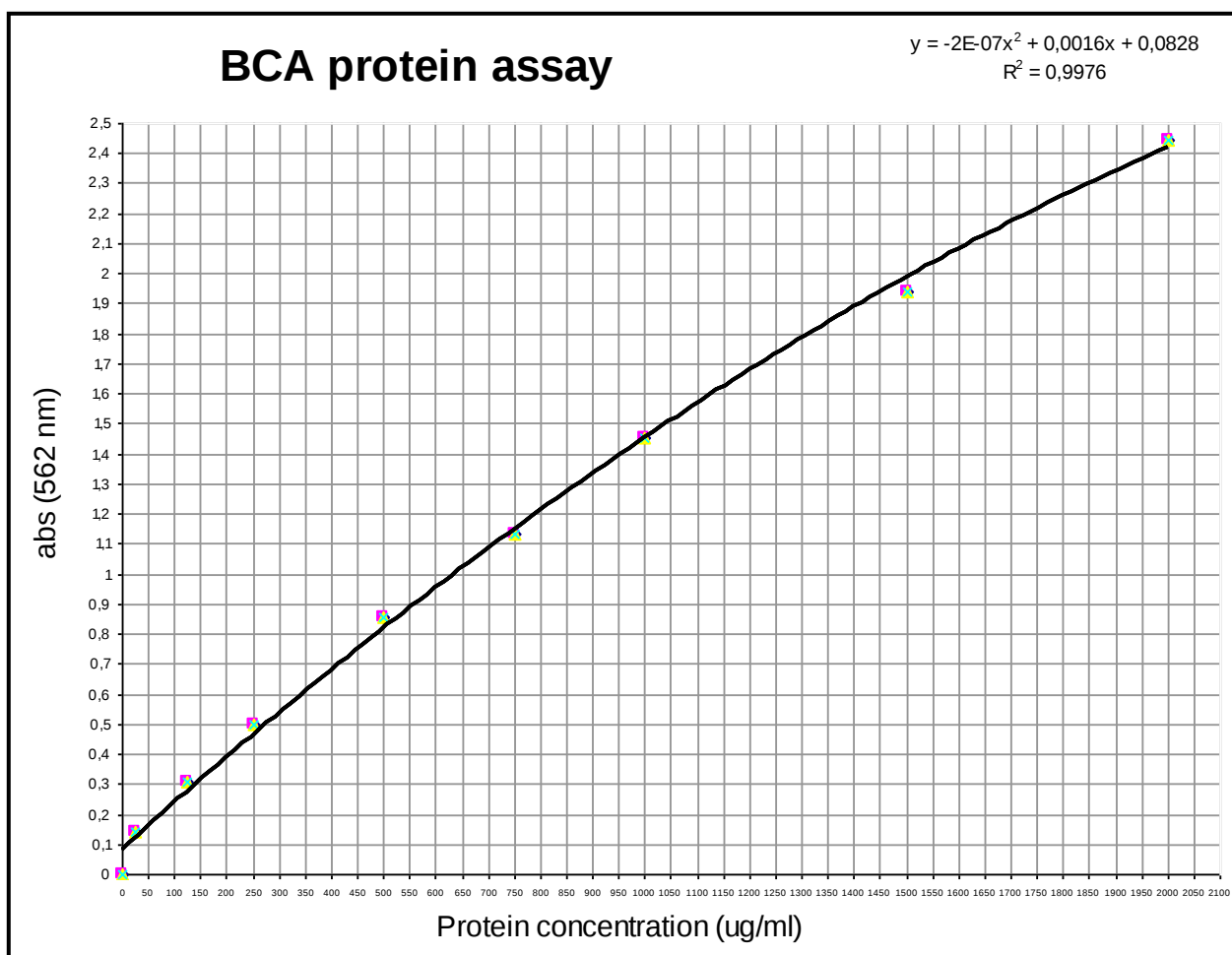


Figura 45: Curva de calibração do kit *Pierce® BCA Protein Assay Kit*.

Abaixo estão apresentadas as leituras das amostras no espectrofotômetro à 562nm e o resultado foi comparado com a curva de calibração:

- **Amostra 1 (core):** Proteína eluída 1(PE1) (indução 30°C - tampão com detergente e lisozima) → 0,150 → concentração = 30µg/mL
- **Amostra 2 (core):** Fração 75mM (indução 30°C – tampão sem imidazol) → 0,183 → concentração = 50µg/mL
- **Amostra 3 (E2):** Fração 250mM (indução 37°C – tampão com detergente e lisozima) → 0,347 → concentração = 150µg/mL

- **Amostra 4 (E2):** Fração 250mM (indução 30°C - tampão com detergente e lisozima) → 0,281 → concentração = 100µg/mL
- **Amostra 5 (E2):** Fração 75mM (indução 37°C – purificação tampão com uréia) → 0,166 → concentração = 50µg/mL
- **Amostra 6 (E2):** Fração 75mM (indução 28°C – purificação tampão com uréia) → 0,198 → concentração = 60µg/mL

4.22. Diálise

Após a realização do procedimento de diálise descrito no item 3.20 de Materiais e Métodos, o material dialisado foi analisado através de eletroforese em gel SDS-PAGE 12% para certificação da presença das proteínas de interesse no material após a diálise. A Figura 46 (a e b) mostra este resultado.

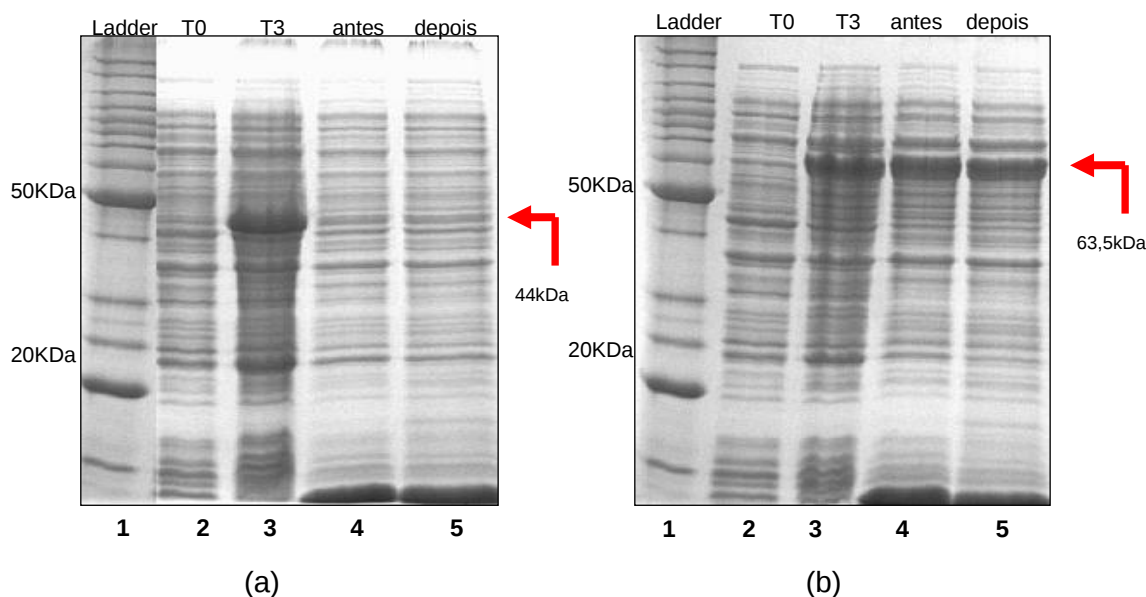


Figura 46 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando a presença das proteínas *core* (a) e E2 (b) recombinantes após a diálise. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *BenchMark™ Protein Ladder* (10 - 220 kDa) - *Invitrogen*. Canaleta 2: T0 – tempo zero. Canaleta 3: T3: 3hs após o

início da indução. Canaleta 4: sobrenadante antes da diálise. Canaleta 5: sobrenadante após a diálise. As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas *core* e E2 de aproximadamente 44kDa e 63,5kDa, respectivamente.

Analizando a Figura 46 (a e b) é possível visualizar a presença das bandas correspondentes às proteínas *core* (a) e E2 (b) recombinantes antes e após a diálise. O sobrenadante foi purificado por coluna de resina de níquel conforme descrito no item 3.16.1 de Materiais e Métodos e a purificação foi analisada em gel SDS-PAGE 12%.

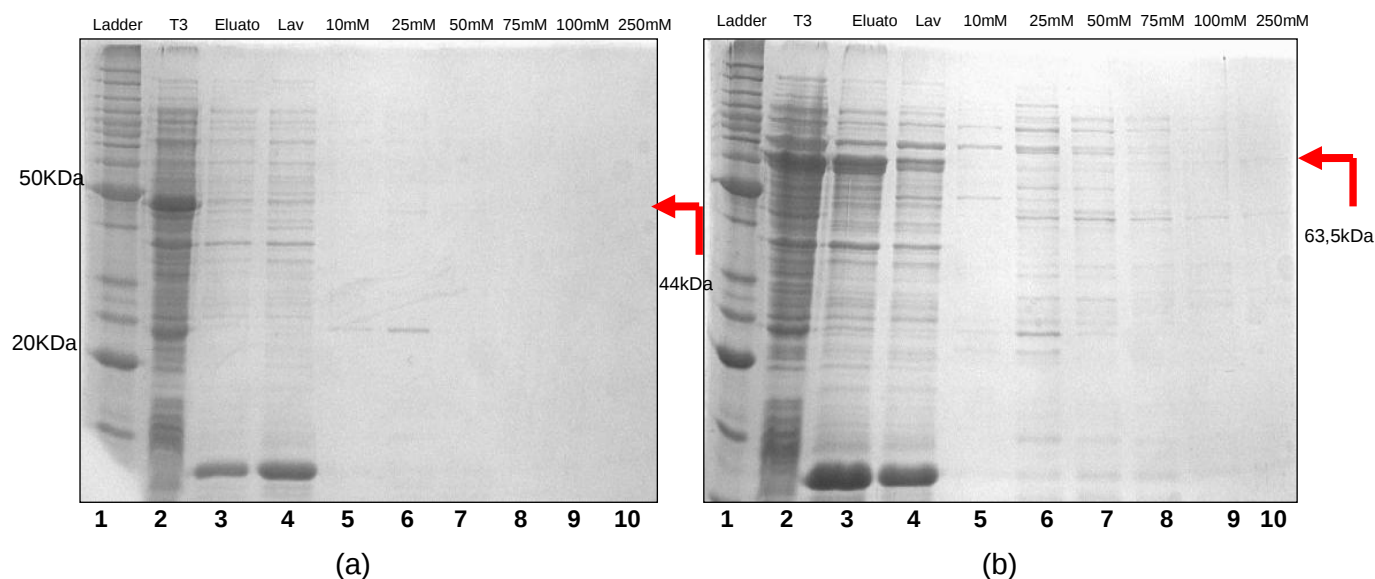


Figura 47 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da purificação em coluna de resina de níquel (*NI-NTA Superflow Qiagen*), das proteínas *core* (a) e E2 (b) recombinantes induzidas à 37°C por 3h e dialisadas em tampão PBS pH8,0. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *BenchMark™ Protein Ladder (10 - 220 kDa) - Invitrogen*. Canaleta 2: T3 – 3h após o início da indução. Canaleta 3: Eluato. Canaleta 4: lavagem. Canaleta 5: gradiente de purificação 10mM. Canaleta 6: gradiente de purificação 25mM. Canaleta 7: gradiente de purificação 50mM. Canaleta 8: gradiente de purificação 75mM. Canaleta 9: gradiente de purificação 100mM. Canaleta 10: gradiente de purificação 250mM. As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas *core* e E2 de aproximadamente 44kDa e 63,5kDa, respectivamente.

Analizando a Figura 47 (a e b), ainda observa-se perda de proteína E2 (b) no

eluato e na lavagem. As bandas dos gradientes de purificação mostram-se muito fracas, desta forma, a purificação apresentou um resultado insatisfatório. Na Figura 47 (a) não é possível observar a banda correspondente ao *core* nos gradientes de purificação. Concluímos então, que a diálise para a troca de tampão não melhorou a afinidade da proteína pela resina.

Realizou-se uma nova indução à 37°C – 300rpm – 3h e o sobrenadante foi purificado por afinidade com resina de glutatona, como descrito em Materiais e Métodos item 3.16.2. A proteína eluída 1(PE1) (que apresentava a banda mais forte no gel SDS-PAGE 12%) foi dialisada e quantificada usando o kit *Pierce® BCA Protein Assay Kit*. Como a primeira leitura ultrapassou a capacidade de dosagem do kit devido à alta concentração de proteínas, a amostra foi diluída 10x e dosada novamente.

- Proteína eluída 1 diluída 10x → Leitura do espectrofotômetro = 0,572 = $280\mu\text{g/mL} \times 10$
= 2800 $\mu\text{g/mL}$

- Proteína *core* → Proteína eluída 1 diluída 10x → Leitura do espectrofotômetro = 0,502
= $270\mu\text{g/mL} \times 10 = 2700\mu\text{g/mL}$.

As amostras foram analisadas em SDS-PAGE 12%, como mostra a Figura 48 (a e b).

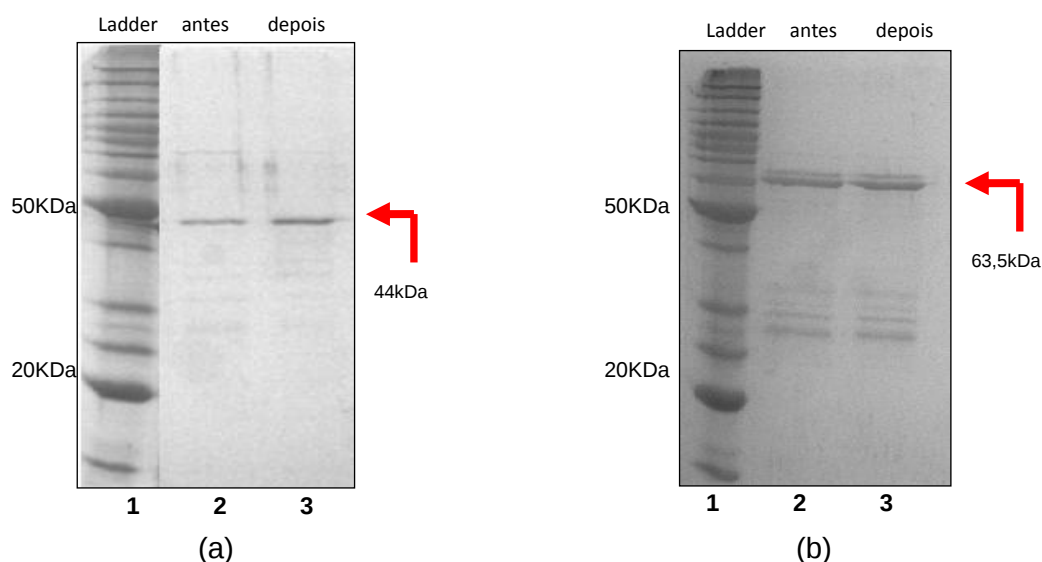


Figura 48 (a e b): Gel SDS-PAGE 12% mostrando a proteína eluída 1 (PE1) das proteínas *core* (a) e E2 (b) recombinantes. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *BenchMark™ Protein Ladder* (10 - 220 kDa) - *Invitrogen*. Canaleta 2: PE1 antes da diálise. Canaleta 3: PE1 após a diálise em tampão PBS pH8,0. As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas *core* e E2 de aproximadamente 44kDa e 63,5kDa, respectivamente.

Analizando a Figura 48 (a e b), observa-se uma banda nítida correspondente às proteínas *core* e E2 antes e depois da diálise, mostrando que elas não se perderam ou degradaram com a troca de tampão.

4.23. Purificação em coluna de glutationa utilizando bomba peristáltica

A Figura 49 mostra o resultado da purificação da proteína *core* recombinante purificada em coluna de glutationa utilizando bomba peristáltica.

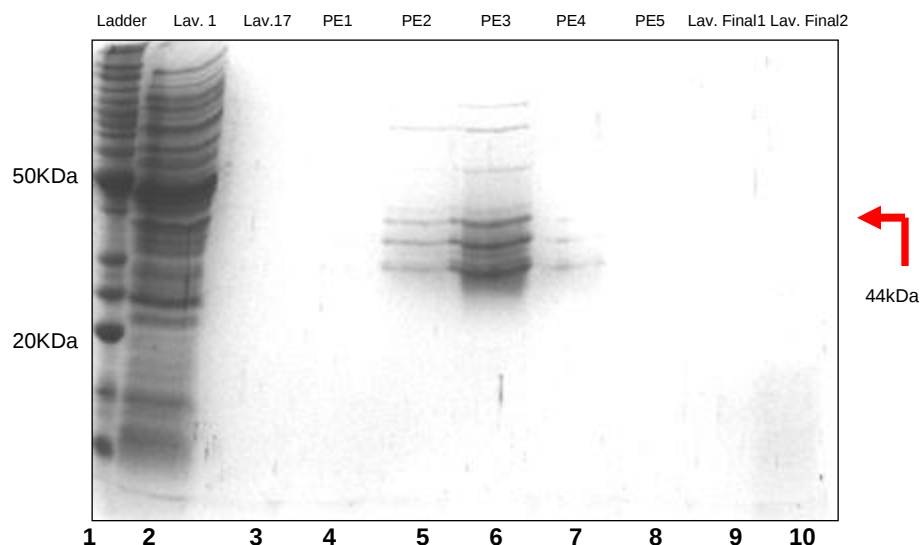


Figura 49: Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da purificação da proteína *core* recombinante fusionada à GST por coluna de glutationa utilizando bomba peristáltica, em diferentes gradientes de purificação, após indução padronizada à 37°C – 300rpm por 3h, e sonicação com tampão de lise sem uréia. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *BenchMark™ Protein Ladder* (10 - 220 kDa) - *Invitrogen*. Canaleta 2: lavagem 1. Canaleta 3: T3: lavagem 17. Canaleta 4: Proteína Eluída 1 (PE1). Canaleta 5: Proteína Eluída 2 (PE2). Canaleta 6: Proteína Eluída 3 (PE3). Canaleta 7: Proteína Eluída 4 (PE4). Canaleta 8: Proteína Eluída 5 (PE5). Canaleta 9: Lavagem final 1. Canaleta 10: Lavagem final 2. A seta indica a banda correspondente à proteína *core* de aproximadamente 44kDa.

Ao analisar a Figura 49 podemos observar a purificação da proteína *core* nas frações PE2, PE3 e PE4. Mostrando que esta metodologia de purificação foi eficiente e eliminou grande parte das bandas contaminantes, apesar da proteína de interesse ainda estar sendo degradada.

4.24. Seqüenciamento do vetor pET42a com o inserto do *core*

O resultado da análise do seqüenciamento através do BLAST está apresentado abaixo.

Nucleotide Sequence (700 letters)

Query ID	Id 48859	Subject ID	gi 209976594 gb FJ410172.1
Description	None	Description	Hepatitis C virus subtype 1a isolate HCV-1a/US/BID-V1746/2008, complete genome
Molecule type	nucleic acid	Molecule type	nucleic acid
Query Length	700	Subject Length	9272
		Program	BLASTN 2.2.25+ Citation

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#)

Graphic Summary

Distribution of 1 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse over to see the define, click to show alignments

Color key for alignment scores

<40	40-50	50-80	80-200	>=200
-----	-------	-------	--------	-------

Query 1 100 200 300 400 500 600 700

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FJ410172.1	Hepatitis C virus subtype 1a isolate HCV-1a/US/BID-V1746/2008, co	710	710	58%	0.0	98%

```

>gb|FJ410172.1| Hepatitis C virus subtype 1a isolate HCV-1a/US/BID-V1746/2008,
complete genome
Length=9272

Score = 710 bits (384), Expect = 0.0
Identities = 400/408 (99%), Gaps = 0/408 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 79 ATGAGCACAAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAACGTAACACCAACCGTCGCCACAG 138
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 236 ATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAACGTAACACCAACCGTCGCCACAG 295

Query 139 GACGTCAAGTTCCCGGGTGGCGGTGTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTGTCGCGCAGG 198
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 296 GACGTCAAGTTCCCGGGTGGCGGTGTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTGTCGCGCAGG 355

Query 199 GGCCCTAGATTGGGTGTGCGCAGCAGAGGAAGACTTCCGAGCGGTGCGAACCTCGAGGT 258
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 356 GGCCCTAGATTGGGTGTGCGCAGCAGAGGAAGACTTCCGAGCGGTGCGAACCTCGAGGT 415

Query 259 AGACGTCAGCCTATCCCCAAGGCGCGTCGGCCCGAGGGCAGGACCTGGGCCAGCCCGGG 318
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 416 AGACGTCAGCCTATCCCCAAGGCGCGTCGGCCCGAGGGCAGGACCTGGGCTCAGCCCGGG 475

Query 319 TATCCTTGGCCCTCTATGGCAATGAGGGCTGCGGGTGGGCGGGATGGCTCCTGTCCCCC 378
      || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 476 TACCCTTGGCCCTCTATGGCAATGAGGGCTGCGGGTGGGCGGGATGGCTCCTGTCCCCC 535

Query 379 CGTGGCTCTCGGCCTAGCTGGGGCCCCACAGACCCCGGCGTAGGTGCGCAACTTGGGT 438
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 536 CGTGGCTCTCGGCCTAGTTGGGGCCCCACAGACCCCGGCGTAGGTGCGCAATTGGGT 595

Query 439 AAAGTCATCGATACCCTCACGTGCGGCTTCGCCGACCTCATGGGGTAC 486
      || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 596 AAGTCATCGATACCCTTACGTGCGGCTTCGCCGACCTCATGGGGTAC 643

```

Analisando os dados obtidos com o sequenciamento concluímos que a sequência obtida possui similaridade com a sequência referente ao vírus da Hepatite C.

4.25. Indução e purificação das proteínas recombinantes *core* e E2 expressas em larga escala

Seguindo a metodologia padronizada de expressão (item 3.17.6 de Materiais e Métodos) e purificação (item 3.16.2 Materiais e Métodos), obtivemos os mesmos padrões de resultados já apresentados, portanto não serão demonstrados aqui para não ser repetitivo. As proteínas recombinantes foram 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.

Obtemos em torno de 50mL da proteína recombinante *core*-GST nas seguintes concentrações:

- Proteína eluída 1: 1182µg/mL
- Proteína eluída 2: 2492µg/mL
- Proteína eluída 3: 3253µg/mL
- Proteína eluída 4: 1526µg/mL
- Proteína eluída 5: 1801µg/mL

Obtemos em torno de 50mL da proteína recombinante E2-GST nas seguintes concentrações:

- Proteína eluída 1: 838µg/mL
- Proteína eluída 2: 7000µg/mL
- Proteína eluída 3: 2077µg/mL
- Proteína eluída 4: 7316µg/mL
- Proteína eluída 5: 2185µg/mL

4.26. Ensaios biológicos com as proteínas *core* e E2 recombinantes produzidas em bactérias (*E. coli* linhagem Rosetta)

4.26.1. Imunorreatividade das proteínas *core* e E2 recombinantes com *pool* de soros humanos positivos para VHC

Para se saber se anticorpos presentes no soro humano de indivíduos infectados com o vírus da hepatite C eram capazes de reconhecer as proteínas *core* e E2 recombinantes produzidas em um sistema de expressão procarioto e purificadas por afinidade com resina de glutationa, foi realizado um ensaio de *Western Blot*, utilizando a proteína eluída 1 (PE1) do *core* e da E2, e um *pool* de soros humanos positivos para o VHC diluído 1:20 e 1:100 em solução de bloqueio, para a verificação da imunorreatividade das proteínas em questão. Além de um controle negativo da reação, utilizando *pool* de soros negativos para o VHC e outras doenças infecciosas. A Figura 50 mostra o resultado desta reação.

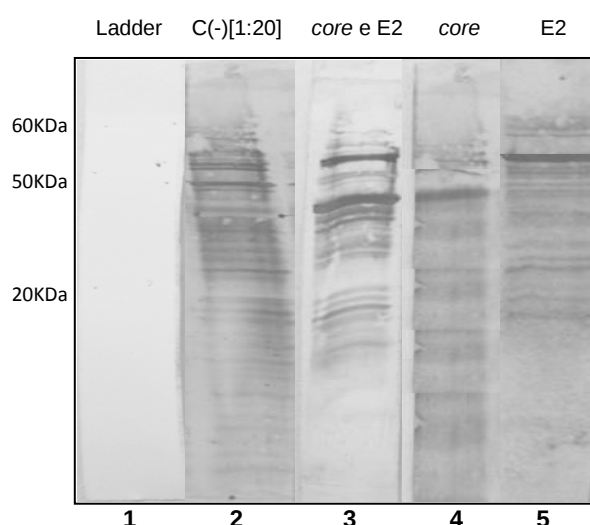


Figura 50: Tiras de membrana de nitrocelulose transferidas com as proteínas *core* e E2 recombinantes através de ensaio de *western blot* e reagidas com diluições 1:20 de soro humano positivo para VHC. C -[1:20]: soro humano negativo para VHC e outras doenças infecciosas testadas, diluído 1:20 em solução de bloqueio. Canaleta 1: marcador de massa

molecular - *BenchMarkTM Protein Ladder (kDa)* - Invitrogen. Canaleta 2: Soro controle negativo diluído 1:20. Canaleta 3: PE1 *core* e E2 após a diálise em tampão PBS pH8,0. Canaleta 4: PE1 *core* (44kDa) após a diálise. Canaleta 5: PE1 E2 (63,5kDa) após a diálise.

Após a análise da membrana observa-se que as proteínas *core* e E2 recombinantes obtidas após o processo de purificação por GST, apresentam imunorreatividade frente ao *pool* de soros de indivíduos infectados com o vírus da hepatite C.

4.26.2. Slot Blot

Para esclarecermos as dúvidas sobre a funcionalidade e imunorreatividade das proteínas recombinantes *core*-GST, E2-GST e GST frente a anticorpos presentes no *pool* de soros positivos para o VHC, foi realizado o *Slot Blot*, onde na Figura 51 (a) pode se observar reação até a concentração 3,125µg/mL, ou seja, a proteína *core* fusionada a GST reagiu especificamente com o *pool* de soro positivo para o VHC e não houve nenhuma reatividade contra a proteína GST mesmo em altas concentrações, como demonstrado na Figura 51 (b), o que reforça a aplicação destas proteínas fusionadas a GST em métodos diagnósticos para a hepatite C.

Na Figura 52 pode se observar o resultado do *Slot Blot*, que foi realizado utilizando as proteínas de fusão, *core*-GST e E2-GST, como descrito no item 3.4. de Materiais e Métodos. Em (a) está representado o resultado da proteína *core*-GST que apresentou resultado até a concentração 3,125µg/mL e em (b) o resultado da proteína E2-GST que demonstrou resultado até a concentração de 6,25µg/mL.

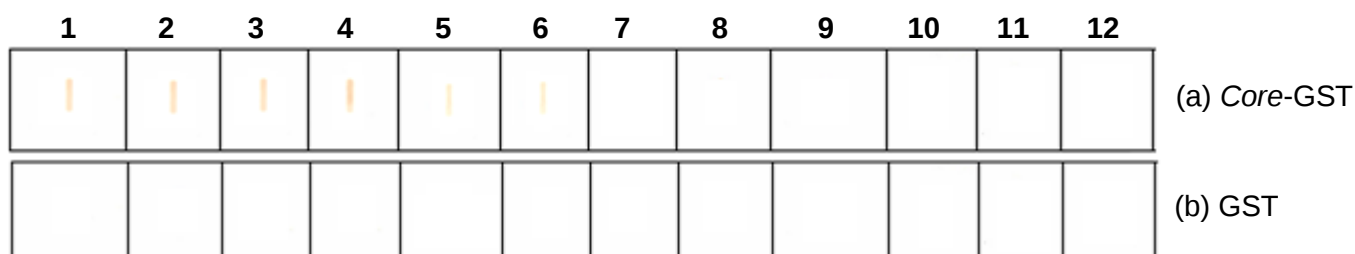


Figura 51: *Slot Blot* realizado com a proteína recombinante *core*-GST (a) diluída em PBS e em série partindo de 100µg/mL. Proteína GST (b) diluída em PBS e em série partindo de 100µg/mL. **1:**100µg/mL, **2:** 50µg/mL, **3:** 25µg/mL, **4:** 12,5µg/mL, **5:** 6,25µg/mL, **6:** 3,125µg/mL, **7:** 1,562µg/mL, **8:** 0,781µg/mL, **9:** 0,390µg/mL, **10:** 0,195µg/mL, **11:** 0,097µg/mL, **12:** 0,048µg/mL

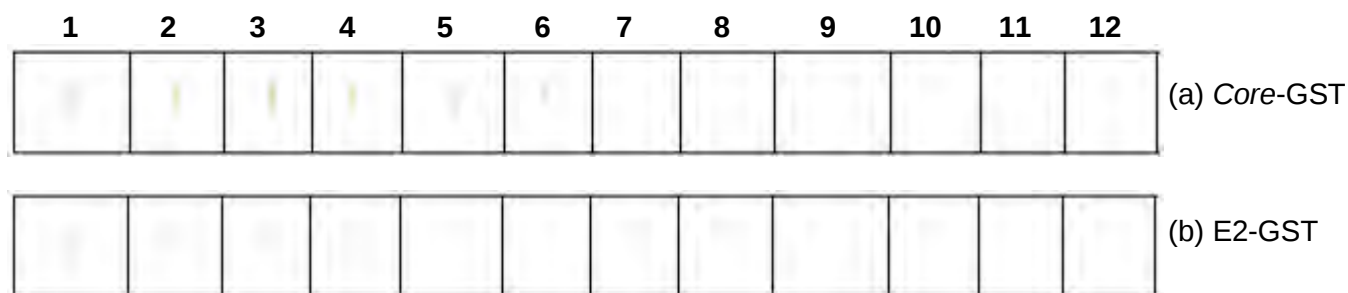


Figura 52: *Slot Blot* realizado com as proteínas recombinantes *core*-GST (a) e E2-GST (b) diluídas em PBS e em série partindo de 100µg/mL. **1:**100µg/mL, **2:** 50µg/mL, **3:** 25µg/mL, **4:** 12,5µg/mL, **5:** 6,25µg/mL, **6:** 3,125µg/mL, **7:** 1,562µg/mL, **8:** 0,781µg/mL, **9:** 0,390µg/mL, **10:** 0,195µg/mL, **11:** 0,097µg/mL, **12:** 0,048µg/mL.

Conforme demonstram nossos resultados, as proteínas de fusão purificadas *core*-GST e E2-GST reagiram especificamente com o *pool* de soros VHC positivos, porém as proteínas estão em altas concentrações e esperávamos melhores resultados, sendo assim, foram realizadas algumas modificações e serão demonstradas à frente.

4.27. Cromatografia de afinidade em coluna de glutathiona (GSTrap FF)

Na tentativa de eliminar as bandas secundárias da proteína *core* recombinante, realizamos uma nova purificação por cromatografia de afinidade em coluna de glutathiona (GSTrap FF - GE Healthcare). Após a passagem do extrato protéico na coluna, foi aplicado um gradiente de concentração do tampão de eluição contendo glutathiona reduzida. A proteína de fusão *core*-GST ligada à coluna foi eluída completamente com tampão de eluição (50mM Tris contendo 10mM de glutathiona reduzida). A Figura 53 mostra a análise das frações de proteínas eluídas.

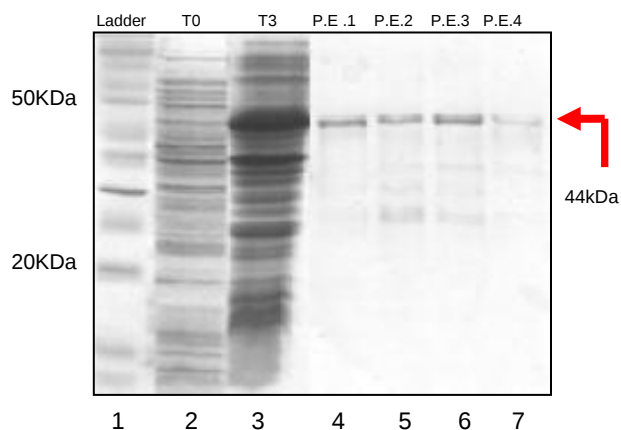


Figura 53: Gel SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da purificação da proteína *core* recombinante fusionada à GST em coluna afinidade a glutathiona (GSTrapFF). Canaleta 1: marcador de peso molecular - *Protein Marker Broad Range (kDa)* - *Biolabs*. Canaleta 2: controle negativo, T0: tempo zero (antes do início da indução). Canaleta 3: T3 - 3h após a indução. Canaleta 4: proteína eluída 1. Canaleta 5: proteína eluída 2. Canaleta 6: proteína eluída 3. Canaleta 7: proteína eluída 4. A seta indica a banda correspondente à proteína *core* de aproximadamente 44kDa.

Ao analisar a Figura 53 podemos observar a purificação da proteína *core*-GST. Este procedimento demonstrou-se eficiente, porém sem diferença significativa das

outras metodologias de purificação já realizadas, pois as bandas secundárias ainda aparecem.

4.28. Análise da Imunorreatividade das proteínas *core*-GST e E2-GST após purificação por coluna GSTrap FF

4.28.1. Western Blot

A reatividade das proteínas recombinantes frente aos anticorpos presentes no *pool* de soros VHC positivo foi verificada através da técnica de *Western blot* de acordo com item 3.27.1 de Materiais e Métodos. Houve reconhecimento destas proteínas pelos anticorpos, demonstrando suas imunogenicidades, como pode ser observado na Figura 54.

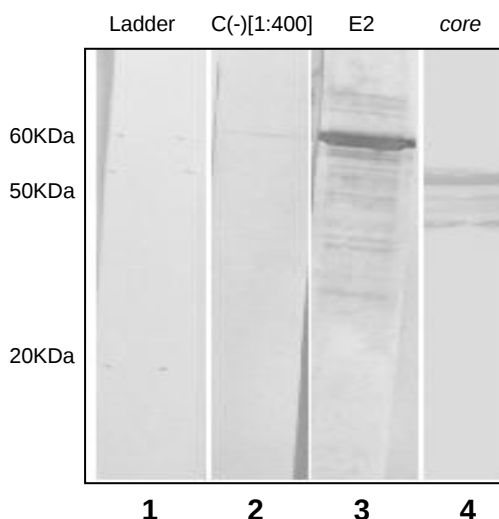


Figura 54: Tiras de membrana de nitrocelulose transferidas com as proteínas *core* e E2 recombinantes através de ensaio de *western blot* e reagidas com diluições 1:400 de soro humano positivo para VHC. C -[1:400]: soro humano negativo para VHC e outras doenças infecciosas testadas, diluído 1:400 em solução de bloqueio. Canaleta 1: marcador de massa molecular - *BenchMarkTM Protein Ladder (kDa)* - *Invitrogen*. Canaleta 2: Soro controle negativo diluído 1:400. Canaleta 3: : PE1 E2 (63,5kDa). Canaleta 4. PE3 *core* (44kDa)

Podemos observar na Figura 54 que a proteína *core* recombinante obtida após o processo de purificação em coluna de glutathione (GSTrap FF - GE Healthcare) e a proteína E2 recombinante obtida após purificação em resina de glutathione, conforme descrito no item 3.16.2 de Materiais e Métodos, apresentaram imunorreatividade frente ao *pool* de soros de indivíduos infectados com o vírus da hepatite C. A proteína recombinante *core* ainda apresenta as bandas secundárias, porém as mesmas não alteram a imunorreação com os anticorpos presentes no soro humano.

4.28.2 Slot Blot

Para avaliar a funcionalidade e imunorreatividade das proteínas *core*-GST purificada em coluna de glutathione GSTrap FF (GE Healthcare) descrito no item 3.26 de Materiais e Métodos e E2-GST purificada por resina de glutathione, conforme descrito no item 3.16.2. de Materiais e Métodos, frente aos anticorpos presentes no *pool* de soros positivos para o VHC, foi realizado o *Slot Blot*, onde esse demonstrou resultado até a concentração 0,195µg/mL utilizando a proteína *core*-GST (a) e para a E2-GST (b) até a concentração 0,781µg/mL, como mostra a Figura 55.

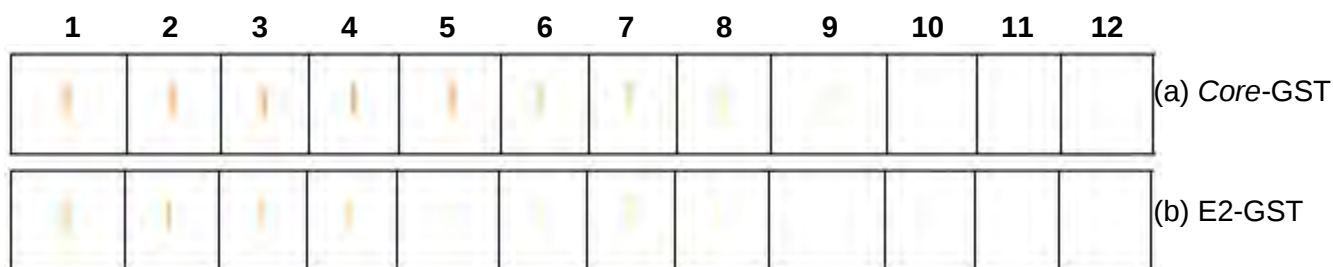


Figura 55: *Slot Blot* realizado com as proteínas recombinantes *core*-GST (a) e E2-GST (b) diluídas em tampão de bloqueio e em série partindo de 50µg/mL e com *pool* de soro controle positivo para o VHC diluído 1:400. **1:**50µg/mL, **2:** 25µg/mL, **3:** 12,5µg/mL, **4:** 6,25µg/mL, **5:**

3,125µg/mL, **6:** 1,562µg/mL, **7:** 0,781µg/mL, **8:** 0,390µg/mL, **9:** 0,195µg/mL, **10:** 0,097µg/mL, **11:** 0,048µg/mL, **12:** 0,024µg/mL

Analisando a Figura 55, observamos que as proteínas *core*-GST e a E2-GST purificadas reagiram especificamente com *pool* de soro controle contendo anticorpos anti-VHC. Comparando este resultado com o resultado do *slot blot* anterior, item 4.26.2, é possível notar a melhora na reatividade e na intensidade das bandas formadas.

4.28.3. Ensaio Imunoenzimático – ELISA

A finalidade da execução do teste ELISA foi para comparação da reatividade apresentada em relação ao *Slot Blot* e *Western Blot*. Assim, realizamos vários ensaios imunoenzimáticos de forma direta e indireta, utilizando *pool* de soros controles positivos para o VHC e *pool* de soros controles positivos para outras doenças inflamatórias e infecciosas crônicas: ASO (anti estreptolisina O), Chagas, Sífilis, Hepatite B e auto anticorpos contra antígenos intracelulares (FAN), porém serão apresentados aqui, somente os ensaios que obtivemos melhores resultados.

Os resultados positivos foram determinados quando a absorbância das amostras ficaram acima do valor *cut off*. O *cut off* foi obtido pela média aritmética das densidades ópticas de amostras negativas (n=12), acrescida de 2 desvios padrão, sendo igual a 0,3873.

4.28.3.1. ELISA de Captura-Sanduiche (Adsorção em microplaca do anticorpo policlonal anti-*core*-GST)

Este imunoensaio foi realizado para determinar a capacidade de

reconhecimento do anticorpo policlonal anti-*core*-GST, produzido em trabalhos anteriores em nosso laboratório, com diferentes concentrações da proteína *core* recombinante. Foi utilizado uma diluição de 1:40 do anticorpo policlonal anti-*core*-GST e uma diluição seriada da proteína recombinante *core*, partindo de 50µg/mL. O resultado pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2: Média e desvio padrão dos valores de absorbância obtidos na reação de ELISA de captura, utilizando anti-*core*-GST (1:40) diluído em tampão carbonato/bicarbonato e diferentes concentrações da proteína *core* fusionada a GST. O *pool* de soros controles positivos para o VHC, foi diluído 1:40 em solução de bloqueio.

Anti- <i>core</i> -GST 1:40	
CORE	ABS.450nm
50µg/mL	1,465 ± 0,015
25µg/mL	1,253 ± 0,004
12,5µg/mL	0,926 ± 0,008
6,25µg/mL	0,857 ± 0,006

4.28.3.2. ELISA de Captura-Sanduiche (Adsorção em microplaca do anticorpo monoclonal anti-GST)

A adsorção em microplacas de poliestireno do anticorpo monoclonal anti-GST permitiu uma orientação adequada das proteínas *core* e E2 recombinantes, sem que houvesse reatividade cruzada do soro humano à GST, aumentando a reatividade anti-*core* e anti-E2 presente em soros VHC positivos diluídos 1:40, como demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3: Média e desvio padrão dos valores de absorbância obtidos na reação de ELISA de captura, utilizando o anticorpo monoclonal anti-GST (1:5000) diluído em tampão carbonato/bicarbonato e as proteínas recombinantes diluídas em série em tampão de bloqueio, partindo de 50µg/mL.

Anti-GST 1:5000			
CORE	ABS. 450nm	E2	ABS.450nm
50µg/mL	2,541 ± 0,025	50µg/mL	2,128 ± 0,002
25µg/mL	1,977 ± 0,004	25µg/mL	2,031 ± 0,004
12,5µg/mL	1,745 ± 0,006	12,5µg/mL	1,436 ± 0,033
6,25µg/mL	1,409 ± 0,006	6,25µg/mL	1,079 ± 0,017

Outros ensaios imunoenzimáticos foram realizados utilizando o anticorpo monoclonal anti-GST diluído 1:10000 em tampão carbonato/bicarbonato e utilizando as proteínas recombinantes nas concentrações de 20µg/mL, 12µg/mL, 5µg/mL e 1µg/mL e *pool* de soros controles negativos e positivos para VHC e outras doenças infecciosas e inflamatórias diluídos 1:200 em solução de bloqueio, como demonstrado nas Tabelas 4 (A) utilizando a proteína core-GST e (B) utilizando a proteína E2-GST.

Tabela 4: Médias e desvio padrão dos valores de absorbâncias obtidos na reação de ELISA de captura utilizando o anticorpo monoclonal anti-GST (1:10000) diluído em tampão carbonato/bicarbonato. **(A):** diferentes concentrações da proteína *core* fusionada a GST. **(B):** diferentes concentrações da proteína E2 fusionada a GST.

Anti-GST 1:10000				
POOL SOROS 1:200	CORE-GST 20µg/mL	CORE-GST 12µg/mL	CORE-GST 5µg/mL	CORE-GST 1µg/mL
Vírus da Hepatite C (VHC NEGATIVO)	0,227 ± 0,008	0,231 ± 0,061	0,185 ± 0,008	0,132 ± 0,007
Vírus da Hepatite C (VHC POSITIVO)	2,074 ± 0,009	1,993 ± 0,085	1,805 ± 0,005	1,782 ± 0,020
Anti-Estreptolisina O (ASO)	0,452 ± 0,019	0,382 ± 0,006	0,394 ± 0,005	0,351 ± 0,015
Fatores Anti-Núcleo (FAN)	0,223 ± 0,021	0,293 ± 0,006	0,185 ± 0,006	0,177 ± 0,016
Doença de Chagas	0,303 ± 0,010	0,296 ± 0,002	0,292 ± 0,114	0,183 ± 0,015
Sífilis	0,314 ± 0,005	0,311 ± 0,027	0,281 ± 0,013	0,285 ± 0,008
Vírus da Hepatite B (VHB)	0,281 ± 0,007	0,239 ± 0,007	0,214 ± 0,004	0,188 ± 0,007

A

Anti-GST 1:10000				
POOL SOROS 1:200	E2-GST 20µg/mL	E2-GST 12µg/mL	E2-GST 5µg/mL	E2-GST 1µg/mL
Vírus da Hepatite C (VHC NEGATIVO)	0,283 ± 0,018	0,275 ± 0,011	0,203 ± 0,005	0,221 ± 0,004
Vírus da Hepatite C (VHC POSITIVO)	2,119 ± 0,028	2,105 ± 0,016	2,036 ± 0,033	2,095 ± 0,002
Anti-Estreptolisina O (ASO)	0,385 ± 0,009	0,397 ± 0,008	0,337 ± 0,003	0,321 ± 0,022
Fatores Anti-Núcleo (FAN)	0,223 ± 0,079	0,236 ± 0,004	0,210 ± 0,013	0,199 ± 0,007
Doença de Chagas	0,331 ± 0,017	0,312 ± 0,006	0,309 ± 0,006	0,283 ± 0,020
Sífilis	0,305 ± 0,024	0,293 ± 0,003	0,281 ± 0,009	0,295 ± 0,005
Vírus da Hepatite B (VHB)	0,316 ± 0,007	0,300 ± 0,083	0,297 ± 0,006	0,282 ± 0,009

B

Como podemos observar nas Tabelas 4 (A e B), está havendo uma reação cruzada com o *pool* de soros positivos para Anti-Estreptolisina O (ASO), tanto quando utilizada a proteína *core*-GST como a E2-GST. Porém essa reação inespecífica ainda

será trabalhada e eliminada, pois na concentração de 1µg/mL esta reação inespecífica não aparece.

O mesmo ensaio imunoenzimático foi repetido utilizando as proteínas recombinantes juntas (*core* + E2-GST), nas concentrações de 5µg/mL cada. Este ensaio foi realizado para verificar se aumentava a imunorreatividade frente aos anticorpos presentes no *pool* de soro positivo para o VHC, como demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5: Médias e desvio padrão dos valores de absorbâncias obtidos na reação de ELISA de captura utilizando o anticorpo monoclonal anti-GST (1:10000) diluído em tampão carbonato/bicarbonato e as proteínas recombinantes nas concentrações de 5µg/mL cada.

Anti-GST 1:10000	
<i>POOL SOROS 1:200</i>	<i>CORE-GST 5µg/mL + E2-GST 5µg/mL</i>
Vírus da Hepatite C (VHC NEGATIVO)	0,217 ± 0,027
Vírus da Hepatite C (VHC POSITIVO)	2,903 ± 0,050
Anti-Estreptolisina O (ASO)	0,418 ± 0,006
Fatores Anti-Núcleo (FAN)	0,209 ± 0,005
Doença de Chagas	0,199 ± 0,008
Sífilis	0,231 ± 0,008
Vírus da Hepatite B (VHB)	0,226 ± 0,011

Analisando a Tabela 5 podemos observar um aumento na imunorreação de captura quando utilizada as proteínas recombinantes juntas (*core* + E2) e o *pool* de soro positivo para o VHC, o que significa que houve uma melhora na reatividade frente aos anticorpos presentes no soro, porém está havendo uma pequena reatividade

inespecífica com o *pool* de soros positivo para ASO. Frente a isso, realizamos mais um ensaio, utilizando o *pool* de soros diluídos 1:400 e as proteínas recombinantes nas concentrações de 1µg/mL cada, como pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6: Médias e desvio padrão dos valores de absorbâncias obtidos na reação de ELISA de captura utilizando o anticorpo monoclonal anti-GST (1:10000) diluído em tampão carbonato/bicarbonato e as proteínas recombinantes nas concentrações de 1µg/mL cada.

Anti-GST 1:10000	
POOL SOROS 1:400	CORE-GST 1µg/mL + E2-GST 1µg/mL
Vírus da Hepatite C (VHC NEGATIVO)	0,198 ± 0,015
Vírus da Hepatite C (VHC POSITIVO)	2,733 ± 0,032
Anti-Estreptolisina O (ASO)	0,208 ± 0,047
Fatores Anti-Núcleo (FAN)	0,236 ± 0,008
Doença de Chagas	0,180 ± 0,031
Sífilis	0,211 ± 0,002
Vírus da Hepatite B (VHB)	0,193 ± 0,005

Analisando a Tabela 6 podemos notar que a imunorreatividade com o *pool* de soros positivos para o VHC continua bem elevada, mesmo com a diminuição da concentração das proteínas recombinantes e da diluição dos *pools* de soros. Também podemos observar que a reatividade cruzada não mais ocorreu com o *pool* de soros positivo para anti-estreptolisina O.

4.28.3.3. ELISA Indireto (Adsorção em microplaca das proteínas recombinantes *core* e E2 fusionadas a GST)

Este ensaio foi realizado para verificar a capacidade de anticorpos anti-VHC reconhecerem as proteínas recombinantes *core* e E2 adsorvidas na microplaca de poliestireno. Estas proteínas foram utilizadas nas concentrações de 20µg/mL, 12µg/mL, 5µg/mL e 1µg/mL, conforme descrito no item 3.6.3.3. de Materiais e Métodos. As Tabelas 7 (A e B) demonstram que houve a imunorreação dos anticorpos com as proteínas *core*-GST e E2-GST.

Tabela 7: Médias e desvio padrão dos valores de absorbâncias obtidos na reação de ELISA indireto utilizando a proteína recombinante *core* **(A)** e a proteína recombinante E2 **(B)** em diferentes concentrações e *pool* de soros controles negativo e positivo para o VHC e para outras doenças infecciosas e inflamatórias diluídos 1:200 em tampão de bloqueio.

POOL SOROS 1:200	CORE-GST 20µg/mL	CORE-GST 12µg/mL	CORE-GST 5µg/mL	CORE-GST 1µg/mL
Vírus da Hepatite C (VHC NEGATIVO)	0,214 ± 0,012	0,202 ± 0,006	0,186 ± 0,010	0,154 ± 0,004
Vírus da Hepatite C (VHC POSITIVO)	2,582 ± 0,052	2,491 ± 0,008	2,359 ± 0,025	2,221 ± 0,013
Anti-Estreptolisina O (ASO)	0,382 ± 0,018	0,345 ± 0,011	0,328 ± 0,010	0,301 ± 0,031
Fatores Anti-Núcleo (FAN)	0,263 ± 0,049	0,252 ± 0,016	0,230 ± 0,027	0,228 ± 0,008
Doença de Chagas	0,293 ± 0,016	0,287 ± 0,011	0,266 ± 0,014	0,254 ± 0,007
Sífilis	0,312 ± 0,008	0,303 ± 0,019	0,285 ± 0,015	0,297 ± 0,005
Vírus da Hepatite B (VHB)	0,285 ± 0,015	0,274 ± 0,010	0,269 ± 0,007	0,278 ± 0,014

A

POOL SOROS 1:200	E2-GST 20µg/mL	E2-GST 12µg/mL	E2-GST 5µg/mL	E2-GST 1µg/mL
Vírus da Hepatite C (VHC NEGATIVO)	0,279 ± 0,011	0,273 ± 0,010	0,265 ± 0,003	0,253 ± 0,006
Vírus da Hepatite C (VHC POSITIVO)	2,432 ± 0,020	2,320 ± 0,031	2,214 ± 0,005	2,195 ± 0,004
Anti-Estreptolisina O (ASO)	0,359 ± 0,010	0,365 ± 0,014	0,353 ± 0,035	0,327 ± 0,002
Fatores Anti-Núcleo (FAN)	0,292 ± 0,011	0,953 ± 0,013	0,286 ± 0,004	0,254 ± 0,006
Doença de Chagas	0,283 ± 0,007	0,278 ± 0,011	0,289 ± 0,010	0,275 ± 0,020
Sífilis	0,312 ± 0,005	0,308 ± 0,009	0,273 ± 0,002	0,260 ± 0,015
Vírus da Hepatite B (VHB)	0,315 ± 0,007	0,309 ± 0,006	0,281 ± 0,009	0,294 ± 0,012

B

4.28.3.4. ELISA Indireto (Adsorção em microplaca das proteínas recombinantes *core* e E2 fusionadas a GST juntas)

Este ensaio foi realizado para verificar um aumento na imunorreatividade e especificidade utilizando uma mistura de proteínas recombinantes (*core*-GST e E2-GST). Na Tabela 8 podemos observar tal reação.

Tabela 8: Médias e desvio padrão dos valores de absorbâncias obtidos na reação de ELISA indireto utilizando uma mistura das proteínas recombinantes *core* e E2 nas concentrações de 2µg/mL cada e *pool* de soros controles negativo e positivo para o VHC e para outras doenças infecciosas e inflamatórias diluídos 1:200 em tampão de bloqueio.

POOL SOROS 1:200	CORE-GST 2µg/mL + E2-GST 2µg/mL
Vírus da Hepatite C (VHC NEGATIVO)	0,183 ± 0,007
Vírus da Hepatite C (VHC POSITIVO)	2,986 ± 0,020
Anti-Estreptolisina O (ASO)	0,411 ± 0,011
Fatores Anti-Núcleo (FAN)	0,185 ± 0,010
Doença de Chagas	0,234 ± 0,015
Sífilis	0,280 ± 0,016
Vírus da Hepatite B (VHB)	0,228 ± 0,018

Analisando a Tabela 8, é possível notar um aumento significativo na imunorreatividade deste ensaio indireto, pois utilizando a mistura das proteínas recombinantes o imunoensaio se torna mais específico e sensível, porém está havendo uma pequena reatividade inespecífica com o *pool* de soros positivo para ASO. Frente a isso, realizamos mais um ensaio, utilizando o *pool* de soros diluídos 1:400 e as proteínas recombinantes nas concentrações de 1µg/mL cada, como pode ser observado na Tabela 9.

Tabela 9: Médias e desvio padrão dos valores de absorbâncias obtidos na reação de ELISA indireto utilizando uma mistura das proteínas recombinantes *core* e E2 nas concentrações de 1µg/mL cada e *pool* de soros controles negativo e positivo para o VHC e para outras doenças infecciosas e inflamatórias diluídos 1:400 em tampão de bloqueio.

POOL SOROS 1:400	CORE-GST 1µg/mL + E2-GST 1µg/mL
Vírus da Hepatite C (VHC NEGATIVO)	0,121 ± 0,016
Vírus da Hepatite C (VHC POSITIVO)	2,391 ± 0,023
Anti-Estreptolisina O (ASO)	0,287 ± 0,009
Fatores Anti-Núcleo (FAN)	0,162 ± 0,018
Doença de Chagas	0,201 ± 0,002
Sífilis	0,189 ± 0,015
Vírus da Hepatite B (VHB)	0,216 ± 0,004

Analisando a Tabela 8 podemos notar que a imunorreatividade com o *pool* de soros positivos para o VHC utilizando a mistura das proteínas recombinantes nas concentrações de 1µg/mL continua bem elevada e que não a reação inespecífica com o *pool* de soros positivos para o ASO não mais ocorreu após as alterações realizadas.

4.29. Teste Imunocromatográfico

O desenvolvimento de um ensaio de imunocromatográfico é complexo em virtude de inúmeros componentes críticos agrupados, que são utilizados para se produzir um teste funcional. A adsorção dos anticorpos, das proteínas recombinantes e da proteína A, na superfície das partículas do ouro coloidal estão mediadas pelas forças *London-van der Waals*.

4.29.1. Conjugação com ouro coloidal

Para avaliar se a conjugação estava ocorrendo no pH determinado e nas concentrações estabelecidas dos anticorpos policlonais anti-*core*-GST, das proteína recombinantes (*core* e E2-GST), da proteína A extracelular e do anticorpo anti-IgG humano, foi realizado o ensaio em microplaca, conforme descrito no item 3.30.1 de Materiais e Métodos. A absorção a 540nm representada pelo ouro coloidal estável e a 620nm para avaliação do ouro instável foi determinada, permitindo uma quantificação completa do processo. Dessa forma, obtivemos os seguintes resultados:

- Anticorpo policlonal anti-*core*-GST de camundongo: concentração 150µg/mL e solução de ouro coloidal pH 7,0. Absorbância 540nm – 620nm = 0,248
- Anticorpo policlonal anti-*core*-GST de coelho: concentração 300µg/mL e solução de ouro coloidal pH 7,0. Absorbância 540nm – 620nm = 0,273
- Proteínas recombinantes *core* e E2 do VHC: concentração 100µg/mL cada e solução de ouro coloidal pH 7,0. Absorbância 540nm – 620nm = 0,487
- Proteína A extracelular: concentração 10µg/mL e solução de ouro coloidal pH 7,0. Absorbância 540nm – 620nm = 0,305

- Anticorpo anti IgG humana: concentração 250µg/mL e solução de ouro coloidal pH 7,0.

Absorbância 540nm – 620nm = 0,289

4.29.2. Avaliação da reação da proteína A com o conjugado *core*-GST-Ouro coloidal de 20nm

Para a padronização do teste imunocromatográfico foi necessário testar a reação alvo, que consiste na ligação das partículas de ouro coloidal de 20nm conjugadas com a proteína *core*-GST e recobertas com anticorpos presentes no *pool* de soros positivos para o VHC utilizando como ligante a proteína A adsorvida na membrana de nitrocelulose, conforme descrito no item 3.30.4. de Materiais e Métodos.

Na Figura 56, podemos observar que houve reação satisfatória utilizando as concentrações de 10 e 5µg/µL da proteína A, portanto vamos considerar a melhor concentração para uso de 5µg/µL.

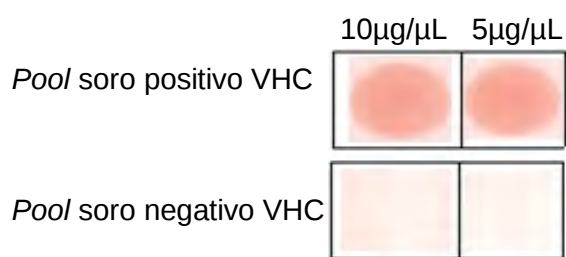


Figura 56: Capacidade de captura da proteína A e sua ligação com anticorpos presentes no *pool* de soro positivo para o VHC e o reconhecimento destes com o conjugado *core*-GST-ouro coloidal.

4.29.3. Avaliação da reação do anticorpo anti-core-GST policlonal com o conjugado core-GST-Ouro coloidal de 20nm

Para padronizar as condições experimentais do teste imunocromatográfico, foi realizado o *imunoblot*, utilizando o anticorpo anti-core-GST policlonal produzido em camundongo nas concentrações de 2,5 e 1,0mg/mL adsorvido na membrana de nitrocelulose e após bloqueio e lavagens foi aplicado o conjugado core-GST-ouro coloidal, produzido conforme descrito no item 3.30.3. de Materiais e Métodos.

Conforme demonstra a Figura 57, podemos observar que o melhor resultado se deu utilizando o anticorpo policlonal na concentração de 2,5mg/mL.

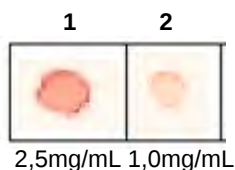


Figura 57: Avaliação da reatividade do anticorpo anti-core-GST adsorvido na membrana de nitrocelulose dirigidos contra a proteína recombinante conjugada com ouro coloidal. Em **1:** concentração do anticorpo policlonal anti-core de 2,5mg/mL, **2:** concentração do anticorpo policlonal anti-core de 1,0mg/mL.

4.29.4. Teste de reatividade do ensaio imunocromatográfico

Após definidas as concentrações e as tiras imunocromatográficas prontas, foi realizado o teste de reatividade utilizando na linha teste (T) a mistura das proteínas core-GST e E2-GST na concentração total de 4,1µg/µL, e na linha controle (C) a proteína A na concentração de 5µg/µL. Foi aplicado em algumas tiras 150µL de *pool* de soro positivo para o VHC e em outras tiras 150µL do *pool* de soro negativo para o VHC. A migração cromatográfica ocorreu em 10 minutos.

A Figura 58 (A e B) demonstra os resultados satisfatórios alcançados neste ensaio.

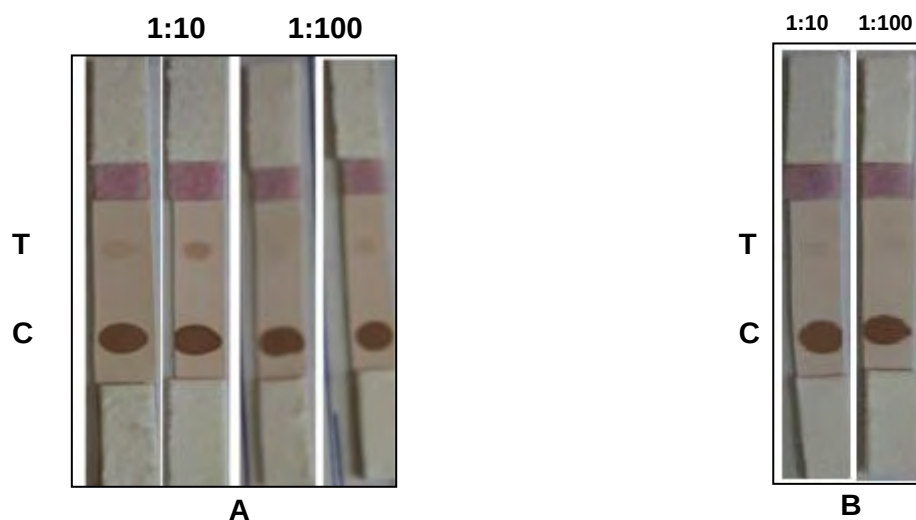


Figura 58: Teste imunocromatográfico mostrando a reatividade da mistura das proteínas recombinantes na área teste (T) e da proteína A na área controle (C) frente ao *pool* de soro positivo e negativo. **A:** *Pool* de soro positivo para o VHC. **B:** *Pool* de soro negativo para o VHC.

4.30. Ensaio para padronização dos métodos diagnósticos para o VHC

4.30.1. Teste imunocromatográfico 1

Vários testes imunocromatográficos foram realizados conforme descrito no item 3.30.6 de Materiais e Métodos, porém com nenhum sucesso, ou seja, as proteínas recombinantes *core* e E2 fusionadas a GST, não estavam causando imunorreação. Estas proteínas provavelmente sofreram processo de degradação devido ao tempo após expressão e também devido ao fator de descongelamento, apesar de estarem aliquotadas em pequenas porções. Frente a estas situações foram realizados outros métodos na tentativa de encontrar a concentração ideal para a padronização do método imunocromatográfico. Estes testes estão demonstrados abaixo.

4.30.2. Testes de *imunoblotting*

Foram realizados ensaios de imunoblotting utilizando na tiras da membrana de nitrocelulose (Millipore®) 1µL e 1,5µL da mistura das proteínas recombinantes *core* e E2 e 1µL para controle da proteína A extracelular recombinante (Sigma®), nas concentrações de 2,4µg/µL, 1,7µg/µL e 5µg/µL respectivamente e o *pool* de soro positivo para o VHC diluído 1:10 e o anticorpo anti-IgG conjugado com peroxidase diluído 1:1000, ambos em solução de bloqueio. O resultado não foi satisfatório, pois somente houve o aparecimento da banda referente ao controle da reação, demonstrando a inatividade das proteínas recombinantes do VHC.

Em outro ensaio de *imunoblotting*, utilizamos as proteínas recombinantes do VHC, *core* e E2 em diferentes eluições, sendo estas de maiores concentrações (*core*: PE3 armazenada a -20°C, PE3 armazenada a -80°C e PE2 armazenada a -20°C) e (E2: PE1 armazenada a -20°C) e a proteínas A extracelular (Sigma®) para controle, a fim de verificar se o tipo de armazenamento estava influenciando e se em outras etapas da eluição havia melhor imunorreatividade. Ao invés de usar o *pool* de soro positivo para o VHC, que poderia estar com baixa carga de anticorpos anti-VHC e por esta razão as proteínas não estariam sendo reconhecidas, utilizamos o soro controle positivo do kit ORTHO HCV 3.0 ELISA (Ortho-Clinical Diagnostics) diluído 1:10. Porém o resultado foi semelhante ao anterior, corando somente a banda referente ao controle, ou seja, a proteína A recombinante (Sigma®).

Outro teste *imunoblotting* foi realizado utilizando as membranas de nitrocelulose (Millipore®) e a folha de nitrocelulose Nytran (SCHLEICHER & SCHUELL) cortada nas mesmas proporções, aplicando 3µL das mesmas proteínas recombinantes do ensaio anterior e um *pool* de soro positivo para o VHC com leitura

espectrofotométrica estourada, ou seja, ELISA positivo com alta absorbância diluído 1:10 em solução de bloqueio. Utilizamos a folha de nitrocelulose para avaliar sensibilidade de adsorção em relação à membrana de nitrocelulose (Millipore®). As bandas onde estavam adsorvidas as proteínas recombinantes do VHC, tanto na membrana quanto na folha de nitrocelulose apareceram, porém fracamente.

Dessa forma, mais testes foram realizados e devido à falta do sucesso esperado, talvez por perda da concentração dessas proteínas, foi realizada a liofilização das proteínas recombinantes *core* PE3 e E2 PE2, conforme descrito no item 3.31.6 de Materiais e Métodos. O resultado do *imunoblotting* não foi o esperado.

4.30.3. Slot Blot

Mediante estes resultados, realizamos o *slot blot*, a fim de verificar se aumentando a quantidade das proteínas recombinantes aplicadas na membrana de nitrocelulose, haveria melhor imunorreatividade. Assim, foi aplicado 10µL das proteínas (*core*: PE2 e PE3 e PE3 liofilizada) e (E2: PE1 e PE2 liofilizada) e a proteína A extracelular (Sigma®) para controle. A metodologia foi realizada conforme descrito no item 3.31.8 de Materiais e Métodos. Este resultado pode ser verificado na Figura 59.

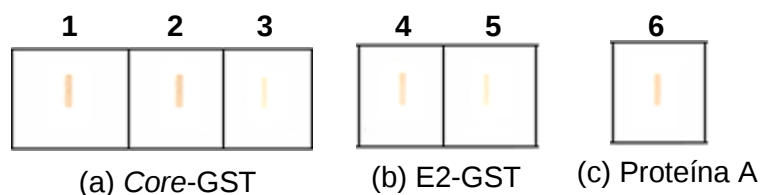


Figura 59: *Slot Blot* realizado com as proteínas recombinantes do VHC, *core*-GST (a) e E2-GST (b) e como controle a proteína A recombinante (Sigma®) (c), sendo: **(a) 1:** *core* PE2; **2:** *core* PE3; **3:** *core* PE3 liofilizada; **(b) 4:** E2 PE1; **5:** E2 PE2 liofilizada; **(c) 6:** proteína A extracelular recombinante (Sigma®).

Analisando a Figura 59, observamos que as proteínas recombinantes quando utilizadas em maiores quantidades, neste ensaio 10µL, houve imunorreatividade das proteínas frente aos anticorpos anti-VHC presentes no *pool* de soros positivos. As proteínas recombinantes liofilizadas, tanto *core* quanto a E2, foram imunorreativas, porém apresentaram intensidade de coloração inferiores as PE1 (E2) e PE2 e PE3 (*core*).

4.30.4. Testes de *Imunoblotting*

Frente a este resultado, realizamos outro *imunoblotting* utilizando as proteínas recombinantes liofilizadas (*core* PE3 e E2 PE2) e *core* PE2, aplicando 8,5µL na nitrocelulose, tendo uma concentração para as liofilizadas de 204µg/µL e 144,5µg/µL, respectivamente e 20,40µg/µL para *core* PE2. Uma membrana de nitrocelulose foi utilizada como controle, aplicando o *pool* de soros negativos para o VHC, tendo as proteínas recombinantes do VHC adsorvidas e a proteína A (Sigma®). A Figura 60 demonstra este resultado.

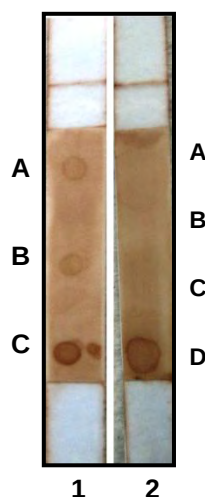


Figura 60: Resultados obtidos usando as proteínas *core*-GST, E2-GST liofilizadas e a proteína recombinante *core* PE2. **Tira 1:** *pool* de soros positivos para o VHC. **Tira 2:** *pool* de soros negativos para o VHC. **Marcações:** **A:** *core* PE3 liofilizada; **B:** E2 PE2 liofilizada; **C:** *core* PE2; **D:** proteína a extracelular recombinante (Sigma®).

Como podemos observar na Figura 60, as proteínas recombinantes *core* e E2 foram imunorreativas, porém a proteína eluída PE2 *core* foi mais sensível frente aos anticorpos anti-VHC, do que as liofilizadas e não houve reações inespecíficas com o *pool* de soros negativos para o VHC.

Assim, repetimos o mesmo método utilizando as proteínas recombinantes (*core*: PE3 liofilizada e PE2,) e (E2: PE2 liofilizada e PE1), além da proteína A para controle. Neste ensaio, o tempo que as membranas de nitrocelulose foram secas após o bloqueio foi de 20 horas e o anticorpo conjugado foi diluído 1:300. O resultado pode ser analisado na Figura 61.

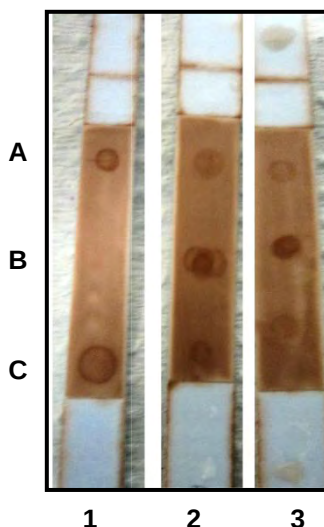


Figura 61: Tiras da membrana de nitrocelulose com adsorção das proteínas recombinantes do VHC e a proteína A. **Tira 1: marcação A:** core PE2; **marcação C:** proteína A. **Tira 2: marcação A:** E2 PE2 liofilizada; **marcação B:** core PE3 liofilizada; **marcação C:** proteína A. **Tira 3: marcação A:** E2 PE1; **marcação B:** core PE2; **marcação C:** proteína A.

Podemos observar na Figura 61 que a proteína recombinante core PE2 em maior concentração, é mais imunorreativa do que a PE3 liofilizada e a proteína recombinante E2 PE2 liofilizada e PE1 praticamente não há diferença significativa na intensidade de coloração, ou seja, todas as formas das proteínas recombinantes testadas neste ensaio foram imunorreativas, pois estavam em maior concentração do que nos ensaios anteriores.

Frente a este resultado, concluímos que as proteínas recombinantes tinham perdido suas concentrações iniciais e realizamos um método alternativo para concentrá-las, o método do nitrogênio, descrito no item 3.31.11 de Materiais e Métodos. O resultado da concentração proteica foi verificado realizando o método de *imunoblotting* e pode ser observado na Figura 62.

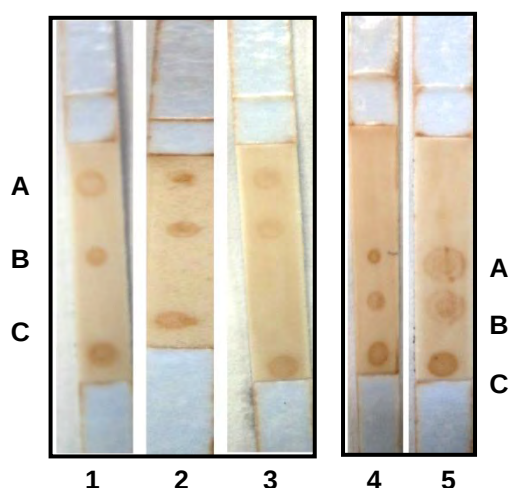


Figura 62: *Imunoblotting* após concentração proteica pelo método do nitrogênio. **Tiras 1 e 2:** **marcações A:** *core*-GST concentrada pelo método do nitrogênio; **marcações B:** E2-GST concentrada pelo método do nitrogênio; **marcações C:** proteína A recombinante (Sigma®), controle. **Tira 3:** **marcação A:** *core* PE3 liofilizada; **marcação B:** E2 PE2 liofilizada; **marcação C:** proteína A. **Tira 4:** **marcação A:** *core* PE2; **marcação B:** *core* PE3; **marcação C:** proteína A. **Tira 5:** **marcação A:** E2 PE1; **marcação B:** E2 PE2; **marcação C:** proteína A.

Ao analisar a Figura 62, notamos que utilizando 1,5µL de cada proteína em suas formas concentradas pelo método do nitrogênio, liofilizadas e simplesmente eluídas, foram antígenicamente reconhecidas pelos anticorpos anti-VHC presentes no *pool* de soros positivos. Porém as proteínas recombinantes *core* e E2 liofilizadas não apresentaram intensidade de coloração satisfatória, mesmo em comparação com as formas eluídas (*core*: PE2 e PE3) e (E2: PE1 e PE2). A melhora na imunorreatividade destas proteínas recombinantes eluídas, mesmo que em baixa concentração, deve-se ao fato de que utilizamos o anticorpo conjugado na diluição 1:300.

Desta forma, após definidas as concentrações das proteínas recombinantes *core* e E2 do VHC, definida a diluição dos soros controles positivos e negativos para o VHC e a diluição do anticorpo conjugado, foi realizado o ensaio de imunoblotting com n=12, sendo n=10 para soros controles positivo e n=2 para soros controles negativo.

Foi aplicado como teste (T) 1 μ L das proteínas recombinantes concentradas pelo método do nitrogênio, *core*-GST na concentração de 24 μ g/ μ L, E2 na concentração de 17 μ g/ μ L e da mistura das duas proteínas (*core* + E2-GST). Este resultado pode ser observado na Figura 63.

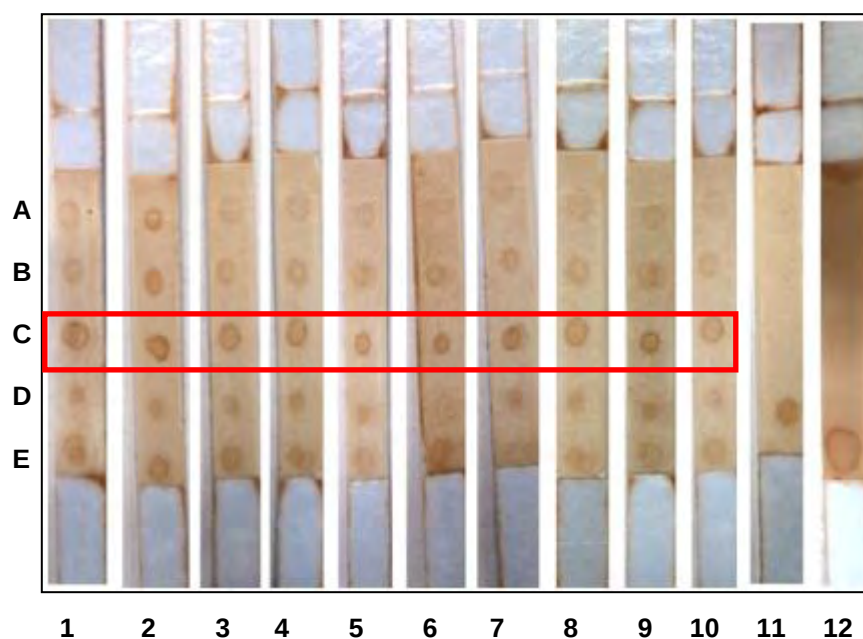


Figura 63: Resultados obtidos usando as proteínas recombinantes *core*-GST, E2-GST e (*core*+E2)-GST, nas concentrações de 24 μ g/ μ L e 17 μ g/ μ L respectivamente. **Tiras 1 a 10:** soro controle positivo para o VHC, sendo **marcação A:** (teste) *core*-GST, **B:** (teste) E2-GST, **C:** (teste) (*core*+E2)-GST, **D e E:** (controle) proteína A extracelular recombinante (Sigma®). **Tiras 11 a 12** soro controle negativo para o VHC, sendo **marcação E:** (controle) proteína A extracelular (Sigma®).

Analisando a Figura 63, observamos que as proteínas recombinantes *core* e E2 concentradas pelo método do nitrogênio foram imunorreativas e a mistura destas duas proteínas proporcionou um aumento da reatividade, promovendo maior sensibilidade e especificidade ao método. Quando utilizado o soro controle negativo, não houve reação na área teste, somente uma marcação na área controle.

4.31. Validação do teste imunocromatográfico desenvolvido

Nesta fase, foram utilizadas as tiras do teste imunocromatográfico, conforme as condições estabelecidas anteriormente e seguindo com os ensaios para o estudo e validação do teste. Utilizamos 53 amostras de pool de soros controles, formados por 3 amostras sorológicas de indivíduos independentes, sendo 35 verdadeiras negativas e 18 verdadeiras positivas. Após a montagem e sobreposição das membranas foram aplicados os soros controles diluídos em solução de bloqueio, 1:10 para os soros verdadeiros negativos para o VHC e positivo para outras patologias e as diluições 1:10, 1:100 e 1:1000 para os soros verdadeiros positivos para o VHC afim de comparar com os resultados do ELISA comercial (Ortho-Clinical Diagnostic®), além do pool de soros positivos para o VHC com genótipo 1, 2 e 3, também diluídos 1:10. Após 8 a 10 minutos ocorreu a corrida cromatográfica e estes resultados podem ser observados nas Figuras 64, 65 e 66.

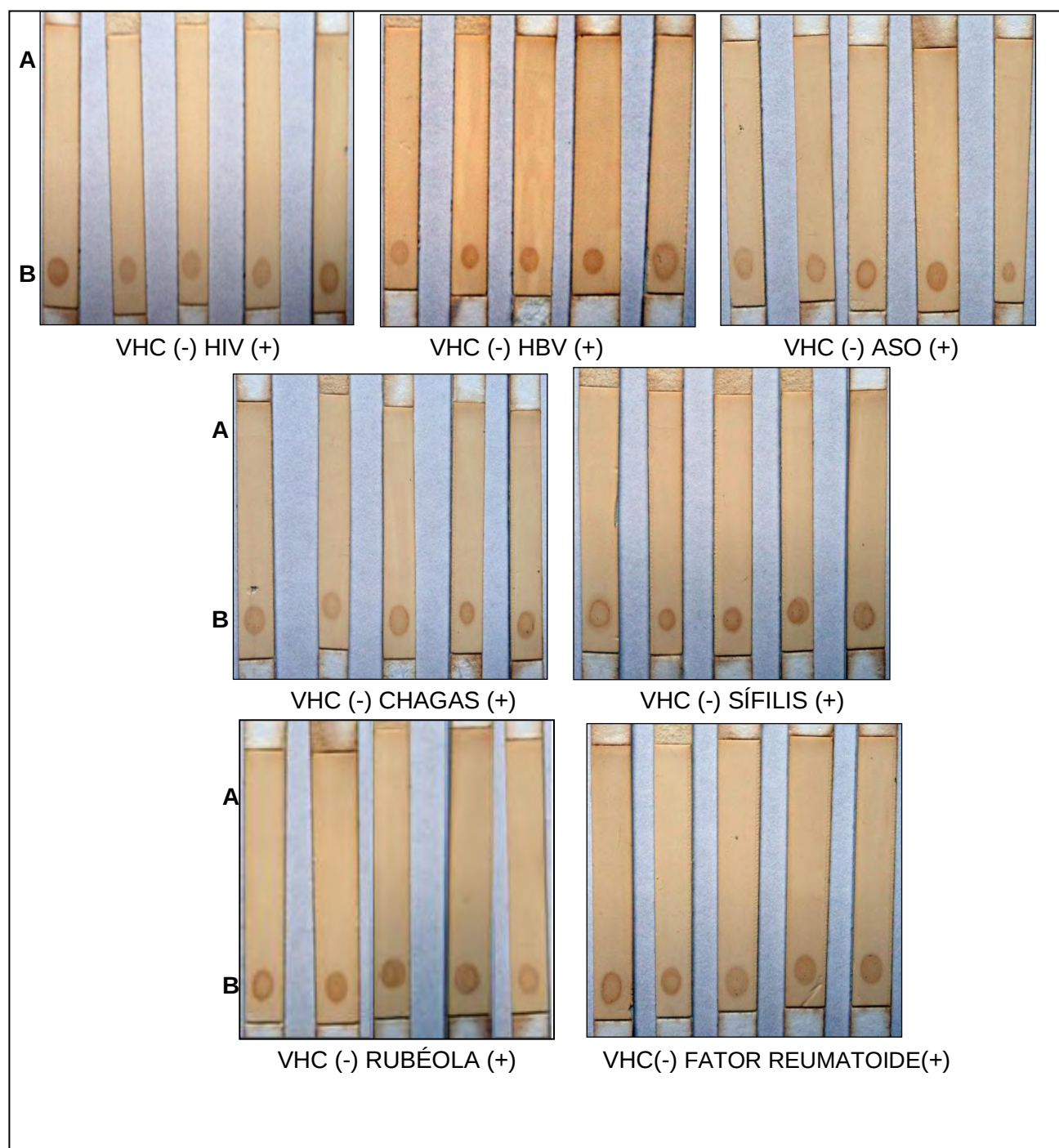


Figura 64: Resultados obtidos usando a mistura das proteínas recombinantes (core+E2)-GST, nas concentrações de 24µg/µL e 17µg/µL respectivamente e pool de soros controles verdadeiros negativos para o VHC e positivo para outras patologias infecciosa e inflamatórias diluídos 1:10. Marcação A: mistura das proteínas recombinantes. Marcação B: IgG humana para controle da reação.

O ELISA comercial (Ortho-Clinical Diagnostic®) utilizado como parâmetro para comparação das absorbâncias com pool de soros controles positivos para o VHC e diluídos 1:10, 1:100 e 1:1000 teve como valor de *cut-off* 0,609 e as seguintes absorbâncias para as respectivas diluições foram: 2,072; 1,116; 0,507.

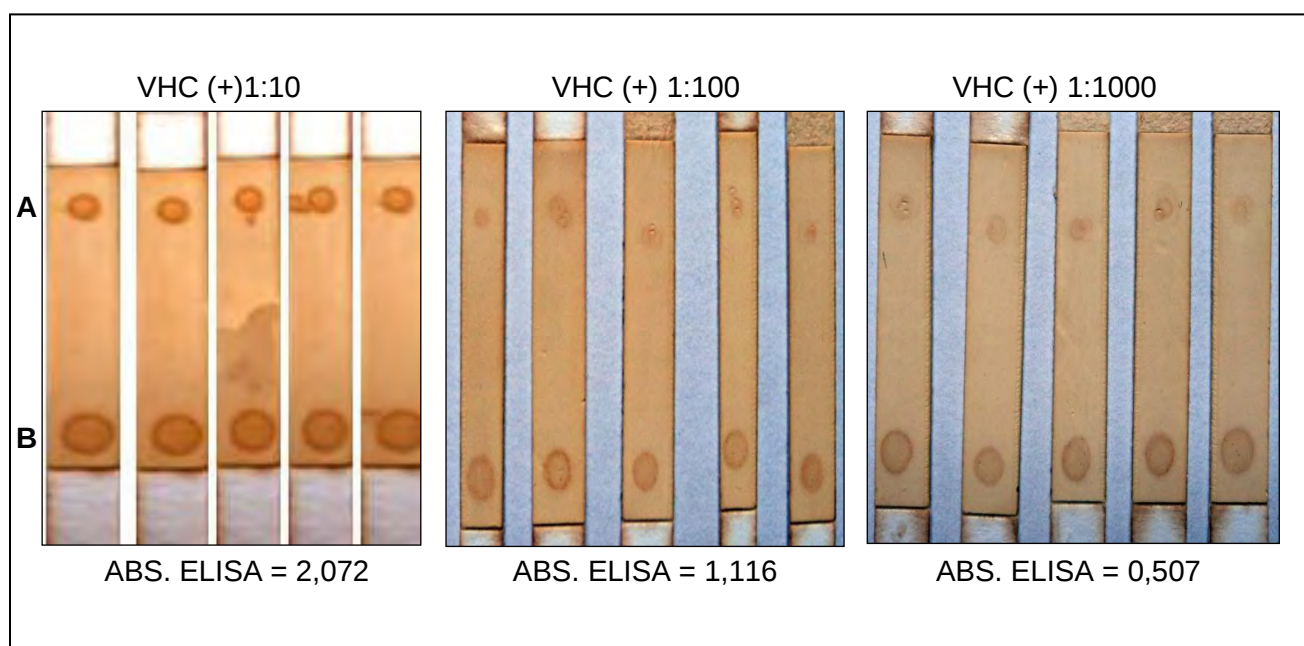


Figura 65: Resultados obtidos usando a mistura das proteínas recombinantes (*core+E2*)-GST, nas concentrações de 24µg/µL e 17µg/µL respectivamente e pool de soros controles verdadeiros positivos para o VHC diluídos 1:10, 1:100 e 1:1000. Marcação 1: mistura das proteínas recombinantes. Marcação 2: IgG humana para controle da reação.

Analisando a Figura 65 podemos observar que o teste imunocromatográfico desenvolvido apresenta reatividade até a diluição 1:1000 e comparando com os valores de absorbâncias do ELISA comercial (Ortho-Clinical Diagnostic®) que na diluição 1:1000 já obteve resultado próximo ao *cut-off*, podemos concluir que o teste imunocromatográfico para o VHC foi mais sensível que o método de ELISA utilizado.

A fim de avaliar se o método desenvolvido era eficaz com soros positivos para o VHC com diferentes genótipos, testamos pool de soros positivos com genótipos 1, 2 e 3. Podemos observar que o teste imunocromatográfico desenvolvido revelou positividade entre os diferentes genótipos.

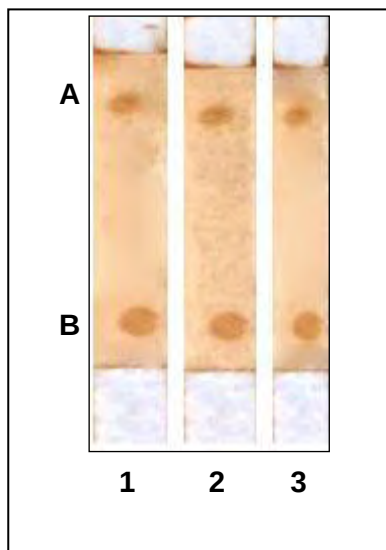


Figura 66: Resultados obtidos usando a mistura das proteínas recombinantes (*core+E2*)-GST, nas concentrações de 24 μ g/ μ L e 17 μ g/ μ L respectivamente e pool de soros controles verdadeiros positivos para o VHC com genótipos 1 (tira 1), 2 (tira 2) e 3 (tira 3) diluídos 1:10. Marcação A: mistura das proteínas recombinantes. Marcação B: IgG humana para controle da reação.

4.31.1. Desempenho do método imunocromatográfico

Analisando os resultados obtidos no teste imunocromatográfico desenvolvido e aplicando os resultados às fórmulas para determinação dos índices de sensibilidade e especificidade, descritos no item 3.33 de Materiais e Métodos, os valores encontrados foram de 100%, pois não houve nenhum teste realizado com o imunocromatográfico desenvolvido que fosse diferente dos resultados obtidos pelo ELISA comercial e PCR qualitativo utilizados para comparação do desempenho do novo método.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Desde o isolamento do DNA complementar do vírus da hepatite C (HCV) por CHOO et al., 1989, a hepatite C vem sendo reconhecida como uma das principais causas de doença hepática crônica em todo o mundo e a partir desta caracterização molecular, muitos testes diagnósticos começaram a ser desenvolvidos. A detecção de anticorpos contra antígenos específicos do VHC é a maneira mais frequentemente empregada para identificar a infecção, presente ou passada. Para isso, são utilizados testes de rastreamento, que apresentam alta sensibilidade, e testes suplementares, também denominados confirmatórios, com maior especificidade. Em função da prevalência de infecção pelo vírus C, estimada em 3% no mundo, o diagnóstico da hepatite C requer um teste bastante sensível, que apresentem vantagens como rapidez no processamento, facilidade de automação, alta confiabilidade e custo relativamente baixo.

As proteínas *core* e E2 do VHC são bastante imunogênicas e induz produção de anticorpos rapidamente após a infecção (JOLIVET-REYNAUD et al., 1998), característica importante para que as proteínas recombinantes *core* e E2 fusionadas a GST pudessem ser utilizadas em nosso estudo. Trabalho relatado na literatura (LOPES et al., 2000) mostra que os anticorpos para a região estrutural do VHC são os primeiros a surgir após a infecção quando comparados a anticorpos da região não estrutural.

A fim de obter um melhor resultado na amplificação das regiões do *core* e da E2 do VHC, utilizamos já no início, métodos que aumentam e concentra o rendimento do RNA viral, um kit que contém reagente Beads, que são partículas de agorose que forçam a deposição do RNA, tornando mais fácil o seu isolamento. A extração do RNA viral ocorreu utilizando o QIAamp RNA Mini Kit Hand, QIAGEN. Para a região do *core*, o

cDNA foi amplificado por PCR com os primers derivados da região do *core* HCV-1b com base nos nucleotídeos publicados na sequência 968R (ALAM et al., 2002). Os primers foram escolhidos para o produto de amplificação de 408pb abrangendo uma região parcial do *core* HCV (aminoácido 1-136), mais solúvel, sendo estes o primer sense VHCC-S SR (9,14 µg/µmole) (5' cca tgg cac ata tga gca caa atc cta aac 3') e o anti-sense (VHCC-AI SR) (8,88 µg/µmole) (5' ttg gat cct tag tac ccc atg agg tcg gc 3') (Invitrogen – Life Technologies). Neste produto obtido de PCR foi adicionado sítios de restrição para as enzimas Nco I e Bam HI (*Fermentas - Life Sciences*) para posteriormente, ser clivado e clonado no vetor de expressão pET – 42a, na orientação correta. Para a região da E2, o cDNA foi amplificado por PCR usando o *primer sense* E2.S (10pM/µL) (5' ggc cat ggg gga aac cca cgt cac cgg 3') e *primer anti-sense* E2.AS (10pM/µL) (5' gct cga ggc tcg gac ctg tcc ctg tc 3'), (*Invitrogen*). O produto da PCR será parte do gene da proteína E2 (834pb) adicionado dos sítios de restrição para as enzimas *NcoI* e *XhoI* (18pb), contendo assim um total de 852pb. Após purificação e análise destes produtos, foram inseridos em vetores de clonagem pTZ, a fim de amplificar a informação genética em centenas de cópias. Posteriormente os insertos *core* e E2 digeridos foram inseridos em vetores de expressão pET-42a, pois em trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório de pesquisa, foi relatado como o de melhor expressão e rendimento após purificação (MIKAWA et al, 2009).

Muitos trabalhos na literatura obtiveram boa expressão e purificação utilizando a proteína de fusão GST, sendo que o trabalho de SEONG et al., 1996, foi um dos primeiros a obter a expressão da proteína do *core* (1-123 aa) na forma solúvel com elevada reatividade pelos anticorpos VHC. Em nosso trabalho, utilizamos o vetor pET-

42a para expressão dos produtos de 408pb do gene do *core* e 852pb do gene da E2 do VHC e a transformação em cepas *E. coli* linhagem Rosetta. O procedimento de clonagem de um fragmento de DNA para expressão deve respeitar o sinal de tradução de genes procarióticos (sinal de Shine-Dalgarno) para obter a proteína correta. O DNA deve ser clonado de maneira que sua fase de leitura (*ORF*) fique em orientação com o códon de iniciação ATG. Além disso, um vetor para expressão em *E. coli* deve apresentar: origem de replicação, marcador para seleção, um promotor forte e regulável para transcrição, sinal de terminação da transcrição, sequencia para controle da tradução e um ATG iniciador. Um sinal de terminação de tradução também deve estar presente no vetor ou ser adicionado no inserto.

A expressão foi induzida pela adição de IPTG 0,4mM e ao final, resultaram proteínas fusionadas a GST: *core*-GST e E2-GST. Com a finalidade de verificar a imunorreatividade das proteínas de fusão foi realizado vários testes: Western Blot, Slot Blot, ELISA indireto e de captura, imunoblotting e o imunocromatográfico desenvolvido, utilizando pool de soros controles positivos e negativos para o VHC e negativo para o VHC e positivo para outras doenças infecciosas e inflamatórias. No ensaio Western Blot, é possível notar a presença de bandas adicionais ou secundárias, tanto para o *core* quanto para a E2, devido a uma degradação da proteína na fase de indução por proteases bacterianas. Ainda um segundo processamento da porção hidrofóbica poderia ocorrer durante seu processo de maturação, resultando em proteínas de pesos moleculares menores (LIU et al., 1997; YASUI et al., 1998).

Em suma, os métodos testado, avaliados e desenvolvidos, utilizando as proteínas recombinantes do VHC fusionadas a GST, com pool de soros positivos para o VHC foram imunorreativos, ou seja, as proteínas recombinantes foram reconhecidas

pelos anticorpos presentes em soros controles positivos para o VHC e quando utilizado pool de soros controles negativos para o VHC e positivo para outras patologias, não houve reatividade, demonstrando que as proteínas recombinantes são somente reconhecidas pelos anticorpos anti-VHC. Outro dado importante é que a proteína GST isolada não provoca reatividade, podendo ser utilizada fusionada às proteínas, não havendo necessidade de removê-la após a purificação, com o fator Xa, por exemplo. Uma pequena reação cruzada foi encontrada com pool de soros positivo para antistreptolisina O, nos ensaios de ELISA, porém muito próximo ao valor de *cut-off*. Essa reação inespecífica foi solucionada quando acertou as concentrações das proteínas recombinantes *core* e E2 para 1µg/mL de cada proteína e o pool de soros diluídos 1:400.

Estudos mostram que a proteína *core* do VHC é altamente antigênica, induz resposta celular e humoral específica e provavelmente, desempenha um papel fundamental na patogênese da infecção (LAI et al., 2000; NELSON et al., 1997). Já a glicoproteína E2 do VHC possui áreas conservadas e é responsável pela ligação do vírus na célula alvo e os anticorpos para esta região são neutralizantes (SABO et al., 2011).

A proteína recombinante *core*, já vem sendo utilizada em alguns testes diagnósticos, juntamente com as proteínas NS3 e NS4 e NS5 do HCV. Porém a utilização da mistura das proteínas recombinantes *core* e E2 fusionadas a GST é um método inovador.

Considerando as informações acima, a característica fundamental para a utilização das proteínas *core* e E2 do VHC neste estudo foi a antigenicidade, garantindo a especificidade do método imunocromatográfico proposto neste trabalho.

Portando, considerando que centenas de novos produtos são lançados no mercado anualmente, a necessidade de desenvolver técnicas analíticas de alta seletividade é inevitável (GIL e KUBOTA, 1999). Ao longo dos anos tem se observado o aperfeiçoamento de técnica, cujas tendências atuais apontam para o desenvolvimento de ensaios rápidos que detectam uma grande diversidade de analitos. Para tanto, o teste imunocromatográfico padronizado e desenvolvido pode ser usado para esta finalidade, permitindo o acompanhamento da terapêutica com imunomodulador (Interferon) e/ou antiviral (Ribavirina), diminuindo resultados falsos negativos, auxiliar no seguimento clínico-laboratorial do estadiamento crônico; podendo ser usado em laboratórios Clínicos ou triagem de doadores de sangue/componentes, clínicas, unidades básicas de saúde, serviço de atendimento especializado-SAE, hospitais e centro de testagem e acolhimento-CTA.

Por causa das características dos ensaios imunocromatográfico como resultado imediato, ausência de equipamento e pessoal técnico treinado e baixo custo, os testes rápidos são muito adequados para a pesquisa de antígenos ou anticorpos (PENG et al., 2007).

Desde a sua introdução nos anos 1980 (ZHANG, GUO, WANG, 2009) os testes imunocromatográficos de fluxo lateral têm sido uma alternativa na área de diagnóstico por causa das inúmeras vantagens (SHIM et al., 2006). Apesar da imunocromatografia ser uma técnica utilizada há anos, e seu princípio pareça simples, a padronização e desenvolvimento do ensaio imunocromatográfico para o VHC foi necessário um prévio

conhecimento de princípios básicos, bem como dos fundamentos dos diversos formatos de imunoenaios existentes, abordando uma série de critérios para sua padronização de forma que o teste desenvolvido alcançasse resultados confiáveis e reprodutíveis. Para alcançar esse nível de confiança foram analisados diversos aspectos analíticos para garantir a qualidade dos procedimentos operacionais para o desenvolvimento dos ensaios.

Vários passos são importantes para a boa reprodutibilidade de um teste imunocromatográfico como aplicação de reagentes, montagem e manuseio das membranas, procedimentos estes que se realizados inadequadamente podem alterar os limites de detecção, formatos das bandas teste e controle, interpretação dos resultados e desempenho geral do teste.

As membranas utilizadas no teste imunocromatográfico da Millipore® já vêm sendo usadas no mercado há algum tempo. Sua composição permite a perfeita montagem do teste, mas esta montagem depende da habilidade do executor de forma que quando for feita a sobreposição das membranas haja um perfeito alinhamento. Qualquer avaliação pode alterar as propriedades de fluidez de capilaridade, devendo haver um caminho uniforme para a amostra correr na tira.

O comprimento da tira reagente de nitrocelulose (Millipore®) normalmente é 30 cm de comprimento de 2,0 a 3,0 cm de largura em média, como também a área de conjugado e a membrana de celulose podem ser laminadas conforme a conveniência.

O corte das membranas foi uma etapa realizada por processo manual com auxílio de guilhotina e estilete, permitindo o corte das membranas sem danificá-las nas bordas. Neste estudo, o tamanho da tira reagente de nitrocelulose mais adequado foi de 2,5 cm comprimento x 0,5 cm de largura, pois em teste com a tira mais larga, a zona

de reação era maior e o desempenho não foi tão bom. Em outros trabalhos o tamanho foi semelhante ao nosso com tiras de 2,5 cm de comprimento por x 0,5 cm de largura (CHUANLAI et al., 2006) e em outro onde apenas o comprimento de 3,5 cm é apresentado (SITHIGORNGUL et al., 2007). As membranas de fibra de vidro foram laminadas em 0,5 cm de comprimento x 0,5 cm de largura e as de celulose em 1,5 cm de comprimento x 0,5 de largura.

Os adsorventes de adsorção podem ser dispensados na membrana de nitrocelulose de varias formas tanto manualmente como através de dispensadores automáticos de ar a jato específico para essa finalidade, normalmente usados em escala industrial (LIU et al., 2007). Em nosso estudo foi realizado manualmente. A melhor forma de aplicação dos reagentes de detecção e controle do teste imunocromatográfico do VHC foi a forma de ponto (circular), utilizando pipeta automática, pois nos ensaios realizados a marcação de sinal nas áreas teste e controle foi mais intensa usando este procedimento e a área de aplicação ficava mais delimitada. Outros estudos também têm adotado esta forma de adsorção dos reagentes e tem-se monitorado a intensidade do sinal nas linhas teste e controle (WANG, ZHAN, XING, 2006). Essa intensidade de cor e imagem ópticas das áreas teste e controle podem ser capturadas com uma tecnologia mais avançada, por scanner digital e quantificada por um software específico (TANAKA et al., 2006), contudo na maioria dos trabalhos esta avaliação é meramente visual como no nosso estudo.

A intensidade do sinal na linha teste esta relacionada com a concentração da molécula alvo na amostra que é observada visualmente na área de reação. Outros estudos também correlacionam a intensidade de coloração na linha teste com a concentração da proteína alvo e o acúmulo de ouro coloidal conjugado nas linhas teste

e controle da membrana (TANAKA et al., 2006). Em nosso estudo alguns dos testes apresentaram intensidade de sinal na linha controle maior do que na linha teste e em outros testes a intensidade de coloração foi inversa e também foi apresentado intensidade de cor igualmente forte nas duas linhas, como apresentado em outros trabalhos (SHIM et al., 2006; ZHOU et al., 2004; GUO et al., 2009).

Acredita-se que a intensidade de cor nas linhas teste e controle estavam condicionadas, tanto à concentração de anticorpos na amostra como as densidades ópticas da solução de ouro usada no conjugado. Estudos comprovam que a alta absorbância do ouro está ligada à intensidade da coloração na área teste e depende da distância entre as partículas (SONNICHSEN et al., 2005).

O objetivo principal do desenvolvimento de um imunoensaio é conseguir o máximo de reconhecimento por parte do anticorpo e/ou das proteínas. Este deve possuir boa sensibilidade e reatividade depois de adsorvido e após ser molhado pela amostra sorológica, não devendo ocorrer alterações quanto a sua natureza e ser reativo na hora do teste. Na prática, todos os reagentes utilizados apresentaram boa especificidade tanto nas reações de Western Blot, Slot Blot, imunoblotting e no ELISA indireto e de captura.

Nas áreas teste e controle foi aplicado um 1 μ L dos adsorventes na zona de reação em cada extremidade da membrana de nitrocelulose. Foi reportada uma quantidade ainda menor que no nosso estudo, 0,5 μ L para a região teste e controle (CHUANLAI et al., 2006). A quantidade média dos adsorventes tanto nas áreas teste como controle não ultrapassam 2 μ L, pois o ponto na forma de dot neste tamanho permite uma melhor visualização do sinal, como descrito em um artigo onde se aplicou 1-1,5 μ L dos reagentes controle e teste (SITHIGORNGUL et al., 2007).

A escolha da proteína A na padronização do ensaio imunocromatográfico foi devido a sua natureza não enzimática e sua propriedade de se ligar as frações Fc da imunoglobulina (YANG et al., 2007). Ela tem sido usada há algum tempo para o desenvolvimento de testes imunocromatográficos, tanto como partícula de captura conjugada ao ouro coloidal como na linha teste para a captura de anticorpos no soro (HUANG, 2006).

As membranas de nitrocelulose foram ativadas pela imersão com solução Tris-HCl contendo 0,4% de glicerol, visando melhorar a absorção dos adsorventes pelas membranas e em seguida secas em estufa a 37°C por 18 horas, procedimento realizado em outro estudo (MIKAWA et al., 2009). A secagem completa das membranas antes da fixação dos reagentes é indispensável, pois a presença de qualquer vestígio de umidade pode levar a perda dos adsorventes e problemas no desempenho do ensaio (MILLIPORE, 2002). Após a adsorção dos reagentes na membrana de nitrocelulose e sua secagem a 37°C por 2 horas foi realizado o bloqueio com Tris-HCl 0,1M com 2% de BSA por 1 hora sob agitação e temperatura ambiente. Estas foram lavadas com Na₂HPO₄ 10mM pH =7,5 e com Tris-HCl para a retirada do excesso da solução, impedindo o entupimento dos poros (MILLIPORE, 2002). A seguir foram secas 37°C por 20 horas. Bloqueio semelhante foi realizado usando Tris-HCl com caseína 2% e secagem na estufa 37°C por 2 horas (MIKAWA et al., 2009) e diferente de outro estudo onde as tiras foram secas a 37°C por 30 minutos e bloqueadas por imersão em PBS com 1% de BSA a 37°C por 30 minutos (CHUANLAI et al., 2006).

Alguns estudos dizem que a membrana de fibra vidro deve ser igualmente bloqueada como a de nitrocelulose antes de o conjugado ser aplicado. Porém em nosso estudo optamos por não tratar a área do conjugado com bloqueio, pois quando foi feito

o tratamento com solução contendo BSA ou caseína, observamos que o conjugado permanecia preso à membrana de fibra de vidro e a reação não ocorria. Em outros estudos para detecção da atrazina (SHIM et al., 2006) e de *S. aureus* (HUANG, 2006) também não se tratou a área do conjugado. Foi aplicado 10µL do conjugado, sendo essa quantidade suficiente para inundar o sistema. A membrana de fibra de vidro foi seca em temperatura ambiente por 4 horas.

A aplicação do ouro coloidal como reagente de detecção no teste desenvolvido teve suporte no fato de que ele tem sido um dos marcadores mais utilizados no desenvolvimento de ensaios imunocromatográficos por possuir propriedades físico-químicas ideais para esta finalidade. O ouro é mais estável que outros marcadores como enzimas, partículas de látex e corantes fluorescentes, por ser menos suscetível a agregação durante a sua conjugação e isso aumenta a sensibilidade dos testes. Como resultado destas características naturais específicas é um indicador ideal para monitorar facilmente as reações antígeno anticorpo (TANAKA et al., 2006) e possui melhor mobilidade na membrana de nitrocelulose em comparação a outros marcadores (SHYU et al., 2002). Uma característica desse sistema é a dependência do pH no processo de conjugação (resultado de uma combinação hidrofóbica do ouro com a proteína e de forças de Van der Waals), para isso, realizamos a leitura a 540 e 620nm a fim de determinar o melhor pH e concentração dos anticorpos, das proteínas recombinantes (core e E2) e da proteína A, para obter as condições ideais da estabilização dos conjugados. Outro fator importante na conjugação foi o bloqueio das superfícies residuais após o período de incubação dos anticorpos, das proteínas recombinantes (core e E2) e da proteína A, com o colóide de ouro. Em nosso trabalho, utilizamos 10% de BSA para o bloqueio, sendo que em outros trabalhos, esta fase pode ser realizada

com caseína. A lavagem do conjugado e a etapa de bloqueio são igualmente importantes para eliminação dos reagentes não ligados para que não haja interferentes durante o ensaio.

Antes da montagem final do dispositivo imunocromatográfico, foi necessário também tratar a membrana de celulose, que compõe a área de amostragem com solução de Tween 20 0,005% a fim de diminuir as reações inespecíficas e aumentar a especificidade do teste, sendo que a secagem foi feita em temperatura ambiente por 18 horas. Também há na literatura teste onde não foi necessário realizar o tratamento das áreas de amostragem (CUI et al., 2008).

A padronização realizada inicialmente por *imunoblotting* utilizando a tira de nitrocelulose, sendo esta posteriormente usada na imunocromatografia, nos forneceu um desempenho analítico de confiança em relação aos procedimentos adotados para o desenvolvimento, importante para que posteriormente as amostras de soros controles fossem usadas para aplicação do teste e comparação dos resultados obtidos com outros métodos. Durante a padronização testamos as proteínas recombinantes fusionadas a GST *core* e E2-VHC utilizadas isoladas, juntas e em diferentes concentrações, sendo que o melhor resultado foi obtido com a mistura das proteínas recombinantes nas concentrações de 24µg/µL e 17µg/µL para *core* e E2 respectivamente. Para a área controle, utilizamos a proteína A extracelular recombinante (Sigma®) na concentração de 5µg/µL, com excelente resultado.

Após a montagem da fita imunocromatográfica pela sobreposição das membranas, a membrana de celulose é colocada em contato com a solução contendo a amostra sorológica diluída 1:10 que dissolve o conjugado e a reação imune entre o analito e o conjugado ocorre formando cor. Em nosso estudo, utilizamos na área teste a

mistura das proteínas recombinantes do VHC (*core+E2*) nas concentrações de 24 e 17µg/µL, respectivamente e como controle de migração da reação a IgG humana (Sigma®) na concentração de 50µg/µL. E como conjugado a proteína A com ouro coloidal. O tempo da corrida cromatográfica foi de 8 a 10 minutos, tempo este necessário para amostra sorológica solubilizar o conjugado e formar a reação imune. Esta metodologia necessita de um menor número de reagentes: proteínas recombinantes do VHC, proteína A conjugada com ouro coloidal e IgG humana, sendo que os dois últimos são produzidos comercialmente, sendo apenas necessário conjugar com o ouro coloidal.

Alguns estudos testaram amostras variadas para o ensaio imunocromatográfico e verificação de seu desempenho (PELERITO et al., 2006), seja soro, plasma ou outro tipo de material de fácil obtenção. Em nosso teste de validação, utilizamos 53 amostras de pool de soros controles formados por 3 amostras sorológicas de indivíduos independentes, sendo 35 verdadeiras negativas e 18 verdadeiras positivas. Ensaio futuros, utilizando mais amostras serão realizados, usando a tira imunocromatográfica desenvolvida.

A verificação do desempenho, especificidade e sensibilidade dos testes rápidos (PELERITO et al., 2006) é realizada comparando amostras de soros ou outra amostra biológica com ensaios clássicos empregados no diagnóstico convencional. Em nosso estudo, verificamos estes parâmetros com ensaios de ELISA (Ortho-Clinical Diagnostic®) e PCR qualitativo (Roche®) realizados como rotina no laboratório de sorologia do NAC (núcleo de atendimento a comunidade), localizado no hospital estadual de Américo Brasilienses.

Quando comparamos os resultados com o ELISA comercial, nas mesmas diluições, observamos que o teste imunocromatográfico desenvolvido apresenta reatividade até a diluição 1:1000 e os valores de absorbâncias do ELISA comercial (Ortho-Clinical Diagnostic®) nesta diluição, obteve resultado próximo ao *cut-off*. Sendo assim, podemos concluir que o teste imunocromatográfico para o VHC foi mais sensível que o método de ELISA utilizado.

Em nosso estudo, também avaliamos a eficácia do método desenvolvido com soros positivos para o VHC com diferentes genótipos (1, 2 e 3). O resultado foi satisfatório, pois revelou positividade entre os diferentes genótipos.

Correlacionando o teste imunocromatográfico para o VHC desenvolvido com a reação de ELISA e PCR qualitativo, evidenciou concordância, sensibilidade e especificidade de 100%, pois não houve nenhum teste realizado com o imunocromatográfico desenvolvido que fosse diferente dos resultados obtidos pelo ELISA comercial e PCR qualitativo. Por ser um teste desenvolvido *in house* e não em escala industrial, o teste apresentou desempenho satisfatório comparando com estes métodos comerciais.

O emprego do teste imunocromatográfico rápido pode ser aplicado no monitoramento de pacientes em hemodiálise, da terapêutica anti-VHC, em laboratórios Clínicos, unidades básicas de saúde e hospitais.

O trabalho mostrou que existe a possibilidade de construir testes comerciais imunocromatográficos para detecção de anticorpos anti-VHC, utilizando as proteínas recombinantes *core*-GST, E2-GST e a mistura (*core* e E2-GST) a um custo acessível, pois os reagentes foram produzidos durante o desenvolvimento do método e a sensibilidade e especificidade foi de 100%.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. As estratégias de amplificação e clonagem da região genômica correspondente à expressão das proteínas *core* e E2 do VHC possibilitaram com êxito a obtenção destas proteínas em sistema de expressão heterólogo (bactérias *E. coli* linhagem Rosetta);
2. As proteínas de fusão *core*-GST (44kDa) e E2-GST (63,5kDa), expressas em sistema heterólogo bacteriano após indução do vetor recombinante pET-42a com IPTG, foram antigenicamente reconhecidas pelos anticorpos anti-VHC do *pool* de soros de portadores crônicos de hepatite C em ensaio de *Western blotting*, onde uma banda na mesma posição demonstrada pelo teste com anticorpos anti-histidina foi marcada, portanto, confirmando a massa molecular esperada das proteínas *core* (44kDa) e E2 (63,5kDa) recombinantes;
3. A indução e purificação das proteínas recombinantes *core* e E2 expressas em larga escala possibilitou uma grande quantidade de proteínas, em torno de 50mL cada, o que proporcionou a realização de vários testes, podendo assim desenvolver métodos com reprodutibilidade;
4. A utilização da coluna de glutationa (GSTrap FF - GE Healthcare) possibilitou uma melhora na purificação da proteína *core*-GST. No entanto, as bandas secundárias ainda permaneceram. Estas bandas podem ser decorrentes de uma possível degradação da proteína na fase de indução por proteases bacterianas, porém não altera a imunorreatividade;
5. A imunorreatividade das proteínas do VHC recombinantes (*core* e E2) foi confirmada através do reconhecimento pelos anticorpos anti-VHC presentes em

pool de soros positivos para vírus da hepatite C, através das técnicas de *Western blot*, *slot blot*, ELISA (de captura e indireto), imunocromatográfico e *imunoblotting*. Nestes ensaios não houve reatividade inespecífica na presença de *pool* de soros negativos para o VHC e positivos para hepatite B, doença de chagas, sífilis, fatores anti-núcleo (FAN) e ASO. Uma pequena reação inespecífica ocorria com o *pool* de soros positivos para ASO, porém esta foi eliminada quando se definiu a concentração ideal do *pool* de soros e ao utilizar uma concentração menor de proteínas. Além disso, a proteína GST não foi reconhecida pelo *pool* de soros positivos para VHC, indicando sua utilização como uma ferramenta no diagnóstico viral;

6. Nos ensaios imunoenzimáticos realizados, foi possível observar que tanto na utilização da proteína *core*-GST como na utilização da proteína E2, não houve diferença significativa nos valores de absorbâncias usando diferentes concentrações proteicas;
7. Para determinar a concentração ideal das frações antigênicas (*core* e E2-GST) e dos anticorpos, um novo método imunoenzimático de captura acabou sendo desenvolvido. Utilizando o anticorpo monoclonal anti-GST, foi possível orientar adequadamente as proteínas recombinantes fusionadas à GST, aumentando a reatividade anti-*core* e anti-E2 presentes no *pool* de soro positivo para o VHC;
8. O novo ensaio imunoenzimático tanto de captura como o indireto, utilizando as proteínas recombinantes juntas (*core* + E2), demonstrou-se mais específico e sensível, pois houve um aumento significativo nos valores de absorbância;
9. O teste *imunoblotting* demonstrou que houve reconhecimento dos anticorpos anti-VHC presentes no *pool* de soros positivos, pelas proteínas recombinantes e pela

mistura das proteínas (*core* + E2-GST) e que não houve inespecificidade com o *pool* de soros negativos;

10. O teste imunocromatográfico para o VHC desenvolvido teve resultados mais sensíveis do que o ELISA comercial (Ortho-Clinical Diagnostic®) na diluição 1:1000 de *pool* de soros controles positivos para o VHC;
11. O novo método imunocromatográfico demonstrou-se satisfatório, pois revelou positividade entre os diferentes genótipos do VHC (genótipo 1, 2 e 3);
12. Comparando o teste imunocromatográfico desenvolvido com a reação de ELISA e PCR qualitativo, evidenciou concordância, sensibilidade e especificidade de 100%, pois não houve nenhum teste realizado com o imunocromatográfico desenvolvido que fosse diferente dos resultados obtidos pelo ELISA comercial e PCR qualitativo.

O trabalho mostrou que existe a possibilidade de construir testes comerciais imunocromatográficos para detecção de anticorpos anti-VHC, utilizando as proteínas recombinantes *core*-GST, E2-GST e a mistura (*core* e E2-GST) a um custo acessível, pois os reagentes foram produzidos durante o desenvolvimento do método e a sensibilidade e especificidade foi de 100%.

7. REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

AC&T CIENTÍFICA®. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus da hepatite C. Disponível em: < <http://www.ciencianews.com.br/revistavirtual/MicrosoftWord-artigoconcluidobiomol.pdf>> Acesso em: 28 de dezembro de 2012.

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

AQUINO NETO, F.R.; NUNES, D.S.S. Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins. Rio de Janeiro: Interciência, p. 64-8, 2003.

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

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.**, v. 197, p. 633-642, 2003.

BATTS, K.P.; LUDWIG, J. Chronic hepatitis. An update on terminology and reporting. **Am. J. Surg. Pathol.**, [S.l.], v. 19, p. 1409-1417, 1995.

BEDOSSA, P.; POYNARD, T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. **Hepatology**, [S.l.], v. 24, p. 289-293, 1996.

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

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

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica. 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Boletim epidemiológico: hepatites Virais. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Hepatites Virais: o Brasil está atento. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

BUCK, A. A.; GART, J. J. Comparison of screening test and a reference test in epidemiologic studies. Indices of agreement and their relation to prevalence. **Am. J. Epidemiol.**, v. 83, p. 586-92, 1966.

BUKH, J.; MILLER, R.H.; PURCELL, R.H. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. **Semin. Liver Dis.**, [S.l.], v. 15, n. 1, p. 41-63, 1995.

BURKE, K.P.; COX, A.L. Hepatitis C virus evasion of adaptive immune responses: a model for viral persistence. **Immunol. Res.**, 2010.

CAMPIOTTO, S.; Pinho, J.R.R.; Carrilho, F.J.; Da Silva, L.C.; Souto, F.J.D.; Spinelli, V.; Pereira, L.M.M.B.; Coelho, H.S.M.; Silva, A.O.; Fonseca, J.C.; Rosa, H.; Lacet, C.M.C.; Bernardini, A.P. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.** [S.l.], v. 38, p. 1, p. 41-9, 2005.

CARNEY, J.; HELEN, B.; JOANNA, S.; EMMA, W. Present and future applications of gold in rapid assays. *IVD Technology – for in Vitro Diagnostics Development and Manufacturing*, v. 12, p. 41-49, 2006.

CHANDLER, J.; GURMIN, T.; ROBINSON, N. The place gold in rapid tests. IVD Technol. **Magazine**, v. 6, n. 2, p. 37-49, IVDT Article Index, 2000.

CHOO, Q.; KUO, G.; WEINER, A.; OVERBY, L.; BRADLEY, D.; HOUGHTON, M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, p. 359-365, 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**, v. 88, p. 2451-2455, 1991.

CHUANLAI, X.; HUTING, W.; CHIFANG, P. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of diethylstilbestrol residues. **Biomed. Chromatogr.**, v. 20, n. 12, p. 1390-94, Dec., 2006.

COREY, K.E.; MENDEZ-NAVARRO, J.; GOROSPE, E.C.; ZHENG, H.; CHUNG, R.T. Early treatment improves outcomes in acute hepatitis C virus infection: a meta-analysis. **J. Viral. Hepat.**, [S.l.], v. 17, p. 201-207, 2010.

CUI, S.; CHEN C.; TONG, G. A simple and rapid immunochromatographic strip test for monitoring antibodies to H5 subtype Avian Influenza Virus. **J. Virol. Methods**, v. 152, n. 1-2, p. 102-05, Sep., 2008.

DESMET, V.J.; Gerber, M.; Hoofnagle, J.H.; Manns, M.; Scheuer, P.J. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. **Hepatology**, [S.l.], v. 19, p. 1513-1520, 1994.

DODD, R.Y.; NOTARI, E.P.; STRAMER, S.L. Current prevalence and incidence of infectious disease markers and estimated window-period risk in the American Red Cross blood donor population. **Transfusion**, v. 42, p. 975-979, 2002.

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.

FABIANI, F.L.; Hepatitis C vírus proteins. *W. J. Gastroenterol.*, v. 13 (17), p. 2406-2415, 2007.

FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2 edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 443, 2001.

FOCACCIA, R.; BARALDO, D.C.M.; FERRAZ, M.L.G.; MARTINELLI, A.L.C.; CARRILHO, F.J.; GONÇALES, JR.F.L.; PEDROSO, M.L.A.; COELHO, H.S.M.; LACERDA, M.A.; BRANDÃO, C.E.; MATTOS, A.A.; LIRA, L.G.C.; ZAMIN, JR. I.; PINHEIRO, J.O.P.; TOVO, C.V.; SOARES, J.A.S.; DITTRICH, S. Demographic and anthropometrical analysis and genotype distribution of chronic hepatitis C patients treated in public and private reference centers in Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.*, [S.l.], v. 8, n. 5, p. 348-355, 2004.

FOCACCIA, R.; BASSIT, L.; TAKEI, K.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; NISHIYA, S.A.; SABINO, C.E.; BASSIT, P.R.; DAMICO, E.; CHAMONE, D.F.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, G. Estimated prevalence of viral hepatitis in the general population of the municipality of São Paulo, measured by a serologic survey of a stratified, randomized and residence-based population. *Braz. J. Infect. Dis.*, [S.l.], v. 2, n. 6, p. 269-284, 1998.

GALEN, R.S.; GAMBINO, S.R. Beyond normality: the predictive value and efficiency of medical diagnosis. New York: John Willey & Sons, 1975.

GERMER, J.J.; RYS, P.N.; THORVILSON, J.N.; PERSING, D.H. Determination of hepatitis C virus genotype by direct sequence analysis of products generated with the Amplicor HCV test. *J. Clin. Microbiol.*, [S.l.], v. 37, p. 2625-2630, 1999.

GIL, E.S.; KUBOTA, L.T. Alguns aspectos de imunoensaios aplicados a química analítica. *Química Nova*, v. 22, n. 6, 1999.

GLOBAL surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in Collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium.

Journal of Viral Hepatology, [S.l.], v. 6, p. 35-47, 1999.

GRINER, P.F.; MAYEWSKI, R.J.; MUSHLIN, A. I.; GROENLANDIA, P. Selection and interpretation of diagnosis test and procedures. Principles and applications. **Ann. Intern. Med.**, v. 94, p. 557-00, 1981.

GUO, Y. R.; LIU, S.Y.; GUI, W.J.; ZHU, G. N. Gold immunochromatographic assay for simultaneous detection of carbofuran and triazophos in water samples. **Anal. Biochem.**, v. 389, n. 1, p. 32-9, Jun., 2009.

HUANG, S. H. Gold nanoparticle-based immunochromatographic test for identification of *Staphylococcus aureus* from clinical specimens. **Clin. Chim Acta**, v. 373, p. 139-143, 2006.

ISHAK, K.; BAPTISTA, A.; BIANCHI, L.; CALLEA, F.; DE GROOTE, J.; GUDAT, F.; DENK, H.; DESMET, V.; KORB, G.; MACSWEEN, R.N. Histological grading and staging of chronic hepatitis. **J. Hepatol.**, [S.l.], v. 22, p. 696-699, 1995.

JIN, Y.; JANG, J.W.; HAN, C.H. LEE, M.H. Development of ELISA and immunochromatographic assay for the detection of gentamicin. **J. Agric. Food Chem.**, v.53, n.20, p.7639-43, 2005.

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

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

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

KATO, 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.

KENFE, F. R. Desenvolvimento do teste Imunoenzimático Indireto para Detecção de Anticorpos anti-core do Vírus da Hepatite C. 2008. 84f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

KRAJAEJUN, T.; IMKHIEO, S.; INTARAMAT, A.; RATANABANANGKOON, K. Development of an immunochromatographic test for rapid serodiagnosis of human pythiosis. Clin. **Vaccine Immunol.**, v. 16, n. 4, p. 506-09, 2009.

KUCIRKA, L.M.; SARATHY, H.; GOVINDAN, P.; WOLF, J.H.; ELLISON, T.A.; HART, L.J.; MONTGOMERY, R.A.; ROS, R.L.; SEGEV, D.L. Risk of Window Period HIV Infection in High Infectious Risk Donors: Systematic Review and Meta-Analysis. **Am. J. Transplantation.**, v. 11, p. 1176-1187, 2011.

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.**, v. 242, p. 117-134, 2000.

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

LANDRO, J. A.; RAYBUCK, S. A.; LUONG, Y. P.; O'MALLEY, E. T.; HARBESON, S. L.; MORGENSTERN, K. A.; RAO, G.; LIVINGSTON, D. J. Mechanistic role of an NS4A peptide cofactor with the truncated NS3 protease of hepatitis C virus: elucidation of the

NS4A stimulatory effect via kinetic analysis and inhibitor mapping. **Biochemistry**, 36: 9340-9348, 1997.

LAUER, G.M.; WALKER, B.D. Hepatitis C virus infection. **N. Engl. J. Med.** [S.l.], v. 345, n. 1, p. 41–52, 2001.

LIN, Y.H.; WANG, Y.; LOUA, A.; GWO-JEN, D.; QIU, Y.; NADALA-Jr, E.C.B.; ALLAIN, J.P.; LEE, H.H. Evaluation of a new hepatitis B virus surface antigen rapid test with improved sensitivity. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n.10, p. 3319-24, 2008.

LINDENBACH, B.D.; RICE, C.M. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. **Nature**, v. 436, p. 933-938, 2005.

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

LIU, L.; PENG, C.; JIN, Z. Development and evaluation of a rapid lateral flow immunochromatographic strip assay for screening 19-nortestosterone. **Biomed. Chromatogr.**, v. 21, n. 8, p. 861-6, Aug., 2007.

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.

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

MARTINS, T.; NARCISO-SCHIAVON, J. L.; SCHIAVON, L. L. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, [S.l.], v. 57, n. 1, p. 107-112, 2011.

MATHUR, P.; SAMANTARAY, J.; CHAUHAN, N.K. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of kala-azar & post kala-azar dermal leishmaniasis at a tertiary care centre of North India. *Indian J. Med. Res.*, v. 122, n. 6, p. 485-90, 2005.

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

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

MIKAWA, A. Y. Desenvolvimento de teste imunocromatográfico para detecção de antígeno circulante do vírus da hepatite C. 2006. 171 f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

MIKAWA, A. Y.; TAGLIAVINI, S. A.; KENFE, F. R.; SILVA, F. H.; COSTA, P. I. Development of a rapid one-step immunochromatographic assay for HCV core antigen detection. **J. Virol. Methods.**, v. 158, n. 1-2, p. 160-4, Jun., 2009.

MILLIPORE CORPORATION. Rapid Lateral Flow Tests Strips: Considerations for product development. Bedford, MA: Millipore Corporation, 2002. 38 p.

NAINAN, O.V.; ALTER, M.J.; KRUSZON-MORAN, D.; GAO, F.X.; XIA, G.; MCQUILLAN, G.; MARGOLIS, H.S. Hepatitis C virus genotypes and viral concentrations in participants of a general population survey in the United States. **Gastroenterology**, [S.l.], v. 131, p. 478-484, 2006.

NELSON, D.R.; MAROUSIS, C.G.; DAVIS, G.L.; RICE, C.M.; WONG, J.; HOUGHTON, M.; LAU, J.Y. The role of hepatitis C virus-specific cytotoxic lymphocytes in chronic hepatitis C. **J. Immunol.** 158:1473–1481, 1997.

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**, [S.l.], v. 282, n. 5386, p. 103-7, 1998.

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

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.

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

PELERITO, A. et al. Evaluation of rapid test assure (R) *Helicobacter pylori* for diagnosis of *H. pylori* in pediatric population. **J. Microbiol. Methods**, v. 66, n. 2, p. 331-5, Aug., 2006.

PENG, D.; HU, S.; HUA, Y. Comparison of a new gold-immunochromatographic assay for the detection of antibodies against avian influenza virus with hemagglutination

inhibition and agar gel immunodiffusion assays. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 117, n. 1-2, p. 17-25, May, 2007.

PENIN, F.; DUBUISSON, J.; REY, F.A.; MORADPOUR, D.; PAWLOTSKY, J.M.; Structural biology of hepatitis C virus. **Hepatology**, 39: 5–19, 2004.

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

POYNARD, T.; MYERS, R.P.; REGIMBEAU, C.; THEVENOT, T.; LEROY, V.; MATHURIN, P.; OPOLON, P.; ZARSKI, J. Interferon for acute hepatitis C. *Cochrane Database Syst. Rev.*, [S.l.], v. 1, p. CD000369, 2002.

Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções. Brasília-DF, 2011. Disponível em:

< http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pcdt_hepatite_c_2011_retificado.pdf>

Acesso em: 05 de outubro de 2012.

REDDY, K.R.; WRIGHT, T.L.; POCKROS, P.J.; SHIFFMAN, M.; EVERSON, G.; REINDOLLAR, R.; FRIED, M.W.; PURDUM, P.P.; JENSEN, D.; SMITH, C.; LEE, W.M.; BOYER, T.D.; LIN, A.; PEDDER, S.; DEPAMPHILIS, J. Efficacy and safety of pegylated (40-kd) interferon alpha-2a compared with interferon alpha-2a in non cirrhotic patients with chronic hepatitis C. **Hepatology**. [S.l.], v. 33, n. 2, p. 433-8, Feb. 2001.

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): 91-9, 2009.

SABO, M.C.; LUCA V.C.; PRENTOE J.; HOPCRAFT S.E.; BLIGHT K.J.; YI M.; LIMÃO S.M.; BOLA J.K.; BUKH J.; EVANS M.J.; FREMONT D.H.; DIAMANTE M.S. **J. Virol.**, 2011, 85 (14): 7005-19.

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**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SCHEUER, P.J. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. **J. Hepatol.**, [S.l.], v. 13, p. 372-374, 1991.

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

SHIM, W.B. et al. Immunochromatography using colloidal gold-antibody probe for the detection of atrazine in water samples. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, n. 26, p. 9728-34, Dec., 2006.

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

SITHIGORNGUL, P.; RUKPRATANPORN, S.; PECHARABURANIN, N. A simple and rapid immunochromatographic test strip for detection of pathogenic isolates of *Vibrio harveyi*. **J. Microbiol. Methods**, v. 71, n. 3, p. 256-64, Dec., 2007.

SONNICHSEN, C.; REINHARD, B.M.; LIPHARDT, J.; ALIVISATOS, A.P. A molecular ruler based on plasmon coupling of single gold and silver nanoparticles. **Nat. Biotechnol.**, v. 23, n. 6, p. 741-5, Jun., 2005.

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

TANAKA, R.; YUHI, T.; NAGATANI, N.; ENDO, T.; KERMAN, K.; TAKAMURA, Y.; TAMIYA, E. A novel enhancement assay for immunochromatographic test strips using gold nanoparticles. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 385, n. 8, p. 1414-20, Aug., 2006.

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.

VAN DEN BROEK, I.; COLINA, O.; GORDILLO, F.; ANGARITA, B.; HAMADE, P.; COUNIHAN, H.; GUTHMANN, J.P. Evaluation of three rapid tests for diagnosis of *P. falciparum* and *P. vivax* malaria in Colombia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 75, n. 6, p. 1209-15, 2006.

VIRAL HEPATITIS PREVENTION BOARD (VHPB). Public health challenges for controlling HCV infection. Geneva: VHPB, 2005.

VOLKOV, A.; MAUK, M.; CORSTJENS, P.; NIEDEBALA, R.S. Rapid prototyping of lateral flow assays. In: RASOOLY, A.; HEROLD, K.E. *Methods in molecular biology: Biosensors and Biodetection - Methods and Protocols*, v. 2, Electrochemical and Mechanical Detectors, Lateral Flow and Ligands for Biosensors, v. 504, p. 217-35, 2009.

WANG, X., ZHAN, W., XING, J. Development of dot-immunogold filtration assay to detect white spot syndrome virus of shrimp. **J. Virol. Methods**, v. 132, n. 1-2, p. 212-5, Mar., 2006.

WEDEMEYER, H.; JACKEL, E.; WIEGAND, J.; COMBERG, M.; MANNS, M.P. Whom? When? How? Another piece of evidence for early treatment of acute hepatitis C. **Hepatology**, [S.l.], v. 39, p. 1201-1203, 2004.

WEDEMEYER, H.; MANNS, M.P. Acute Hepatitis C – therapy with interferon $\alpha 2b$. **Internest**, [S.l.], v. 43, p. 1477-1478, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Hepatitis C – 2002. Geneva: WHO, 2003. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/Hepc.pdf>>. Acesso em: 15 maio 2011.

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.

YANG, J.; JIN, M.; CHEN, J.; YANG, Y.; ZHENG, P.; ZHANG, A.; SONG, Y.; ZHOU, H.; HUANCHUN. Development and evaluation of an immunochromatographic strip for detection of *Streptococcus suis* type 2 antibody. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 19, n. 4, p. 355-361, Jul., 2007.

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.**, 2010. In press.

ZHANG, G.; GUO, J.; WANG, X. Immunochromatografic lateral flow strip test. In: RASOOLY, A.; HEROLD, K.E. Methods in molecular biology – Biosensors and Biodetection – Methods and Protocols, v. 2, Electrochemical and Mechanical Detectors, Lateral Flow and Ligands for Biosensors, v. 504, p. 169-83, 2009.

ZHOU, P.; LU, Y.; ZHU, J. Nanocolloidal gold-based immunoassay for the detection of the N-methylcarbamate pesticide carbofuran. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 14, p. 4355-59, Jul., 2004.

8. ANEXOS

8. ANEXOS – PREPARO DE SOLUÇÕES E TAMPÕES

Corante *Coomassie Blue*

O corante foi preparado da seguinte forma:

Comassie blue.....	1g
Metanol.....	200mL
Ácido acético.....	40mL
Água deionizada estéril qsp	400mL

Primeiro foi dissolvido o *coomassie* no metanol e depois foram acrescentados os outros componentes da solução. Ao final a solução foi filtrada em papel *Whatman* número 1 (SAMBROOK et al, 2001).

Gel de agarose 1%

De acordo com a metodologia descrita por Sambrook et al, 1989, para a confecção de um gel nas dimensões de 6cm x 8,5cm, foram adicionados à um béquer 0,3g de agarose e 30mL de tampão TAE (1x). A agarose foi diluída e aquecida no microondas por 2 minutos (agitando levemente a cada 30 segundos). Após a completa dissolução e queda de temperatura foi acrescido 1µl de Brometo de Etídeo (0,5µg/ml) e a agarose foi adicionada no suporte acrílico da cuba de eletroforese e resfriada até a sua polimerização.

Gel SDS-PAGE 12%

→ Gel de Empilhamento:

O gel de empilhamento foi preparado de acordo com a metodologia descrita por Sambrook et al, 2001, da seguinte forma:

Para um gel:

Água milli-Q.....	1545µL
SDS 10%.....	20µL
Tris HCl 2M pH6,8.....	125µL
Acril/Bis-Acril.....	300µL
Temed.....	5µL
PA 10%	18,75µL

→ **Gel de Resolução:**

O gel de resolução foi preparado de acordo com a metodologia descrita por Sambrook et al, 2001, da seguinte forma:

Para um gel:

Água Milli-Q.....	1590µL
SDS 10%.....	40µL
Tris HCl 2M pH8,8.....	750µL
Acril/Bis-Acril.....	1600µL
Temed.....	5µL
PA 10%.....	25µL

IPTG

IPTG.....	0,9532g (200mM)
Água deionizada estéril qsp	20mL

Após o preparo, o IPTG é guardado em freezer.

Meio LB (Meio Luria-Bertani broth) líquido

Este é um meio utilizado para crescimento bacteriano, e foi preparado da seguinte forma:

NaCl.....	1g
Triptona.....	1g
Extrato de levedura.....	0,5g

Em um béquer, adicionou-se os componentes do meio e 90 ml de água destilada, o frasco foi agitado até que todos os componentes estivessem dissolvidos. O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 5N, e então o volume da solução foi acertado para 100ml com água destilada. Para esterilização o meio foi colocado em autoclave por 20 minutos à 125°C (SAMBROOK et al, 2001).

Meio LB ágar (1,5%)

De acordo com a metodologia descrita por Sambrook et al, 2001, para cada litro de meio LB líquido foi adicionado 15g de ágar e procedeu-se a autoclavagem por 20 minutos. Em seguida, foi colocado no banho à 56°C e aguardado a queda da temperatura para que fosse distribuído em placas de petri.

SDS 10%

Foram adicionados 5g de SDS à 50mL de água deionizada estéril (SAMBROOK et al, 2001).

Solução corante de amostra ou Solução de azul de bromofenol

A solução corante de amostra utilizada na corrida eletroforética foi preparada de acordo com a metodologia descrita por Sambrook et al, 2001, da seguinte forma:

Glicerol	5mL (50%)
EDTA.Na ₂ .2H ₂ O	0,37g (0,1 M)
SDS	0,1g (1%)
Azul de bromofenol	0,01g (0,1%)
Água deionizada estéril qsp	10mL

Solução de Bloqueio contendo TBS 1x

Leite em pó desnatado.....	2,5g
TBS 1x.....	50mL

Solução de Ponceau

Para uma membrana:

Pouceau.....	250μL (0,5%)
Ácido acético.....	50μL (0,1%)
Água Milli-Q qsp.....	50mL

Solução descorante

A solução descorante foi preparada com ácido acético 7% (SAMBROOK et al, 2001).

Ácido acético.....	70mL
Água Milli-Q qsp 1000mL.....	930mL

Tampão da cuba pH 8,3 (5x)

O tampão da cuba foi preparado de acordo com a metodologia descrita por Sambrook et al, 2001, da seguinte forma:

Tris.....	15,14g (0,125M)
Glicina.....	72,06g (0,96M)
SDS.....	5g (0,1%)
Água deionizada estéril qsp	1000mL

Ao final o pH foi ajustado para 8,3 e o tampão foi filtrado em papel *Whatman* número 1 e armazenado em geladeira.

Tampão de amostra 3x

O tampão utilizado nas amostras induzidas e não induzidas foi preparado como segue (SAMBROOK et al, 2001):

Tris HCl 2M pH6,8.....	4,70mL
SDS.....	3,0g
Glicerol 87%.....	17,2mL

β -mercaptoetanol.....	7,5mL
Azul de bromofenol 0,5%.....	1,0mL
Água deionizada estéril qsp	50mL

Tampão de Eluição

Glutathiona reduzida.....	0,0307g (10mM)
TRIS-HCl pH 8,0.....	0,5mL (50mM)
Água deionizada estéril qsp	10mL

Tampão de Lavagem STE

TRIS HCl pH 8,0.....	0,12114g (10mM)
NaCl.....	0,876g (150mM)
EDTA.....	0,037224g (1mM)

O pH final foi ajustado para 8,0.

Tampão de Lise – TP

Lisozima.....	0,200g
Triton x-100.....	1mL (2%)
N-Laurylsarcosine.....	0,75g (1,5%)
DTT.....	0,039g (5mM)
Água Milli-Q qsp	50mL

Tampão de Lise com Imidazol

TRIS HCl.....	10mL (1M)
NaH ₂ PO ₄	6,88g
NaCl.....	20mL (5M)
Água deionizada estéril qsp	1000mL

O pH final foi ajustado para 8,0 com NaOH e adicionado 17,02g de Imidazol.

Tampão de Lise com Lisozima 0,2mM e Uréia 0,5mM e NaCl 200mM

TRIS-HCl.....	1,21g (10mM)
NaH ₂ PO ₄	6,89g (50mM)
NaCl.....	1,1680g (200mM)
Água deionizada estéril qsp	100mL
Lisozima	0,02g (0,2mg/mL)
Uréia	0,03g (0,5mM)

Tampão de Lise com Uréia 0,5mM

TRIS-HCl.....	1,21g (10mM)
NaH ₂ PO ₄	6,89g (50mM)
NaCl.....	5,84g (100mM)
Água deionizada estéril qsp	1000mL
Uréia.....	0,03g (0,5mM)

O pH final foi ajustado para 8,0 com NaOH e adicionado uréia (0,5mM).

Tampão de Lise

TRIS-HCl.....	1,21g (10mM)
NaH ₂ PO ₄	6,89g (50mM)
NaCl.....	5,84g (100mM)
Água deionizada estéril q.....	1000mL

O pH final foi ajustado para 8,0 com NaOH.

Tampão de Transferência

O tampão de transferência foi preparado de acordo com a metodologia descrita por Sambrook et al, 2001, da seguinte forma:

TRIS.....	2,5g (200mM)
Glicina.....	4,3g (50mM)
Água Milli-Q qsp.....	810mL
Metanol.....	165mL (15%)

O metanol foi adicionado somente na hora de encher a cuba.

Tampão MTPBS

NaCl.....	0,876g (150mM)
Na ₂ HPO ₄	0,227g (16mM)
NaH ₂ PO ₄	0,048g (4mM)
Água Milli-Q qsp	100mL

O pH final foi ajustado para 7,3.

Tampão PBS 1x

O tampão PBS 1x foi preparado adicionando em um béquer 1200mL de água destilada e em seguida os reagentes descritos abaixo e deixado sob agitação até a completa dissolução. O pH foi ajustado para 7,3 com NaOH e em seguida completou-se o volume com água destilada para 2000mL.

NaCl.....	16g (140mM)
KCl.....	0,4g (2,7mM)
Na ₂ HPO ₄	2,8g (10M)
KH ₂ PO ₄	0,48g

Tampão TAE (50x)

Tampão TAE (tampão Tris-Acetato-EDTA) é uma solução usada tanto como um tampão de corrida como em gel de agarose, tipicamente para a separação de ácidos nucleicos tais como o DNA e RNA. Ele é feito de tampão acetato da base Tris, normalmente a pH 8.0, e EDTA, os quais sequestram cátions divalentes (SAMBROOK et al, 2001).

TRIS base (2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol).....	242g
Ácido acético glacial.....	57,1ml
Solução de EDTA dissódico (Na ₂ EDTA) 0,5 M (pH 8.0)...	100ml
Água deionizada estéril qsp	1000mL

Tampão TBE (10x)

Tampão TBE (tampão Tris-Borato-EDTA) é uma solução usada como um tampão de corrida em gel de agarose.

TRIS base (2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol).....	121,10g (1M)
Ácido bórico anidro.....	55,60g (0,9M)
Solução de EDTA dissódico (Na ₂ 2H ₂ O) 10mM.....	3,70g (10mM)
Água deionizada estéril qsp	1000mL

O pH final foi ajustado para 8,3 à 25°C com NaOH.

TBS (Tris Buffered Soline) 10x

TRIS.....	60,5g (0,05M)
NaCl.....	87,6g (0,15M)
Água Milli-Q qsp.....	1000mL

O pH final foi ajustado para 8,0 com HCl.

TBS (Tris Buffered Soline) 10x

TRIS.....	60,5g (0,05M)
NaCl.....	87,6g (0,15M)
Água Milli-Q qsp.....	1000mL

O pH final foi ajustado para 8,0 com HCl.

Solução de Bloqueio contendo TBS 1x

Leite em pó desnatado 5%.....	2,5g
TBS 1x.....	50mL

Solução de Lavagem contendo TBS 1x

Tween 20 0,05%.....	25µL
TBS 1x.....	50mL

Tampão PBS 1x

O tampão PBS 1x foi preparado adicionando em um béquer 1200mL de água destilada e em seguida os reagentes descritos abaixo e deixado sob agitação até a completa dissolução. O pH foi ajustado para 7,3 com NaOH e em seguida completou-se o volume com água destilada para 2000mL.

NaCl.....	16g (140mM)
KCl.....	0,4g (2,7mM)
Na ₂ HPO ₄	2,8g (10M)
KH ₂ PO ₄	0,48g (1,8mM)

Solução de Bloqueio contendo PBS 1x

Leite em pó desnatado 5%.....	2,5g
PBS 1x.....	50mL

Solução de Lavagem contendo PBS 1x

Tween 20 0,05%.....	25µL
PBS 1x.....	50mL

Tampão de Eluição pH 8,0

Glutathiona reduzida.....	0,0307g (10mM)
TRIS-HCl pH 8,0.....	0,5mL (50mM)
Água deionizada estéril qsp	10mL

Solução TRIS-HCl

TRIS-HCl pH 8,0.....	1,4332g (0,05M)
Água deionizada estéril qsp	100mL

O pH final foi ajustado para 8,0 com HCl.

Tampão Carbonato/Bicarbonato 1M

Na ₂ CO ₃	1,59g
NaHCO ₃	2,98g
Água destilada qsp.....	1000mL

O pH final foi ajustado para 9,6.

Tampão Carbonato 0,1M

Na ₂ CO ₃	1,06g
Água destilada qsp.....	100mL

Solução TRIS-HCl contendo 10% de BSA

TRIS-HCl.....	2,8665g (0,1M)
Água deionizada estéril qsp	100mL
O pH final foi ajustado para 7,6 com HCl.	
BSA 10%.....	0,010g

Solução TRIS-HCl contendo 0,4% de glicerol

TRIS-HCl.....	2,8665g (0,1M)
Água deionizada estéril qsp	100mL
O pH final foi ajustado para 7,6 com HCl.	
Glicerol.....	0,004g

Solução TRIS-HCl contendo 0,5% de Caseína

TRIS-HCl.....	2,8665g (0,1M)
Água deionizada estéril qsp	100mL
O pH final foi ajustado para 7,6 com HCl.	
Caseína.....	0,005g

Solução 5% de etanol

Álcool Isopropílico.....	5mL
Água deionizada qsp	100mL

Tampão Na_2HPO_4 0,01M pH 7,5

Na_2HPO_4	0,358g
Água deionizada qsp	100mL