

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Clonagem de antígenos quiméricos contendo epítomos das glicoproteínas E1 e E2
do envelope do vírus da hepatite C e caracterização de suas propriedades
imunogênicas através da imunização com DNA**

Guilherme Ramos Oliveira e Freitas

Uberlândia – MG

Agosto-2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Clonagem de antígenos quiméricos contendo epítomos das glicoproteínas E1 e E2
do envelope do vírus da hepatite C e caracterização de suas propriedades
imunogênicas através da imunização com DNA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito parcial a
obtenção do título de Doutor

Guilherme Ramos Oliveira e Freitas (Doutorando)

Prof. Dr. Jonny Yokosawa (Orientador)

Uberlândia – MG

Agosto-2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

F866c
2014 Freitas, Guilherme Ramos Oliveira e, 1985-
Clonagem de antígenos quiméricos contendo epítomos das glicoproteínas E1 e E2 do envelope do vírus da hepatite C e caracterização de suas propriedades imunogênicas através da imunização com DNA / Guilherme Ramos Oliveira e Freitas. - 2014.
55 f. : il.

Orientador: Jonny Yokosawa.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Parasitologia - Teses. 2. Vírus - Hepatite C - Teses. 3. Glicoproteínas - Teses. 4. Vacinas - Ácido desoxirribonucleico - Teses. I. Yokosawa, Jonny. II. Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 576.8



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Guilherme Ramos Oliveira e Freitas

“Clonagem de antígenos quiméricos contendo epítopos das glicoproteínas E1 e E2 do envelope do vírus da hepatite C e caracterização de suas propriedades imunogênicas através da imunização com DNA”

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 28 de agosto de 2014.

Prof. Dr. Paulo Lee Ho
Instituto Butantan/SP

Prof. Dr. André Luiz da Silva Domingues
UFTM

Profa. Dra. Ana Carolina Gomes Jardim
ICBIM/UFU

Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior
ICBIM/UFU

Prof. Dr. Jonny Yokosawa – orientador
ICBIM/UFU

"O maior líder é aquele que reconhece sua pequenez, extrai força de sua humildade e experiência da sua fragilidade"

Augusto Cury

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por iluminar meu caminho, guiar meus passos e transmitir coragem, paciência, e sabedoria durante esta jornada.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Jonny Yokosawa, pela oportunidade e orientação. Sempre incentivou que eu desempenhasse o meu melhor e, foi isso que possibilitou a realização deste trabalho. Sou muito grato a todo conhecimento discutido e aprendido ao longo desses anos.

Agradeço aos professores Dr. Fábio de Oliveira e Dr. Luiz Ricardo Goulart, por permitirem a realização de alguns dos experimentos deste trabalho em seus laboratórios.

Agradeço às agências de fomento FAPEMIG, CNPq e CAPES pela disponibilização de verba que permitiu desde a aquisição de materiais diversos até o custeio de inscrições e viagens a eventos científicos, que possibilitaram a realização e divulgação deste trabalho.

Agradeço aos professores Dr. Thiago Wilson Patriarca Mineo, Dr^a Lizandra Ferreira de Almeida e Borges e Dr^a Ana Carolina Gomes Jardim pelas valiosas sugestões durante meu exame de qualificação.

Agradeço aos membros da banca examinadora: Prof. Dr. Paulo Lee Ho (Instituto Butantan – São Paulo), Prof. Dr. André Luiz da Silva Domingues (UFTM - Uberaba), Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior (UFU - Uberlândia) e Prof^a Dr^a Ana Carolina Gomes Jardim (UFU - Uberlândia), por aceitarem com presteza nosso convite e pela contribuição na concretização deste trabalho.

Agradeço a todos os professores do PPIPA que contribuíram para minha formação.

Agradeço às secretárias do PIPPA, Lucélia e Lucileide (as Lú!) pela assistência durante o doutorado.

Agradeço a todas as gerações de amigos do Laboratório de Virologia da UFU, em especial à Thelma. Afinal, foram dez anos de convivência! Muito obrigado pelos ensinamentos, companheirismo e por tornar o ambiente de trabalho mais agradável e descontraído.

Agradeço aos amigos da pós-graduação, em especial aos companheiros do Laboratório de Microbiologia. Obrigado pela força e momentos de descontração, principalmente durante o almoço e intervalos para o café.

Agradeço à Daiane, minha linda esposa, minha companheira, minha alma gêmea, que acompanhou de perto todo esse período e soube entender meus momentos de angústia, estresse e ansiedade (que não foram poucos!). Como não agradecer de coração a alguém que aceitou estar ao meu lado, mesmo eu sendo biólogo, pós-graduando e que ainda teve coragem de me dar o meu maior presente?

Agradeço à Helena, minha filha amada, que em tão pouco tempo me fez redescobrir o sentido da vida. Que mesmo sem saber, me faz lutar todos os dias pelos meus objetivos. E que também me faz sentir a pessoa mais amada do mundo quando me vê e abre um lindo sorriso.

Agradeço aos meus pais, André Luiz e Mônica, e também ao meu irmão Pedro Luiz, por todo amor, carinho, confiança e incentivo para eu concluir este estudo.

Agradeço aos meus avós Pedro e Célia, pessoas por quem tenho grande admiração e as faço meu exemplo de vida.

Agradeço com saudades aos meus grandes amigos Maca, Norival, Roberto, Paulo, Hugo, Paula e Cláudia que desde a época da graduação me apóiam nos momentos difíceis e com quem divido vários momentos felizes.

Lista de abreviaturas e siglas

6xHis	seis resíduos de histidina
8xHis	sequência nucleotídica codificante de oito resíduos de histidina
APC	células apresentadoras de antígeno
BSA	soro albumina bovina
C-terminal	região carboxi-terminal
dNTPs	desoxiribonucleotídeo trifosfatado
DO	densidade óptica
FD	fator de diluição
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
GST	glutathione S-transferase
HBV	vírus da hepatite B
HCV	vírus da hepatite C
HCVcc	partículas infecciosas do HCV produzidas em cultura de células
HCVpp	pseudopartículas do vírus da hepatite C
HIV	vírus da imunodeficiência adquirida humana
HVR	região hipervariável
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IF	imunofluorescência
IFN	interferon
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactosídeo
IRES	sítio interno de entrada de ribossomos
Kb	quilobases
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LDLR	receptor de lipoproteína de baixa densidade
mAb	anticorpo monoclonal
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
MS	Ministério da Saúde do Brasil
NANB	hepatites não A e não B
NK	células <i>natura killer</i>
NS	proteínas não estruturais
N-terminal	região amino-terminal
NTR	regiões não tradutoras

OMS	Organização Mundial da Saúde
Pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
PEG	polietilenoglicol
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes
SFB	soro fetal bovino
SPP	peptidase de peptídeo sinal
SR-BI	receptor scavenger classe B1
SVR	resposta virológica sustentada
U	unidade
UFF	unidades formadoras de foco
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade

Lista de figuras

Figura 1.	Representação esquemática da partícula viral do HCV.....	5
Figura 2.	Organização genética, clivagem da poliproteína e topologia das proteínas funcionais do HCV.....	6
Figura 3.	Ciclo de replicação do HCV.....	9
Figura 4.	a. Representação da organização dos genes E1 e E2 do HCV. b. Organização do gene E1E2. c. Localização das sequências correspondentes aos quatro peptídeos sintéticos utilizados para o ELISA (I a IV).....	16
Figura 5.	(a.) Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação obtidos por PCR com os <i>primers</i> FRE1EcoRI e RVE2IINotI utilizando pGSE1E2 como molde. (b.) Eletroforese em gel de agarose dos produtos da digestão de pEFJFHc-NS2 com as enzimas de restrição <i>EcoR</i> I e <i>Not</i> I. (c) Eletroforese em gel de agarose dos produtos da digestão de pEFJFHc-NS2 com as enzimas de restrição <i>Spe</i> I e <i>Xba</i> I.....	26
Figura 6.	Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação, obtidos por PCR com os <i>primers</i> T7 e BGH (a) , ou FRE2I e RVE2II (b)	27
Figura 7.	Reação de imunofluorescência indireta utilizando o mAb anti-6xHis e células Huh7.5/pEFE1E2.....	28
Figura 8.	Dados de ELISA expressos em índice ELISA (IE) obtidos com testes dos soros de camundongos contra as proteínas GST-E1E2 (a) e GST (b) , controle negativo).....	29
Figura 9.	Dados de ELISA expressos em índice ELISA (IE) obtidos com testes de soros de camundongos contra quatro diferentes peptídeos sintéticos (I a IV) cujas sequências estão presentes no antígeno E1E2.....	30

Figura 10. Ensaio de imunofluorescência indireta utilizando soro de camundongo imunizado com pEFE1E2 e células Huh7.5/JFH1..... **31**

Figura 11. Teste de vírus-neutralização com soros anti-pEFE1E2..... **32**

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3. MATERIAL e MÉTODOS.....	16
3.1 Construção do plasmídeo EFE1E2.....	16
3.2. Transfecção de células de mamíferos com pEFE1E2.....	18
3.3 Extração de DNA total e reação em cadeia da polimerase (PCR).....	19
3.4 Reação de imunofluorescência.....	20
3.5 Imunização de camundongos BALB/c.....	20
3.6 ELISA	22
3.7 Transfecção de células Huh7.5 com o RNA de JFH1 e produção de HCVcc.....	23
3.8 Reação de imunofluorescência utilizando o soro dos camundongos imunizados.....	24
3.9 Ensaio de vírus-neutralização.....	24
3.10 Análise dos resultados.....	25
4 RESULTADOS.....	26
4.1 Construção do plasmídeo EFE1E2.....	26
4.2 Expressão do antígeno E1E2 em células Huh7.5.....	27
4.3 Avaliação da resposta imune humoral induzida por imunização com DNA.....	27
4.4 Avaliação da capacidade vírus-neutralizante dos soros anti-pEFE1E2.....	32
5 DISCUSSÃO.....	33
6 CONCLUSÕES.....	37
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
ANEXO.....	55

RESUMO

Aproximadamente 130 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas pelo vírus da hepatite C (HCV). O desenvolvimento de uma vacina tem sido dificultado pela variabilidade genética do vírus, bem como pela falta de modelos animais apropriados. Neste estudo, descrevemos a construção de um antígeno artificial baseado na sequência nucleotídica da cepa JFH1 (genótipo 2a), contendo segmentos das glicoproteínas E1 e E2 do HCV, que têm sido relacionados com a indução de anticorpos com capacidade vírus-neutralizante. A imunogenicidade do antígeno E1E2 foi avaliada em camundongos BALB/c através da imunização com DNA administrado em três doses (imunização homóloga). Também, outro grupo de camundongos foi imunizado com duas doses de DNA e uma dose adicional da proteína E1E2 expressa em bactérias (imunização heteróloga). Os soros dos animais imunizados foram testados por ELISA, e reagiram contra a proteína recombinante E1E2, bem como contra quatro peptídeos sintéticos (I - IV), cujas sequências abrangem partes de E1E2. Os anticorpos presentes em alguns soros dos dois grupos de camundongos reagiram contra as proteínas virais expressas em células Huh7.5 produtoras de HCVcc. Além disso, os soros dos animais apresentaram anticorpos com capacidade vírus-neutralizante, evidenciada pela redução da infecção viral em cultura de células de aproximadamente 40%. Os nossos resultados demonstraram a capacidade de um antígeno artificial, administrado como vacina de DNA, para induzir anticorpos específicos com capacidade neutralizante contra a(s) glicoproteína(s) do HCV. Investigações adicionais ainda são necessárias para explorar a resposta imune celular desencadeada por este antígeno.

Palavras chave:

Vírus da hepatite C

Glicoproteínas E1 e E2

Vacina de DNA

Anticorpos vírus-neutralizantes

ABSTRACT

Approximately 130 million people are infected chronically with hepatitis C virus (HCV). The development of vaccines has been hampered by the high genetic variability of the virus as well as by the lack of suitable animal models. In this study, we describe the construction of an artificial antigen based in the nucleotide sequence of the strain JFH1 (genotype 2a) containing segments of the HCV glycoproteins E1 and E2 that have been reported to elicit neutralizing antibodies against HCV. The immunogenicity of the E1E2 antigen was assessed in BALB/c mice by DNA immunization given in three doses (homologous immunization). Also, another group of mice was immunized with two doses of DNA and one additional dose of bacteria-expressed E1E2 protein (heterologous immunization). The sera of immunized mice were tested by ELISA and reacted against the recombinant E1E2 protein as well as four synthetic peptides (I - IV) covering parts of the E1E2 sequence. In addition, the antibodies present in some sera of both immunized groups of mice reacted against viral proteins in Huh7.5 cells producing JFH1 strain HCV in immunofluorescence assay. Moreover, the sera of animals had antibodies with virus-neutralizing capacity as evidenced by a reduction in approximately 40% of viral infection in cell culture. Our results demonstrate the ability of an artificial antigen, administered as DNA vaccine, to elicit specific antibodies with neutralizing capacity against HCV glycoprotein(s). Further investigations are still needed to explore the cellular immune response elicited by this antigen.

Key words:

Hepatitis C virus

Glycoproteins E1 and E2

DNA vaccine

Virus-neutralizing antibodies

1. INTRODUÇÃO

A hepatite C

A hepatite C constitui uma doença infecciosa que acomete o fígado e é causada pelo vírus da hepatite C (HCV) (Organização Mundial da Saúde – OMS, 2014). Em 1975, detectou-se que muitos dos casos relacionados à transfusão de sangue e/ou hemoderivados não apresentavam marcadores para infecções causadas pelos vírus das hepatites A e B, sendo então classificados como hepatites não A e não B (NANB) (ALTER *et al.*, 1975; FEINSTONE *et al.*, 1975).

Após mais de uma década de estudos, Choo e colaboradores isolaram parte do genoma do vírus causador de hepatites NANB a partir do plasma de um chimpanzé cronicamente infectado, passando a denominá-lo de HCV (CHOO *et al.*, 1989). Este patógeno foi associado a aproximadamente 90% dos casos de hepatites NANB e atualmente é considerado um dos principais responsáveis por doença hepática crônica em todo o mundo (CHOO *et al.*, 1989; HOUGHTON, 2009).

A transmissão do HCV ocorre principalmente pela via parenteral, com exposição ao sangue contaminado. Casos de transmissão via transfusão sanguínea e/ou hemoderivados e por transplantes de órgãos de doadores infectados tiveram sua frequência significativamente reduzida a partir do início da década de 1990, pela introdução dos testes anti-HCV para a triagem de doadores (SHEPARD *et al.*, 2005; LAVANCHY, 2011). Atualmente, destaca-se como importante forma de transmissão do HCV o compartilhamento de materiais para uso de drogas injetáveis, correspondendo a mais de 40% dos casos de infecção. No Brasil, dependendo da região de estudo, entre 5,8 - 36,2% dos usuários de drogas estão infectados pelo HCV (BASTOS *et al.*, 2000; SEGURADO *et al.*, 2004; LOPES *et al.*, 2009). Segundo Chung *et al.* (2003), a transmissão ocupacional relacionada a trabalhadores da área da saúde, ocorrida por acidentes com objetos perfurocortantes, pode atingir cerca de 3% dos casos de infecção pelo HCV. Também a transmissão perinatal pode ocorrer em até 6% dos nascidos de mães infectadas (DAL MOLIN *et al.*, 2002; COTTRELL *et al.*, 2013).

A possibilidade de transmissão do HCV pela via sexual é controversa, sendo que alguns estudos indicam que o risco é mínimo ou inexistente entre casais heterossexuais monogâmicos (TOHME e HOLMBERG, 2010; TERRAULT *et al.*, 2013). Entretanto, existe um aumento no risco da transmissão sexual entre aqueles que mantêm contato íntimo com múltiplos parceiros, pessoas co-infectadas com o vírus da imunodeficiência

adquirida humana (HIV) ou outras infecções sexuais, presença de doenças genitais ulcerativas, ou ainda que realizem práticas relacionadas a traumas na mucosa genital (ROMANO *et al.*, 2010; TOHME e HOLMBERG, 2010).

São apontados ainda como fatores de risco para hepatite C práticas como as injeções terapêuticas não seguras, tratamento dentário sem o uso apropriado de equipamentos de proteção, hemodiálise, confecção de tatuagens e colocação de *piercing*, além do compartilhamento de objetos de uso pessoal, tais como lâminas de barbear, escovas de dente e instrumentos para manicure/pedicure (HAYES e HARKNESS, 2001; ERNST e SHERMAN, 2003; MAHBOOBI *et al.*, 2013).

Segundo a OMS, existem de 130 a 150 milhões de pessoas com infecção crônica causada pelo HCV no mundo (2-3% da população mundial). A cada ano, ocorrem 3 - 4 milhões de novos casos e 350 mil óbitos em decorrência de complicações provocadas pela doença (OMS, 2014). A prevalência de hepatite C varia de acordo com a região analisada, sendo os menores índices encontrados entre os países do Reino Unido e da Escandinávia (0,01 - 0,1%) e os maiores no Egito (15 - 20%) (ALTER, 2007; LAVANCHY, 2011; MOHAMOUD *et al.*, 2013). Também pode ser notada uma variação quanto à faixa etária mais acometida pelo HCV. Em países como os Estados Unidos da América e a Austrália, a faixa etária com maior incidência é de 30 a 49 anos de idade, respondendo por mais de 2/3 das infecções. Já no Japão, Espanha e Itália, a maior prevalência de casos de hepatite C encontra-se entre os maiores de 50 anos de idade (LAVANCHY, 2011).

De acordo com a OMS, o Brasil é considerado um país de endemicidade intermediária para hepatite C, com prevalência de infecção de 2,5 - 10% (OMS, 2014). Entretanto, no Boletim Epidemiológico sobre Hepatites Virais, publicado em 2012 pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (MS), a prevalência global para HCV no Brasil é de 1,38%, colocando o país como sendo de baixa endemicidade (MS, 2012). Ainda neste boletim, a faixa etária de 40 a 59 anos de idade corresponde a de maior incidência, e o uso de drogas, bem como o uso de seringa de vidro em algum momento da vida, foram associados como fatores de risco para infecção pelo HCV (MS, 2012).

De modo geral, a fase aguda da infecção apresenta-se de forma assintomática em cerca de 80% dos casos, dificultando o diagnóstico (BAILEY *et al.*, 2009; STIEFELHAGEN, 2009). Quando presente, o quadro clínico é semelhante àquele decorrente de outros agentes responsáveis pelas hepatites virais, com o paciente

podendo apresentar icterícia, anorexia, astenia, mal-estar e dor abdominal. O diagnóstico diferencial só é possível com a realização de testes laboratoriais para identificação do genoma viral ou identificação de anticorpos específicos para o HCV.

Em cerca de 80% dos casos, o indivíduo não consegue eliminar o vírus do seu organismo, desenvolvendo-se assim a hepatite C crônica (BAILEY *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2012). Na maioria dos portadores crônicos de HCV, as primeiras décadas após a infecção caracterizam-se por evolução insidiosa, com ausência de sinais ou sintomas. Nos casos mais graves, ocorre a progressão para cirrose (20% dos casos crônicos), sendo que destes 1-5% podem progredir para o carcinoma hepático. Estimam-se que 27% dos casos de cirrose e 25% de carcinoma hepático ocorram em pacientes infectados pelo HCV (HUANG *et al.*, 2012).

A infecção crônica pelo HCV é atualmente a maior causa de indicação de transplantes de fígado, compreendendo de 40 a 50% dos casos de indivíduos que esperam a realização do transplante e pacientes que já realizaram um transplante prévio (BROWN, 2005; BECKEBAUM e SCHMIDT, 2014)

O vírus da hepatite C

O HCV é um membro da família *Flaviviridae*, sendo o único representante do gênero *Hepacivirus* capaz de infectar humanos (*International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV*, 2014). Estruturalmente, as partículas virais são esféricas, com aproximadamente 40-60 nm de diâmetro, contendo envelope derivado da membrana do retículo endoplasmático da célula hospedeira, capsídeo de simetria icosaédrica e genoma viral (**Figura 1**).

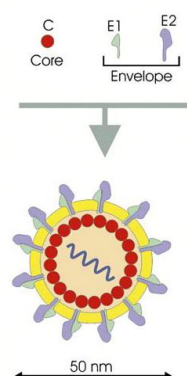


Figura 1. Representação esquemática da partícula viral do HCV, formada pelas proteínas *core*, constituindo o capsídeo viral, glicoproteínas do envelope E1 e E2 e material genético (adaptado de Roingard *et al.*, 2004).

O genoma viral é constituído por RNA de fita simples e polaridade positiva (+) com aproximadamente 9,6 quilobases (Kb) (ROINGEARD *et al.*, 2004; BARTENSCHLAGER *et al.*, 2013). Possui uma única sequência nucleotídica codificante, flanqueada por regiões não tradutoras (NTR) próximas às extremidades 5' e 3' (**Figura 2**). Na região 5'-NTR encontra-se o sítio interno de entrada de ribossomos (IRES), constituído por três domínios estruturais em forma de alça (*stem loops* – domínios II, III e IV).

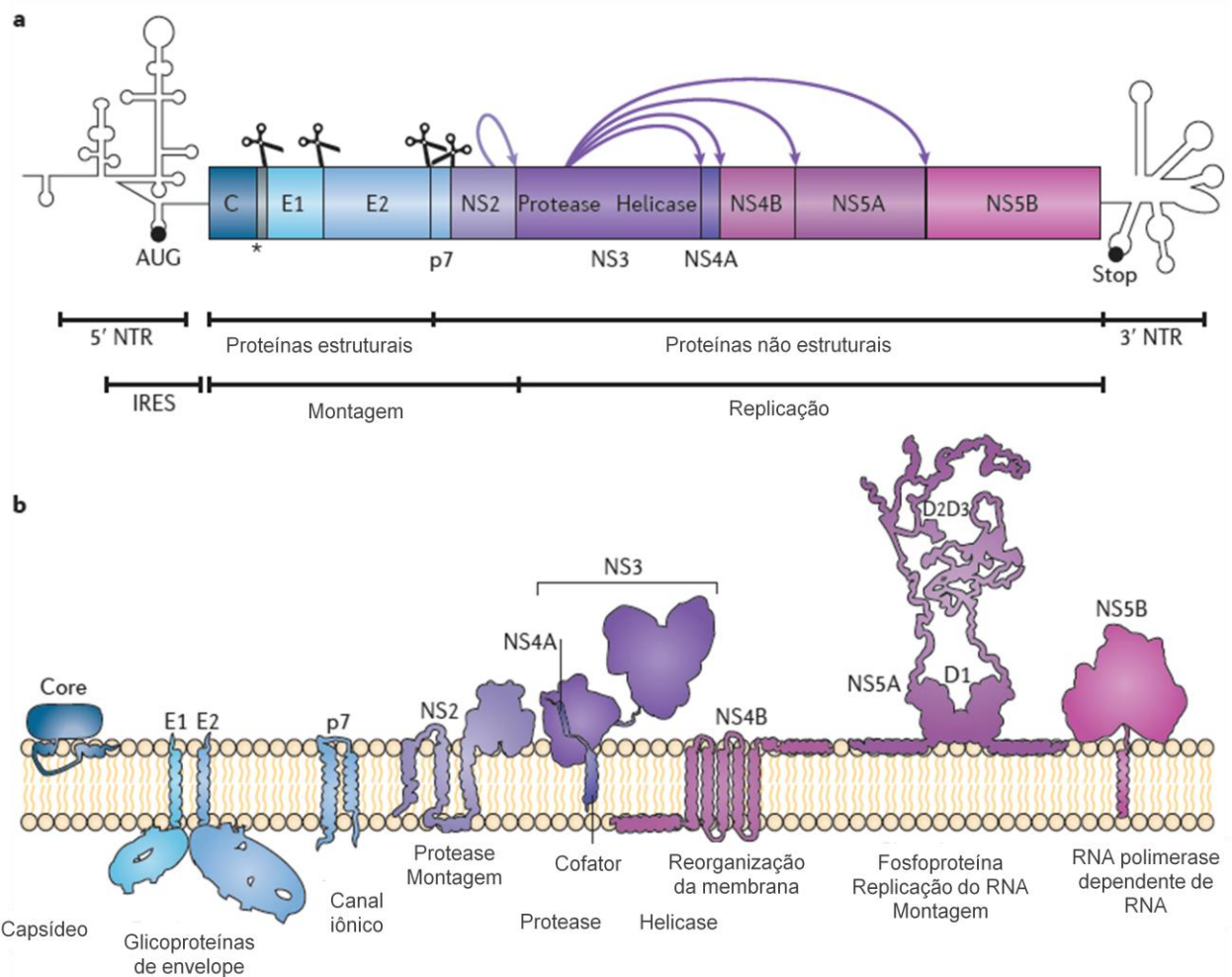


Figura 2. Organização genética, clivagem da poliproteína e topologia das proteínas funcionais do HCV. **a.** Sequência nucleotídica codificante da poliproteína viral, e estruturas secundárias das regiões 5' e 3' não tradutoras (NTRs). A região 5'-NTR contém o sítio interno de entrada de ribossomos (IRES). Os sítios da poliproteína clivados por proteases celulares são representadas pelas tesouras. As setas indicam os sítios de clivagem da poliproteína reconhecidos por proteases virais. **b.** Topologia de membrana e principais funções dos produtos da clivagem da poliproteína viral (adaptado de Bartenschlager *et al.*, 2013)

O RNA do HCV é traduzido em uma poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos, que posteriormente é clivada pela ação de proteases celulares e viral em 10 proteínas funcionais. Na região amino-terminal da poliproteína encontram-se as

proteínas estruturais que constituem o vírion: a proteína do *core* (C), responsável pela formação do capsídeo; e as glicoproteínas de envelope E1 e E2. Em seguida, uma pequena proteína integral, p7, é sintetizada e, logo após as proteínas não estruturais (NS): NS2; NS3; NS4A; NS4B; NS5A; NS5B (MORADPOUR *et al.*, 2007; BARTENSCHLAGER *et al.*, 2013). As proteínas estruturais *core*, E1 e E2, juntas com p7 e NS2, são essenciais ao processo de montagem da partícula viral (módulo de montagem). As outras proteínas não estruturais são necessárias à replicação do RNA viral (módulo de replicação) (BARTENSCHLAGER *et al.*, 2013).

A proteína do *core* é uma proteína α -helicoidal, com capacidade de se ligar a outras moléculas da mesma proteína e a moléculas de RNA *in vitro* formando partículas que se assemelham ao nucleocapsídeo viral (KUNKEL *et al.*, 2001). Essa proteína é clivada da poliproteína viral por uma protease de origem celular (peptidase de peptídeo sinal - SPP) e, apesar da sua função principal ser a formação do nucleocapsídeo, por meio da encapsidação do genoma viral, também existem evidências de que esteja envolvida em outras funções por meio de sua interação com diversas proteínas celulares (PENIN *et al.*, 2004; MCLAUCHLAN, 2009). Modulação da transcrição gênica, proliferação celular, morte e sinalização celular, interferência no metabolismo lipídico e supressão da resposta imune do hospedeiro seriam algumas dessas possíveis funções do *core*.

As glicoproteínas E1 e E2 são classificadas como proteínas transmembrânicas de tipo I, com um ectodomínio N-terminal e um pequeno domínio C-terminal de transmembrana. Após a formação da partícula viral, essas glicoproteínas encontram-se inseridas na bicamada fosfolipídica do envelope, onde formam um complexo não-covalente de heterodímero, essencial aos processos de adsorção e penetração através da interação com receptores da célula hospedeira (**Figura 3**) (MORADPOUR *et al.*, 2007). Apesar deste mecanismo ainda não estar totalmente elucidado, algumas proteínas de membrana já foram identificadas como receptores. CD81 e receptor scavenger classe B1 (SR-BI) se ligam à glicoproteína E2 e são considerados essenciais para entrada do vírus na célula (FLINT *et al.*, 1999; SCARSELLI *et al.*, 2002; BARTENSCHLAGER *et al.*, 2013). Entretanto, a ligação a esses receptores não é suficiente e o processo de penetração da partícula viral necessita da interação de co-receptores, como claudinas tipo 1 e ocludinas (BARTOSCH *et al.*, 2003; EVANS *et al.*, 2007; BARTENSCHLAGER *et al.*, 2013). Também o receptor de lipoproteínas de baixa densidade (LDLR) já foi descrito como participante da ligação entre a partícula viral e a célula, uma vez que vírions encontram-se associados com moléculas de lipoproteínas de

baixa densidade (LDL) ou lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e assim direcionam a interação com os receptores CD81 (WUNSCHMANN *et al.*, 2000).

A proteína p7 é composta por 63 aminoácidos e é frequentemente clivada de forma incompleta a partir de E2 (CARRERE-KREMER *et al.*, 2002). Evidências indicam que essa proteína seja necessária à replicação viral *in vivo* e que possui função na maturação e liberação das partículas virais (MORADPOUR *et al.*, 2007).

As proteínas NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B exercem funções enzimáticas. A NS2 é uma proteína transmembrânica, que juntamente com a porção N-terminal da NS3 constitui a protease NS2/NS3 dependente de zinco, que é capaz de clivar a NS2 a partir da poliproteína (MORADPOUR *et al.*, 2007). Estudos sugerem o envolvimento específico da NS2 durante a montagem de partículas infecciosas do HCV e que essa proteína seja essencial para replicação do RNA viral (MORADPOUR *et al.*, 2007; YI *et al.*, 2009).

A NS3 é uma proteína multifuncional, com sua região N-terminal com função de serino-protease e uma região C-terminal com atividade de RNA helicase/NTPase. A função de serino-protease, juntamente com o co-fator NS4A, é responsável pela clivagem das junções NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A e NS5A/NS5B, dando origem às proteínas funcionais do vírus (MOTTOLA *et al.*, 2002; BARTENSCHLAGER *et al.*, 2013). A NS4B é responsável por alterações na região da membrana que serve como suporte para a replicação do HCV (EGGER *et al.*, 2002). A NS5A é uma proteína altamente fosforilada, possivelmente envolvida no complexo replicativo. Já a NS5B é a RNA polimerase dependente de RNA (MOTTOLA *et al.*, 2002). Proteínas virais, em conjunto com fatores da célula hospedeira, induzem a formação de compartimentos membranosos (denominados *membranous web*) onde ocorre a replicação do RNA viral através de uma fita de RNA (-) usada como molde para a transcrição de várias cópias de RNA (+) (BARTENSCHLAGER *et al.*, 2013).

A análise da sequência completa do genoma de diferentes cepas do HCV permitiu classificá-las em sete grupos geneticamente distintos denominados de genótipos (de 1 a 7), que divergem entre si de 30 a 35% em suas sequências nucleotídicas (MURPHY *et al.*, 2007; NAKANO *et al.*, 2012; NEWMAN *et al.*, 2013; SIMMONDS, 2013). Essas variantes genotípicas foram originadas por meio de mutações que ocorrem durante o ciclo de replicação viral, relacionadas à ausência de atividade corretiva da NS5B, e são reflexo do processo evolutivo do vírus (DUFFY *et al.*, 2008). Cada um dos sete genótipos do HCV é subdividido em diferentes subtipos, que tipicamente diferem entre

si de 20 a 25% em suas seqüências nucleotídicas (SIMMONDS *et al.*, 2005; SIMMONDS, 2013). As mutações também levam à formação, em um mesmo indivíduo, de variantes virais correlatas porém distintas, denominadas quasiespécies, que divergem entre si em menos de 10% em suas seqüências nucleotídicas (MURPHY *et al.*, 2007). As maiores taxas de variabilidade genética são observadas nos genes das glicoproteínas E1 e E2 e da NS5A, enquanto que as menores taxas estão na 5'-NCR (SIMMONDS *et al.*, 2005; SIMMONDS, 2013).

No gene codificante de E2, são identificadas três regiões hipervariáveis (HVR), denominadas HVR1, HVR2 e HVR3. Essa variabilidade é considerada relevante para o mecanismo proposto de escape do vírus à resposta imune do hospedeiro e à resposta ao tratamento com drogas antivirais (TORRES-PUENTE *et al.*, 2008). Diversos estudos apontam seqüências dentro das HVRs como sendo importantes para o processo de adsorção viral (PENIN *et al.*, 2004; KAITO *et al.*, 2006; DUBUISSON *et al.*, 2008).

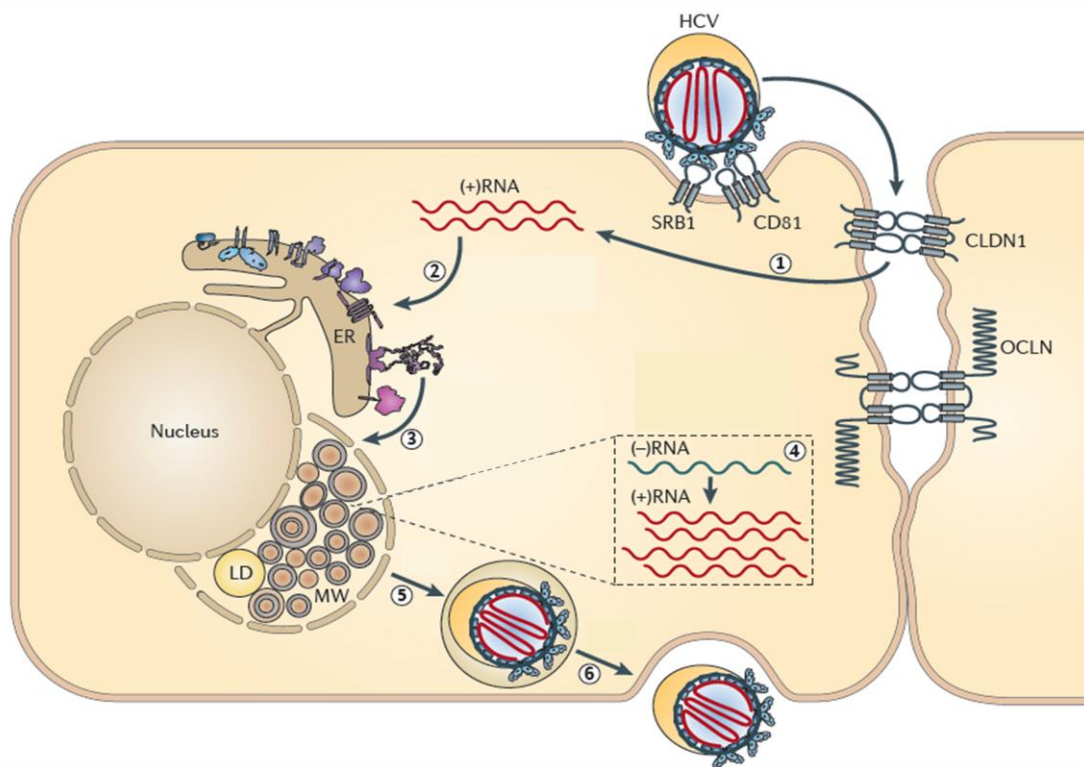


Figura 3. Ciclo de replicação do HCV. **1.** Após a adsorção inicial da partícula viral aos receptores celulares (CD81 ou SRBI), se iniciam interações com os co-receptores (claudinas 1 ou ocludinas) e posteriormente ocorre a penetração viral por endocitose. **2.** O RNA viral é liberado no citoplasma e traduzido no interior do retículo endoplasmático rugoso, dando origem à poliproteína viral que em seguida é clivada nas proteínas funcionais. **3.** Proteínas virais, em conjunto com fatores da célula hospedeira, induzem a formação de compartimentos membranosos (denominados *membranous web*). **4.** A replicação do RNA viral ocorre no interior de regiões inespecíficas dos compartimentos membranosos, através de uma fita de RNA (-) usada como molde para a transcrição de várias cópias de RNA (+). **5.** A montagem das novas partículas, provavelmente, se inicia nas proximidades da membrana do retículo. **6.** A liberação das novas partículas do HCV ocorre via exocitose (adaptado de Bartenschlager *et al.*, 2013).

Resposta imune contra a infecção pelo HCV

Grande parte das manifestações clínicas da hepatite C durante a fase crônica da infecção não é resultado direto da ação viral, mas sim da resposta imune, responsável pela destruição de hepatócitos, porém, sem conseguir eliminar o vírus do organismo na maioria dos casos (DUSTIN e RICE, 2007; LLOYD *et al.*, 2007).

Assim como em outras infecções virais, um dos primeiros mecanismos de defesa do organismo contra o HCV é a produção de interferons tipo I (IFN- α e IFN- β) (LLOYD *et al.*, 2007). A replicação viral é a causa direta da produção desses IFNs, uma vez que o RNA de dupla fita, produzido durante o ciclo viral, é um potente indutor de IFN- α (CELLA *et al.*, 1999). Apesar de o HCV sofrer a ação dos IFNs (CASTET *et al.*, 2002), já foi demonstrado que o vírus possui estratégias que interferem na atividade antiviral dessas citocinas (LLOYD *et al.*, 2007).

A replicação do HCV no paciente, sem a presença de sinais de inflamação hepática, não é apenas indicativo da natureza não-citopática do vírus, mas também da contribuição das células *natural killer* (NK) e NK-T (DUSTIN e RICE, 2007; PETROVIC *et al.*, 2012). Essas duas populações celulares são componentes da resposta imune inata que respondem rapidamente à infecção através da produção de IFN- γ e da indução da morte de células infectadas (BIRON e BROSSAY, 2001). O IFN- γ produzido por essas células não tem apenas função antiviral, como também medeia o recrutamento de células inflamatórias para o tecido hepático (LIU *et al.*, 2000; TSENG e KLIMPEL, 2002; PETROVIC *et al.*, 2012). Como estratégia de evasão do sistema imune do hospedeiro, o HCV evoluiu de tal forma a apresentar múltiplos mecanismos para conter a resposta das células NK e NK-T. Pileri *et al.* (1998) mostraram que a proteína E2 pode inibir diretamente as funções das células NK, através de sua ligação com o CD81.

As células dendríticas atuam como a ligação entre resposta imune inata e adaptativa (PETROVIC *et al.*, 2012). Sinais liberados pelo sistema imune inato (IFNs tipo I, células NK e NK-T) levam à maturação dessas células, que funcionam como apresentadoras de antígenos (APCs) para os linfócitos T, desencadeando consequentemente a resposta antígeno-específica (BANCHEREAU *et al.*, 2000). Apesar de ainda não ser clara, existe a possibilidade de células dendríticas serem infectadas *in vivo* pelo HCV (BAIN e INCHAUSPE, 2001), fato que pode contribuir para alterações de suas funções, levando a uma fraca estimulação da resposta imune adaptativa.

A resposta imune humoral desempenha um papel importante durante a infecção pelo HCV (EDWARDS *et al.*, 2012; TARR *et al.*, 2012). O controle da infecção está associado, mesmo que temporariamente, à produção de anticorpos específicos contra as proteínas do envelope viral, de maneira que soros com altos níveis desses anticorpos previnem a infecção (FARCI *et al.*, 1996; ZIBERT *et al.*, 1997). Utilizando pseudopartículas contendo glicoproteínas do envelope do HCV (HCVpp), Logvinoff *et al.* (2004) demonstraram, *in vitro*, a presença de anticorpos com capacidade neutralizante, mesmo quando o soro foi obtido de pacientes com infecção persistente, indicando a existência concomitante de vírus e anticorpos neutralizantes em um mesmo indivíduo infectado. Esses anticorpos reconhecem epítomos presentes nas proteínas do envelope viral, inclusive nas HVRs da proteína E2 (NETSKI *et al.*, 2005).

A resposta imune celular multiespecífica, com citocinas provenientes da ativação de linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) e linfócitos T auxiliares (CD4⁺) de perfil Th1, é detectada no sangue de indivíduos com infecção auto-limitada (GRUNER *et al.*, 2000; LECHNER, GRUENER *et al.*, 2000; THIMME *et al.*, 2001; PETROVIC *et al.*, 2012). Esse tipo de resposta é mais vigorosa do que em pacientes que desenvolvem infecção crônica, podendo ser proposto que uma resposta imune celular eficiente seja um dos mecanismos responsáveis pelo controle da infecção pelo HCV. Da mesma forma, a falha nesse tipo de resposta pode estar ligada à cronicidade da doença (LECHNER, WONG *et al.*, 2000).

Tratamento contra a hepatite C

Atualmente, o tratamento contra a hepatite C crônica é realizado com uso de formas baseadas em IFN- α e ribavirina, com o objetivo de se controlar a reação inflamatória e a progressão para a cirrose e para o câncer hepático (OMATA *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2013). Como referido anteriormente, o IFN- α é um componente da resposta imune com ação antiviral e foi o primeiro medicamento utilizado contra a hepatite C. Em sua forma convencional, utilizado como monoterapia, alcança uma resposta virológica sustentada (RVS) em 16-20% dos casos tratados, enquanto que combinado com ribavirina a RVS pode chegar 35-40% dos pacientes tratados (BARTENSCHLAGER *et al.*, 2013).

Terapias baseadas na administração de IFN- α modificado como os chamados PEG-IFNs, nos quais uma molécula de polietilenoglicol (PEG) é adicionada à molécula do IFN, demonstraram ser mais eficazes que as terapias convencionais. O PEG possui a capacidade de retardar a eliminação do composto do sangue do paciente tratado,

mantendo a concentração estável por um período de tempo maior e, dessa forma, diminuindo o número e a frequência de doses a serem administradas (OMATA *et al.*, 2012). Sua combinação com a ribavirina no tratamento de pacientes cronicamente infectados sem sinais de cirrose alcançou RVS de 76-84% em pacientes infectados pelos genótipos 2 ou 3 do HCV, e de 42-52% pelo genótipo 1 (WOHNSLAND *et al.*, 2007; KLENERMAN *et al.*, 2009). Entretanto, o aparecimento de efeitos colaterais relacionados ao uso de PEG-IFN acarreta dificuldades na continuidade do tratamento e, ainda, o alto custo desta terapia faz com que o IFN convencional seja ainda utilizado em países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil (YANG *et al.*, 2013).

Em 2011, a *U.S. Food and Drug Administration* (FDA), órgão dos Estados Unidos da América, aprovou o uso do boceprevir e do telaprevir, dois antivirais específicos, inibidores da NS3, para o tratamento da hepatite C, que combinados com PEG-IFN e ribavirina alcançaram uma RVS em 70 a 80% dos pacientes tratados durante os testes clínicos (KWO *et al.*, 2010; KUMADA *et al.*, 2012). Apesar da tripla terapia no tratamento de infecções pelo HCV de genótipo 1 estar associada à diminuição no tempo do tratamento, efeitos adversos já foram descritos, como reações hematológicas causadas pelo boceprevir e quadros de exantema e anemia associados ao telaprevir (CHOU *et al.*, 2013).

Além disso, estudos já descreveram variantes virais resistentes aos inibidores de protease (BACON *et al.*, 2011; POORDAD *et al.*, 2011; SULLIVAN *et al.*, 2013). Estudos realizados com pacientes incluídos nos testes clínicos de fase III dos inibidores de NS3 mostraram a presença de variantes resistentes em 5 - 7% dos pacientes. Essas variantes apresentavam, dentre outras, substituições nos aminoácidos de posição 155 (R155K) e 156 (A156S) associadas à grande diminuição da sensibilidade viral ao tratamento (SULLIVAN *et al.*, 2013).

Vacinas contra o HCV

Ao contrário do que ocorre com o vírus da hepatite B (HBV), outro importante agente causador de hepatite crônica, até o momento não existe uma vacina eficaz para a prevenção da infecção causada pelo HCV. Diversos grupos de pesquisadores, em todo o mundo, estão trabalhando no desenvolvimento de uma possível vacina (MAJID e BARBER, 2006; SHI *et al.*, 2006; WAKITA, 2008; WEN *et al.*, 2010).

Os principais alvos testados por esses grupos são as glicoproteínas E1 e E2, uma vez que estão expostas na superfície da partícula viral e, desta forma, à ação de anticorpos

(YAGNIK *et al.*, 2000; ZEISEL *et al.*, 2007; DAHARI *et al.*, 2010). Além disso, a interação entre o vírus e a célula hospedeira ocorre inicialmente através da interação entre E2 e receptores situados na membrana plasmática da célula hepática (PILERI *et al.*, 1998; FLINT *et al.*, 1999). Assim, epítomos que induzem a produção de anticorpos neutralizantes foram localizados nessa proteína (FARCI *et al.*, 1996; GOTO *et al.*, 2001; MIKKELSEN e BUKH, 2007; LAW *et al.*, 2008; HOUGHTON, 2011).

Entretanto, alguns aspectos vêm dificultando o desenvolvimento de uma vacina. Primeiramente, a grande diversidade genética do HCV, consequência da alta taxa de mutação observada durante a replicação viral (SIMMONDS *et al.*, 2005; MURPHY *et al.*, 2007). Esse fato implica que uma potencial vacina, baseada na sequência de uma única variante do HCV, não possa oferecer proteção contra variantes de diferentes genótipos, subtipos e quasiespécies virais.

Outro fato importante é a dificuldade em se ter a replicação do HCV em cultura de células e, atualmente, o sistema de replicação do vírus em cultura celular capaz de produzir partícula viral infecciosa de maneira eficiente que continua sendo o mais utilizado é baseado no genótipo 2a (WAKITA *et al.*, 2005). Além disso, o único modelo animal disponível, capaz de ser infectado pelo HCV e desenvolver doença crônica, é o chimpanzé (LANFORD *et al.*, 2001).

Novos esforços estão voltados ao desenvolvimento de vacinas capazes de induzir uma resposta imune humoral, baseada na produção de anticorpos com capacidade neutralizante e, simultaneamente, uma resposta imune celular com a formação de células de memória, uma vez que estas são consideradas necessárias para o controle da infecção pelo HCV (ENCKE *et al.*, 2007; ALVAREZ-LAJONCHERE *et al.*, 2009). Nessa linha, entram as vacinas de DNA, baseadas na administração de um plasmídeo para a expressão em células eucarióticas de uma sequência codificante para o antígeno de interesse (LIU, 2003). Ao ser administrado, o DNA plasmidial presente na vacina é internalizado nas células do indivíduo imunizado, passando a ocorrer a expressão do antígeno e, conseqüentemente, a indução de uma resposta imunológica. Um importante atributo das vacinas de DNA é a apresentação antigênica via complexo principal de histocompatibilidade (MHC), o que mimetiza o processo resultante de uma infecção natural, ativando a resposta imune celular, além da produção de anticorpos.

Em um trabalho publicado em 2007, Encke *et al.* (2007) vacinaram camundongos com DNA plasmidial contendo o gene que codifica a proteína E1 do HCV de genótipo 1 e, como o esperado, os animais apresentaram forte resposta imune humoral e celular

contra partículas virais homólogas (do mesmo genótipo). Entretanto, a resposta imunológica contra vírus de diferentes genótipos foi observada em apenas alguns casos (genótipos 4 e 5).

A vacina candidata considerada a mais promissora descrita até hoje foi capaz de proteger chimpanzés contra a infecção somente quando desafiados com o vírus homólogo, enquanto que, com vírus heterólogos, foi ineficiente (HOUGHTON, 2011; MEUNIER *et al.*, 2011). Essa vacina foi baseada nas sequências completas das glicoproteínas E1 e E2 (RALSTON *et al.*, 1993), e foram administradas na forma de proteína recombinante, ou ainda no sistema dose/reforço, utilizando DNA plasmidial ou HCVpp, que expressavam os genes das glicoproteínas do HCV.

Em nossos estudos, avaliamos segmentos presentes nas glicoproteínas E1 e E2 do HCV envolvidos na produção de anticorpos neutralizantes contra o vírus. Além disso, sequências de pouco interesse, ou seja, aquelas que não estão envolvidas na produção de anticorpos neutralizantes, foram suprimidas ou estavam presentes em número reduzido. Tais segmentos foram utilizados na construção de um único antígeno e sua sequência foi clonada em um vetor para expressão em células de mamífero, gerando o plasmídeo denominado pEFE1E2. Por meio da imunização de camundongos com apresentação homóloga (três doses do DNA plasmidial) ou heteróloga (duas doses do DNA plasmidial e uma dose com proteína recombinante), avaliamos a resposta imune humoral. Além disso, também foi determinada a capacidade vírus-neutralizante dos anticorpos produzidos em resposta às duas formas de apresentação.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar as propriedades imunogênicas de um antígeno artificial contendo segmentos das glicoproteínas E1 e E2 do HCV, administrado como vacina de DNA em modelo murino, quanto à indução da resposta imune humoral e à capacidade vírus-neutralizante dos anticorpos gerados.

2.2. Objetivos específicos

- Construir o gene E1E2 que codifica um antígeno artificial composto por diferentes segmentos das glicoproteínas E1 e E2 do HCV;
- Clonar o gene E1E2 em um plasmídeo para expressão do antígeno em células eucariotas;
- Verificar a expressão do antígeno artificial em células de mamífero *in vitro*;
- Avaliar a resposta imune humoral induzida em camundongos por imunização com o plasmídeo construído;
- Avaliar *in vitro* a capacidade vírus-neutralizante dos anticorpos produzidos por camundongos em resposta à imunização com o plasmídeo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Construção do plasmídeo EFE1E2

Três segmentos das glicoproteínas E1 e E2 do HCV (cujas sequências nucleotídicas serão mantidas em sigilo) foram selecionados com base em artigos científicos devido à sua capacidade de induzir a produção de anticorpos neutralizantes (ZHANG *et al.*, 2007; MEUNIER *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2009). Em seguida, as sequências nucleotídicas que codificam esses segmentos foram unidas dando origem ao gene denominado de E1E2 (**Figura 4**). A sequência nucleotídica do gene foi derivada da cepa JFH1 do genótipo 2a do HCV (WAKITA *et al.*, 2005). Entre os segmentos, foi adicionada uma sequência codificante para os aminoácidos GSGG (*linker*), evitando assim a criação de epítomos juncionais e consequente interferência no processamento e apresentação dos antígenos. Uma sequência nucleotídica codificante de oito resíduos de histidina (8xHis) foi acrescentada à extremidade 3' de E1E2. Inicialmente, o gene E1E2 foi inserido no vetor pGS21a (GenScript USA Inc. Piscataway, NJ, EUA), entre os sítios para as enzimas de restrição *Eco* RV e *Not* I, utilizado para a expressão em sistema procarioto, dando origem a pGSE1E2 (FROELICH, 2014).

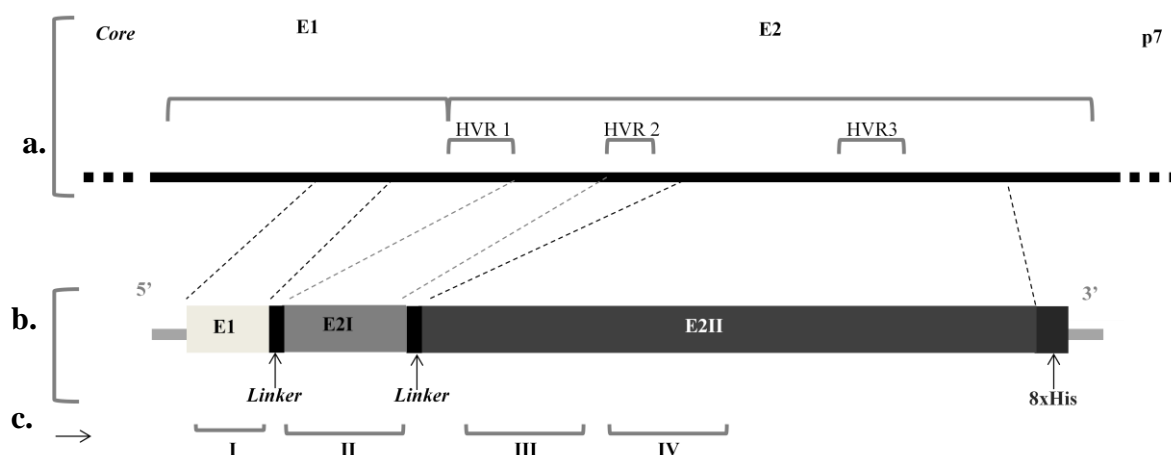


Figura 4. **a.** Representação da organização dos genes E1 e E2 do HCV. *Core*, E1, E2 e p7 representam as sequências nucleotídicas dos respectivos genes. HVR 1, 2 e 3 representam a sequência nucleotídica das regiões hipervariáveis do gene E2; **b.** Organização do gene E1E2. E1, E2I e E2II representam três segmentos dos genes E1 e E2 da cepa JFH1 do HCV que codificam sequências de 15, 18 e 211 aminoácidos, respectivamente. *Linkers* representam sequências nucleotídicas codificantes de aminoácidos inseridos entre os segmentos de interesse que evitam a criação de epítomos juncionais. 8xHis representa uma sequência codificante de oito resíduos de histidina contíguas; **c.** Localização das sequências correspondentes aos quatro peptídeos sintéticos utilizados para o ELISA (I a IV).

Utilizando como molde o DNA de pGSE1E2, o gene E1E2 foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) com um *primer forward*, constituído por um

sítio para a enzima de restrição *EcoR* I, a sequência Kozak (KOZAK, 1987) e uma terceira sequência específica para o início do segmento E1, e um *primer reverse*, constituído por um sítio para a enzima de restrição *Not* I e uma sequência específica para o final do segmento E2II. Para a reação, foram utilizados 0,4 mM de cada desoxiribonucleotídeo trifosfato (dNTPs); 0,4 µM de cada um dos iniciadores *forward* e *reverse*; *Taq* DNA polimerase 2 U (Neo Bio. Botucatu, SP, Brasil); Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, pH 8,3; completando o volume com água livre de DNase e RNase para 50 µl. As condições das reações envolveram as seguintes incubações: 94°C por 10 min; 35 ciclos de 94°C por 30 s, 53°C por 30 s e 72°C por 1 min; 72°C por 7 min.

O produto da PCR foi tratado com proteinase K 0,1 mg/ml e SDS 0,5% a 65°C por 15 minutos e purificado utilizando o kit GeneJET PCR purification kit (Thermo Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, foi realizada a digestão de 1 µg do DNA amplificado contendo a sequência de E1E2 com 1 unidade (U) de *Eco* RI (Promega Corporation. Madison, WI, EUA) e 1 U de *Not* I (New England BioLabs Inc. Ipswich, MA, EUA) em Tampão 3 (New England BioLabs), 0,1 mg/ml de soro albumina bovina (BSA, Promega) em um volume final de 20 µl, completado com água para biologia molecular (Sigma-Aldrich. Saint Louis, MO, EUA) a 37°C por 3 horas. As enzimas foram inativadas a 65°C por 20 minutos.

O DNA de pEF4 (vetor para expressão em células de mamíferos - Life Technologies Corporation. Carlsbad, CA, EUA) foi obtido a partir da digestão de pEFJFHc-NS2 (ISHII *et al.*, 2008) com as enzimas de restrição *EcoR* I e *Not* I, sob condições semelhantes às descritas anteriormente. Após a digestão, o DNA foi tratado com fosfatase alcalina 1 U (Fermentas) por 30 minutos a 37°C. Em seguida, o produto foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 0,5X (Tris base 45 mM, ácido bórico 45 mM e EDTA 1 mM) e a região do gel com o fragmento de DNA desejado foi excisada, transferida para um microtubo e o DNA foi purificado utilizando o kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN. Hilden, Alemanha) conforme instruções do fabricante.

Os DNAs de E1E2 e de pEF4, ambos previamente digeridos com *EcoR* I e *Not* I, foram ligados utilizando as seguintes condições: DNA do gene E1E2 10 µg, pEF4 3 µg, T4 DNA ligase 1 U (Fermentas), 2 µl de tampão fornecido pelo fabricante, em um volume final de 20 µl, completados com água para biologia molecular (Sigma-Aldrich). A reação foi incubada a 22°C por 1 hora, a 16°C *overnight* (O/N) e a 65°C por 10

minutos. Após nova purificação do DNA, este foi utilizado na transformação de células bacterianas eletrocompetentes *E. coli* Top10.

A inserção correta do gene de interesse foi confirmada através do sequenciamento nucleotídico utilizando os *primers* T7 e BGH, o kit Big Dye terminator (Applied Biosystems. CA, EUA) e ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os dados derivados do sequenciamento foram compilados e analisados utilizando os *softwares* SeqMan e MegAlign do pacote Lasergene (DNASTAR Inc. Madison, WI, EUA).

Através da digestão de pEFJFHc-NS2 com as enzimas de restrição *Spe* I e *Xba* I, seguida da ligação das extremidades coesivas formadas, foi obtido o vetor pEF4, utilizado nos ensaios como controle negativo. A reação de digestão foi semelhante à descrita anteriormente, porém utilizando DNA de pEFJFHc-NS2 1 µg, *Spe* I 1 U (Vivantes. Subang Jaya, Selangor, Malásia) e *Xba* I 1 U (Fermentas) em Tampão Tango Y (Fermentas). Após a eletroforese em gel de agarose e excisão da região do gel com o fragmento de DNA desejado, o DNA foi purificado e as extremidades do vetor foram ligadas com a enzima T4 DNA ligase. A construção correta de pEF4 também foi verificada através do sequenciamento nucleotídico com os *primers* T7 e BGH.

3.2. Transfecção de células de mamíferos com pEFE1E2

Células da linhagem Huh7.5 (células derivadas da linhagem parental Huh7 de carcinoma hepatocelular humano) foram transfectadas com DNA de pEFE1E2 para verificar a expressão do antígeno artificial E1E2. Resumidamente, uma placa de cultura de células de seis poços, com aproximadamente 2×10^5 células por poço, foi preparada e mantida com meio completo, preparado com DMEM Glutamax e baixa concentração de glicose (Life Technologies), contendo de soro fetal bovino (SFB) 10%, aminoácidos não essenciais (Life Technologies), HEPES 10 mM (Life Technologies), sem antibióticos, por 18-24h (até atingir a confluência de 60-80%). Em tubos de 1,5 ml foram preparadas separadamente duas soluções contendo 2 µg de pEFE1E2 e 12 µl do reagente de transfecção DMRIE-C (Life Technologies), ambas diluídas em 500 µl DMEM, livre de SFB, antibióticos e antifúngicos, e incubadas por 30 minutos. Após a combinação das duas soluções, seguida de nova incubação por 15 minutos, a mistura DMRIE-C/DNA foi adicionada à monocamada de células e a cultura incubada a 37°C e CO₂ 5%. Após 24 horas, a mistura DMRIE-C/DNA foi substituída por DMEM completo contendo penicilina 100 U/ml (Invitrogen) e estreptomicina 100 µg/ml

(Invitrogen). Decorridas 48 horas da transfecção, o meio de cultura foi substituído por meio contendo zeocina 200µg/ml (Life Technologies), para seleção das células transfectadas.

Quatro semanas após a transfecção, os clones de células resistentes à zeocina foram isolados com a ajuda de anéis de clonagem (Sigma-Aldrich) e cultivados separadamente em placas de 24 poços. As células dos clones obtidos foram testadas para a presença de pEFE1E2 e para a expressão do antígeno artificial. De forma semelhante, células Huh7.5 também foram transfectadas com o DNA do vetor pEF4 e os clones obtidos foram utilizados como controle negativo.

3.3. Extração de DNA total e reação em cadeia da polimerase (PCR)

O DNA total de diferentes clones de células Huh7.5 transfectadas com pEFE1E2 foi extraído utilizando proteinase K/fenol/clorofórmio. Resumidamente, as células foram lisadas com Tris-HCl 20 mM, pH 8, NaCl 100 mM, proteinase K 0,1 mg/ml e SDS 0,5% por incubação por 30 minutos a 65°C. Posteriormente, o lisado foi tratado com um volume (vol) da mistura de fenol tamponado com Tris-HCl, pH 8/clorofórmio (vol/vol) e centrifugado a 11.000 xg por 15 minutos. Após a transferência da fase aquosa para um novo tubo, foram adicionados 0,1 vol de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 2 vol de etanol absoluto e realizada nova centrifugação. O sobrenadante foi descartado e, após a secagem do DNA, este foi ressuspensão em 50 µl Tris-HCl 10 mM pH 8, RNase A 10 µg/ml e estocado a -20°C.

Em seguida, os DNAs extraídos foram submetidos à PCR utilizando os *primers* T7 e BGH, cujas sequências estão presentes no vetor, e os *primers* FRE2I (5'CAGAACATTCAGCTCATTAAC3') e RVE2II (5'AGGAAGACATCTGTCTCATT3'), específicos para sequências presentes no inserto. Para as PCRs, foram utilizadas as condições descritas anteriormente, com as seguintes alterações: 0,2 mM dNTPs; 0,2 µM de cada um dos iniciadores; *Taq* DNA polimerase 1 U; Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, pH 8,3; volume final de 25 µl; temperatura de *annealing* de 51°C; e tempo de extensão de 1,5 min. O DNA extraído de células Huh7.5 não transfectadas e transfectadas com o vetor pEF4 foram utilizadas como controles negativos.

3.4. Reação de imunofluorescência

Após a confirmação da presença do DNA de pEFE1E2, um dos clones, denominado de Huh7.5/pEFE1E2, foi selecionado para a detecção da expressão do antígeno recombinante por imunofluorescência (IF), utilizando o anticorpo monoclonal (mAb) anti-6xHis. Para esta reação, 10 µl de uma suspensão de células Huh7.5/pEFE1E2 foram depositado em uma lâmina de IF, e as células foram secadas, fixadas e permeabilizadas com metanol 100% por 20 minutos a -20°C. Posteriormente, realizou-se o bloqueio com 10 µl de PBS (NaCl 130 mM, NaH₂PO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1 mM e KCl 2,7 mM, pH 7,2) contendo BSA 1% (PBS/BSA 1%) por incubação por 1 h a 37°C. Após lavagem com PBS, as células foram incubadas com 10 µl do mAb anti-6xHis (Life Technologies) diluído 1:300 (1,7 µg/ml) em PBS/BSA 1% por 1 h a 37°C. Nova lavagem foi realizada, seguida de incubação com 10 µl do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (Life Technologies) diluído 1:1000 (2 µg/ml) em solução de DAPI 300 nM (Life Technologies) por 1 h a 37°C. A monocamada de células foi novamente lavada com PBS, coberta com lamínula e visualizada em microscópio de fluorescência (EVOS® FL Digital Fluorescence Microscope, Life Technologies) em $\lambda = 495$ nm. Em paralelo, células Huh7.5 não transfectadas e transfectadas com o vetor pEF4 foram utilizadas como controles negativos da reação.

3.5. Imunização de camundongos BALB/c

A utilização dos camundongos foi aprovada pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU) sob protocolo nº 022/13 (ANEXO).

Os DNAs de pEFE1E2 e pEF4 (controle negativo) utilizados na imunização foram purificados com o kit Endofree Plasmid Maxi kit (QIAGEN) de acordo com as especificações do fabricante. Cada dose do inóculo foi preparada com 50 µg de DNA, 20 µg de DMRIE-C e tampão TE modificado (Tris-Cl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8) para um volume total de 100 µl administrado intramuscularmente no quadríceps da coxa direita de cada animal.

A proteína recombinante E1E2 fusionada à glutathione S-transferase, denominada de GST-E1E2, foi obtida utilizando-se de sistema de expressão bacteriano, de acordo com o descrito por Froelich (2014), e utilizada como a terceira dose na imunização de um dos grupos de animais (imunização heteróloga). Brevemente, células do clone BLC+E1E2(DE3)B, obtido por transformação de células da cepa BL21-CodonPlus

(DE3)-RIPL (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) com pGSE1E2, foram cultivadas e a expressão da proteína recombinante foi induzida por adição de isopropil- β -D-tiogalactosídeo (IPTG) ao meio de cultura para concentração final de 1 mM. Após a confirmação da expressão de GST-E1E2 por eletroforese em gel de poliácridamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e *Western blotting* utilizando o mAb anti-6xHis, a purificação da proteína foi realizada com a resina Ni-NTA agarose (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante. A proteína glutatona S-transferase (GST), sem a sequência de E1E2, expressa a partir do vetor pGS-21a, foi obtida de maneira similar às condições descritas acima, porém utilizando para sua purificação a resina Glutaciona Sefarose 4B (GE Healthcare Life Sciences. Uppsala, Suécia), e utilizada como controle negativo da imunização heteróloga. Cada dose do inóculo protéico foi composta de 50 μ g de proteína recombinante (GST-E1E2 ou GST), 50 μ l de adjuvante de Freund incompleto (Sigma-Aldrich), e PBS para o volume final de 100 μ l. Nos grupos específicos, cada animal foi submetido à administração intradérmica do inóculo contendo as proteínas recombinantes.

No total, cinco grupos de camundongos BALB/c (n=5), fêmeas, de seis a oito semanas de idade, foram utilizados nos experimento de imunização. Cada grupo foi imunizado com 100 μ l do inóculo detalhado na **Tabela I** nas semanas 0, 2 e 4. Antes de cada imunização, os animais foram anestesiados com uma solução contendo 80 mg de cetamina por kg de animal e 15 mg de xilazina por kg de animal, administrada intraperitonealmente. Duas semanas após a última dose, os camundongos foram sacrificados com uma mistura contendo 375 mg de cetamina por kg de camundongo e 100 mg xilazina por kg de camundongo e o sangue foi coletado através de punção cardíaca.

Tabela I. Composição dos inóculos utilizados nos diferentes grupos de imunização.

Grupos	1ª dose (50 μ g)	2ª dose (50 μ g)	3ª dose (50 μ g)	Imunização
1	pEFE1E2	pEFE1E2	pEFE1E2	Imunização homóloga
2	pEFE1E2	pEFE1E2	GST-E1E2	Imunização heteróloga
3	pEF4	pEF4	pEF4	Controle negativo da imunização homóloga
4	pEF4	pEF4	GST	Controle negativo da imunização heteróloga
5	Tampão TE	Tampão TE	Tampão TE	Controle negativo

pEFE1E2: plasmídeo codificante do antígeno E1E2; pEF4: vetor plasmidial (controle negativo); Tampão TE: tampão Tris-EDTA; GST-E1E2: proteína recombinante E1E2 fusionada à enzima glutatona S-transferase (GST); GST: proteína recombinante com sequência não relacionada ao HCV (controle negativo).

Para obtenção do soro, as amostras de sangue de cada animal foram incubadas a 37°C por 1 h e centrifugadas a 1.000 xg. Em seguida, o soro foi transferido para um novo tubo e armazenado a -20°C até o uso.

3.6. ELISA

Para as reações de ELISA com os soros dos camundongos dos grupos de imunização homóloga, foram utilizados a proteína GST-E1E2 e quatro peptídeos sintéticos (I a IV) correspondentes a sequências presentes no antígeno E1E2 (localização na **Figura 4c**) para a sensibilização dos poços das placas de ELISA. Para as reações com os soros provenientes da imunização heteróloga, foram utilizados apenas os peptídeos sintéticos. A proteína recombinante GST e um quinto peptídeo sintético (V), contendo a sequência parcial de um antígeno do vírus da hepatite D, foram utilizados como controles negativos.

Para as reações contra as proteínas recombinantes, cada poço da placa de ELISA (Costar- Corning Inc. Corning, NY, EUA) foi sensibilizado com 0,5 µg de proteína GST-E1E2 ou GST em 50 µl PBS por incubação O/N à temperatura ambiente. Os poços foram lavados três vezes com 200 µl de PBS contendo Tween 20 0,05% (PBS/T) e o bloqueio foi realizado durante 1 h a 37°C com 100 µl de PBS contendo leite desnatado 5% (massa/vol, PBS/M). Após nova lavagem, 50 µl de soro diluído 1:100 em PBS/T/M foram adicionados aos poços e a placa foi incubada durante 1 h a 37°C. Após cinco lavagens com PBS/T, 50 µl de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com HRP (KPL. Gaithersburg, MD, EUA) diluído 1:16000 (5 µg/ml) em PBS/T/M foram adicionados aos poços e a placa foi incubada por 1 h a 37°C. Os poços foram novamente lavados cinco vezes e 50 µl OPD (Life Technologies)/peróxido de hidrogênio 0,03% em tampão fosfato citrato pH 5,0 foram adicionados. Durante aproximadamente 20 minutos, a reação foi incubada à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e posteriormente foi interrompida por adição de 25 µl de H₂SO₄ 1 M e a densidade óptica (DO) foi determinada a 492 nm.

As reações contra os peptídeos sintéticos foram realizadas de forma semelhante à descrita anteriormente, com as seguintes modificações: a sensibilização foi realizada com 1,0 µg de peptídeo sintético em tampão carbonato/bicarbonato (Na₂CO₃ 0,07 M, NaHCO₃ 0,42 M, pH 9,6); o bloqueio foi realizado com 100 µl de PBS contendo BSA 2% (PBS/BSA); as diluições dos soros (1/100) e do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com HRP (1/16000) foram feitas em PBS/T/BSA.

O valor do *cut off* foi calculado como a média dos valores da DO líquida ($DO_{amostra} - DO_{branco}$) dos cinco soros do grupo 5 (camundongos imunizados com TE) adicionada de duas vezes o valor do desvio padrão. A reatividade de cada amostra foi expressa como Índice ELISA (IE), de acordo com a seguinte fórmula: $IE = DO_{líquida}_{amostra} / cut\ off$, e amostras com valores de $IE > 1$ foram consideradas reativas (SILVA *et al.*, 2002).

3.7. Transfecção de células Huh7.5 com o RNA de JFH1 e produção de HCVcc

O protocolo utilizado para a produção de partículas infecciosas do HCV da cepa JFH1 em cultura de células (HCVcc) foi descrito por Kato *et al.* (2006). Primeiramente, o RNA viral foi obtido através da transcrição *in vitro* utilizando o DNA de pJFH1 (cedido pelo Dr. Takaji Wakita), previamente linearizado com a enzima *Xba* I (Fermentas), utilizando o kit MEGAScript T7 Transcription kit (AMBION. Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Após a digestão com DNase I e extração do RNA com TRIzol LS (Invitrogen), a integridade do RNA de JFH1 foi checada por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Posteriormente, $3,5 \times 10^5$ células Huh7.5 foram cultivadas em cada poço de uma placa de seis poços, conforme o descrito anteriormente (item 3.2). A 1 ml de DMEM incompleto, foram adicionados 10 µg de RNA de JFH1 e 10 µl de DMRIE-C. Após a lavagem das células com 2 ml de DMEM incompleto, a mistura contendo RNA/DMRIE-C foi adicionada à monocamada celular e incubada por 4 h, a 37°C e CO₂ 5%. Em seguida, a mistura RNA/DMRIE-C foi retirada, a monocamada celular foi lavada e 2 ml de DMEM completo foram adicionados. Quando a confluência das células atingiu 90%, a monocamada celular foi transferida para uma garrafa de cultivo celular de 25 cm², posteriormente para uma garrafa de 75 cm² e novamente para outra de 125 cm².

A cada passagem, 1×10^4 células foram transferidas para um poço de uma placa de 96 poços para a realização de uma IF utilizando o mAb anti-*core* HCV (Thermo Scientific. Rockford, IL, EUA), com o objetivo de acompanhar o aumento no número de células que expressavam a proteína do *core*. A reação foi realizada de forma semelhante à descrita anteriormente (item 3.4), porém com a utilização do mAb anti-*core* HCV diluído 1:300 (3,3 µg/ml) em PBS/T/BSA como anticorpo primário.

Também foi coletado o sobrenadante de cada passagem celular, para se acompanhar e determinar o título de HCVcc infecciosos. Para a titulação viral, 1×10^4 células Huh7.5 não transfectadas foram cultivadas em cada poço de uma placa de 96 poços e

inoculadas, em duplicata, com 100 µl dos sobrenadantes do cultivo das células transfectadas com o RNA de JFH1 (Huh7.5⁺JFH1) de diferentes passagens, diluídos seriadamente (1:10) em DMEM completo. Após quatro horas de incubação, o sobrenadante foi removido e substituído por DMEM completo. Depois de três dias de incubação, o sobrenadante foi retirado, as monocamadas celulares foram lavadas com 200 µl de PBS e fixadas por 20 minutos com 200 µl de metanol a -20°C. Posteriormente, foi realizada uma nova IF utilizando o mAb anti-*core* HCV para a contagem de focos fluorescentes e determinação do título viral do sobrenadante de cada passagem. O título viral de cada sobrenadante do cultivo de células Huh7.5⁺JFH1 foi expresso em unidades formadoras de foco por ml (UFF/ml) de acordo com a seguinte fórmula: $T = N^{\circ} \text{UFF}_{\text{médio}} \times \text{FD} \times 10$, onde N° de UFF_{médio} corresponde à média do número de unidades formadoras de foco visualizadas nas duplicatas de cada diluição do sobrenadante de Huh7.5⁺JFH1; FD corresponde ao fator de diluição do sobrenadante; e 10 corresponde ao fator de correção do volume de 100 µl para 1 ml.

3.8. Reação de imunofluorescência utilizando o soro dos camundongos imunizados

Com o objetivo de se confirmar a reatividade observada por ELISA dos soros dos animais imunizados, foi realizada uma IF com células Huh7.5⁺JFH1, que expressavam as proteínas do HCV e produziam partículas virais infecciosas.

Células Huh7.5⁺JFH1 da sexta passagem (17 dias após a transfecção com o RNA de JFH1) foram selecionadas e a reação foi realizada de forma semelhante à descrita no item 3.4, porém, substituindo-se o anticorpo primário por soros dos camundongos diluídos 1:100 em PBS/T/BSA. O mAb anti-*core* HCV e células Huh7.5 não transfectadas foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente.

3.9. Ensaio de vírus neutralização

Soros positivos por IF (descrita no item 3.8) foram utilizados no ensaio de vírus-neutralização, realizado com o objetivo de se investigar a capacidade dos anticorpos produzidos em resposta à imunização em bloquear, *in vitro*, a infecção de HCVcc. Primeiramente, 50 UFFs de HCVcc, em volume de 50 µl com DMEM, foram misturadas e incubadas por 1 h a 37°C com 50 µl de soro de camundongo imunizado, previamente inativado e diluído 1:50 com DMEM. Em seguida, monocamadas celulares de Huh7.5 cultivadas em placas de 96 poços com confluência de aproximadamente 60-

80% foram inoculadas em triplicata com a mistura HCVcc/soro e incubadas por 4 h, a 37°C e CO₂ 5%. Posteriormente, o sobrenadante foi retirado, as monocamadas celulares foram lavadas, meio DMEM completo foi adicionado e nova incubação foi realizada por três dias. Posteriormente, foi realizada uma nova IF utilizando o mAb anti-*core* HCV e procedida a contagem de UFFs. Paralelamente, foram utilizados como controles positivo e negativo das reações os mAbs anti-CD81 (BD Pharmigen. San Diego, CA, EUA) e anti-GST (Invitrogen), respectivamente, diluídos 1:50 (10 µg/ml).

A capacidade vírus-neutralizante dos soros obtidos em resposta às imunizações foi determinada para a amostra de cada animal, de acordo com a fórmula: $VN = \frac{UFF_{branco} - UFF_{medio}}{UFF_{branco}} \times 100$, onde: UFF_{branco} representa a média do número de UFFs visualizadas nos poços incubados com HCVcc na ausência de soro; e, UFF_{medio} representa a média do número de UFFs visualizadas nas triplicatas dos poços incubados com HCVcc/soro.

3.10. Análise dos resultados

Para análise dos resultados, foi utilizado o *software* GraphPad Prism, v. 5.0, (GraphPad Software. San Diego, CA, EUA). Após a análise dos dados pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, foram utilizados testes não paramétricos. Os níveis de reatividade foram comparados entre os grupos de estudo utilizando o teste de Mann-Whitney. A capacidade vírus-neutralizante apresentada pelos soros dos diferentes grupos de imunização foi comparada através do teste exato de Fisher. Um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1. Construção do plasmídeo EFE1E2

Utilizando como molde o DNA de pGSE1E2, a sequência codificante de E1E2 foi amplificada por PCR com *primers* específicos para segmentos nucleotídicos presentes no início e no fim de E1 e E2II, respectivamente, gerando assim um fragmento de aproximadamente 900 pb (**Figura 5a**), que foi digerido com as enzimas de restrição *EcoR* I e *Not* I. A obtenção do DNA de pEF4 foi realizada a partir da digestão de pEFJFHc-NS2 com *EcoR* I e *Not* I, gerando um fragmento de aproximadamente 5,9 kb (**Figura 5b**), que foi tratado com fosfatase alcalina, purificado e utilizado na ligação com a sequência E1E2, dando origem ao pEFE1E2.

Através da digestão de pEFJFHc-NS2 com as enzimas de restrição *Spe* I e *Xba* I (**Figura 5c**), seguida da purificação do fragmento correspondente ao vetor e posterior ligação das extremidades, foi obtido o vetor pEF4 (sem inserto), que foi utilizado nos ensaios como controle negativo.

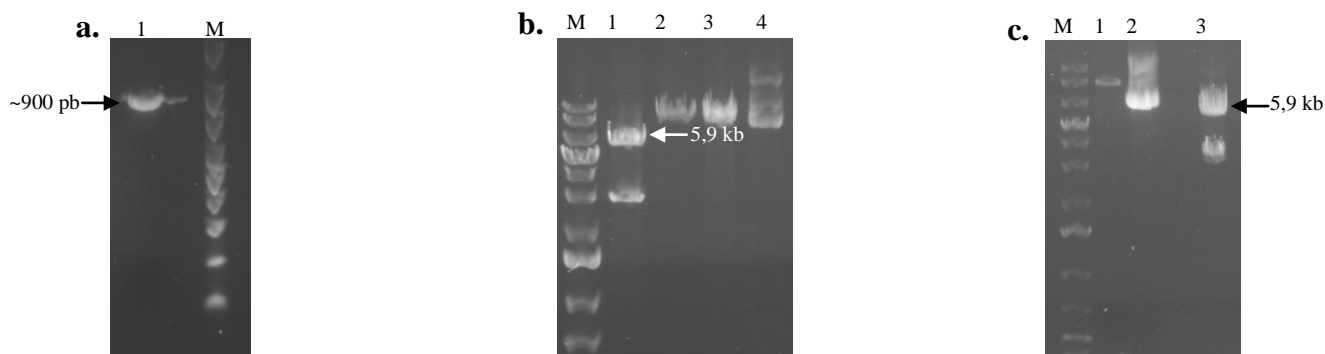


Figura 5. (a.) Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação obtidos por PCR com os *primers* FRE1EcoRI e RVE2II*Not*I utilizando pGSE1E2 como molde. Raia 1: produto da reação; M: padrão molecular de 100 pb (Norgen. Biotek. Thorold, Ontário, Canadá). Na raia 1, a banda indicada pela seta corresponde à sequência E1E2 amplificada (aproximadamente 900 pb) (b.) Eletroforese em gel de agarose dos produtos da digestão de pEFJFHc-NS2 com as enzimas de restrição *EcoR* I e *Not* I. MW: padrão molecular de 1 kb (Fermentas); raia 1: digestão com *EcoR* I e *Not* I; raia 2: digestão com *EcoR* I; raia 3: digestão com *Not* I; raia 4: não digerido. Na raia 1, a banda indicada pela seta corresponde ao vetor pEF4 (aproximadamente 5,9 kb) (c.) Eletroforese em gel de agarose dos produtos da digestão de pEFJFHc-NS2 com as enzimas de restrição *Spe* I e *Xba* I. MW: padrão molecular de 1 kb; raia 1: digestão com *Spe* I; raia 2: não digerido; raia 3: digestão com *Spe* I e *Xba* I. Na raia 3, a a banda indicada pela seta corresponde ao vetor pEF4 (aproximadamente 5,9 kb).

Em seguida, os DNAs de pEFE1E2 e pEF4 foram submetidos ao sequenciamento nucleotídico, e a análise dos dados gerados permitiu confirmar a construção correta dos novos plasmídeos.

4.2. Expressão do antígeno E1E2 em células Huh7.5

Para confirmar a expressão de E1E2 em células de mamíferos, a linhagem Huh7.5 foi transfectada com pEFE1E2. A presença do DNA plasmidial foi confirmada em cinco clones resistentes à zeocina, através de PCR utilizando *primers* específicos para segmentos nucleotídicos presentes no vetor e no inserto (**Figuras 6a** e **6b**, respectivamente). As reações também foram realizadas com DNAs de dois clones de células transfectadas com o vetor pEF4.

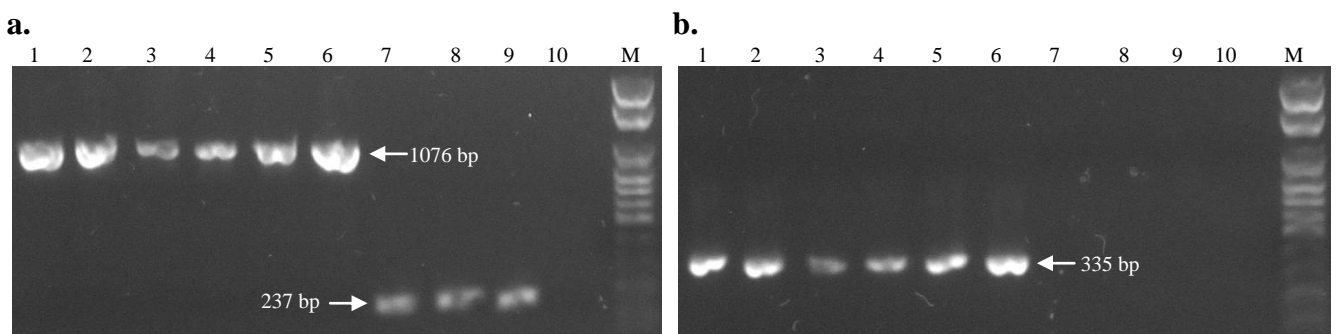


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação, obtidos por PCR com os *primers* T7 e BGH (**a.**), ou FRE2I e RVE2II (**b.**) para detecção do DNA plasmidial em células Huh7.5 transfectadas. Raias 1 – 5: diferentes clones transfectados com pEFE1E2; Raia 6: DNA de miniprep de pEFE1E2 diluído 1:500; Raias 7 e 8: diferentes clones transfectados com pEF4; Raia 9: DNA de miniprep de pEF4 diluído 1:500; Raia 10: água para biologia molecular; M: padrão molecular de 100 pb (Norgen).

Em seguida, um dos clones (raia 1 – **Figura 6**), denominado de Huh7.5/pEFE1E2, foi selecionado e suas células foram submetidas à IF, utilizando mAb anti-6xHis, para confirmar a expressão do antígeno E1E2, evidenciado pela presença de focos fluorescentes (**Figura 7**).

4.3. Avaliação da resposta imune humoral induzida por imunização com DNA

Camundongos BALB/c dos grupos 1 e 3 foram imunizados com três doses do DNA de pEFE1E2 ou pEF4 (vetor), respectivamente. Duas semanas após a última dose, os soros dos animais foram obtidos e testados por ELISA contra as proteínas recombinantes GST-E1E2 e GST (**Figuras 8a** e **8b**, respectivamente). Diferença significativa de reatividade contra GST-E1E2 foi observada com soros do grupo 1 em comparação com os do grupo 3 (**Figura 8a**). Como o esperado, não foi observada diferença significativa de reatividade com soros desses grupos contra a proteína GST

(Figura 8b). Também não foi observada reatividade dos soros dos camundongos do grupo 5 contra as proteínas GST-E1E2 e GST (Figuras 8a e 8b)

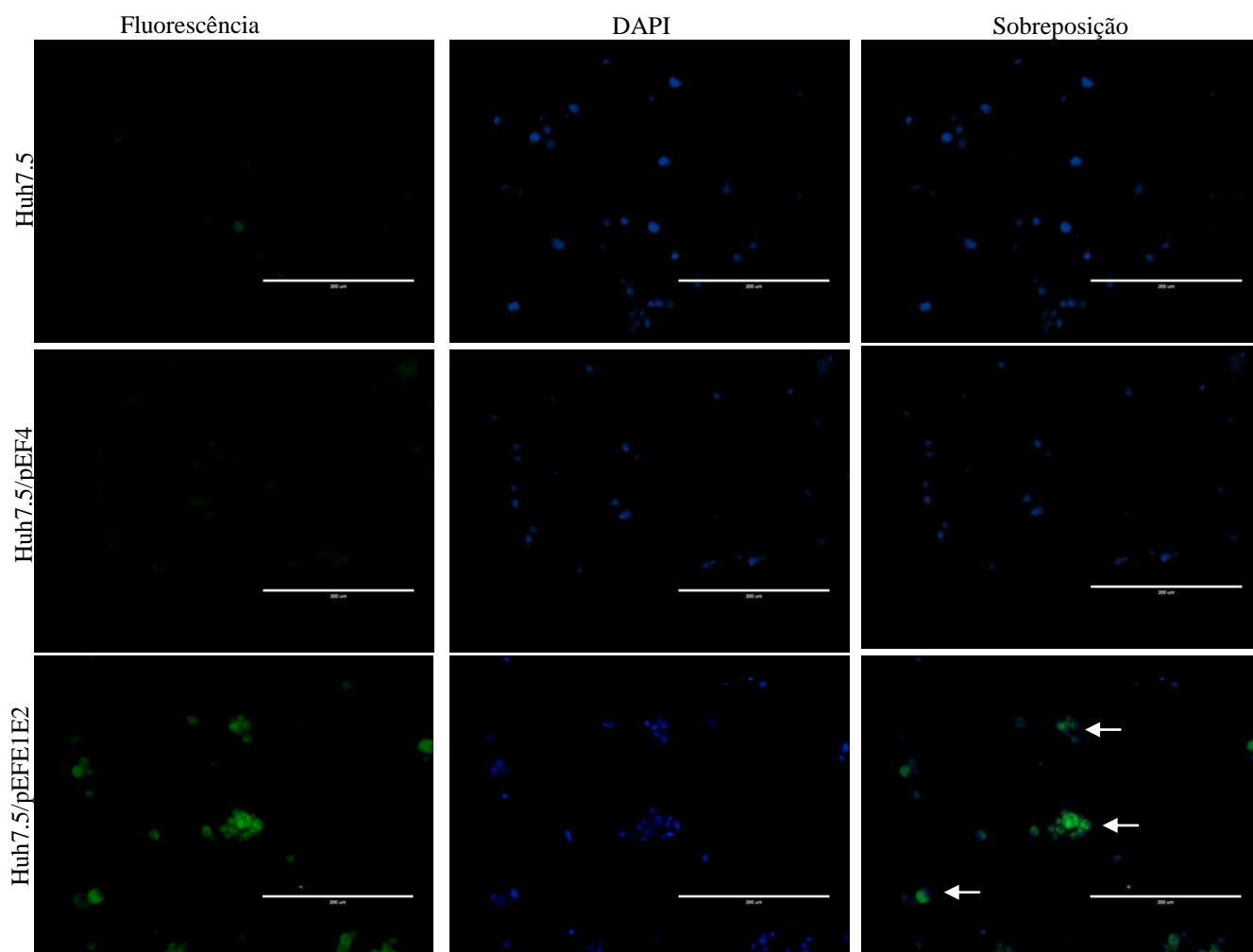


Figura 7. Reação de imunofluorescência indireta utilizando o mAb anti-6xHis e células Huh7.5/pEFE1E2. Como controles negativos, foram utilizadas células Huh7.5 não transfectadas e um clone de células transfectadas com o vetor pEF4 (Huh7.5/pEF4). O núcleo das células foi corado com DAPI. Aumento de 200X. As setas indicam fluorescência específica.

Os grupos 2 e 4 foram imunizados com duas doses do DNA de pEFE1E2 ou pEF4 e uma dose adicional das proteínas recombinantes GST-E1E2 ou GST, respectivamente, em um regime heterólogo. A reatividade em resposta à imunização nestes dois grupos não pôde ser avaliada através do ELISA contra as proteínas recombinantes, uma vez que se tratavam das mesmas preparações utilizadas na imunização. Além disso, a presença da sequência de GST na proteína recombinante, considerada altamente imunogênica, inviabiliza este tipo de análise, uma vez que também seriam detectados anticorpos específicos contra esta sequência e não apenas aqueles específicos contra o antígeno E1E2.

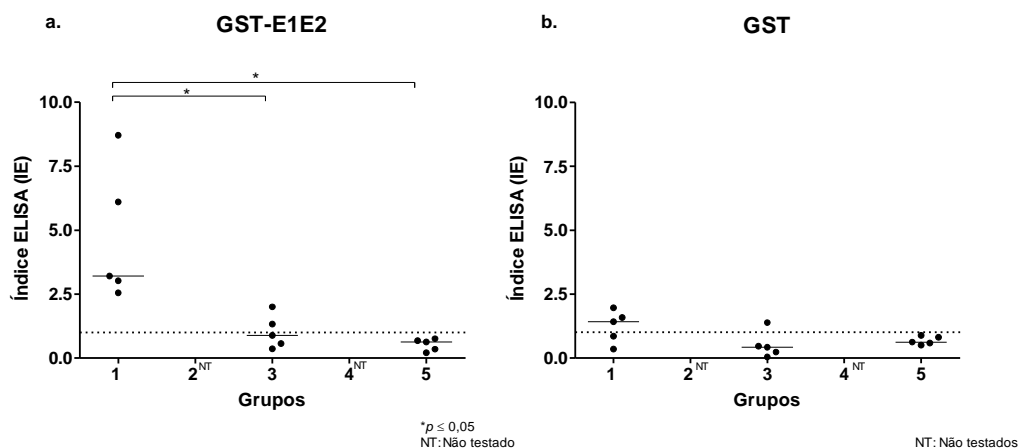


Figura 8. Dados de ELISA expressos em índice ELISA (IE) obtidos com testes dos soros de camundongos contra as proteínas GST-E1E2 (**a.**) e GST (**b.**, controle negativo). Os círculos representam os valores de IE para cada soro. Os traços indicam o valor da mediana para cada grupo, que foi utilizado para o cálculo dos valores de p . As linhas pontilhadas indicam o valor do *cut off* (IE=1,0) calculado com valores obtidos com soros do grupo 5. NT: não testado. * $p \leq 0,05$

Com o objetivo de avaliar se a produção de anticorpos foi induzida por sequências específicas de E1E2, quatro peptídeos sintéticos, cujas sequências estão presentes no antígeno artificial, foram utilizados em teste de ELISA. De forma similar ao observado no teste contra a proteína GST-E1E2, os soros do grupo 1 apresentaram reatividade contra os quatro peptídeos, com diferença significativa em comparação com os soros do grupo 3 (**Figuras 9 a-e**). Todos os soros do grupo 2 apresentaram reatividade contra o peptídeo IV (**Figuras 9d**), enquanto que quatro deles reagiram contra o peptídeo III (**Figura 9c**) e três reagiram contra os peptídeos I e II (**Figuras 9a e 9b**, respectivamente). Novamente, não foi observada reatividade dos soros dos camundongos do grupo 5 contra os peptídeos sintéticos (**Figuras 9 a-e**)

Não foi observada diferença entre as imunizações homóloga (grupo 1) e heteróloga (grupo 2). Também como o esperado, nenhuma reatividade foi observada contra o peptídeo V (**Figure 9e**).

Posteriormente, para investigar se os anticorpos induzidos pela imunização, com base na reatividade observada por ELISA, eram capazes de reconhecer as proteínas do HCV em sua conformação nativa, os soros foram testados contra células Huh7.5⁺JFH1, que expressavam as proteínas do HCV, em um ensaio de IF. Respectivamente, três e dois soros dos grupos de imunização 1 e 2 reagiram com essa células (**Figura 10**) e nenhuma reatividade foi observada com os soros dos outros grupos. Uma associação foi

encontrada entre os resultados dos ensaios de IF e ELISA, ou seja, os soros que reagiram contra as células Huh7.5⁺JFH1 foram os mais reativos nos ensaios de ELISA.

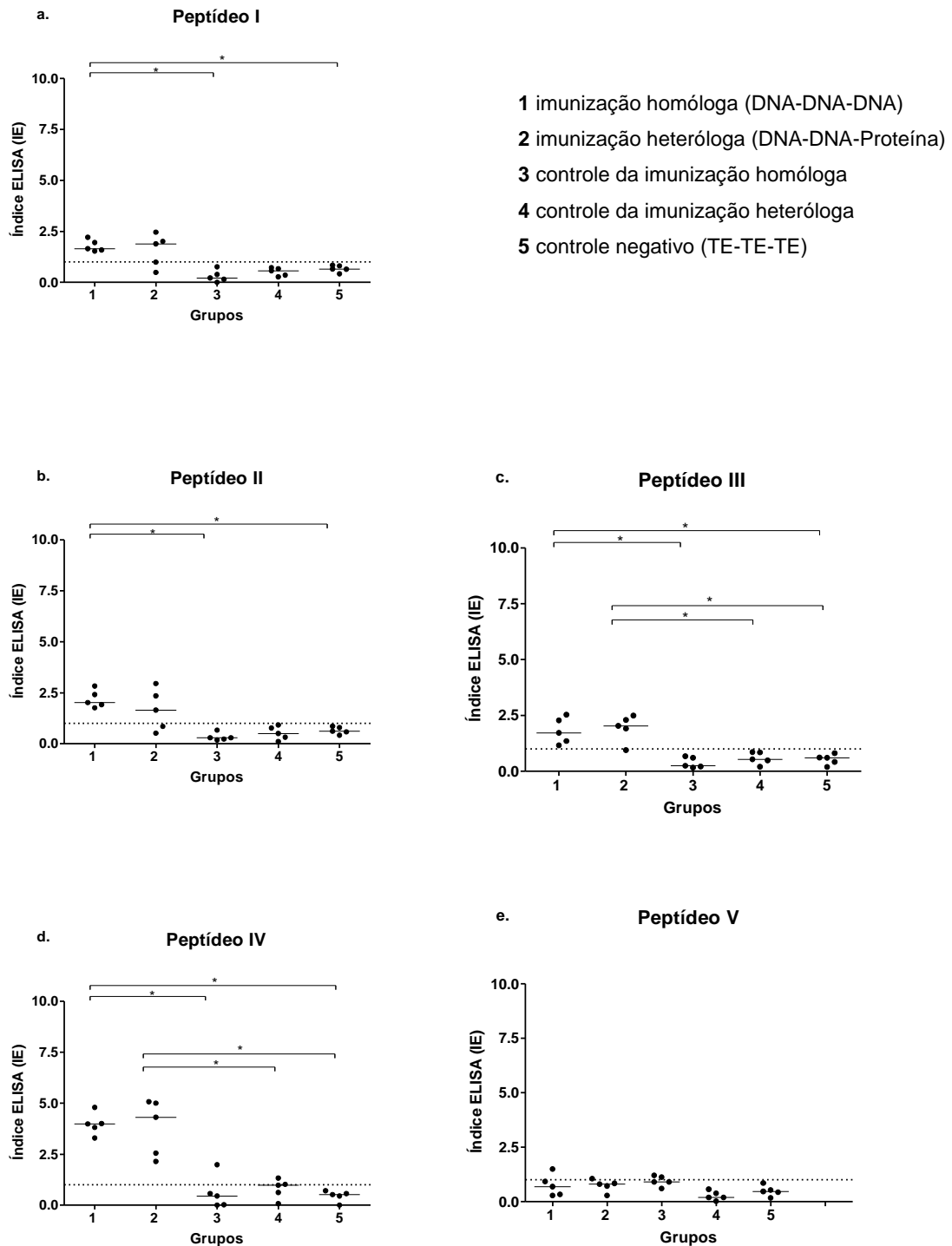


Figura 9. Dados de ELISA expressos em índice ELISA (IE) obtidos com testes de soros de camundongos contra quatro diferentes peptídeos sintéticos (I a IV) cujas seqüências estão presentes no antígeno E1E2. O peptídeo V corresponde a uma seqüência não relacionada às seqüências codificadas por pEFE1E2 e foi utilizado como controle negativo. Os círculos representam os valores de IE para cada soro. Os traços indicam o valor da mediana para cada grupo, que foi utilizado para o cálculo dos valores de *p*. As linhas pontilhadas indicam o valor do *cut off* (IE=1,0) calculado com valores obtidos com soros do grupo 5. **p* ≤ 0,05

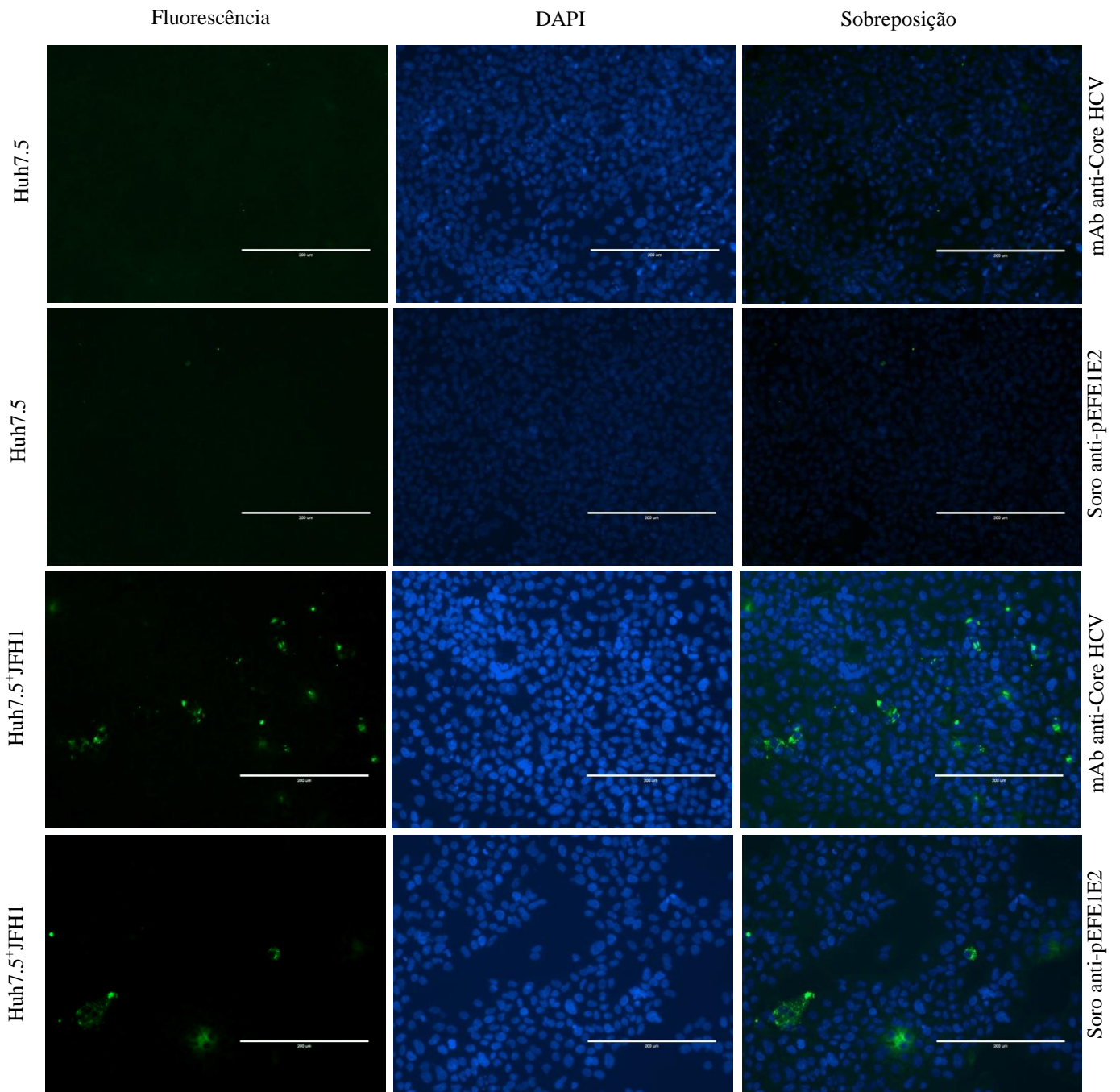


Figura 10. Ensaio de imunofluorescência indireta utilizando soro de camundongo imunizado com pEFE1E2 e células Huh7.5⁺JFH1. Como controles positivo e negativo foram utilizados o mAb anti-Core HCV e células Huh7.5 não transfectadas, respectivamente. O núcleo das células foi corado com DAPI. Aumento de 200X. As setas indicam fluorescência específica.

4.4. Avaliação da capacidade vírus-neutralizante dos soros anti-pEFE1E2

Cinco soros foram submetidos ao ensaio de vírus-neutralização, sendo três soros de camundongos imunizados com três doses de pEFE1E2 e dois soros de camundongos imunizados com duas doses de pEFE1E2 e uma dose de GST-E1E2. A pré-incubação de HCVcc com esses soros resultou em uma redução de aproximadamente 40% no número de UFFs (**Figura 11**), indicando seu potencial neutralizante. De forma semelhante, a pré-incubação das células com o mAb anti-CD81 (controle positivo) reduziu em cerca de 50% o número de UFFs, enquanto que o mAb anti-GST não apresentou nenhum efeito neutralizante.

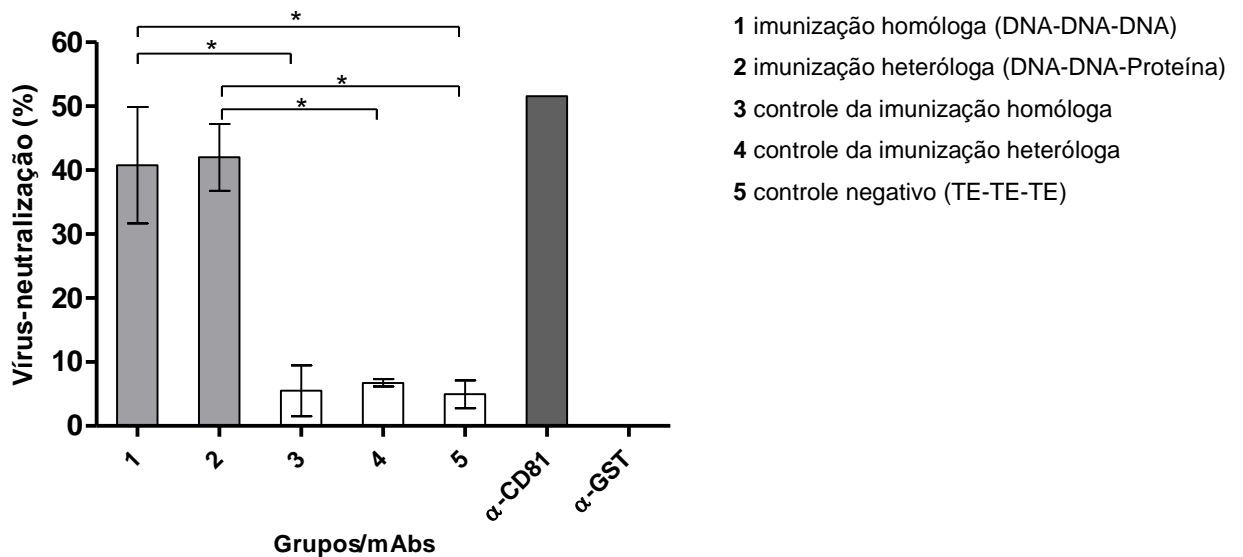


Figura 11. Teste de vírus-neutralização com soros anti-pEFE1E2. Aproximadamente 50 UFFs de HCVcc da cepa JFH1 foram incubadas com o soro dos animais imunizados e, posteriormente, adicionadas a monocamadas de células Huh7.5. Após três dias de incubação, a capacidade vírus-neutralizante dos anticorpos foi determinada para cada soro em relação à redução na porcentagem de UFFs comparado com a infecção de HCVcc sem soro.

5. DISCUSSÃO

Segmentos das glicoproteínas de envelope E1 e E2 do HCV associados à indução de anticorpos neutralizantes foram selecionados para a construção de um antígeno artificial denominado E1E2 (ZHANG *et al.*, 2007; MEUNIER *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2009). O gene que codifica para esse antígeno foi construído baseado na sequência nucleotídica da cepa JFH1 do HCV, cepa que é a mais frequentemente utilizada em estudos envolvendo a produção de partículas virais infecciosas *in vitro* (WAKITA *et al.*, 2005).

Além disso, com a seleção de sequências específicas procurou-se reduzir o número de epítomos que induzem a formação de anticorpos sem capacidade neutralizante e que podem estar relacionados com o aumento da infecção (ZHANG *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2009), através de um processo conhecido como *antibody-dependent enhancement of infection* (HALSTEAD *et al.*, 1981). Zhang *et al.* (2009) demonstraram que a presença de anticorpos específicos para um epítomo localizado entre os resíduos de aminoácidos 434 e 446 da glicoproteína E2 anulava a capacidade vírus-neutralizante de anticorpos direcionados para outros segmentos. Também foi eliminada do antígeno E1E2 a HVR1 que apesar de sabidamente induzir a produção de anticorpos neutralizantes (FARCI *et al.*, 1996), possui uma enorme quantidade de sequências variantes, dificultando a proteção por esses anticorpos (CAMPO *et al.*, 2012).

Utilizando ensaios de ELISA, foi observada a reatividade dos soros contra a sequência de E1E2 apresentada na forma de proteína (GST-E1E2) e também contra peptídeos sintéticos correspondentes a porções do antígeno E1E2, indicando que a imunização induziu a produção de anticorpos específicos contra as sequências do HCV em modelo murino, tanto no regime homólogo (três doses de DNA) quanto no heterólogo (duas doses de DNA seguidas de uma dose de proteína).

O peptídeo I corresponde a uma sequência altamente conservada da glicoproteína E1 entre os diferentes genótipos do HCV, e anticorpos específicos contra esta região demonstraram capacidade neutralizante contra HCVpp e HCVcc contendo proteínas do envelope de diferentes genótipos. (GROLLO *et al.*, 2006; TORRESI *et al.*, 2007; MEUNIER *et al.*, 2008). O peptídeo II corresponde a uma sequência linear de uma região conformacional conservada da glicoproteína E2, que foi caracterizada como sendo a principal região antigênica alvo para a neutralização, denominada região antigênica 3 (AR3) (CLAYTON *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2007; LAW *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2009). O peptídeo III corresponde a outra sequência da glicoproteína E2,

descrita por Kachko *et al.* (2011), localizada entre duas regiões propostas como domínios de ligação ao receptor CD81. Especulou-se que esta região seja importante para a estabilidade ou apresentação de regiões de ligação adjacentes (KACHKO *et al.*, 2011), e anticorpos que se ligam a este epítipo representam um obstáculo capaz de inibir a ligação do HCV ao receptor CD81. A sequência de E2 correspondente ao peptídeo IV também foi descrita por Grollo *et al.* (2006) como estando envolvida na produção de anticorpos neutralizantes.

Neste estudo, os soros obtidos com a imunização homóloga reagiram contra os quatro peptídeos testados, enquanto que para a imunização heteróloga a reatividade foi observada contra os peptídeos III e IV. É importante salientar, que os peptídeos utilizados na avaliação da resposta imune humoral correspondem a apenas 27% de toda a sequência do antígeno E1E2 utilizado na imunização. Dessa forma, outras sequências presentes em E1E2 capazes de induzir a produção de anticorpos não foram investigadas.

Ainda de acordo com os resultados obtidos nos ensaios contra os peptídeos sintéticos, nenhuma diferença foi observada entre a reatividade dos soros dos camundongos imunizados com os regimes homólogo e heterólogo. De maneira contrária, em um estudo realizado por Li *et al.* (2006), utilizando uma vacina de DNA composta por uma sequência codificante para a forma solúvel da glicoproteína E2 do HCV, foi demonstrada que a estratégia de imunização heteróloga desencadeou um aumento significativo nos níveis de resposta imune humoral quando comparado com os animais que receberam apenas doses de DNA.

Vale ressaltar, que dois dos cinco soros pertencentes ao grupo de imunização heterólogo (grupo 2) demonstraram baixos níveis de reatividade contra todos os peptídeos testados (**Figuras 9 a-e**), indicando possivelmente uma menor indução da resposta imune humoral nesses indivíduos. Quando os valores de reatividade dos soros desses dois animais foram excluídos da análise dos resultados, o regime de imunização heteróloga mostrou tendência a ser mais imunogênico que a imunização homóloga (maior valor de mediana de reatividade contra os quatro peptídeos - dados não mostrados). A possível causa desse fato pode estar relacionada ao uso de lipossomos como mecanismo de entrega do DNA plasmidial que, apesar de ser o mais utilizado até o momento, já foi apontado como ineficiente para a transfecção de células em modelos *in vivo* (FERRARO *et al.*, 2011). Um método também utilizado para a entrega de DNA é a aplicação de pequenos pulsos elétricos logo após a vacinação, resultando no aumento da eficácia da transfecção celular e, conseqüentemente, no aumento da

expressão antigênica e imunogenicidade da vacina (HIRAO *et al.*, 2008; ROSATI *et al.*, 2008).

Além disso, alguns soros de camundongos imunizados com os regimes homólogo e heterólogo foram capazes de reconhecer as glicoproteínas do HCV em sua conformação natural, avaliados por IF utilizando células Huh7.5⁺JFH1, que expressavam as proteínas virais (**Figura 10**). Esses mesmos soros foram utilizados no ensaio de vírus-neutralização *in vitro* contra HCVcc da cepa JFH1 e, reduziram em cerca de 40% o número de UFFs, demonstrando a capacidade dos anticorpos produzidos em resposta a ambos os regimes de imunização em neutralizar, ainda que parcialmente, a infecção por HCVcc.

Induzir a produção de anticorpos específicos por meio da imunização com as glicoproteínas E1 e E2 do HCV foi a estratégia utilizada por Ralston *et al.* (1993) e esses antígenos, ainda hoje, são considerados componentes de uma das candidatas mais promissoras para uma vacina profilática (HONEGGER *et al.*, 2014). Em estudos posteriores (MEUNIER *et al.*, 2011), chimpanzés foram vacinados com as glicoproteínas recombinantes E1 e E2 do HCV do genótipo 1a, expressas em linhagem de células de mamíferos. Após a imunização, os animais foram desafiados com HCV da cepa homóloga às glicoproteínas utilizadas na imunização e de uma cepa diferente (H77, genótipo 1a). Ainda que a maioria tenha sido infectada, em pelo menos 80% a infecção não progrediu para a forma crônica. Em adição, ensaios de vírus-neutralização *in vitro* utilizando HCVpp e HCVcc, alguns dos soros desses chimpanzés mostraram neutralização contra vírus dos genótipos 1a, 4a, 5a, e 6a.

Na infecção causada pelo HCV, a indução de uma rápida e ampla resposta imunológica baseada na ativação de células T CD4⁺ e CD8⁺ tem sido associada à erradicação viral ainda na fase aguda da infecção (GRAKOUÏ *et al.*, 2003). Rollier *et al.* (2004), utilizando um inóculo composto por sequências de *core*, E1, E2 e NS3, por meio da imunização em chimpanzés, com a estratégia de duas doses iniciais constituídas de DNA e uma terceira dose de proteínas, demonstraram que além da produção de anticorpos específicos contra as proteínas estruturais, a vacinação foi capaz de induzir uma resposta imune celular. Além disso, a imunização foi capaz de proteger um dos animais vacinados contra a hepatite C crônica. A resposta imune celular induzida contra o antígeno artificial E1E2, baseada na imunização com DNA empregada no presente estudo, será o objetivo de investigações futuras.

Estratégia semelhante à adotada em nosso trabalho foi empregada em outro estudo, em que foi descrita a utilização de epítomos selecionados para compor uma vacina de DNA contra o HIV tipo 1 (RIBEIRO *et al.*, 2010; ROSA *et al.*, 2011). Um plasmídeo codificando 18 epítomos conservados das proteínas virais, capazes de ser reconhecidos por múltiplas moléculas de MHC, selecionados a partir de análise *in silico*, induziu uma ampla resposta imune celular, caracterizada pela ativação de linfócitos T auxiliares e citotóxicos de perfil Th1, além da formação de células de memória de longa duração.

Em conclusão, os resultados obtidos no presente estudo indicam que anticorpos gerados pela vacina de DNA codificante de um antígeno construído com segmentos das glicoproteínas E1 e E2 do HCV foram capazes de neutralizar o vírus *in vitro*. Investigações futuras serão realizadas para avaliar a resposta imune celular contra diferentes regiões deste antígeno, bem como a capacidade neutralizante dos anticorpos contra cepas de diferentes genótipos do HCV.

O desenvolvimento de uma vacina efetiva e segura contra o HCV constitui uma importante ferramenta para a prevenção contra a hepatite C. O entendimento de como ocorrem a neutralização viral baseada em anticorpos e a ativação de uma resposta imune celular efetiva são importantes para o desenvolvimento desta vacina.

6. CONCLUSÕES

- O plasmídeo EFE1E2 foi construído e foi confirmada a expressão *in vitro* do antígeno artificial E1E2 em células de mamíferos;
- A imunização com pEFE1E2 em modelo murino, tanto no regime homólogo quanto no heterólogo, induziu a produção de anticorpos específicos reativos contra a sequência de E1E2 e também contra peptídeos sintéticos, cujas sequências correspondem a sequências presentes no antígeno E1E2;
- Não foi observada diferença entre a reatividade dos soros de camundongos imunizados com os regimes homólogo e heterólogo;
- Alguns soros de camundongos imunizados com os regimes homólogo e heterólogo foram capazes de reconhecer as glicoproteínas do HCV em sua conformação natural;
- Os anticorpos produzidos em resposta a ambos os regimes de imunização reduziram em cerca de 40% o número de UFFs em um ensaio de vírus-neutralização, demonstrando sua capacidade vírus-neutralizante.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTER, H. J.; HOLLAND, P. V.; MORROW, A. G.; PURCELL, R. H.; FEINSTONE, S. M.; MORITSUGU, Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. **Lancet**, v. 2, n. 7940, p. 838-41, 1975.

ALTER, M. J. Epidemiology of hepatitis C virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 17, p. 2436-2441, 2007.

ALVAREZ-LAJONCHERE, L.; SHOUKRY, N. H.; GRA, B.; AMADOR-CANIZARES, Y.; HELLE, F.; BEDARD, N.; GUERRA, I.; DROUIN, C.; DUBUISSON, J.; GONZALEZ-HORTA, E. E.; MARTINEZ, G.; MARANTE, J.; CINZA, Z.; CASTELLANOS, M.; DUENAS-CARRERA, S. Immunogenicity of CIGB-230, a therapeutic DNA vaccine preparation, in HCV-chronically infected individuals in a Phase I clinical trial. **J Viral Hepat**, v. 16, n. 3, p. 156-67, 2009.

BACON, B. R.; GORDON, S. C.; LAWITZ, E.; MARCELLIN, P.; VIERLING, J. M.; ZEUZEM, S.; POORDAD, F.; GOODMAN, Z. D.; SINGS, H. L.; BOPARAI, N.; BURROUGHS, M.; BRASS, C. A.; ALBRECHT, J. K.; ESTEBAN, R. Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. **N Engl J Med**, v. 364, n. 13, p. 1207-17, 2011.

BAILEY, D. E., JR.; LANDERMAN, L.; BARROSO, J.; BIXBY, P.; MISHEL, M. H.; MUIR, A. J.; STRICKLAND, L.; CLIPP, E. Uncertainty, symptoms, and quality of life in persons with chronic hepatitis C. **Psychosomatics**, v. 50, n. 2, p. 138-46, 2009.

BAIN, C.; INCHAUSPE, G. Dendritic cells and hepatitis C virus. **Pathol Biol**, v. 49, n. 6, p. 464-5, 2001.

BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C.; DAVOUST, J.; LEBECQUE, S.; LIU, Y. J.; PULENDRAN, B.; PALUCKA, K. Immunobiology of dendritic cells. **Annu Rev Immunol**, v. 18, p. 767-811, 2000.

BARTENSCHLAGER, R.; LOHMANN, V.; PENIN, F. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. **Nat Rev Microbiol**, v. 11, n. 7, p. 482-96, 2013.

BARTOSCH, B.; VITELLI, A.; GRANIER, C.; GOUJON, C.; DUBUISSON, J.; PASCALE, S.; SCARSELLI, E.; CORTESE, R.; NICOSIA, A.; COSSET, F. L. Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. **J Biol Chem**, v. 278, n. 43, p. 41624-30, 2003.

BASTOS, F. I.; LOWNDES, C. M.; CASTELLO-BRANCO, L. R.; LINHARES-DE-CARVALHO, M. I.; OELEMANN, W.; BERNIER, F.; MORGADO, M. G.; YOSHIDA, C. F.; ROZENTAL, T.; ALARY, M. Sexual behaviour and infection rates for HIV, blood-borne and sexually transmitted infections among patients attending drug treatment centres in Rio de Janeiro, Brazil. **Int J STD AIDS**, v. 11, n. 6, p. 383-92, 2000.

BECKEBAUM, S. K.; SCHMIDT, H. H. Begin of a New Era in Treating Hepatitis C in Patients on the Waiting List and after Liver Transplantation. **Z Gastroenterol**, v. 52, n. 7, p. 746-8, 2014.

BIRON, C. A.; BROSSAY, L. NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. **Curr Opin Immunol**, v. 13, n. 4, p. 458-64, 2001.

BROWN, R. S. Hepatitis C and liver transplantation. **Nature**, v. 436, n. 7053, p. 973-8, 2005.

CAMPO, D. S.; DIMITROVA, Z.; YOKOSAWA, J.; HOANG, D.; PEREZ, N. O.; RAMACHANDRAN, S.; KHUDYAKOV, Y. Hepatitis C virus antigenic convergence. **Sci Rep**, v. 2, p. 267, 2012.

CARRERE-KREMER, S.; MONTPELLIER-PALA, C.; COCQUEREL, L.; WYCHOWSKI, C.; PENIN, F.; DUBUISSON, J. Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. **J Virol**, v. 76, n. 8, p. 3720-30, 2002.

CASTET, V.; FOURNIER, C.; SOULIER, A.; BRILLET, R.; COSTE, J.; LARREY, D.; DHUMEAUX, D.; MAUREL, P.; PAWLOTSKY, J. M. Alpha interferon inhibits hepatitis C virus replication in primary human hepatocytes infected in vitro. **J Virol**, v. 76, n. 16, p. 8189-99, 2002.

CELLA, M.; SALIO, M.; SAKAKIBARA, Y.; LANGEN, H.; JULKUNEN, I.; LANZAVECCHIA, A. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. **J Exp Med**, v. 189, n. 5, p. 821-9, 1999.

CHOO, Q. L.; KUO, G.; WEINER, A. J.; OVERBY, L. R.; BRADLEY, D. W.; HOUGHTON, M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, n. 4902, p. 359-62, 1989.

CHOU, R.; HARTUNG, D.; RAHMAN, B.; WASSON, N.; COTTRELL, E. B.; FU, R. W. Comparative Effectiveness of Antiviral Treatment for Hepatitis C Virus Infection in Adults: A Systematic Review. **Annals of Internal Medicine**, v. 158, n. 2, p. 114-+, 2013.

CHUNG, H.; KUDO, M.; KUMADA, T.; KATSUSHIMA, S.; OKANO, A.; NAKAMURA, T.; OSAKI, Y.; KOHIGASHI, K.; YAMASHITA, Y.; KOMORI, H.; NISHIUMA, S. Risk of HCV transmission after needlestick injury, and the efficacy of short-duration interferon administration to prevent HCV transmission to medical personnel. **J Gastroenterol**, v. 38, n. 9, p. 877-9, 2003.

CLAYTON, R. F.; OWSIANKA, A.; AITKEN, J.; GRAHAM, S.; BHELLA, D.; PATEL, A. H. Analysis of antigenicity and topology of E2 glycoprotein present on recombinant hepatitis C virus-like particles. **J Virol**, v. 76, n. 15, p. 7672-82, 2002.

COTTRELL, E. B.; CHOU, R.; WASSON, N.; RAHMAN, B.; GUISE, J. M. Reducing risk for mother-to-infant transmission of hepatitis C virus: a systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force. **Ann Intern Med**, v. 158, n. 2, p. 109-13, 2013.

DAHARI, H.; FEINSTONE, S. M.; MAJOR, M. E. Meta-analysis of hepatitis C virus vaccine efficacy in chimpanzees indicates an importance for structural proteins. **Gastroenterology**, v. 139, n. 3, p. 965-74, 2010.

DAL MOLIN, G.; D'AGARO, P.; ANSALDI, F.; CIANA, G.; FERTZ, C.; ALBERICO, S.; CAMPELLO, C. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus: rate of infection and assessment of viral load and IgM anti-HCV as risk factors. **J Med Virol**, v. 67, n. 2, p. 137-42, 2002.

DUBUISSON, J.; HELLE, F.; COCQUEREL, L. Early steps of the hepatitis C virus life cycle. **Cell Microbiol**, v. 10, n. 4, p. 821-7, 2008.

DUFFY, S.; SHACKELTON, L. A.; HOLMES, E. C. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. **Nat Rev Genet**, v. 9, n. 4, p. 267-76, 2008.

DUSTIN, L. B.; RICE, C. M. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. **Annu Rev Immunol**, v. 25, p. 71-99, 2007.

EDWARDS, V. C.; TARR, A. W.; URBANOWICZ, R. A.; BALL, J. K. The role of neutralizing antibodies in hepatitis C virus infection. **J Gen Virol**, v. 93, n. Pt 1, p. 1-19, 2012.

EGGER, D.; WOLK, B.; GOSERT, R.; BIANCHI, L.; BLUM, H. E.; MORADPOUR, D.; BIENZ, K. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. **J Virol**, v. 76, n. 12, p. 5974-84, 2002.

ENCKE, J.; RADUNZ, W.; EISENBACH, C.; GEIB, J.; GEHRKE, S.; PFAFF, E.; STREMMEL, W. Development of a heterologous, multigenotype vaccine against hepatitis C virus infection. **Eur J Clin Invest**, v. 37, n. 5, p. 396-406, 2007.

ERNST, E.; SHERMAN, K. J. Is acupuncture a risk factor for hepatitis? Systematic review of epidemiological studies. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 18, n. 11, p. 1231-6, 2003.

EVANS, M. J.; VON HAHN, T.; TSCHERNE, D. M.; SYDER, A. J.; PANIS, M.; WOLK, B.; HATZIOANNOU, T.; MCKEATING, J. A.; BIENIASZ, P. D.; RICE, C. M. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. **Nature**, v. 446, n. 7137, p. 801-5, 2007.

FARCI, P.; SHIMODA, A.; WONG, D.; CABEZON, T.; DE GIOANNIS, D.; STRAZZERA, A.; SHIMIZU, Y.; SHAPIRO, M.; ALTER, H. J.; PURCELL, R. H. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 26, p. 15394-9, 1996.

FEINSTONE, S. M.; KAPIKIAN, A. Z.; PURCELL, R. H.; ALTER, H. J.; HOLLAND, P. V. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. **N Engl J Med**, v. 292, n. 15, p. 767-70, 1975.

FERRARO, B.; MORROW, M. P.; HUTNICK, N. A.; SHIN, T. H.; LUCKE, C. E.; WEINER, D. B. Clinical applications of DNA vaccines: current progress. **Clin Infect Dis**, v. 53, n. 3, p. 296-302, 2011.

FLINT, M.; MAIDENS, C.; LOOMIS-PRICE, L. D.; SHOTTON, C.; DUBUISSON, J.; MONK, P.; HIGGINBOTTOM, A.; LEVY, S.; MCKEATING, J. A. Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. **J Virol**, v. 73, n. 8, p. 6235-44, 1999.

FROELICH, L. **Clonagem e expressão de um antígeno quimérico contendo glicoproteínas E1 e E2 do envelope do vírus da hepatite C**. p. 47. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, 2014.

GOTO, J.; NISHIMURA, S.; ESUMI, M.; MAKIZUMI, K.; RIKIHISA, T.; NISHIHARA, T.; MIZUNO, K.; ZHOU, Y.; SHIKATA, T.; FUJIYAMA, S.; TOMITA, K. Prevention of hepatitis C virus infection in a chimpanzee by vaccination and epitope mapping of antiserum directed against hypervariable region 1. **Hepatol Res**, v. 19, n. 3, p. 270-283, 2001.

GRAKOU, A.; SHOUKRY, N. H.; WOOLLARD, D. J.; HAN, J. H.; HANSON, H. L.; GHRAYEB, J.; MURTHY, K. K.; RICE, C. M.; WALKER, C. M. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. **Science**, v. 302, n. 5645, p. 659-62, 2003.

GROLLO, L.; TORRESI, J.; DRUMMER, H.; ZENG, W.; WILLIAMSON, N.; JACKSON, D. C. Exploiting information inherent in binding sites of virus-specific antibodies: design of an HCV vaccine candidate cross-reactive with multiple genotypes. **Antivir Ther**, v. 11, n. 8, p. 1005-14, 2006.

GRUNER, N. H.; GERLACH, T. J.; JUNG, M. C.; DIEPOLDER, H. M.; SCHIRREN, C. A.; SCHRAUT, W. W.; HOFFMANN, R.; ZACHOVAL, R.; SANTANTONIO, T.; CUCCHIARINI, M.; CERNY, A.; PAPE, G. R. Association of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. **J Infect Dis**, v. 181, n. 5, p. 1528-36, 2000.

HALSTEAD, S. B.; TOM, M. C.; ELM, J. L., JR. In vitro virulence marker: growth of dengue-2 virus in human leukocyte suspension cultures. **Infect Immun**, v. 31, n. 1, p. 102-6, 1981.

HAYES, M. O.; HARKNESS, G. A. Body piercing as a risk factor for viral hepatitis: an integrative research review. **Am J Infect Control**, v. 29, n. 4, p. 271-4, 2001.

HIRAO, L. A.; WU, L.; KHAN, A. S.; HOKEY, D. A.; YAN, J.; DAI, A.; BETTS, M. R.; DRAGHIA-AKLI, R.; WEINER, D. B. Combined effects of IL-12 and electroporation enhances the potency of DNA vaccination in macaques. **Vaccine**, v. 26, n. 25, p. 3112-20, 2008.

HONEGGER, J. R.; ZHOU, Y.; WALKER, C. M. Will there be a vaccine to prevent HCV infection? **Semin Liver Dis**, v. 34, n. 1, p. 79-88, 2014.

HOUGHTON, M. **Discovery of the hepatitis C virus**. *Liver Int*, v. 29 Suppl 1, p. 82-8, 2009.

HOUGHTON, M. Prospects for prophylactic and therapeutic vaccines against the hepatitis C viruses. **Immunol Rev**, v. 239, n. 1, p. 99-108, 2011.

HUANG, T.; WANG, J.; CAI, Y. D.; YU, H.; CHOU, K. C. Hepatitis C virus network based classification of hepatocellular cirrhosis and carcinoma. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e34460, 2012.

International Comitee on Taxonomy of Viruses – ICTV, 2014
<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> (acessado em 03/07/2014)

ISHII, K.; MURAKAMI, K.; HMWE, S. S.; ZHANG, B.; LI, J.; SHIRAKURA, M.; MORIKAWA, K.; SUZUKI, R.; MIYAMURA, T.; WAKITA, T.; SUZUKI, T. Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 371, n. 3, p. 446-50, 2008.

KACHKO, A.; KOCHNEVA, G.; SIVOLOBOVA, G.; GRAZHDANTSEVA, A.; LUPAN, T.; ZUBKOVA, I.; WELLS, F.; MERCHLINSKY, M.; WILLIAMS, O.; WATANABE, H.; IVANOVA, A.; SHVALOV, A.; LOKTEV, V.; NETESOV, S.; MAJOR, M. E. New neutralizing antibody epitopes in hepatitis C virus envelope glycoproteins are revealed by dissecting peptide recognition profiles. **Vaccine**, v. 30, n. 1, p. 69-77, 2011.

KAITO, M.; WATANABE, S.; TANAKA, H.; FUJITA, N.; KONISHI, M.; IWASA, M.; KOBAYASHI, Y.; GABAZZA, E. C.; ADACHI, Y.; TSUKIYAMA-KOHARA, K.; KOHARA, M. Morphological identification of hepatitis C virus E1 and E2 envelope glycoproteins on the virion surface using immunogold electron microscopy. **Int J Mol Med**, v. 18, n. 4, p. 673-8, 2006.

KATO, T.; DATE, T.; MURAYAMA, A.; MORIKAWA, K.; AKAZAWA, D.; WAKITA, T. Cell culture and infection system for hepatitis C virus. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2334-2339, 2006.

KLENERMAN, P.; FLEMING, V.; BARNES, E. What are the prospects for controlling hepatitis C? **PLoS Med**, v. 6, n. 6, p. e1000096, 2009.

KOZAK, M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. **Nucleic Acids Res**, v. 15, n. 20, p. 8125-48, 1987.

KUMADA, H.; TOYOTA, J.; OKANOUE, T.; CHAYAMA, K.; TSUBOUCHI, H.; HAYASHI, N. Telaprevir with peginterferon and ribavirin for treatment-naive patients chronically infected with HCV of genotype 1 in Japan. **J Hepatol**, v. 56, n. 1, p. 78-84, 2012.

KUNKEL, M.; LORINCZI, M.; RIJNBRAND, R.; LEMON, S. M.; WATOWICH, S. J. Self-assembly of nucleocapsid-like particles from recombinant hepatitis C virus core protein. **J Virol**, v. 75, n. 5, p. 2119-29, 2001.

KWO, P. Y.; LAWITZ, E. J.; MCCONE, J. Efficacy of boceprevir, an NS3 protease inhibitor, in combination with peginterferon alfa-2b and ribavirin in treatment-naive patients with genotype 1 hepatitis C infection (SPRINT-1): an open-label, randomised, multicentre phase 2 trial (vol 376, pg 705, 2010). **Lancet**, v. 376, n. 9748, p. 1224-1224, 2010.

LANFORD, R. E.; BIGGER, C.; BASSETT, S.; KLIMPEL, G. The chimpanzee model of hepatitis C virus infections. **ILAR J**, v. 42, n. 2, p. 117-26, 2001.

LAVANCHY, D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 2, p. 107-15, 2011.

LAW, M.; MARUYAMA, T.; LEWIS, J.; GIANG, E.; TARR, A. W.; STAMATAKI, Z.; GASTAMINZA, P.; CHISARI, F. V.; JONES, I. M.; FOX, R. I.; BALL, J. K.; MCKEATING, J. A.; KNETEMAN, N. M.; BURTON, D. R. Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. **Nat Med**, v. 14, n. 1, p. 25-7, 2008.

LECHNER, F.; GRUENER, N. H.; URBANI, S.; UGGERI, J.; SANTANTONIO, T.; KAMMER, A. R.; CERNY, A.; PHILLIPS, R.; FERRARI, C.; PAPE, G. R.; KLENERMAN, P. CD8+ T lymphocyte responses are induced during acute hepatitis C virus infection but are not sustained. **Eur J Immunol**, v. 30, n. 9, p. 2479-87, 2000.

LECHNER, F.; WONG, D. K.; DUNBAR, P. R.; CHAPMAN, R.; CHUNG, R. T.; DOHRENWEND, P.; ROBBINS, G.; PHILLIPS, R.; KLENERMAN, P.; WALKER, B. D. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. **J Exp Med**, v. 191, n. 9, p. 1499-512, 2000.

LI, Y. P.; KANG, H. N.; BABIUK, L. A.; LIU, Q. Elicitation of strong immune responses by a DNA vaccine expressing a secreted form of hepatitis C virus envelope protein E2 in murine and porcine animal models. **World J Gastroenterol**, v. 12, n. 44, p. 7126-35, 2006.

LIU, M. A. DNA vaccines: a review. **J Intern Med**, v. 253, n. 4, p. 402-10, 2003.

LIU, Z. X.; GOVINDARAJAN, S.; OKAMOTO, S.; DENNERT, G. NK cells cause liver injury and facilitate the induction of T cell-mediated immunity to a viral liver infection. **J Immunol**, v. 164, n. 12, p. 6480-6, 2000.

LLOYD, A. R.; JAGGER, E.; POST, J. J.; CROOKS, L. A.; RAWLINSON, W. D.; HAHN, Y. S.; FFRENCH, R. A. Host and viral factors in the immunopathogenesis of primary hepatitis C virus infection. **Immunol Cell Biol**, v. 85, n. 1, p. 24-32, 2007.

LOGVINOFF, C.; MAJOR, M. E.; OLDACH, D.; HEYWARD, S.; TALAL, A.; BALFE, P.; FEINSTONE, S. M.; ALTER, H.; RICE, C. M.; MCKEATING, J. A. Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 27, p. 10149-54, 2004.

LOPES, C. L.; TELES, S. A.; ESPIRITO-SANTO, M. P.; LAMPE, E.; RODRIGUES, F. P.; MOTTA-CASTRO, A. R.; MARINHO, T. A.; REIS, N. R.; SILVA, A. M.; MARTINS, R. M. Prevalence, risk factors and genotypes of hepatitis C

virus infection among drug users, Central-Western Brazil. **Rev Saude Publica**, v. 43 Suppl 1, p. 43-50, 2009.

MAHBOOBI, N.; PORTER, S. R.; KARAYIANNIS, P.; ALAVIAN, S. M. Dental treatment as a risk factor for hepatitis B and C viral infection. A review of the recent literature. **J Gastrointestin Liver Dis**, v. 22, n. 1, p. 79-86, 2013.

MAJID, A. M.; BARBER, G. N. **Recombinant Vesicular Stomatitis Virus (VSV) and Other Strategies in HCV Vaccine Designs and Immunotherapy**. 2006.

MCLAUCHLAN, J. Hepatitis C virus: viral proteins on the move. **Biochem Soc Trans**, v. 37, n. Pt 5, p. 986-90, 2009.

MEUNIER, J. C.; GOTTWEIN, J. M.; HOUGHTON, M.; RUSSELL, R. S.; EMERSON, S. U.; BUKH, J.; PURCELL, R. H. Vaccine-induced cross-genotype reactive neutralizing antibodies against hepatitis C virus. **J Infect Dis**, v. 204, n. 8, p. 1186-90, 2011.

MEUNIER, J. C.; RUSSELL, R. S.; GOOSSENS, V.; PRIEM, S.; WALTER, H.; DEPLA, E.; UNION, A.; FAULK, K. N.; BUKH, J.; EMERSON, S. U.; PURCELL, R. H. Isolation and characterization of broadly neutralizing human monoclonal antibodies to the E1 glycoprotein of hepatitis C virus. **Journal of Virology**, v. 82, n. 2, p. 966-973, 2008.

MIKKELSEN, M.; BUKH, J. Current status of a hepatitis C vaccine: encouraging results but significant challenges ahead. **Curr Infect Dis Rep**, v. 9, n. 2, p. 94-101, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico: Hepatites Virais**, Brasília, DF, ano III, n. 1, 2012.

MOHAMOUD, Y. A.; MUMTAZ, G. R.; RIOME, S.; MILLER, D.; ABU-RADDAD, L. J. The epidemiology of hepatitis C virus in Egypt: a systematic review and data synthesis. **BMC Infect Dis**, v. 13, n. 1, p. 288, 2013.

MORADPOUR, D.; PENIN, F.; RICE, C. M. Replication of hepatitis C virus. **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 6, p. 453-63, 2007.

MOTTOLA, G.; CARDINALI, G.; CECCACCI, A.; TROZZI, C.; BARTHOLOMEW, L.; TORRISI, M. R.; PEDRAZZINI, E.; BONATTI, S.; MIGLIACCIO, G. Hepatitis C virus nonstructural proteins are localized in a modified endoplasmic reticulum of cells expressing viral subgenomic replicons. **Virology**, v. 293, n. 1, p. 31-43, 2002.

MURPHY, D.; CHAMBERLAND, J.; DANDAVINO, R.; SABLON, E. A new genotype of hepatitis C virus originating from central Africa. **Hepatology**, v. 46, n. 4, p. 623a-623a, 2007.

NAKANO, T.; LAU, G. M.; SUGIYAMA, M.; MIZOKAMI, M. An updated analysis of hepatitis C virus genotypes and subtypes based on the complete coding region. **Liver Int**, v. 32, n. 2, p. 339-45, 2012.

NETSKI, D. M.; MOSBRUGER, T.; DEPLA, E.; MAERTENS, G.; RAY, S. C.; HAMILTON, R. G.; ROUNDTREE, S.; THOMAS, D. L.; MCKEATING, J.; COX, A. Humoral immune response in acute hepatitis C virus infection. **Clin Infect Dis**, v. 41, n. 5, p. 667-75, 2005.

NEWMAN, R. M.; KUNTZEN, T.; WEINER, B.; BERICAL, A.; CHARLEBOIS, P.; KUIKEN, C.; MURPHY, D. G.; SIMMONDS, P.; BENNETT, P.; LENNON, N. J.; BIRREN, B. W.; ZODY, M. C.; ALLEN, T. M.; HENN, M. R. Whole genome pyrosequencing of rare hepatitis C virus genotypes enhances subtype classification and identification of naturally occurring drug resistance variants. **J Infect Dis**, v. 208, n. 1, p. 17-31, 2013.

OMATA, M.; KANDA, T.; YU, M. L.; YOKOSUKA, O.; LIM, S. G.; JAFRI, W.; TATEISHI, R.; HAMID, S. S.; CHUANG, W. L.; CHUTAPUTTI, A.; WEI, L.; SOLLANO, J.; SARIN, S. K.; KAO, J. H.; MCCAUGHAN, G. W. APASL consensus statements and management algorithms for hepatitis C virus infection. **Hepatology Int**, v. 6, n. 2, p. 409-435, 2012.

Organização Mundial da Saúde – OMS, 2014
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/> (acessado em 03/07/2014).

PENIN, F.; DUBUISSON, J.; REY, F. A.; MORADPOUR, D.; PAWLITSKY, J. M. Structural biology of hepatitis C virus. **Hepatology**, v. 39, n. 1, p. 5-19, 2004.

PETROVIC, D.; DEMPSEY, E.; DOHERTY, D. G.; KELLEHER, D.; LONG, A. Hepatitis C virus--T-cell responses and viral escape mutations. **Eur J Immunol**, v. 42, n. 1, p. 17-26, 2012.

PILERI, P.; UEMATSU, Y.; CAMPAGNOLI, S.; GALLI, G.; FALUGI, F.; PETRACCA, R.; WEINER, A. J.; HOUGHTON, M.; ROSA, D.; GRANDI, G.; ABRIGNANI, S. Binding of hepatitis C virus to CD81. **Science**, v. 282, n. 5390, p. 938-41, 1998.

POORDAD, F.; MCCONE, J., JR.; BACON, B. R.; BRUNO, S.; MANNS, M. P.; SULKOWSKI, M. S.; JACOBSON, I. M.; REDDY, K. R.; GOODMAN, Z. D.; BOPARAI, N.; DINUBILE, M. J.; SNIUKIENE, V.; BRASS, C. A.; ALBRECHT, J. K.; BRONOWICKI, J. P. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. **N Engl J Med**, v. 364, n. 13, p. 1195-206, 2011.

RALSTON, R.; THUDIUM, K.; BERGER, K.; KUO, C.; GERVASE, B.; HALL, J.; SELBY, M.; KUO, G.; HOUGHTON, M.; CHOO, Q. L. Characterization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia viruses. **J Virol**, v. 67, n. 11, p. 6753-61, 1993.

RIBEIRO, S. P.; ROSA, D. S.; FONSECA, S. G.; MAIRENA, E. C.; POSTOL, E.; OLIVEIRA, S. C.; GUILHERME, L.; KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. A vaccine

encoding conserved promiscuous HIV CD4 epitopes induces broad T cell responses in mice transgenic to multiple common HLA class II molecules. **PLoS One**, v. 5, n. 6, p. e11072, 2010.

ROINGEARD, P.; HOURIOUX, C.; BLANCHARD, E.; BRAND, D.; AIT-GOUGHOULETE, M. Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. **Biol Cell**, v. 96, n. 2, p. 103-8, 2004.

ROLLIER, C.; DEPLA, E.; DREXHAGE, J. A.; VERSCHOOR, E. J.; VERSTREPEN, B. E.; FATMI, A.; BRINSTER, C.; FOURNILLIER, A.; WHELAN, J. A.; WHELAN, M.; JACOBS, D.; MAERTENS, G.; INCHAUSPE, G.; HEENEY, J. L. Control of heterologous hepatitis C virus infection in chimpanzees is associated with the quality of vaccine-induced peripheral T-helper immune response. **J Virol**, v. 78, n. 1, p. 187-96, 2004.

ROMANO, C. M.; DE CARVALHO-MELLO, I. M.; JAMAL, L. F.; DE MELO, F. L.; IAMARINO, A.; MOTOKI, M.; PINHO, J. R.; HOLMES, E. C.; DE ANDRADE ZANOTTO, P. M. Social networks shape the transmission dynamics of hepatitis C virus. **PLoS One**, v. 5, n. 6, p. e11170, 2010.

ROSA, D. S.; RIBEIRO, S. P.; ALMEIDA, R. R.; MAIRENA, E. C.; POSTOL, E.; KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. A DNA vaccine encoding multiple HIV CD4 epitopes elicits vigorous polyfunctional, long-lived CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e16921, 2011.

ROSATI, M.; VALENTIN, A.; JALAH, R.; PATEL, V.; VON GEGERFELT, A.; BERGAMASCHI, C.; ALICEA, C.; WEISS, D.; TREECE, J.; PAL, R.; MARKHAM, P. D.; MARQUES, E. T.; AUGUST, J. T.; KHAN, A.; DRAGHIA-AKLI, R.; FELBER, B. K.; PAVLAKIS, G. N. Increased immune responses in rhesus macaques by DNA vaccination combined with electroporation. **Vaccine**, v. 26, n. 40, p. 5223-9, 2008.

SCARSELLI, E.; ANSUINI, H.; CERINO, R.; ROCCASECCA, R. M.; ACALI, S.; FILOCAMO, G.; TRABONI, C.; NICOSIA, A.; CORTESE, R.; VITELLI, A. The

human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. **EMBO J**, v. 21, n. 19, p. 5017-25, 2002.

SEGURADO, A. C.; BRAGA, P.; ETZEL, A.; CARDOSO, M. R. Hepatitis C virus coinfection in a cohort of HIV-infected individuals from Santos, Brazil: seroprevalence and associated factors. **AIDS Patient Care STDS**, v. 18, n. 3, p. 135-43, 2004.

SHEPARD, C. W.; FINELLI, L.; ALTER, M. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. **Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 9, p. 558-567, 2005.

SHI, L.; LIU, S.; FAN, G. X.; SHENG, L.; REN, H. X.; YUAN, Y. K. Effective induction of type 1 cytotoxic T cell responses in mice with DNA vaccine encoding two hepatitis C virus cytotoxic T lymphocyte epitopes. **Viral Immunol**, v. 19, n. 4, p. 702-11, 2006.

SILVA, D. A.; SILVA, N. M.; MINEO, T. W.; PAJUABA NETO, A. A.; FERRO, E. A.; MINEO, J. R. Heterologous antibodies to evaluate the kinetics of the humoral immune response in dogs experimentally infected with *Toxoplasma gondii* RH strain. **Vet Parasitol**, v. 107, n. 3, p. 181-95, 2002.

SIMMONDS, P. The origin of hepatitis C virus. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 369, p. 1-15, 2013.

SIMMONDS, P.; BUKH, J.; COMBET, C.; DELEAGE, G.; ENOMOTO, N.; FEINSTONE, S.; HALFON, P.; INCHAUSPE, G.; KUIKEN, C.; MAERTENS, G.; MIZOKAMI, M.; MURPHY, D. G.; OKAMOTO, H.; PAWLOTSKY, J. M.; PENIN, F.; SABLON, E.; SHIN, I. T.; STUYVER, L. J.; THIEL, H. J.; VIAZOV, S.; WEINER, A. J.; WIDELL, A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, v. 42, n. 4, p. 962-73, 2005.

STIEFELHAGEN, P. Symptoms, chronic course and therapy: differences in hepatitis types. **MMW Fortschr Med**, v. 151, n. 6, p. 12-4, 2009.

SULLIVAN, J. C.; DE MEYER, S.; BARTELS, D. J.; DIERYNCK, I.; ZHANG, E. Z.; SPANKS, J.; TIGGES, A. M.; GHYS, A.; DORRIAN, J.; ADDA, N.; MARTIN, E. C.; BEUMONT, M.; JACOBSON, I. M.; SHERMAN, K. E.; ZEUZEM, S.; PICCHIO, G.; KIEFFER, T. L. Evolution of treatment-emergent resistant variants in telaprevir phase 3 clinical trials. **Clin Infect Dis**, v. 57, n. 2, p. 221-9, 2013.

TARR, A. W.; URBANOWICZ, R. A.; BALL, J. K. The role of humoral innate immunity in hepatitis C virus infection. **Viruses**, v. 4, n. 1, p. 1-27, 2012.

TERRAULT, N. A.; DODGE, J. L.; MURPHY, E. L.; TAVIS, J. E.; KISS, A.; LEVIN, T. R.; GISH, R. G.; BUSCH, M. P.; REINGOLD, A. L.; ALTER, M. J. Sexual transmission of hepatitis C virus among monogamous heterosexual couples: the HCV partners study. **Hepatology**, v. 57, n. 3, p. 881-9, 2013.

THIMME, R.; OLDACH, D.; CHANG, K. M.; STEIGER, C.; RAY, S. C.; CHISARI, F. V. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. **J Exp Med**, v. 194, n. 10, p. 1395-406, 2001.

TOHME, R. A.; HOLMBERG, S. D. Is sexual contact a major mode of hepatitis C virus transmission? **Hepatology**, v. 52, n. 4, p. 1497-505, 2010.

TORRES-PUENTE, M.; CUEVAS, J. M.; JIMENEZ-HERNANDEZ, N.; BRACHO, M. A.; GARCIA-ROBLES, I.; WROBEL, B.; CARNICER, F.; DEL OLMO, J.; ORTEGA, E.; MOYA, A.; GONZALEZ-CANDELAS, F. Genetic variability in hepatitis C virus and its role in antiviral treatment response. **J Viral Hepat**, v. 15, n. 3, p. 188-99, 2008.

TORRESI, J.; FISCHER, A.; GROLO, L.; ZENG, W. G.; DRUMMER, H.; JACKSON, D. C. Induction of neutralizing antibody responses to hepatitis C virus with synthetic peptide constructs incorporating both antibody and T-helper epitopes. **Immunol and Cell Biol**, v. 85, n. 2, p. 169-173, 2007.

TSENG, C. T.; KLIMPEL, G. R. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. **J Exp Med**, v. 195, n. 1, p. 43-9, 2002.

WAKITA, T. **Hepatitis C virus vaccine**. *Nihon Rinsho*, v. 66, n. 10, p. 1961-4, 2008.

WAKITA, T.; PIETSCHMANN, T.; KATO, T.; DATE, T.; MIYAMOTO, M.; ZHAO, Z.; MURTHY, K.; HABERMANN, A.; KRAUSSLICH, H. G.; MIZOKAMI, M.; BARTENSCHLAGER, R.; LIANG, T. J. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. **Nat Med**, v. 11, n. 7, p. 791-6, 2005.

WEN, B.; DENG, Y.; TAN, W. J.; YING, X.; GAO, J. M.; RUAN, L. **Construction and evaluation of hepatitis C virus (HCV) DNA vaccine containing E2-gAD fusion gene**. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*, v. 24, n. 1, p. 53-5, 2010.

WOHNSLAND, A.; HOFMANN, W. P.; SARRAZIN, C. Viral determinants of resistance to treatment in patients with hepatitis C. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 1, p. 23-38, 2007.

WUNSCHMANN, S.; MEDH, J. D.; KLINZMANN, D.; SCHMIDT, W. N.; STAPLETON, J. T. Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. **J Virol**, v. 74, n. 21, p. 10055-62, 2000.

YAGNIK, A. T.; LAHM, A.; MEOLA, A.; ROCCASECCA, R. M.; ERCOLE, B. B.; NICOSIA, A.; TRAMONTANO, A. A model for the hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. **Proteins**, v. 40, n. 3, p. 355-66, 2000.

YANG, Z. G.; ZHUANG, L. P.; YANG, L.; CHEN, X. R. Efficacy and Tolerability of Peginterferon alpha-2a and Peginterferon alpha-2b, Both plus Ribavirin, for Chronic Hepatitis C: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Gastroenterol Research and Practice**, 2013.

YI, M.; MA, Y.; YATES, J.; LEMON, S. M. Trans-complementation of an NS2 defect in a late step in hepatitis C virus (HCV) particle assembly and maturation. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 5, p. e1000403, 2009.

ZEISEL, M. B.; FAFI-KREMER, S.; FOFANA, I.; BARTH, H.; STOLL-KELLER, F.; DOFFOEL, M.; BAUMERT, T. F. Neutralizing antibodies in hepatitis C virus infection. **World J Gastroenterol**, v. 13, n. 36, p. 4824-30, 2007.

ZHANG, P.; WU, C. G.; MIHALIK, K.; VIRATA-THEIMER, M. L.; YU, M. Y.; ALTER, H. J.; FEINSTONE, S. M. Hepatitis C virus epitope-specific neutralizing antibodies in Igs prepared from human plasma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 20, p. 8449-54, 2007.

ZHANG, P.; ZHONG, L.; STRUBLE, E. B.; WATANABE, H.; KACHKO, A.; MIHALIK, K.; VIRATA-THEIMER, M. L.; ALTER, H. J.; FEINSTONE, S.; MAJOR, M. Depletion of interfering antibodies in chronic hepatitis C patients and vaccinated chimpanzees reveals broad cross-genotype neutralizing activity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 18, p. 7537-41, 2009.

ZIBERT, A.; MEISEL, H.; KRAAS, W.; SCHULZ, A.; JUNG, G.; ROGGENDORF, M. Early antibody response against hypervariable region 1 is associated with acute self-limiting infections of hepatitis C virus. **Hepatology**, v. 25, n. 5, p. 1245-9, 1997.

ANEXO



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa
Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 099/13 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 022/13

Projeto Pesquisa: "Estudo da indução da produção de anticorpos através da imunização de camundongos Balb-C com vacinas de DNA, peptídeos sintéticos e/ou antígenos recombinantes expressos em cultura de células de mamíferos das proteínas do envelope do vírus da hepatite C".

Pesquisador Responsável: Jonny Yokosawa

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 27 de Maio de 2013

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU