

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

CLONAGEM E EXPRESSÃO DE UM ANTÍGENO QUIMÉRICO CONTENDO
SEGMENTOS DAS GLICOPROTEÍNAS E1 E E2 DO ENVELOPE DO VÍRUS DA
HEPATITE C

Loiane Froelich

Uberlândia

Maior- 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

CLONAGEM E EXPRESSÃO DE UM ANTÍGENO QUIMÉRICO CONTENDO
SEGMENTOS DAS GLICOPROTEÍNAS E1 E E2 DO ENVELOPE DO VÍRUS DA
HEPATITE C

Dissertação Apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-graduação do Programa em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas como
requisito parcial para a obtenção do título de
mestre.

Loiane Froelich

Prof. Dr. Jonny Yokosawa

Uberlândia

Maio- 2014.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me guiou nessa caminhada.

À minha família que sempre me apoiaram e incentivaram em todos os momentos.

Ao meu namorado Saulo e às minhas amigas Daiane e Ana Luiza pela motivação e companheirismo em todos os momentos.

Ao meu orientador pela colaboração para o desenvolvimento da pesquisa.

A toda equipe do laboratório pelo auxílio, e principalmente, ao pós-graduando Guilherme que contribuiu para a execução e conclusão desse trabalho.

LISTA DE ABREVIACÕES

ALT – alanina aminotransferase
AR3 – região antigênica 3
BSA – albumina de soro bovino
CD-81 – “scavenger receptor”
DAB – diaminobenzidina
ELISA – “enzyme-linked immunosorbent assay”
GST – glutationa S-transferase
HAV – vírus da hepatite A
HBV – vírus da hepatite B
HCC – carcinoma hepatocelular
HCV – vírus da hepatite C
HCVcc – vírus da hepatite C em cultura de células
HCV-LPs – “HCV-like particles”
HCVpp – pseudopartícula do vírus da hepatite C
HIV – vírus da imunodeficiência humana
HRP – “horseradish peroxidase”
HVR – região hipervariável
IFI – imunofluorescência indireta
IFN – interferons
IPTG – isopropil- β -1-D-tiogalactopiranosídeo
JFH1 – cepa JFH1
LB – luria bertani
LDL – lipoproteínas de baixa densidade
LDLR – receptor de lipoproteínas de baixa densidade
mAb – anticorpo monoclonal
NANBH – Hepatite não A e não B
NCR – regiões não codificantes
OPD – “*o*-phenylenediamine dihydrochloride”
PBS – tampão fosfato salino
PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonilo
PVDF – membrana de difluoreto de polivinilideno
RNA_t – RNA de transferência
SDS – dodecil-sulfato-de-sódio
SDS-PAGE – eletroforese em gel de poli(acrilamida)-SDS
SFB – soro fetal bovino
SGR – replicon subgenômico
SL3 – “stem loop”
SR-B1 – “scavenger receptor class B member 1”
SVR – resposta virológica sustentada
VLDL – lipoproteínas de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 CLONAGEM E EXPRESSÃO DE UM ANTÍGENO CONTENDO DIFERENTES SEGMENTOS DAS GLICOPROTEÍNAS DE E1 E E2 DO HCV	21
3.2 SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING	23
3.3 PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS	24
3.4 IMUNIZAÇÃO.....	25
3.5 ELISA	25
3.6 TRANSFECCÃO DE CÉLULAS CHO-K1 E REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI)	26
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
4 RESULTADOS	28
5 DISCUSSÃO	33
6 CONCLUSÕES	36
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
ANEXO A	47

RESUMO

Aproximadamente 150 milhões de pessoas estão infectadas cronicamente pelo vírus da hepatite C (HCV). O desenvolvimento de vacinas tem sido dificultado pela variabilidade genética do vírus, bem como pela falta de modelos animais apropriados. Neste estudo, é descrita a construção de um antígeno artificial contendo segmentos das glicoproteínas E1 e E2 do HCV, expresso em sistema bacteriano fundido com a enzima glutathione S-transferase (GST-E1E2). Estes segmentos foram selecionados pela sua capacidade de induzir anticorpos neutralizantes, descrita em artigos científicos. A imunogenicidade da GST-E1E2 foi avaliada por meio de inoculação da proteína em camundongos e testando-se o soro desses animais por ELISA contra quatro peptídeos sintéticos (I a IV) correspondentes a segmentos presentes na sequência de E1E2. Foi observada reatividade estatisticamente significativa somente contra os peptídeos I, II e IV em comparação entre os soros do grupo imunizado com GST-E1E2 e daquele imunizado com GST. O soro que mostrou ter a maior reatividade por ELISA foi utilizado em imunofluorescência indireta (IFI) contra células CHO-K1 transfectadas com o plasmídeo EFJFH c-NS2, que expressa as proteínas estruturais do HCV, e também mostrou ser reativo, confirmando que o observado por ELISA foi específico. Esses resultados indicam que alguns dos segmentos presentes na sequência E1E2 e analisados neste estudo foram capazes de induzir a produção de anticorpos contra o HCV.

Palavras-chave:

vírus da hepatite C;
glicoproteínas E1 e E2;
imunogenicidade;
proteína recombinante.

ABSTRACT

Approximately 150 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 containing segments of the HCV glycoproteins E1 and E2, expressed in bacterial system as a fusion protein (GST-E1E2), six and eight residues of histidine (6xHis and 8xHis). These segments were selected by their ability to elicit neutralizing antibodies, described in scientific articles. Immunogenicity of GST-E1E2 was assessed by means of inoculation of mice and testing protein in the serum of these animals by ELISA against four synthetic peptides (I to IV) corresponding to segments E1E2 present in the sequence. Statistically significant reactivity was observed only against peptides I, II and IV compared between sera of immunized group and that GST-E1E2 immunized with GST. The serum was shown to have the highest reactivity by ELISA was used in indirect immunofluorescence (IFI) against CHO-K1 cells transfected with plasmid EFJFH c-NS2, which express the structural proteins of HCV, and also shown to be reactive, confirming that the observed ELISA was specific. These results indicate that some of the segments E1E2 present in the sequence and analyzed in this study were able to induce the production of antibodies against HCV.

Keywords:

hepatitis C virus;
glycoproteins E1 and E2;
immunogenicity;
recombinant protein.

1 INTRODUÇÃO

O vírus da hepatite C (HCV) é um dos principais agentes etiológicos responsáveis por casos de hepatites aguda e crônica, levando frequentemente ao desenvolvimento de cirrose e câncer hepáticos. Entre 70 a 80% dos casos de infecção pelo HCV evoluem para cronicidade (MORADPOUR et al., 2001). Além disso, calcula-se que 27% dos casos de cirrose e 25% de carcinoma hepatocelular (HCC) estão relacionados com a infecção pelo HCV (PERZ et al., 2006).

Em meados da década de 70, ocorreu o surgimento dos testes sorológicos específicos para os vírus das hepatites A (HAV) e B (HBV), que na maioria dos casos estavam ligados à transfusão de sangue, porém o diagnóstico era inconclusivo, tanto para infecção causada pelo HAV quanto pelo HBV. Surgiu, então, um terceiro diagnóstico que foi chamado de hepatite não A e não B (NANBH) (FEINSTONE et al., 1975). Apesar desta descoberta e do esforço para a identificação do vírus, ainda não era possível caracterizar os agentes de NANBH pela dificuldade de se clonar pequenas amostras de ácido nucleico do HCV antes da disponibilização das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) (FERREIRA; CORREA, 2011). Apenas uma década depois, em 1989, pesquisadores conseguiram identificar um clone do genoma do HCV (CHOO et al., 1989; KUO, 1989).

Dados recentes revelam que cerca de 150 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas por este vírus e é estimado que mais de 35 mil morram a cada ano devido a doenças do fígado relacionadas com a infecção pelo HCV (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

A transmissão do vírus ocorre pela via parenteral e, até a identificação do HCV em 1989 (CHOO et al., 1989), a via mais comum era através de transfusões sanguíneas. Atualmente, em vários países, a transmissão ocorre principalmente através do compartilhamento de seringas por usuários de drogas injetáveis (ZANETTI et al., 2003). A utilização de práticas impróprias com objetos perfurocortantes por profissionais da área da saúde, o compartilhamento de objetos pessoais contendo sangue contaminado, assim como a transmissão vertical e a sexual, também contribuem para a transmissão do vírus (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

Segundo dados do Ministério da Saúde, a prevalência da hepatite C na população em geral do Brasil é de 1,38% nas faixas etárias de 10 a 69 anos. A maior prevalência está na região Norte, com 3,2%, seguida da região Sul com 1,7%, as regiões Sudeste e Centro-Oeste

com 1,6%, Distrito Federal com 1,1% e Nordeste com 1,0%, acometendo principalmente a população entre 20 a 69 anos de idade (BRASIL, 2013). No Brasil, em um estudo realizado com 170 casos de hepatite C aguda diagnosticados entre os anos de 2000 e 2008 envolvendo 16 centros do país, os principais fatores de risco do provável modo de transmissão do vírus foram aqueles associados às unidades de serviços de saúde, em especial a cirurgia, com 28% dos casos, a hemodiálise, com 22%, e a admissão em hospital, com 8,5% (FERREIRA et al., 2011). Diferentemente do que ocorre nos EUA, o uso de drogas ilícitas injetáveis pode ter sido o provável modo de transmissão em somente 2% dos casos no Brasil. Por outro lado, em um boletim epidemiológico emitido pelo Ministério da Saúde em 2012, com dados de quase 70 mil casos notificados de hepatite C aguda e crônica das capitais brasileiras entre 1999 e 2010, este fator pode ter sido o principal meio de transmissão, com 17% de casos, seguido de transfusão sanguínea, com 16% (BRASIL, 2012). Porém, de acordo com o mesmo levantamento, em 43% dos casos o provável fator de risco era desconhecido ou não foi informado.

O HCV, classificado como membro da família *Flaviviridae*, possui envelope, capsídeo icosaédrico e um genoma de RNA de fita simples, de polaridade positiva, de aproximadamente 9,6 Kb (CHOO et al., 1991; MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007). Seu genoma codifica uma poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos que é posteriormente processada por proteases celulares e virais para formar 10 proteínas virais funcionais (figura 1). As proteínas estruturais, que formam a partícula viral, são as do core (C) e das glicoproteínas do envelope E1 e E2 (figura 2). As proteínas não estruturais (NS) são p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B e estão envolvidas no processo de replicação do genoma viral (MORADPOUR et al., 2001).

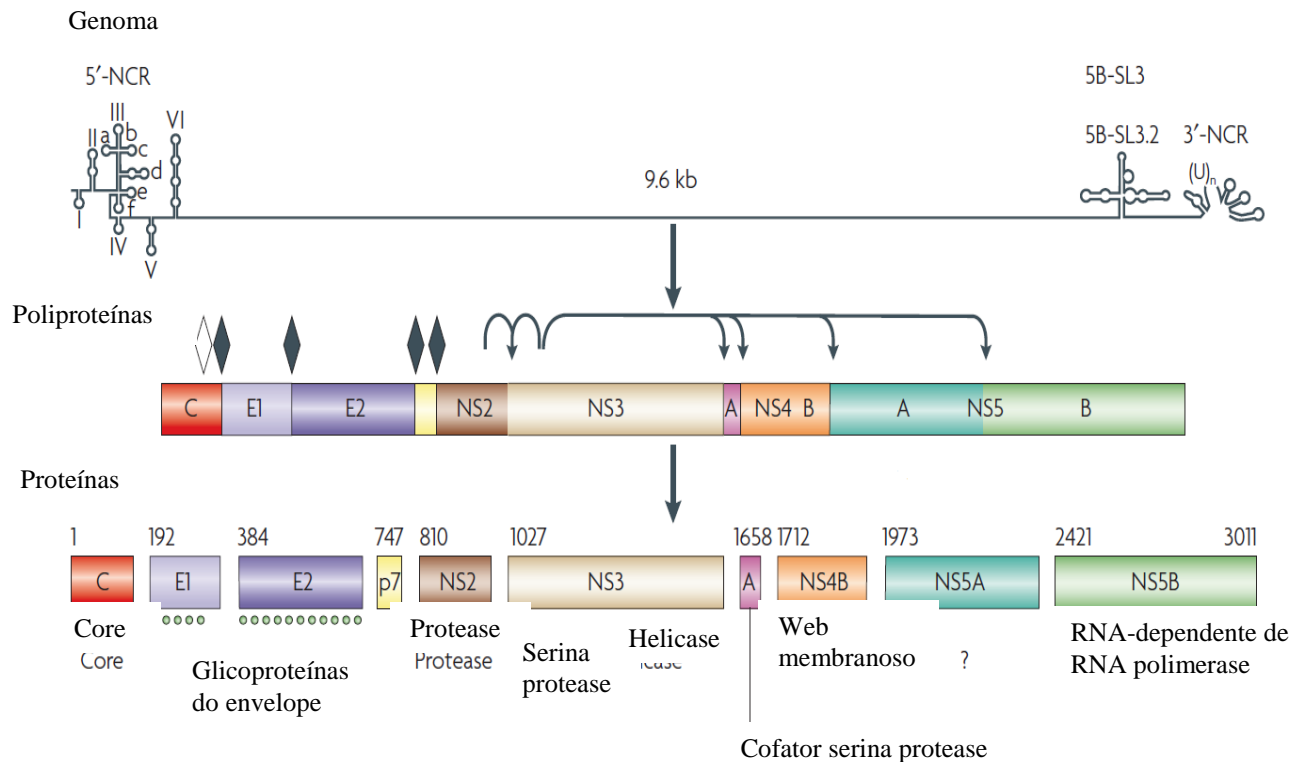


Figura 1. Organização genética e processamento da poliproteína do vírus da hepatite C. Genoma de RNA de fita simples, polaridade positiva, 9,6 Kb, representado na parte superior. Estruturas de regiões não codificantes (NCR) e o elemento de replicação “stem loop 3” (SL3) são mostrados (MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007). Os losangos representam as proteínas estruturais. As setas representam as proteínas não estruturais.

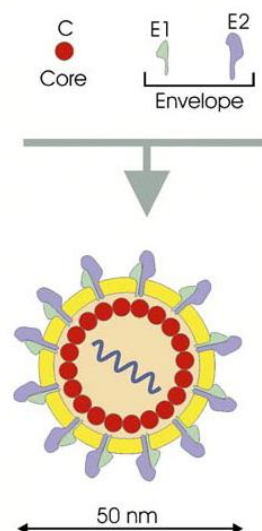


Figura 2. Representação esquemática da partícula viral do HCV, formada pelas proteínas do core, constituindo o capsídeo e E1 e E2 do envelope viral (ROINGEARD et al., 2004).

As proteínas estruturais do HCV derivam do segmento N-terminal da poliproteína, formando a proteína do core, que é o principal componente do nucleocapsídeo, e as proteínas E1 e E2 que formam o envoltório viral. A proteína do core, é uma proteína dimérica α -helicoidal e possui basicamente dois domínios: um N-terminal hidrofílico com aminoácidos carregados positivamente e um domínio C-terminal hidrofóbico (MCLAUCHLAN, 2009; SHARMA, 2010).

A principal função da proteína core é a de encapsidação do genoma, protegendo assim o material genético do vírus e o nucleocapsídeo (MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007). Além disso, acredita-se que essa proteína esteja envolvida em diferentes funções, tais como: modulação da transcrição gênica, sinalização, proliferação e morte celular, como também no metabolismo lipídico (esteatose), oncogênese do HCC e na supressão da resposta do hospedeiro (PENIN et al., 2004; MCLAUCHLAN, 2009).

As proteínas do envelope E1 e E2 são glicosiladas, formam complexos não covalentes e são essenciais para a entrada do vírus na célula, através do seu envolvimento no processo de ligação com os receptores celulares (MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007).

Essas proteínas exibem alto grau de variabilidade genética, sendo que a proteína E2 apresenta três regiões hipervariáveis (HVR), denominadas HVR1, HVR2 e HVR3. Essa variabilidade é relevante para o escape do vírus à resposta imune (TORRES-PUENTE et al., 2008). A HVR1 é constituída por 27 aminoácidos, possui epítomos para anticorpos neutralizantes produzidos durante a infecção pelo HCV, e parece ser importante no reconhecimento e na ligação do vírus à célula (PENIN et al., 2004; KAITO et al., 2006; DUBUISSON, 2007). Essa região também exhibe uma alta variabilidade genética e é importante o estudo dessa variação que conduz a formação de quasiespécies após a infecção (SALA; WAIN-HOBSON, 2000). A segunda região hipervariável da E2, consiste em 9 aminoácidos localizados a jusante da HVR1 (KATO et al., 1992). E essa estrutura possui um potencial envolvimento com o receptor de ligação de superfície celular (YAGNIK et al., 2000). Um estudo demonstra que a HVR3 abrange os aminoácidos 431 a 466 da glicoproteína E2 e que sua atuação é semelhante às regiões HVR1 e HVR2, os quais são importantes para o reconhecimento dos receptores celulares e ligação do vírus à célula (TROESCH et al., 2006).

A proteína p7 é composta por 63 aminoácidos e é frequentemente clivada de forma incompleta a partir da proteína E2 (CARRÈRE-KREMER et al., 2002). Ela é necessária para replicação *in vivo* do vírus e tem um papel importante na maturação e liberação de partículas virais (MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007).

As proteínas não estruturais NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B exercem função enzimática e estão envolvidas na replicação do vírus. A proteína NS2 é uma proteína hidrofóbica transmembrana, que juntamente com aminoácidos de NS3 constituem a proteinase NS2/NS3 dependente de zinco, capaz de clivar NS2 a partir da poliproteína (LINDENBACH; RICE, 2001). Estudos sugerem o envolvimento específico da NS2 durante a montagem de partículas infecciosas do HCV e que essa proteína é essencial para replicação do RNA viral (YI et al., 2009; BLIGHT; KOLYKHALOV; RICE, 2000).

A proteína NS3 é multifuncional, com uma protease de serina localizada na região N-terminal e uma RNA helicase/NTPase localizada na região C-terminal. A protease de serina, por meio da atuação do co-fator NS4A, é responsável pela clivagem das junções NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A e NS5A/NS5B, resultando nas proteínas NS4A, NS4B, NS5A e NS5B (figura 1), e desempenha função primordial nos processos de replicação viral (MOTTOLA et al., 2002). A NS4B induz a formação do tecido membranoso, a fim de alterar a membrana que serve como suporte para a replicação do HCV (EGGER et al., 2002). A NS5A é uma proteína altamente fosforilada, possivelmente envolvida na replicação do vírus e a NS5B é a polimerase dependente de RNA (MOTTOLA et al., 2002).

A análise do genoma completo das diferentes cepas do HCV permitiu classificá-las em sete genótipos principais (de 1 a 7), que divergem entre si de 30 a 35% em suas sequências nucleotídicas (NAKANO et al., 2012; NEWMAN et al., 2013) e são subdivididos em 67 subtipos (SMITH et al., 2014). Cada subtipo é classificado em determinado genótipo, como HCV-1a, 1b, 2a, 3a, 4c, 5a, 6e, 7a (SMITH et al., 2014). Essas variantes genotípicas foram originadas por meio de mutações que ocorrem durante o ciclo de replicação viral, refletindo no processo evolutivo do vírus (DUFFY et al., 2008).

A fase aguda da hepatite C ocorre nos primeiros seis meses após o início da infecção e é assintomática em cerca de 80% dos casos (GERLACH et al., 1999; ALTER et al., 2007). Os sintomas, quando presentes, são mal estar, febre baixa, fraqueza, fadiga, diminuição do apetite, náusea, vômito, dor abdominal, colúria, artralgia e icterícia (CHEN; MORGAN, 2006; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). Níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) podem aumentar cerca de duas a oito semanas após a exposição ao vírus, o que pode significar o desenvolvimento de necrose hepatocelular (THIMME et al., 2001; FARCI et al., 1991). A fase aguda da infecção pelo HCV pode ser grave, mas a falência hepática fulminante é rara, ao contrário da fase crônica.

A hepatite C crônica é marcada pela presença do vírus no sangue durante pelo menos seis meses após o início da infecção e, como a maioria de seus portadores não apresentam sinais ou sintomas, a doença pode evoluir durante décadas sem diagnóstico. Ainda assim, a infecção crônica pode estar associada com numerosas manifestações extra-hepáticas e envolver outros sistemas orgânicos, incluindo sistemas renais, dermatológicos, hematológicos e reumatológicos (GUMBER et al., 1995 *apud* CHEN; MORGAN, 2006; EL-SERAG et al., 2002 *apud* CHEN; MORGAN, 2006). A condição extra-hepática mais comum é a microglobulinemia mista, podendo apresentar sintomas clínicos, tais como a fadiga, erupção cutânea, púrpura, artralgia, vasculite, doença renal e neuropatia periférica (CACOUB et al., 2000 *apud* CHEN; MORGAN, 2006).

Em relação à patogênese, sabe-se que a hepatite C crônica é consequência da resposta imune desencadeada, que induz destruição celular e fibrose, sem ser capaz de erradicar o vírus. O vírus da hepatite C é um agente patogênico bem sucedido que estabelece uma infecção persistente em mais de dois terços das pessoas que o contraem. Seu sucesso está relacionado com a capacidade de neutralizar vias antivirais e evadir a resposta imune adaptativa (DUSTIN; RICE, 2006).

Em geral, cerca de 20% dos doentes com infecção crônica irão desenvolver cirrose hepática dentro de cerca de 20 anos. Uma vez que a cirrose é estabelecida, a taxa de desenvolvimento para HCC é de 1-4% ao ano (figura 3). Essa infecção está relacionada ao aumento de mortalidade por HCC (EL-SERAG; MASON, 2000).

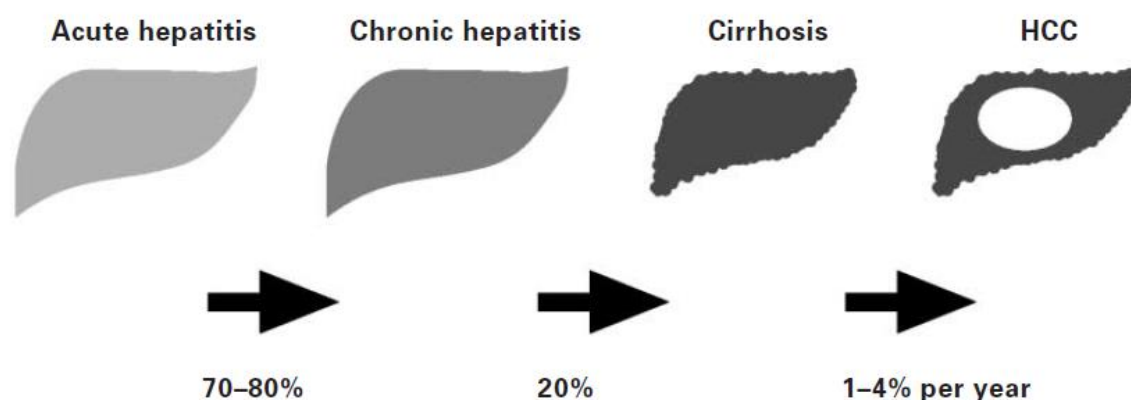


Figura 3. Curso natural da hepatite C. Os valores indicam a porcentagem de casos que evoluem para a fase seguinte (MORADPOUR et al., 2001).

Estudos indicam que o fígado deve ser o sítio primário de replicação do HCV (REHERMANN; NASCIMBENI, 2005; THIMME et al., 2001; MAJOR et al., 2004). O mecanismo de entrada do vírus na célula ainda não é totalmente conhecido, mas há evidências

indicando que os receptores CD81 (GROLLO et al., 2006; KACHKO et al., 2011; BROERING et al., 2009), SR-BI (AGNELLO et al., 1999), o receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDLR) (SCARSELLI et al., 2002) e a claudina-1 (EVANS et al., 2007) são moléculas-chave para a interação vírus-célula.

O LDLR atua como receptor porque o vírion se associa com moléculas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e de muito baixa densidade (VLDL), podendo atuar na fase precoce da entrada do HCV e direcionando posteriormente para a ligação com o receptor CD81. No entanto, seu papel ainda não foi bem determinado (MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007).

Tanto o receptor CD81 quanto o SR-B1 se ligam à proteína E2 e são primordiais para a entrada do vírus na célula, mas não são suficientes. A expressão do receptor CD81 nas células hepáticas confere uma susceptibilidade ao vírus. Moradpour, Penin, Rice (2007) demonstram que a expressão desses mesmos receptores em outras células não interfere na adsorção viral nessas células, indicando que outros fatores dos hepatócitos são necessários para a infecção pelo HCV.

A claudina-1 atua como co-receptor em uma fase tardia no processo de entrada do vírus, após a ligação com a molécula CD81 (COYNE; BERGELSON, 2006; EVANS 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 do tipo I (IFN- α e IFN- β) (LLOYD et al., 2007). Sabe-se que a replicação viral é a causa direta da produção de IFN tipo I, uma vez que o RNA, produzido durante o ciclo replicativo viral, é um potente indutor de IFN- α (CELLA et al., 1999).

Há evidências que sugerem que as células T CD4+ e T CD8+ tenham papéis cruciais na determinação do prognóstico da infecção pelo HCV (DIEPOLDER et al., 1995; THIMME et al., 2001; REHERMANN, 2009). A resposta intensa de células T CD4+ e T CD8+ está associada à eliminação viral e à resolução da doença. Já uma resposta imune celular fraca e tardia está associada à infecção crônica (DUSTIN; RICE, 2006). Anticorpos neutralizantes também contribuem para o controle da infecção durante a fase aguda, através da eliminação viral em associação com a resposta imune celular (DOWD et al., 2009; RAGHURAMAN et al., 2012).

Os anticorpos anti-HCV são geralmente detectados cerca de sete a oito semanas após o início da infecção. No entanto, as evidências do papel protetor dos anticorpos são limitadas. A

sequência da HVR1, localizada na extremidade N-terminal da proteína E2 do HCV, foi identificada como sendo uma sequência que induz a produção de anticorpos neutralizantes (FARCI et al., 1994). Porém, como seu nome indica, essa região exibe uma alta taxa de variabilidade que é provocada pela alta taxa de mutação do vírus, produzindo novas variantes virais que escapam desses anticorpos.

Além da alta taxa de mutação do genoma do HCV durante a replicação viral, levando à presença de diferentes variantes virais em um mesmo indivíduo infectado (quasiespécies) (DOWD et al., 2009; VON et al., 2007), fatores genéticos do hospedeiro também podem influenciar a resposta do sistema imune contra a infecção (DUSTIN; RICE, 2006).

Atualmente, o tratamento da hepatite C crônica baseia-se numa combinação de IFN- α e ribavirina e é eficaz somente em cerca de 50% dos pacientes (TORRESI; JOHNSON; WEDEMEYER, 2011). Pacientes infectados com o genótipo 1, o mais frequente em muitos países, ao serem tratados têm a probabilidade de cura da infecção em apenas 40% a 50% dos casos, enquanto que essa probabilidade aumenta para aproximadamente 80% dos pacientes infectados com o vírus de genótipos 2 ou 3. Estudos ainda mostram que a baixa eficiência do tratamento está, pelo menos parcialmente, relacionada a determinantes tanto virológicos quanto genéticos do portador (CHEVALIEZ; ASSELAH, 2011). Outro fator importante são as proteínas específicas do HCV que provavelmente desempenham um papel na eficácia do tratamento, tal como sugerido pelo fato de que os pacientes infectados com genótipos diferentes respondem de formas diferentes a terapia (MANNIS et al., 2001; FRIED et al., 2002; HADZIYANNIS et al., 2004). Mesmo com a obtenção de uma resposta virológica sustentada (SVR) através da terapia antiviral, pacientes com cirrose relacionada ao HCV ainda têm risco de desenvolvimento de HCC por até oito anos. Isto indica que a vigilância contínua para o HCC deve ser mantida durante um período de tempo prolongado (ALEMAN et al., 2013). Novos tratamentos, com base na combinação de IFN- α , ribavirina e inibidores de proteases, tais como o telaprevir, que já foram aprovados para o tratamento de pacientes em diversos países, inclusive no Brasil, estão sendo iniciados (CHEVALIEZ; ASSELAH, 2011). No entanto, esses tratamentos ainda têm o inconveniente de apresentar graves efeitos adversos (CHEN; MORGAN, 2006).

A hepatite B, outra doença que também pode evoluir para um quadro crônico e levar ao desenvolvimento de cirrose e câncer hepáticos, pode ser evitada através de vacinação. No entanto, até o momento não existe vacina contra a hepatite C. Assim, existe a necessidade de desenvolvê-la a fim de prevenir a infecção.

Um dos motivos que dificultam o desenvolvimento de uma vacina contra hepatite C reside no fato de o chimpanzé ser o único modelo animal disponível, até o momento, capaz de ser infectado pelo HCV e desenvolver a doença crônica. Além disso, existe somente um sistema de replicação do vírus em cultura celular, baseado em um único genótipo viral, o 2a, da cepa JFH1, com produção de partícula viral infecciosa (HCVcc) (WAKITA et al., 2005). No entanto, atualmente é possível produzir genomas quiméricos do HCV em cultura de célula que codificam proteínas estruturais de outro genótipo do HCV (YI et al., 2006; GOTTSWEIN et al., 2007; SCHEEL et al., 2008).

Outro motivo importante está no fato de uma potencial vacina, baseada na sequência nucleotídica de uma única variante do HCV, não oferecer proteção contra a infecção causada por variantes de diferentes genótipos ou ainda diferentes subtipos. De fato, o estudo descrito por Choo et al. (1994) mostra que chimpanzés imunizados com uma vacina experimental foram protegidos somente contra a cepa viral homóloga àquela usada para dar origem à vacina.

Sabe-se que novas variantes são geradas continuamente durante a replicação viral, em consequência a ausência de atividade de correção cometida pela RNA polimerase dependente de RNA e o elevado nível de replicação durante seu ciclo de vida (PAWLOTSKY, 2003). E como resultado das alterações de nucleotídeos que ocorrem no genoma do HCV, os clones do vírus em cada paciente demonstram a diversidade da população viral com um elevado grau de heterogeneidade genética. Genomas intimamente relacionados, mas não idênticos é designado como uma quasispécie (MARTELL et al., 1992; PAWLOTSKY, 2006), e a população viral dominante pode estar evoluindo, como resultado da sua capacidade de replicação e influência de respostas imunes simultâneas que estimulam a seleção clonal. Portanto, ainda que exista a possibilidade de que uma vacina possa ser formulada com a combinação de antígenos com sequências de mais de uma variante, o número de antígenos a combinar é limitado e, com a alta taxa de mutação do HCV, a possibilidade do surgimento de variantes que possam escapar do espectro de proteção de uma vacina combinada é bastante alta.

Têm sido estudadas abordagens para vacinas contra o HCV com proteínas (CHOO et al., 1994), peptídeos sintéticos (FARCI et al., 1996; KLADE et al., 2008; WEDEMEYER et al., 2009), DNA (PUIG et al., 2006), vetores virais e com diferentes estratégias de “prime-boost” (FOLGORI et al., 2006). Porém, o sucesso destas abordagens tem sido limitado, possivelmente devido ao fornecimento de um número limitado de epítomos associados à proteção, às respostas imunes celular e humoral limitadas, à utilização de adjuvantes

potencialmente pobres, dentre outros motivos (TORRESI; JOHNSON; WEDEMEYER, 2011).

Alguns dos alvos principais para o desenvolvimento de vacinas são as proteínas do envelope viral, uma vez que estão expostas à superfície da partícula viral e, desta forma, à ação de anticorpos produzidos pela resposta imune (YAGNIK et al., 2000; ZEISEL et al., 2007). Além disso, a interação entre o vírus e o hospedeiro ocorre inicialmente através da proteína E2 e os receptores situados na membrana plasmática da célula hepática, tendo como receptor principal a proteína CD81 (PILERI et al., 1998; FLINT et al., 1999). Assim, epítomos que induzem a produção de anticorpos capazes de neutralizar o vírus foram localizados na proteína E2 (FARCI et al., 1996; GOTO et al., 2001; MIKKELSEN; BUKH, 2007; LAW et al., 2008; HOUGHTON, 2011). Um desses epítomos, como mencionado anteriormente, está localizado na HVR1. Apesar da alta viabilidade da sequência de aminoácidos apresentada nesse segmento, esforços têm sido envidados com o objetivo de se encontrar variantes de HVR1 que, quando usadas como imunógenos em uma vacina, produzam anticorpos com reatividade cruzada e possam proteger contra um grande número de variantes virais (ESUMI et al., 1998; ROCCASECCA et al., 2001; VIETHEER et al., 2007; CAMPO et al., 2012). Porém, ainda que se possa obter anticorpos com reatividade cruzada relativamente alta através da imunização com uma ou mais sequências da HVR1, o nível de proteção contra a grande diversidade de variantes virais poderá ainda estar abaixo do desejado para uma vacina profilática.

Na etapa de adsorção, diferentes epítomos das glicoproteínas virais estão envolvidos na ligação aos diferentes receptores celulares. Isso mostra que, para uma estratégia preventiva com base em anticorpos neutralizantes ser eficaz, é necessário atingir vários domínios-chave do envelope viral (TORRESI; JOHNSON; WEDEMEYER, 2011).

Dentre outros epítomos com propriedades vírus-neutralizantes da proteína E2, alguns deles foram localizados na região antigênica 3 (AR3) (LAW et al., 2008), que apresenta esses epítomos em sequências descontínuas, ou seja, as sequências desses epítomos estão próximas em uma estrutura conformacional ativa da proteína. Esse mapeamento foi realizado utilizando-se diferentes anticorpos monoclonais direcionados para diferentes locais da proteína e demonstraram ter a capacidade de neutralizar o HCV *in vitro*. Além disso, dois grupos de camundongos quiméricos Alb-uPA/SCID, que possuem células de fígado humano, foram protegidos em 40% (2/5) e 75% (3/4) da infecção pelo HCV através da administração, nos animais, de dois dos anticorpos monoclonais que reagem com AR3 e realizado

monitorização da infecção através da avaliação da carga viral no soro até seis semanas após a inoculação. A ausência de RNA no soro, detectado por PCR quantitativa, sugere proteção contra o vírus (LAW et al., 2008).

Outros estudos também mostraram a existência de anticorpos neutralizantes direcionados para epítomos próximos à região de interação da proteína E2 ao receptor CD81. Esses anticorpos foram capazes de neutralizar *in vitro* pseudopartículas virais contendo proteínas do envelope de diferentes genótipos do HCV (KECK et al., 2004; KECK et al., 2007; KECK et al., 2008). Outro anticorpo monoclonal que interage com a proteína E2 também mostrou ter propriedades neutralizantes similares (PEROTTI; MANCINI et al., 2008). Porém, nesses estudos, os anticorpos foram obtidos através da clonagem, em sistema de *phage-display*, do fragmento Fab do repertório da cadeia leve κ da imunoglobulina G de pacientes infectados pelo HCV. Assim, as sequências de aminoácidos dos epítomos que geraram esses anticorpos são desconhecidas e, por isso, não é possível utilizá-los na composição de vacinas. Epítomos presentes na glicoproteína E1, que forma heterodímero com a glicoproteína E2 no envelope viral, também geraram anticorpos com propriedades neutralizantes (BEYENE et al., 2002; KECK et al., 2004).

Para o desenvolvimento de uma vacina eficaz, os pesquisadores se valem de dados obtidos com a eliminação espontânea do HCV, principalmente durante a fase aguda da infecção. Assim, vários estudos mostraram que a eliminação viral pode também ser associada com a indução precoce de anticorpos neutralizantes (LAVILLETTE et al., 2005; DOWD et al., 2009; OSBURN et al., 2010). Da mesma forma, outros estudos envolvendo seres humanos e chimpanzés mostraram que a eliminação do HCV está associada com a indução precoce de respostas de células T CD4⁺ e T CD8⁺ a proteínas NS3, NS4 e NS5 e, em menor grau, a proteína C (PAPE et al., 1999; LUCAS et al., 2007).

Assim, utilizando como alvo a indução da resposta imune celular, chimpanzés foram imunizados com vírus vaccínia recombinante expressando genes estruturais e não estruturais do HCV e foi observada a eliminação viral durante a infecção aguda, sem a progressão para persistência (YOUN et al., 2008). Resultados similares foram obtidos através da imunização de chimpanzés com vetor adenoviral e DNA plasmidial expressando os genes da NS3, NS4 e NS5 (FOLGORI et al., 2006).

Outros estudos também estão sendo realizados para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas tendo como alvo a indução de células T contra o HCV, com foco inicial em

pacientes cronicamente infectados, com base na disfunção de células específicas T CD4+ e T CD8+ nesses pacientes com o HCV na fase crônica (HOUGHTON, 2011).

Dentre as várias estratégias de vacinas estudadas, a principal vacina candidata contra a hepatite C se encontra em fase de teste clínico e é formulada com as glicoproteínas E1 e E2 expressas em células de mamífero (HOUGHTON; ABRIGNANI, 2005; HOUGHTON, 2011; HOUGHTON, 2012). Após a purificação desses antígenos recombinantes, foi observada sua alta imunorreatividade com anticorpos circulantes presente em praticamente todos os pacientes infectados pelo HCV (CHIEN et al., 1993). Em experimentos envolvendo chimpanzés, aqueles que produziram altos títulos de anticorpos dirigidos a essas proteínas ficaram totalmente protegidos no experimento de desafio com o vírus homólogo (CHOO et al., 1994). Por outro lado, aqueles animais que produziram títulos baixos de anticorpos foram infectados, apesar de a infecção não ter evoluído para a forma crônica. Quando o desafio foi realizado com vírus heterólogo, ainda que do mesmo genótipo das glicoproteínas E1 e E2 vacinais, todos os animais vacinados foram infectados, porém sem a evolução da infecção para a forma crônica. Assim, apesar da baixa eficiência em proteger contra a infecção, esta e outras possíveis vacinas candidatas, caso venham a ser aprovadas, poderão ter o importante papel de proteger os indivíduos vacinados contra a forma crônica da infecção, que é a forma que pode levar à formação de cirrose e de câncer hepático (HOUGHTON; ABRIGNANI, 2005; HOUGHTON, 2011; HOUGHTON, 2012).

Em outro estudo, fortes respostas T auxiliares foram observadas em voluntários humanos, juntamente com a produção de anticorpos anti-E1 e anti-E2, que foram similares às respostas provocadas em chimpanzés vacinados. Títulos baixos, porém significativos, de anticorpos que bloquearam a ligação da E2 ao receptor CD81 também estavam presentes nos indivíduos vacinados (FREY et al., 2010). Análises adicionais, descritas por Ray et al. (2010), mostraram que a maioria dos indivíduos vacinados induziu anticorpos que neutralizam a infectividade de pseudopartículas do HCV (HCVpp), produzido tanto com o vírus da estomatite vesicular (VSV) como o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) com apresentação das glicoproteínas E1 e E2 derivadas da cepa homóloga (1a) do HCV. Além disso, títulos significativos de anticorpos apresentados por alguns indivíduos vacinados foram capazes de neutralizar a infecciosidade *in vitro* do HCVcc heterólogo (2a) enquanto os anticorpos que neutralizaram o HCVcc homólogo (1a) foram detectados em mais indivíduos. Em combinação, estes dados apoiam a continuidade do desenvolvimento desta vacina candidata.

O presente estudo teve como objetivo principal construir uma proteína quimérica contendo diferentes segmentos das proteínas E1 e E2 do envelope do HCV, baseada na cepa JFH1. As sequências utilizadas para constituir a proteína recombinante foram baseadas em artigos científicos que descreveram epítomos presentes nas proteínas do envelope viral que induziam a produção de anticorpos neutralizantes. Além disso, procurou-se reduzir o número de epítomos que mostraram efeito contrário, potencializando a infecção. Uma vacina preventiva eficaz reduziria consideravelmente o número de novas infecções e, conseqüentemente, diminuiria o peso que a hepatite C tem nos sistemas de saúde, como, por exemplo, na redução de gastos com medicamentos para o tratamento e na redução do número de transplantantes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Construir e avaliar o potencial imunogênico de uma proteína recombinante contendo segmentos das glicoproteínas E1 e E2 do vírus da hepatite C.

2.2 Objetivos específicos

1. Construir um gene que codifica o antígeno quimérico contendo diferentes segmentos das glicoproteínas E1 e E2 do vírus da hepatite C envolvidos na indução da produção de anticorpos neutralizantes;
2. Obter a expressão desse antígeno em sistema bacteriano;
3. Estabelecer a purificação e caracterização o antígeno recombinante por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e Western blotting;
4. Avaliar a capacidade imunogênica desse antígeno através de imunização de camundongos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Clonagem e expressão de um antígeno contendo diferentes segmentos das glicoproteínas de E1 e E2 do HCV

Três diferentes segmentos, um da proteína E1 e dois de E2, que contém epítomos envolvidos na indução da produção de anticorpos neutralizantes foram selecionados para a construção do antígeno recombinante (CLAYTON et al., 2002; OWSIANKA et al., 2005; GROLLO et al., 2006; ZHANG et al., 2007; MEUNIER et al., 2008; BROERING et al., 2009; ZHANG et al., 2009 KACHKO et al., 2011). A partir destas descrições, foi construído um gene artificial (GenScript USA Inc. Piscataway, NJ, EUA) denominado de E1E2 (figura 4) baseado na sequência da cepa JFH1 de genótipo 2a do HCV (KATO et al., 2003) e inserido no vetor pGS-21a (GenScript) (figura 5).

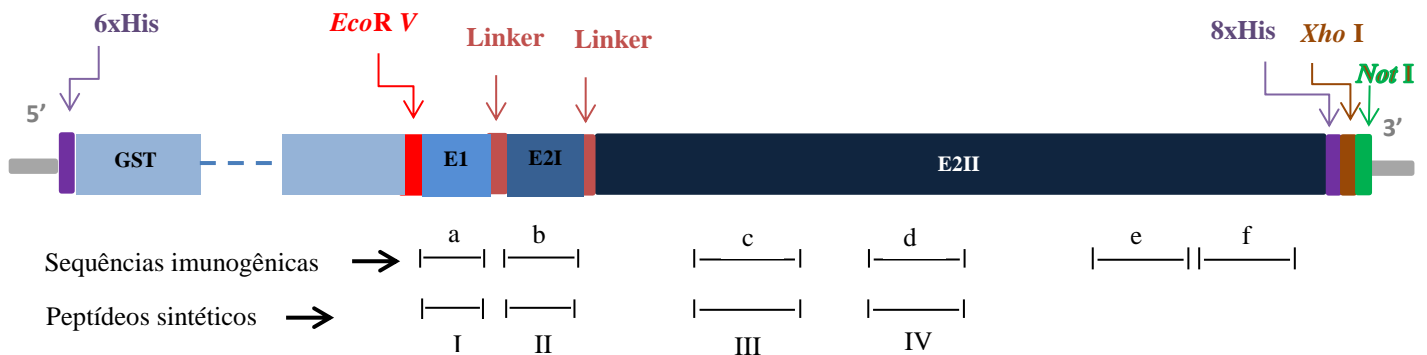


Figura 4. Representação sistemática da organização da proteína GST-E1E2. E1, E2I e E2II representam os três segmentos de interesse das proteínas E1 e E2 do HCV e os tamanhos das sequências de aminoácidos codificados por eles são 15, 18 e 211 aminoácidos, respectivamente. (a) Grollo et al. (2006) e Meunier et al. (2008); (b) Clayton et al. (2002), Owsianka et al. (2005), Zhang et al. (2007), Broering et al. (2009) e Zhang et al. (2009); (c) Kachko et al. (2011); (d), (e) e (f) Grollo et al. (2006). Os segmentos utilizados para sintetizar os peptídeos I ao IV estão referenciados de acordo com as sequências imunogênicas. *EcoR V* e *Not I* representam os sítios das enzimas de restrição correspondentes utilizadas para clonagem no vetor pGS21a. GST, 6xHis e 8xHis representam, respectivamente, sequências da glutationa S-transferase de seis e de oito resíduos de histidina.

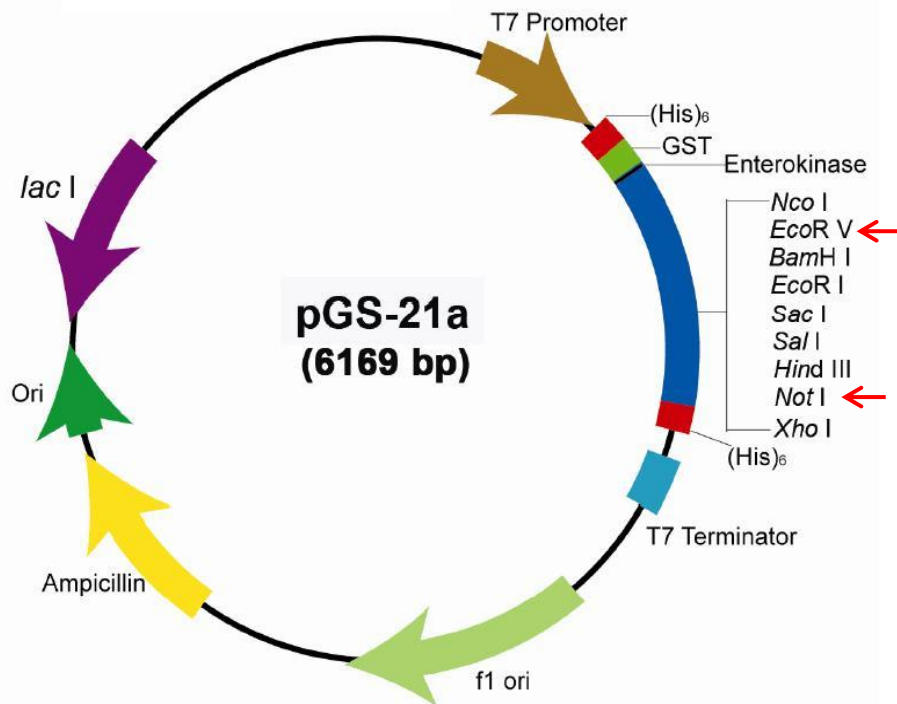


Figura 5. Representação esquemática do mapa físico do vetor de expressão pGS21a. O fragmento E1E2 foi clonado entre os sítios de restrição das enzimas *EcoR V* e *Not I* (setas), sendo denominado pGSE1E2.

O DNA do plasmídeo obtido, denominado de pGSE1E2, foi utilizado para transformação de células bacterianas de *Escherichia Coli* da cepa BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), para realizar a expressão da proteína recombinante. Para a transformação, foi utilizado 1 μ l (cerca de 1 ng) do DNA de pGSE1E2 e 24 μ l de células competentes, seguida de adição de 175 μ l de meio SOC e incubação a 37°C por 1 h (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Após a eletroporação, as células foram dispersas em placa de Petri contendo meio LB (triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1% e ágar 2%) contendo ampicilina 100 μ g/ml e cloranfenicol 34 μ g/ml e incubadas a 37°C “overnight”. Várias colônias bacterianas foram selecionadas e inoculadas em 2,5 ml de meio 2x YT (triptona 1,6%, extrato de levedura 1% e NaCl 0,5%) contendo ampicilina 100 μ g/ml e cloranfenicol 34 μ g/ml (2x YT/amp/cam). Após incubação “overnight” a 37°C sob agitação, 1,6 ml da suspensão bacteriana foi inoculada em 50 ml de meio 2x YT/amp/cam e a cultura foi incubada a 37°C durante 3 h sob agitação. A expressão da proteína heteróloga foi induzida por adição de isopropil- β -D-tiogalactosídeo (IPTG) para atingir a concentração final de 1 mM. Após incubação adicional por 2 horas a 37°C sob agitação, 1 ml da suspensão bacteriana

foi transferida para um microtubo para triagem rápida e o restante foi reservado para análise mais detalhada. As suspensões foram centrifugadas a 4000 xg por 15 min a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Para triagem rápida, o “pellet” bacteriano foi ressuspensão com 1 µl de Stop Solution (azul de bromofenol 0,4%; Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; glicerol 40%, SDS 2%) e a suspensão foi incubada a 95°C por 10 min. O lisado foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).

Para análise mais detalhada, os sedimentos foram guardados a -20°C até o momento de seu processamento. Para isso, o sedimento foi ressuspensão com 500 µl de tampão de lise (Tris-HCl 45 mM, EDTA 0,7 mM, NaCl 0,07 M, ureia 3 M, pH 8,0, preparado no momento do uso) e à suspensão foram adicionados 5 µl de fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100 mM e 5 µl de lisozima 10 mg/ml, seguidos de incubação por 10 min a 4°C. Após a realização de três ciclos de congelamento, por cinco min a -70°C, e descongelamento à temperatura ambiente, 13 µl de DNase I 2 U/µl e 13 µl de MgCl₂ 25 mM, foram adicionados ao lisado e a mistura foi incubada à temperatura ambiente por cerca de 30 min ou até a perda da viscosidade. O lisado foi então centrifugado a 15000 xg por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi transferido para outro microtubo. No caso da obtenção da proteína GST (clone transformado com o vetor), que foi utilizada como controle, o sobrenadante foi utilizado nos passos seguintes, enquanto que para GST-E1E2 utilizou-se o “pellet”. Ambos (sobrenadante e “pellet”) foram armazenados a -20°C.

3.2 SDS-PAGE e Western blotting

Dois clones foram selecionados para a purificação das proteínas GST (clone BLC+21a (DE3) A) e GST-E1E2 (clone BLC+E1E2 (DE3) B). Seus lisados foram submetidos à SDS-PAGE, contendo 5% de poliacrilamida para o gel de empilhamento e 14% para o de separação e em seguida, o gel foi corado com Coomassie blue (SAMBROOK, RUSSEL; 2001), para visualização das bandas correspondentes à GST e à GST-E1E2, com massas moleculares estimadas de 31,6 kDa e 61,8 kDa, respectivamente. As massas moleculares das bandas proteicas visualizadas foram avaliadas de acordo com suas mobilidades eletroforéticas em comparação com um padrão de peso molecular (Pierce Biotechnology, EUA). Outro item da caracterização da propriedade antigênica avaliado foi a reatividade do antígeno expresso com o anticorpo monoclonal anti-6xHis (Life Technologies Corp. Long Island, NY, EUA) por Western blotting. Primeiramente, foi realizada a SDS-PAGE e o gel foi tratado com

tampão de transferência (glicina 192 mM, Tris 25 mM, metanol 20%) por 10 min. A membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF- GE) foi tratada com metanol 100% por cerca de 10 segundos e o sistema de transferência foi montado. A transferência foi realizada por 1 hora a 23 mA. A membrana foi removida do sistema e lavada com PBS 1X (NaCl 130 mM, NaH₂PO₄ 8 mM e KH₂PO₄ 1 mM, pH 7,2). Áreas livres da membrana foram bloqueadas por incubação com leite desnatado 5% em PBS 1X/Tween 20 a 0,05% (PBS-T) “overnight” a 4°C. No dia seguinte, a membrana foi lavada três vezes com PBS-T deixando-a no tampão da última lavagem por cinco min e, em seguida, incubada com o anticorpo monoclonal (mAb) anti-6xHis, diluído com PBS-T para concentração final de 0,12 µg/ml, por 1 hora a 37°C. A membrana foi lavada brevemente com PBS-T para retirar o excesso de anticorpo e mais duas lavagens de 10 min com o mesmo tampão. A membrana foi incubada com o anticorpo anti-IgG de camundongo marcado com HRP (“horseradish peroxidase”- Invitrogen) na concentração 0,5 µg/ml (diluído com PBS-T) por 1 hora a 37°C. Imediatamente, a membrana foi lavada com PBS-T três vezes por 10 min. A revelação foi realizada por adição de diaminobenzidina (DAB – Life Technologies) e incubação por cerca de 5 min. A reação foi interrompida por lavagem com água destilada e, posteriormente, a membrana foi secada à temperatura ambiente.

3.3 Purificação dos antígenos

Para a expressão em maior escala, para purificação de GST e GST-E1E2, os clones selecionados foram inoculados em 6 ml de meio 2x YT/amp/cam e incubados a 37°C “overnight”, sob agitação. Depois disso, a suspensão foi transferida para um frasco contendo 125 ml de 2x YT/amp/cam e as células foram incubadas durante mais 3 h a 37°C. Em seguida, IPTG foi adicionado para 1 mM, para a expressão da GST-E1E2, e 0,1 mM, para a expressão da GST, seguindo-se de incubação durante 3 h. A suspensão foi centrifugada a 4000 xg durante 15 min a 4°C e o sobrenadante foi descartado.

A lise das células foi realizada como descrito acima, ajustando-se os volumes de acordo com o volume do meio de cultura, e a GST foi purificada utilizando-se a resina de glutationa sepharose 4B (GE), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, 4 ml do sobrenadante do lisado foram incubados com 4 ml da resina (suspensão a 50%) à temperatura ambiente durante 30 min. A suspensão foi transferida para uma coluna vazia, o tampão foi

drenado e a resina foi lavada com 2,5 ml de PBS 1X. A eluição foi realizada com 600 µl de glutatona reduzida 10 mM em Tris-HCl 50 mM, pH 8,0.

Para purificação da GST-E1E2, o “pellet” do lisado foi ressuspensão com 4,4 ml de tampão de lise contendo ureia 8 M e, depois de outra centrifugação, o novo sobrenadante foi misturado com 1,1 ml de resina Ni-NTA agarose (QIAGEN, Valencia, CA, EUA), seguindo-se de incubação durante 1,5 h à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada a 500 xg durante 5 min e o sobrenadante foi removido. Em seguida, a resina foi lavada duas vezes com 490 µl de tampão C (NaH₂PO₄ 100 mM, Tris-HCl 10 mM, ureia 8 M, pH 6,3). A eluição foi realizada com 1,5 ml de tampão D (NaH₂PO₄ 100 mM, Tris-HCl 10 mM, ureia 8 M, pH 5,9), repetida cinco vezes. Os eluados foram dialisados com PBS 1X e armazenados a -20 °C.

3.4 Imunização

Foram utilizados três grupos de camundongos fêmeas Balb/C, contendo cinco camundongos em cada grupo, com 6 a 8 semanas de idade. A utilização desses animais foi aprovada pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sob protocolo nº 023/11 (Anexo A). Os camundongos foram anestesiados com uma mistura contendo 80 mg/kg de cetamina e 15 mg/kg de xilazina, administrada por via intraperitoneal, antes da imunização.

Um grupo foi imunizado com PBS 1X, como controle negativo, um segundo grupo foi imunizado com GST e o terceiro grupo foi imunizado com GST-E1E2. Cada camundongo foi imunizado por via intradérmica, com uma mistura de 100 µl contendo cerca de 50 µg de proteína em PBS 1X e 100 µl de adjuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich Corp, Saint Louis, EUA), para a primeira dose, ou o adjuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich), para as duas outras doses, administradas em intervalos de duas semanas.

Três semanas após a última dose, os animais foram sacrificados com uma mistura contendo 375 mg/kg de cetamina e de 100 mg/kg de xilazina e o sangue foi colhido por punção cardíaca. As amostras de soro dos animais foram obtidas e armazenadas a -20 °C.

3.5 ELISA

Para o teste dos soros dos camundongos por ELISA, foram utilizados quatro peptídeos sintéticos comerciais correspondentes aos segmentos da proteína E1 (peptídeo I) e da proteína

E2 (peptídeos II, III, IV) presentes na sequência da proteína GST-E1E2. Outro peptídeo (V), contendo sequência parcial de um antígeno do vírus da hepatite D, foi utilizado como controle negativo.

Cada poço da placa de ELISA (Costar – Corning Inc; Corning, NY, EUA) foi sensibilizada com 0,5 µg de peptídeo em 50 µl de tampão carbonato/bicarbonato (Na_2CO_3 0,07 M, NaHCO_3 0,42 M, pH 9,6) por incubação “overnight” à temperatura ambiente. Os poços foram lavados três vezes com 200 µl de PBS-T e o bloqueio foi realizado por incubação com 100 µl de BSA 2% em PBS 1X (PBS/BSA) por 1 h a 37°C. Depois de lavar duas vezes com 200 µl de PBS-T, 50 µl de cada soro diluído 1:100 em PBS-T/BSA foram adicionados aos poços e a placa foi incubada durante 1 h a 37°C. Após cinco lavagens com PBS-T, 50 µl de anti-IgG de camundongo conjugado com HRP (KPL-Gaithersburg-EUA) diluído 1:16000 em PBS-T/BSA foram adicionados aos poços e a placa incubada por 1 h a 37°C. Os poços foram lavados cinco vezes e 50 µl OPD (Life Technologies)/peróxido de hidrogênio 0,03% em tampão fosfato citrato pH 5,0 foram adicionados. Após a incubação no escuro durante 20 min à temperatura ambiente, a reação foi interrompida por adição de 25 µl de H_2SO_4 1 M e a densidade óptica foi determinada a 492 nm.

3.6 Transfecção de células CHO-K1 e reação de imunofluorescência indireta (IFI)

A transfecção das células CHO-K1 foi realizada com o plasmídeo EFJFH c-NS2 (ISHII et al., 2008) preparada por G.R.O Freitas. O DNA do plasmídeo foi obtido utilizando o kit *_QIAprep[®] Spin Miniprep* (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante e em seguida o produto da purificação foi analisado em gel de agarose a 0,8%. No dia anterior à transfecção, 1×10^5 células CHO-K1 foram depositadas em um poço de uma placa de seis poços e mantidas com meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA), suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10%, a 37°C e CO_2 , até a confluência de 70-80% (de 16-24 h).

Para a transfecção, 2 µg de DNA de pEFJFH c-NS2 foram misturados com 1 ml de meio Opit-MEM livre de SFB e, em outro microtubo 12 µl de DMRIE-C (Life Technologies) foram misturados com 1 ml de meio Opit-MEM livre de SFB. Após incubação por 30 min à temperatura ambiente, as duas soluções (DNA/DMRIE-C) foram misturadas e incubadas à temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, a mistura DNA/DMRIE-C foi adicionada à monocamada celular e incubada “overnight” a 37°C e CO_2 5%. A mistura de transfecção foi removida e então o meio de cultivo completo foi adicionado seguido de nova incubação. A

seleção das células foi iniciada 48 h após a transfecção com meio completo acrescido de zeocina 200 µg/ml. Após 4 semanas de seleção, diferentes clones foram individualizados utilizando anéis de clonagem e testados por IFI com mAb anti-core HCV (Thermo Scientific Pierce, EUA) para confirmar a síntese da proteína core do HCV a partir do pEFJFH c-NS2.

A reação de IFI foi realizada de acordo com Kato et al. (2003). Resumidamente, 1×10^4 células dos diferentes clones transfectados foram depositados em cada poço de uma placa de 96 poços e cultivadas por 24 h a 37°C e CO₂ 5%. Em seguida, as células foram fixadas com 100 µl de metanol por 20 min e mantidas -20°C até sua utilização. Após a remoção do metanol, o bloqueio foi realizado com PBS/BSA e incubação a 37°C por 1 h. Os poços foram lavados três vezes com 200 µl de PBS-T e 50 µl do mAb anti-core HCV (Pierce) diluído 1:300 foram adicionados. Após incubação a 37°C por 1 h, foi realizada nova lavagem seguida de adição de 50 µl de anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa flúor 488 (Invitrogen), diluído 1:2000 e incubação a 37°C por 1 h. Após nova lavagem, foram adicionados 50 µl de PBS e a placa foi observada em microscópio de fluorescência. Células CHO-K1 não transfectadas foram utilizadas como controle negativo. Para os experimentos de IFI utilizando o soro dos camundongos imunizados, foi então selecionado o clone de células CHO-K1 transfectadas com pEFJFH c-NS2 que apresentou mais focos fluorescentes por campo. Para isso, o mesmo protocolo descrito anteriormente foi utilizado, substituindo-se o mAb anti-core HCV por 50 µl de soro dos camundongos previamente inativado a 56°C por 30 min e diluído 1:50 com PBS-T/BSA 2%.

3.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o 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 os testes não paramétricos. Os níveis de anticorpos foram comparados entre os grupos de estudo utilizando o teste de Mann-Whitney. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

Três segmentos da cepa JFH1 do HCV, um de parte da proteína E1 e dois da proteína E2, foram selecionados para a construção de um único antígeno quimérico para a expressão em bactérias como uma proteína de fusão (figura 4).

Após a transformação em células bacterianas BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL com DNA de pGS-21a (vetor) ou de pGSE1E2 (construção), várias colônias foram selecionadas para análise de expressão. Em SDS-PAGE de lisados das células, uma banda proteica de intensidade forte de massa molecular próxima à estimada para GST foi observada com o clone bacteriano transformado com o vetor, enquanto que uma banda de intensidade fraca foi observada de massa molecular estimada para o antígeno recombinante GST-E1E2 (figura 6).

Para se confirmar que as bandas observadas correspondiam às proteínas de interesse, um Western blotting foi realizado utilizando anticorpo monoclonal anti-6xHis e novamente foram observadas bandas reativas que correspondiam às proteínas de massas moleculares estimadas para GST e GST-E1E2 (figura 7).

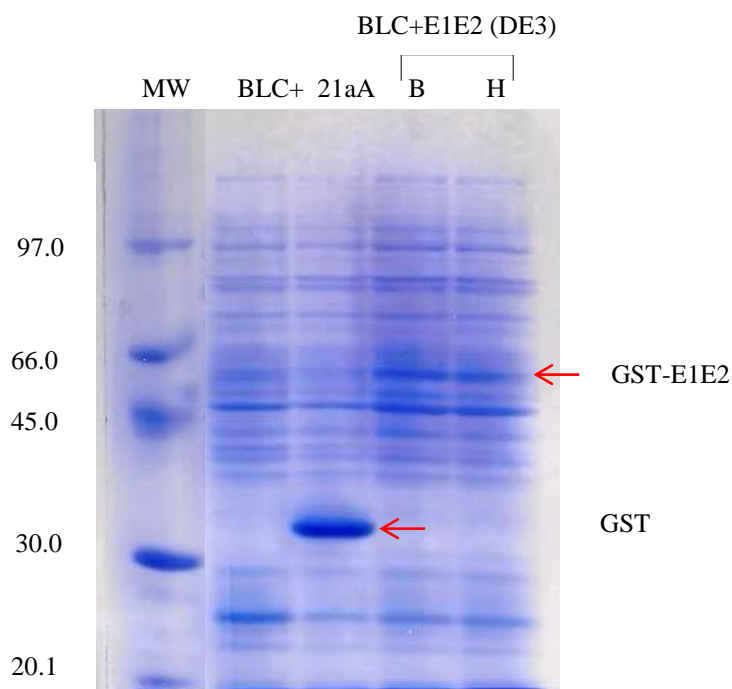


Figura 6. SDS-PAGE dos lisados de clones selecionados. BLC+: clone não transformado; 21aA: clone BL21a transformado com pGS-21a; BLC+E1E2 (DE3), B e H: clones transformados com pGSE1E2. As bandas das proteínas presumidas de interesse estão indicadas pelas setas. A massa molecular estimada da proteína GST-E1E2 foi aproximadamente 61,8 kDa, com segmento da GST tendo 31,6 kDa e o da E1E2 tendo 30,2 kDa. MW: padrão de peso molecular.

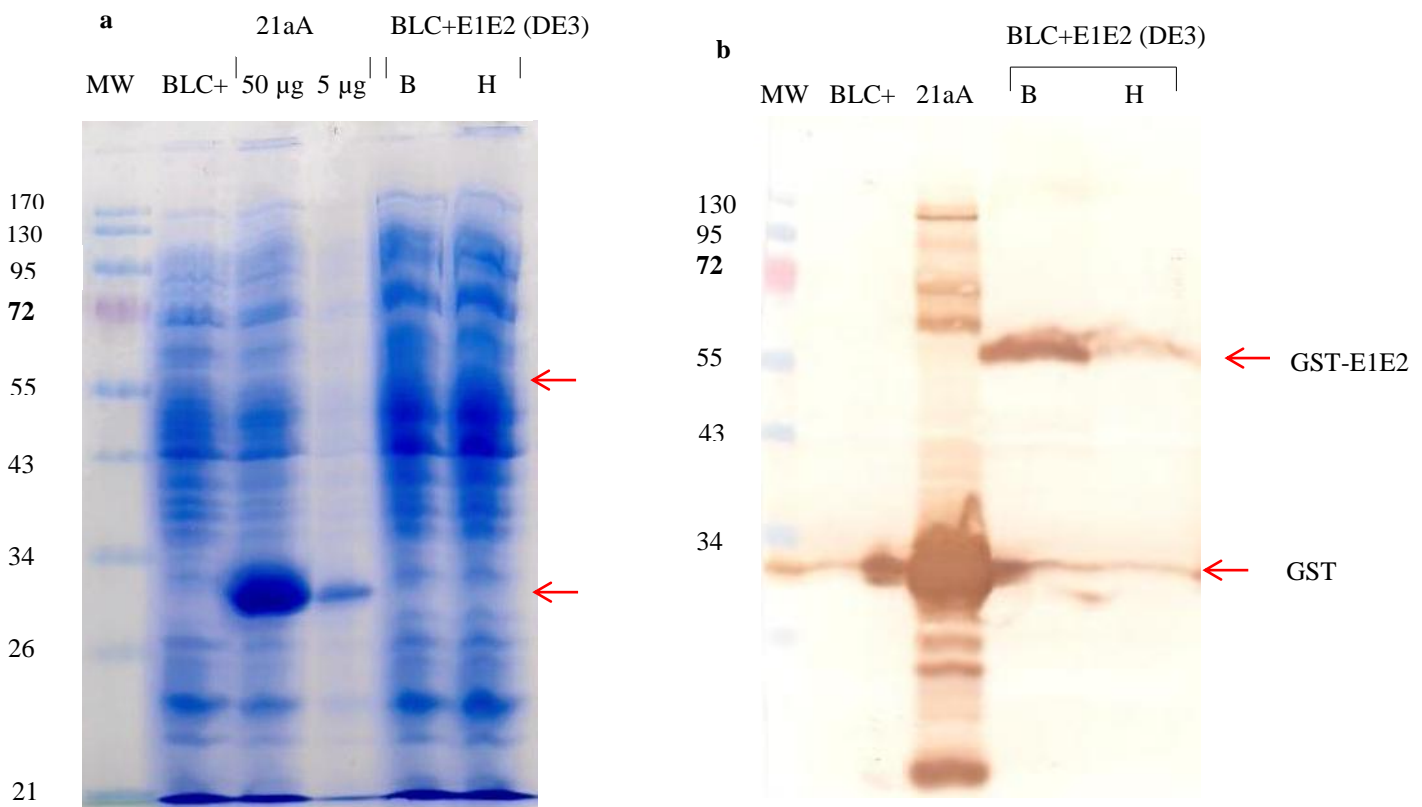


Figura 7. SDS-PAGE (a) e Western blotting (b) realizados com lisados dos clones selecionados. Aproximadamente 50 μg da proteína total de cada lisado foram colocados nos géis, exceto onde indicado. Anticorpo monoclonal anti-6xHis foi usado como anticorpo primário no Western blotting. As setas indicam as prováveis bandas correspondentes às proteínas GST e GST-E1E2. MW: padrão de peso molecular.

Com base na intensidade da banda da proteína GST-E1E2 do experimento de Western blotting, o clone BLC+E1E2 (DE3) B foi selecionado para a expressão em maior escala e purificação da proteína de interesse. Para a GST, foi utilizado o clone BL21a. Embora a resina glutationa sepharose 4B tenha sido eficiente para a purificação de GST (Figura 8a), para GST-E1E2 ela não funcionou. Assim, foi utilizada a resina Ni-NTA agarose e mais uma vez a purificação não foi bem sucedida (figura 8b). No entanto, uma vez que, visualmente, algumas das proteínas bacterianas foram removidas depois da passagem através da resina, foi feito um “pool” com o 1^o ao 5^o eluados, que continham a GST-E1E2, o qual foi usado na imunização de camundongos.

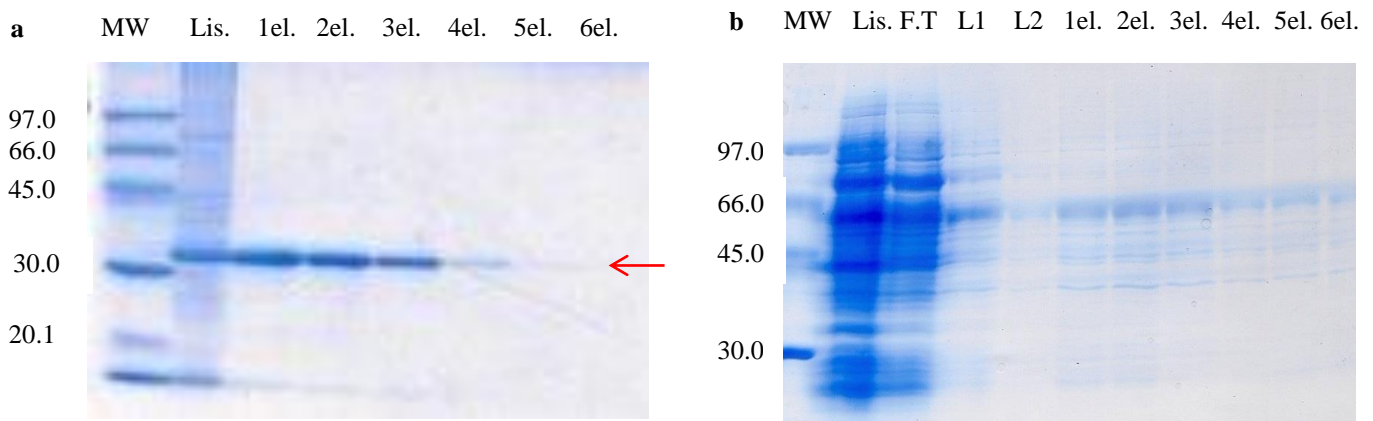


Figura 8. SDS-PAGE dos eluados das etapas de purificação usando a resina glutationa sepharose 4B para purificação da GST (a) e a resina Ni-NTA para purificação da GST-E1E2 (b). As setas indicam as bandas correspondentes para os tamanhos estimados das proteínas GST e GST-E1E2. Lis.: lisado, 1el. a 6el. 1° ao 6° eluados com tampão de eluição; F.T: “flow through” do lisado, L1 e L2: “flow through” obtido com tampão de lavagem. MW: padrão de peso molecular.

Após a imunização, realizada em três doses, os soros obtidos foram testados por ELISA contra peptídeos sintéticos correspondentes a segmentos presentes na proteína GST-E1E2 (figura 9). Diferenças significativas de reatividade foram observadas entre os soros de camundongos imunizados com GST-E1E2 e aqueles de camundongos imunizados com GST contra os peptídeos I, II e IV (figura 9). Baixa diferença de reatividade foi observada contra o peptídeo III, não havendo diferença estatística entre os dois grupos de soros e também não houve diferença contra o peptídeo V, que continha uma sequência correspondente a parte do antígeno vírus da hepatite D. Para ambos os grupos de soro, foi detectada alta reatividade dos soros de ambos os grupos contra GST, indicando que a sequência de GST presente na proteína GST-E1E2 foi capaz de induzir a produção de anticorpos anti-GST.

Para confirmar se a reatividade observada no experimento de ELISA utilizando peptídeos sintéticos também era observada contra proteínas do vírus, foi realizado o experimento de IFI. Para isso, foram utilizadas células CHO-K1 transfectadas com pEFJFH c-NS2, que promove a expressão das proteínas E1 e E2 do HCV, além das proteínas do core, p7 e NS2. Assim, o soro que mostrou ter a maior reatividade contra os peptídeos I, II e IV (soro número 67, figura 9) também mostrou ser reativo por IFI (figura 10).

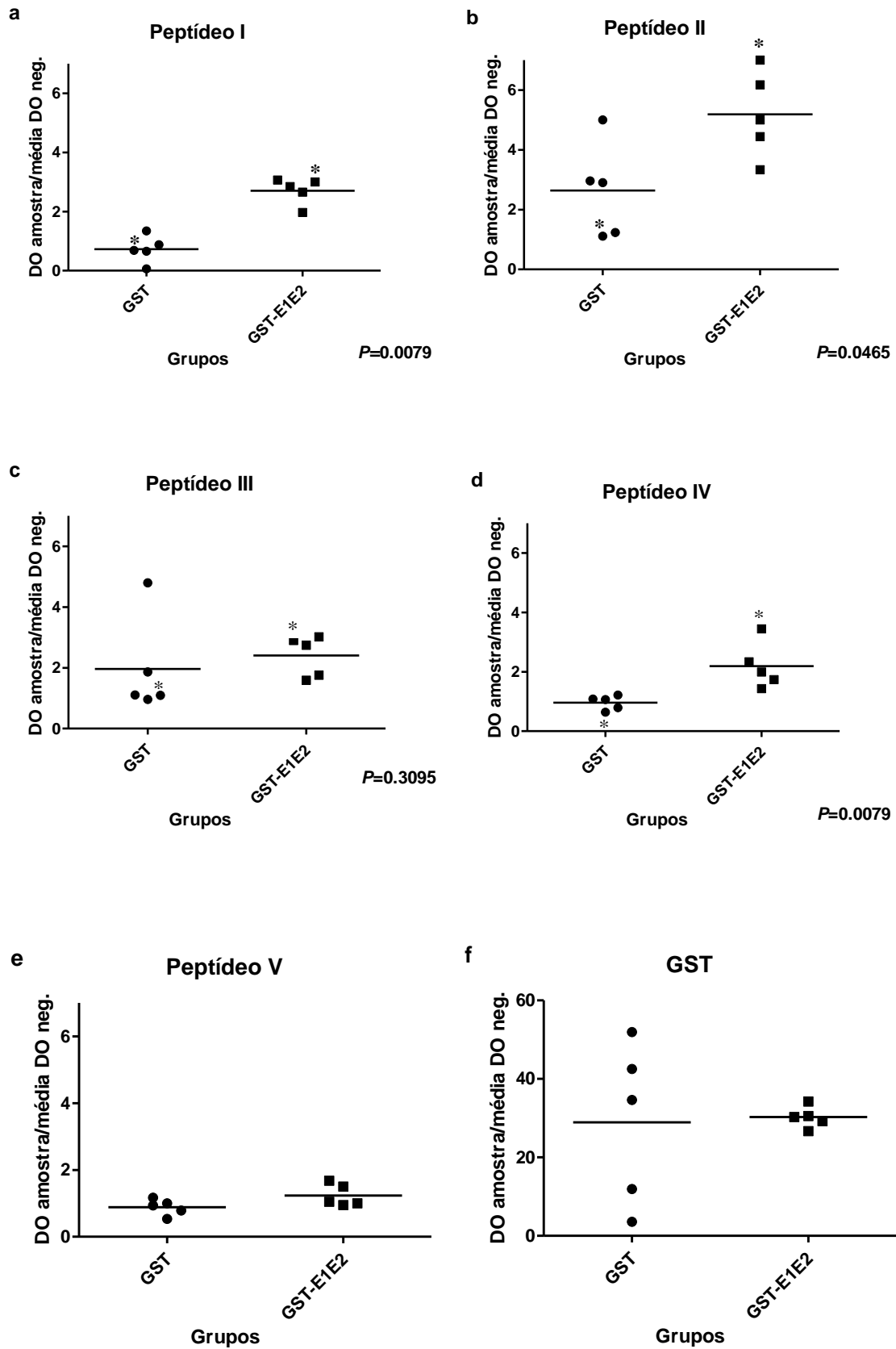


Figura 9. Dados de ELISA obtidos com soros dos camundongos imunizados. Os círculos e quadrados representam os valores de DO 492 nm obtidos com cada soro divididos pela média dos valores da DO obtidos com soros dos camundongos imunizados com PBS (média DO neg.). As linhas indicam os valores da mediana que foram utilizados para análise estatística. *soros números 64 (anti-GST) e 67 (anti-GST-E1E2) selecionados para o experimento de IFI.

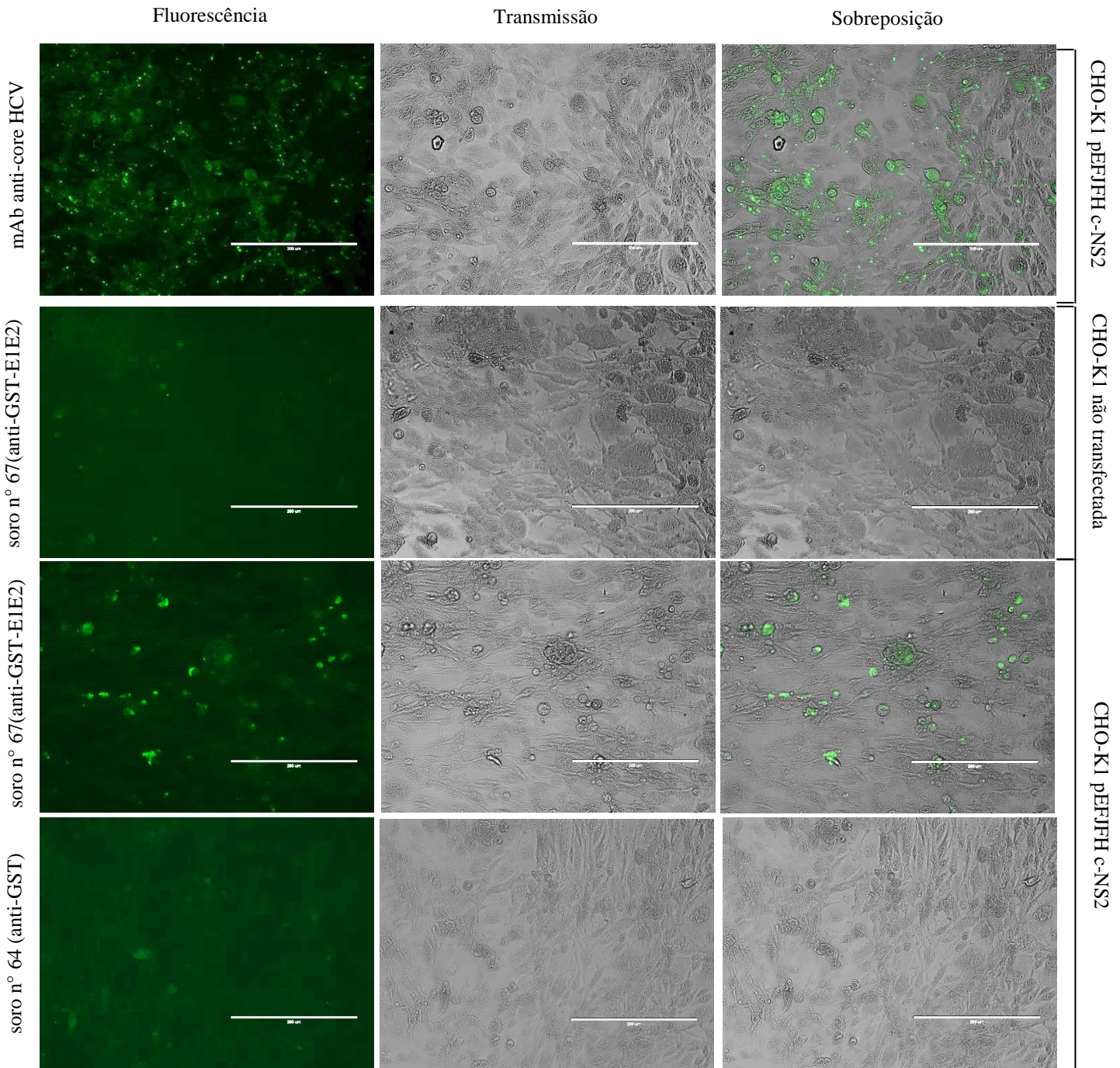


Figura 10. Imunofluorescência indireta realizada com soros de camundongos imunizados com GST ou GST-E1E2 e células CHO-K1 transfectadas com pEFJFH c-NS2. MAb anti-core HCV foi utilizado como controle positivo e células CHO-K1 não transfectadas e soro de camundongo imunizado com GST foram utilizados como controle negativo.

5. DISCUSSÃO

Epítomos associados com a indução da produção de anticorpos neutralizantes foram selecionados para a construção de um antígeno quimérico do HCV (ZHANG et al., 2007; MEUNIER et al., 2008; ZHANG et al., 2009). Além disso, procurou-se reduzir o número de epítomos cujos anticorpos potencializam a infecção (ZHANG et al., 2007; ZHANG et al., 2009), fenômeno conhecido como “antibody-dependent enhancement of infection” (HALSTEAD; TOM; ELM, 1981). Para clonagem molecular, foi utilizada a sequência nucleotídica original da cepa JFH1 do HCV. Apesar dessa escolha ter sido feita para permitir a clonagem e a expressão da proteína E1E2 em outros sistemas de expressão, principalmente o de células de mamífero, isso provocou a dificuldade de expressão da proteína GST-E1E2 com a utilização de cepas bacterianas comumente utilizadas. Essa dificuldade foi superada com a utilização da cepa B121-CodonPlus (DE3)-RIPL, que contém genes adicionais que codificam para RNAt de Arg, Ile, Pro e Leu.

Apesar de a proteína GST-E1E2 ter sido construída com as sequências de GST e 8xHis, que seriam utilizadas para sua purificação através do uso da resina glutationa sepharose 4B ou da Ni-NTA agarose, nenhum dos sistemas foi eficaz, provavelmente devido à formação de agregados de baixa solubilização em condições próximas às fisiológicas. Mesmo com a utilização de alta concentração de ureia, que possibilitou a dissolução da GST-E1E2 e é compatível com ambos os sistemas, não foi possível purificá-la. Interessantemente, uma proteína E2 truncada foi expressa em células de mamíferos e obtida na forma solúvel (sE2 – MICHALAK et al., 1997; FALKOWSKA et al., 2007). Essa proteína continha a sequência de aminoácidos da posição 384 à posição 661 do subtipo 1a do HCV, enquanto as sequências de E2 presentes na GST-E1E2 foram da 412 à 426 e da 451 à 661 de subtipo 2a.

Para a avaliação da resposta imune humoral causada pela imunização com a GST-E1E2, os soros obtidos foram testados por ELISA contra peptídeos sintéticos correspondentes a partes das sequências da E1E2 (figura 4). Assim, o peptídeo I continha a sequência idêntica ao epítomo da E1, que foi descrito por Grollo et al. (2006) e Meunier et al. (2008); peptídeo II (E2I) continha a sequência do epítomo descrito por Clayton et al. (2002), Owsianka et al. (2005), Zhang et al. (2007), Zhang et al. (2009) e Broering et al. (2009); a sequência do peptídeo III foi descrita por Kachko et al. (2011) e a sequência do peptídeo IV por Grollo et al. (2006), ambas eram partes do segmento E2II. No estudo relatado por Grollo et al. (2006), os resultados obtidos com imunização de camundongos utilizado peptídeos correspondentes

ao peptídeos I e IV deste estudo mostraram resposta imune humoral fraca com o primeiro e forte com o outro. Por outro lado, a inibição da entrada de HCVpp obtida somente com soro de camundongo imunizado com primeiro. Neste estudo, a resposta obtida pela imunização com GST-E1E2 mostrou-se similar para ambos os peptídeos. Além disso, Grollo et al. (2006) mostraram que as sequências de aminoácidos desses dois epítomos são bastante conservadas dentre os genótipo analisados, mas principalmente os genótipos 1a, 2a e 3b.

Estudos realizados com anticorpos monoclonais (CLAYTON et al., 2002; OWSIANKA et al., 2005; BROERING et al., 2009) e com anticorpos de soros de pacientes com hepatite C crônica ou de chimpanzés imunizados com as proteínas E1 e E2 recombinantes (ZHANG et al., 2007; ZHANG et al., 2009) específicos para o segmento E2I mostraram ser capazes de neutralizar o HCVcc ou HCVpp de diferentes genótipos, possivelmente por envolver uma sequência conservada. Em nosso estudo, os soros de camundongos imunizados com a GST-E1E2 se mostraram reativos com o peptídeo correspondente a esse segmento.

Por outro lado, os experimentos de Zhang et al. (2007) e de Zhang et al. (2009) mostraram que a presença de anticorpos específicos para um epítomo localizado entre os resíduos de aminoácidos 434 e 446 anulava a capacidade vírus-neutralizante dos anticorpos direcionados para o segmento E2I (do aminoácido 412 ao 426). Assim, para reduzir a interferência de anticorpos que tenham essa característica, a sequência do resíduo 434 ao 446 foi eliminada da construção da GST-E1E2.

Outra sequência eliminada foi a da HVR1, que, apesar de ter somente 27 resíduos de aminoácidos e epítomos que levam à produção de anticorpos neutralizantes, possui enorme quantidade de variantes virais com sequências diferentes de HVR1, ainda que algumas delas possam dar origem a anticorpos com alto grau de reatividade cruzada (CAMPO et al., 2012).

O segmento correspondente à sequência do peptídeo III foi descrito por Kachko et al. (2011), que reportaram ser altamente conservado dentre os diferentes genótipos do HCV e os anticorpos direcionados a ele, obtidos de chimpanzés imunizados com as proteínas E1 e E2, foram capazes de neutralizar o HCVcc dos genótipos 1a, 1b, e 2a. Os autores também observaram que em somente 10,3% dos pacientes e chimpanzés com infecção causada pelo vírus apresentaram esses anticorpos, sugerindo que esse epítomo é pouco imunogênico no contexto da partícula viral. Porém, contrário aos resultados observados por esses autores, a imunização com GST-E1E2, no presente estudo, não levou a produção desses anticorpos.

Como a reatividade de anticorpos específicos para três dos quatro epítomos analisados foi observada, a especificidade desses anticorpos foi confirmada por meio de reação de IFI com células que expressavam as proteínas estruturais do HCV. Essas células foram obtidas com base na cepa JFH1 do vírus, que é a cepa original que permitiu o cultivo *in vitro* do HCV (WAKITA et al., 2005). A replicação em cultura de células somente é possível através da construção de vírus recombinantes, mantendo-se a parte do genoma do JFH1 que codifica proteínas não estruturais e substituindo-se a que codifica proteínas estruturais pela parte do vírus de outros genótipos (YI et al., 2006; GOTTFWEIN et al., 2007; SCHELL et al., 2008). Posteriormente, Ishii et al. (2008) desenvolveram um sistema de produção de partículas virais (“HCV-like particles”- HCV-LP) contendo o replicon subgenômico (KATO et al., 2003), através do fornecimento *in trans* das proteínas não codificadas pelo SGR. Isso envolveu a construção de um plasmídeo, o pEFJFH c-NS2, contendo a sequência codificante do core, E1, E2, p7 e NS2 sob controle de um promotor mamífero de expressão. Esses HCV-LP foram capazes de transduzir o SGR em células da linhagem Huh7. Em nosso estudo, o mesmo plasmídeo foi utilizado para transfectar células CHO-K1, para se obter células que expressavam as mesmas proteínas que foram capazes de produzir as HCV-LP infecciosas, e o soro selecionado, que se mostrou reativo por ELISA, também apresentou reatividade com essas células.

A mesma estratégia utilizada neste estudo foi empregada em um estudo que investigou a utilização de epítomos selecionados para o desenvolvimento de uma vacina contra o HIV por pesquisadores brasileiros (ROSA et al., 2011). A vacina, administrada na forma de DNA em camundongos transgênicos, envolveu 18 epítomos conservados do HIV capazes de se ligar ao HLA-DR e promoveu alta resposta de células T. A diferença, porém, do alvo principal do presente estudo foi a geração de anticorpos com potencial vírus-neutralizante. Em experimentos futuros, os soros dos camundongos imunizados com a proteína E1E2 quimérica serão utilizados em ensaios de vírus-neutralização para avaliar a capacidade neutralizante dos anticorpos produzidos em resposta à vacinação.

O desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz continua sendo um objetivo importante para o controle da hepatite C. Tendo em vista que a maioria das vacinas tiveram sucesso até o momento tem como base a ação de anticorpos neutralizantes e, de acordo com os estudos mencionados acima, a geração desses anticorpos é possível, neutralizando inclusive HCV de diferentes genótipos, a estratégia adotada no presente estudo para o desenvolvimento da vacina segue sendo atraente. Para continuidade, mais estudos são

necessários para investigar mais detalhadamente os epítomos escolhidos no presente trabalho, inclusive a aplicação de diferentes estratégias de “prime-boost” envolvendo imunização com proteínas e/ou DNA, que poderão potencializar a produção desses anticorpos.

6. CONCLUSÕES

- Um antígeno quimérico contendo diferentes segmentos das proteínas E1 e E2 foi expresso em sistema bacteriano;
- Anticorpos obtidos da imunização de camundongos com esse antígeno se mostraram reativos com proteínas do HCV.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNELLO, V.; ABEL, G.; ELFAHAL, M.; KNIGHT, B.; ZHANG, Q. X. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. **Proc Natl Acad Sci USA** 96 (22): 12766-71, 1999.

ALEMAN, S.; RABBIN, N.; WEILAND, O.; DAVIDSDOTTIR, L.; HEDENSTIEMA, M.; ROSE, N.; VERBAAN, H.; STÁL, P.; CARLSSON, T.; NORRGREN, H.; EDBOM, A.; GRANATH, F.; HULCRATNZ, R. A risk for hepatocellular carcinoma persists long-term after sustained virologic response in patients with hepatitis C- associated liver cirrhosis. **Major Article** 57: 230-236, 2013.

ALTER, M. J. Epidemiology of hepatitis C virus infection. **World J Gastroenterol** 13(17): 2436-41, 2007.

BEYENE, A.; BASU, A.; MEYER, K.; RAY, R. Hepatitis C virus envelope glycoproteins and potential for vaccine development. **Vox Sang** 83, suppl 1:27-32, 2002.

BLIGHT, K, J.; KOLYKHALOV, A. A.; RICE, C. M. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. **Science** 290(5498): 1972-4, 2000.

BROERING, T. J.; GARRITY, K. A.; BOATRIGHT, N. K.; SLOAN, S. E.; SANDOR, F.; THOMAS, W. D. J.; SZABO, G.; FINBERG, R. W.; AMBROSINO, D. M.; BABCOCK, G. J. Identification and characterization of broadly neutralizing human monoclonal antibodies directed against the E2 envelope glycoprotein of hepatitis C virus. **J Virol** 83(23) 12473-82, 2009.

CAMPO, D. S.; DIMITROVA, Z.; YOKOSAWA, J.; HOANG, D.; PEREZ, N. O.; RAMACHANDRAN, S.; KHUDYAKOV, Y. Hepatitis C virus antigenic convergence. **Sci Rep** 2(267): 1-8, 2012.

CARRÈRE-KREMER, S.; MONTPELLIER-PALA, C.; COCQUEREL, L.; WVCHOWSKI, C.; PENNIN, F.; DUBUISSON, J. Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. **J Virol** 76(8): 3720-30, 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** 189(5): 821-9, 1999.

CHEN, S. L.; MORGAN, T. R. The natural history of hepatitis C virus infection. **Int J Med Science** 3(2): 47-52, 2006.

CHEVALIEZ, S.; ASSELAH, T. Mechanisms of non-response to antiviral treatment in chronic hepatitis C. **Clinics and Research in Hepatol and Gastroenterol** 35: S31-S41, 2011.

CHIEN, D. J.; CHOO, Q.-L.; RALSTON, R.; SPAETE, R.; TONG, M.; HOUGHTON, M.; KUO, G. Persistence of HCV despite antibodies to both putative envelope glycoproteins. **Lancet** 342(8876): 933, 1993.

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

CHOO, Q. L.; RICHMAN, K. H.; HAN, J. H.; BERGER, K.; LEE, C.; DONG, C.; GALLEGOS, C.; COIT, D.; MEDINA-SELBY, R.; BARR, P. J. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. **Proc Natl Acad Sci USA** 88(6): 2451-5, 1991.

CHOO, Q. L.; KUO, G.; RALSTON, R.; WEINER, A.; CHIEN, D.; VAN NEST, G.; HAN, J.; BERGER, K.; THUDIUM, K.; KUO, C.; KANSOPON, J.; MCFARLAND, J.; TABRIZI, A.; CHING, K.; MOSS, B.; CUMMINS, L. B.; HOUGHTON, M.; MUCHMORE, E. Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. **Proc Natl Acad Sci USA** 91: 1294-8, 1994.

CLAYTON, R. F.; OWSIANKA, A.; AIKEN, J.; CRAHAM, S.; BHELLA, D.; PATEL, A. H. Analysis of antigenicity and topology of E2 glycoprotein present on recombinant hepatitis C virus-like particles. **J Virol** 76(15): 7672-82, 2002.

COYNE, C. B.; BERGELSON, J. M. Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. **Cell** 124(1): 119-131, 2006.

DIEPOLDER, H. M.; ZACHOVAL, R.; HOFFMANN, R. M.; WIERENGA, E. A.; SANTANTONIO, T.; JUNG, M. C.; EICHENLAUB, D.; PAPE, G. R. Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. **The Lancet** 346(8981): 1006-7, 1995.

DOWD, K. A.; NETSKI, M. D.; WANG, X. H.; COX, A. L.; RAY, S. C. Selection pressure from neutralizing antibodies drives sequence evolution during acute infection with hepatitis C virus. **Gastroenterol**, v. 136(7): 2377-86, 2009.

- DUBUISSON, J. Hepatitis C virus proteins. **World J. Gastroenterol** 13(17): 1206-15, 2007.
- DUFFY, S.; SHACKELTON, L. A.; HOLMES, E. C. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. **Nat Rev Genet** 9: 267-76, 2008.
- DUSTIN, L. B.; RICE, C. M. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. **Annu Rev Immunol** 25: 71-99, 2006.
- EGGER, D.; WÖLK, 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** 76(12): 5974-84, 2002.
- EL-SERAG, H. B.; MASON, A. C. Risk factors for the rising rates of primary liver cancer in the United States. **Arch Intern Med** 160(21): 3227-30, 2000.
- ESUMI, M.; AHMED, M.; ZHOU, Y. H.; TAKAHASHI, H.; e SHIKATA, T. Murine antibodies against E2 and hypervariable region 1 cross-reactively capture hepatitis C virus. **Virol** 251: 158-64, 1998.
- EVANS, M. J.; HAHN, T. V.; TSCHERNE, D. M.; SYDER, A. J.; PANIS, M.; WÖLK, 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. **Nat** 466(7137): 801-805, 2007.
- FALKOWSKA, F.; KAJUMO, F.; GARCIA, E.; REINUS, J.; DRAGIC, T. Hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 glycans modulate entry, CD81 binding and neutralization. **J Virol** 81(15): 8072-79, 2007.
- FARCI, P.; HALTER, H. J.; WONG, D.; MILLER, R. H.; SHIH, J. W.; JETR, B.; PURCELL, R. H. A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. **The New England J of Med** 325(2): 98-104, 1991.
- FARCI, P.; ALTER, H. J.; WONG, D. C.; MILLER, R. H.; GOVINDARAJAN, S.; ENGLE, R.; SHAPIRO, M.; PURCELL, R. H. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated *in vitro* neutralization. **Proc Natl Acad Sci USA** 91(16): 7792-96, 1994.
- FARCI, P.; SHIMODA, A.; WONG, D.; CABEZON, T.; DE GIOANNIS, D.; STRAZZERA, A.; SHIMIZU, Y.; SHAPIRO, M.; ALTER, H. J.; PURCELL, R. H. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. **Proc Natl Acad Sci USA** 93: 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. **The New England J of Med** 292(15): 767-70, 1975.
- FERREIRA, A. S. P.; PEREZ, R. M.; FERRAZ, M. L. G.; LEWIS-XIMENEZ, L. L.; PEREIRA, J. L.; DE ALMEIDA, P. R. L.; DE MATTOS, A. A. Acute hepatitis C in Brazil: results of a national survey. **J Med Virol** 83(10): 1738-43, 2011.

FERREIRA, P.R.A.; CORREA, M.C. J.M. **Manual de conduta na hepatite C**. Permanyer Brasil Publicações, Ltda. Cap. 1, p. 1-4, 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** 73(8): 6235-44, 1999.

FOLGORI, A.; CAPONE, S.; RUGGERI, L.; MEOLA, A.; SPORENO, E.; ERCOLE, B. B.; PEZZANERA, M.; TAFI, R.; ARCURI, M.; FATTORI, E.; LAHM, A.; LUZZAGO, A.; VIRTELLI, A.; COLLOCA, S.; CORTESE, R.; NICOSIA, A. A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees. **Nat Med** 12(2): 190-197, 2006.

FREY, S. E.; HOUGHTON, M.; COATES, S.; ABRIGNANI, S.; CHIEN, D.; PILERI, P.; RAY, R.; BISCEGLIE, Di A. M.; RINELLA, P.; HILL, H.; WOLFF, M. C.; SCHULTZE, V.; HAN, J. H.; SCHARSCHMIDT, B.; BELSHE, R. B. Safety and immunogenicity of HCV E1E2 vaccine adjuvanted with MF59 administered to healthy adults. **Vaccine** 28(38): 6367-73, 2010.

FRIED, M. W.; SHIFFMAN, M. L.; REDDY, K. R.; SMITH, C.; MARINOS, G.; GONCALES, Jr. F. L.; HAUSSINGER, D.; DIAGO, M.; CAROSI, G.; DHUMEAUX, D.; CRAXI, A.; LIN, A.; HOFFMAN, J.; YU, J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. **N Engl J Med** 347(13): 975-82, 2002.

GERLACH, J. T.; DIEPOLDER, H.; JUNG, M. C.; GRUENER, N.; SCHRAUT, W.; ZACHOVAL, R.; HOFFMANN, R. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus specific CD4 T-cell response in acute hepatitis C. **Gastroenterol** 117(4): 933-47, 1999.

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** 19(3): 270-83, 2001.

GOTTWEIN, J. M.; SCHEEL, T. K. H.; HOEGH, A. M.; LADEMANN, J. B.; OLSEN, J. E.; LISBY, G.; BUKH, J. Robust hepatitis C genotype 2a cell culture releasing adapted intergenotypic 3a/2a (S52/JFH1) viruses. **Gastroenterol** 133(5): 1614-26, 2007.

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. **Antiv Therapy** 11(8): 1005-14, 2006.

HADZIYANNIS, S. J.; SETTE, Jr. H.; MORGAN, T. R.; BALAN, V.; DIAGO, M.; MARCELLIN, P.; RAMADORI, G.; BODENHEIMER, Jr. H.; BERNSTEIN, D.; RIZZETTO, M.; ZEUZEM, S.; POCKROS, P. J.; LIN, A.; ACKRILL, A. M. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. **Ann Intern Med** 140(5): 346-355, 2004.

HALSTEAD, S. B.; TOM, M. C.; ELM, J. L. J. In vitro virulence marker: growth of dengue-2 virus in human leukocyte suspension cultures. **Infect and Immunity** 31(1): 102-106, 1981.

HOUGHTON, M.; ABRIGNANI, S. Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus. **Nat** 436: 961-6, 2005.

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

HOUGHTON, M.; Chimp virus makes a savvy vaccine vector. **Hepatitis C virus** 4(115): 1-3, 2012.

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** 371: 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** 30: 69-77, 2011.

KAITO, M.; WATANABE, S.; TANAKA, H.; FUJITA, N.; KONISHI, M.; IWASA, 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, p. 673-8, 2006.

KATO, N.; OOTSUYAMA, Y.; TANAKA, T.; NAKAGAWA, M.; NAKAZAWA, T.; MURAISSO, K.; OHKOSHI, S.; HIJIKATA, M.; SHIMOTOHNO, K. Marked sequence diversity in the putative envelope proteins of hepatitis C viruses. **Virus Res** 22(2): 107-123, 1992.

KATO, T.; DATE, T.; MIYAMOTO, M.; FURUSAKA, A.; TOKUSHIGE, K.; MIZOKAMI, M.; WAKITA, T. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. **Gastroenterol** 125: 1808-17, 2003.

KECK, Z. Y.; OP DE BEECK, A.; HADLOCK, K. G.; XIA, J.; LI, T. K.; DUBUISSON, J.; FOUNG, S. K. Hepatitis C virus E2 has three immunogenic domains containing conformational epitopes with distinct properties and biological functions. **J Virol** 78(17): 9224-32, 2004.

KECK, Z. Y.; XIA, J.; CAI, Z.; LI, T. K.; OWSIANKA, A. M.; PATEL, A. H.; LUO, G.; e FOUNG, S. K. Immunogenic and functional organization of hepatitis C virus (HCV) glycoprotein E2 on infectious HCV virions. **J Virol** 81(2): 1043-7, 2007.

KECK, Z. Y.; LI, T. K.; XIA, J.; GAL-TANAMY, M.; OLSON, O.; LI, S. H.; PATEL, A. H.; BALL, J. K.; LEMON, S. M.; FOUNG, S. K. Definition of a conserved immunodominant

domain on hepatitis C virus E2 glycoprotein by neutralizing human monoclonal antibodies. **J Virol** 82(12): 6061-66, 2008.

KLADE C. S.; WEDEMEYER H.; BERG, T.; HINRICHSSEN, H.; CHOLEWINSKA, G.; ZEUZEM, S.; BLUM, H.; BUSCHLE, M.; JELOVCAN, S.; BURGER, V.; TAUBER, E.; FRISCH, J.; MANNS, M. P. Therapeutic vaccination of chronic hepatitis C nonresponder patients with peptide vaccine IC41. **Gastroenterol** 134(5): 1385- 95, 2008.

KUO, G. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. **Science** 244(4902): 362-4, 1989.

LAVILLETTE, D.; MORICE, Y.; GERMANIDIS, G.; DONOT, P.; SOULIER, A.; PAGKALOS, E.; SAKELLARIOU, G.; INTRATOR, L.; BARTOSCH, B.; PAWLOTSKY, J. M.; COSSET, F. L. Human serum facilitates hepatitis C virus infection, and neutralizing responses inversely correlate with viral replication kinetics at the acute phase of hepatitis C virus infection. **J Virol** 79(10): 6023-34, 2005.

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.; e BURTON, D. R. Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. **Nat Med** 14(1): 25-7, 2008.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Flaviridae: the viruses and their replication. **Virology** 347:991-1041, 2001.

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** 85(1): 24-32, 2007.

LUCAS, M.; ULSENHEIMER, A.; PFAFFEROT, K.; HEEG, M. H. J.; GAUDIERI, S.; GRÜNER, N.; RAUCH, A.; GERLACH, J. T.; JUNG, M. C.; ZACHOVAL, R.; PAPE, G. R.; SCHRAUT, W.; SANTANTONIO, T.; NITSCHKO, H.; OBERMEIER, M.; PHILIPS, R.; SCRIBA, T. J.; SEMMO, N.; DAY, C.; WEBER, J. N.; FIDLER, S.; THIMME, R.; HABERSTROH, A.; BAUMERT, T. F.; KLENERMAN, P.; DIEPOLDER, H. M. Tracking Virus-Specific CD4+ T Cells during and after Acute Hepatitis C Virus Infection. **PLoS one** 2(7): e649, 2007.

MAJOR, M. E.; DAHARI, H.; MIHALIK, K.; PUIG, M.; RICE, C. M. Hepatitis C virus kinetics and host responses associated with disease and outcome of infection in chimpanzees. **Hepatology** 39(6): 1709-20, 2004.

MANNS, M. P.; MCHUTCHISON, J. G.; GORDON, S. C.; RUSTGI, V. K.; SHIFFMAN, M.; REINDOLLAR, R.; GOODMAN, Z. D.; KOURY, K.; LING, M.; ALBRECHT, J. K. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomized trial. **Lancet** 358(9286): 958-65, 2001.

MARTELL, M.; ESTEBAN, J.; QUER, J.; GENESCA, J.; WEINER, A.; ESTEBAN, R.; GUARDIA, J.; GÓMEZ, J. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but

closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. **J Virol** 66(5): 3225-29, 1992.

MCLAUCHLAN, J. Hepatitis C virus: viral proteins on the move. **Biochemical Society Transactions** 37(Pt 5): 986-90, 2009.

MEUNIER, J. C.; RUSSEL, 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. **J Virol** 82(2): 966-73, 2008.

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

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em saúde. Departamento de Aids, DST e hepatites virais. **Boletim epidemiológico de hepatites virais**. Brasília, DF, ano II, n. 01, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de DST, Aids e hepatites virais. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral C e coinfeções**. Brasília, DF, 2013.

MORADPOUR, D.; CERNY, A.; HEIM, M. H.; BLUM, H. E. Hepatitis C: an update. **Swiss Med Wkly** 131: 291-8, 2001.

MORADPOUR, D.; PENIN, F.; RICE, C. M. Replication of hepatitis C virus. **Nat Rev Microbiol** 1-11, 2007.

MOTTOLA, G.; CARDINALI, G.; CECCACCI, A.; TROZZI, C.; BARTHOLOMEW, L.; TORRISI, M. R.; PEDRAZZINI, E.; BONATI, S.; MIGLIACCIO G. Hepatitis C vírus nonstructural proteins are localized in a modified endoplasmic reticulum of cells expressing viral subgenomic replicons. **Virol** 293: 31-43, 2002.

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** 339-45, 2012.

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** 208(1): 17-31, 2013.

OSBURN, W. O.; FISHER, B. E.; DOWD, K. A.; URBAN, G.; LIU, L.; RAY, S. C.; THOMAS, D. L.; COX, A. L. Spontaneous control of primary hepatitis C virus infection and immunity against persistent reinfection. **Gastroenterol** 138(1): 315-24, 2010.

OWSIANKA, A.; TARR, A. W.; JUTLA, V. S.; LAVILLETTE, D.; BARTOSCH, B.; COSSET, F. L.; BALL, J. K.; PATEL, A. H. Monoclonal antibody AP33 defines a broadly neutralizing epitope on the hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein. **J Virol** 79(17): 11095-114, 2005.

PAPE, G. R.; GERLACH, T. J.; DIEPOLDER, H. M.; GRÜNER, N.; JUNG, M.; SANTANTONIO, T. Role of the specific T-cell response for clearance and control of hepatitis C virus. **J Viral hepat** 6, suppl 1: 36-40, 1999.

PAWLOTSKY, J. M. Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. **Clin Liver Dis** 7(1): 45-66, 2003.

PAWLOTSKY, J. M. Hepatitis C virus population dynamics during infection. **Curr Top Microbiol Immunol** 29 261-84, 2006.

PENIN, F.; DUBUISSON, J.; REY, F. A.; MORADPOUR, D.; PAWLOTSKY, J. Structural Biology of Hepatitis C Virus. **Hepatol** 39(1): 5-19, 2004.

PEROTTI, M.; MANCINI, N.; DIOTTI, R. A.; TARR, A. W.; BALL, J. K.; OWSIANKA, A.; ADAIR, R.; PATEL, A. H.; CLEMENTI, M.; BURIONI, R. Identification of a broadly cross-reacting and neutralizing human monoclonal antibody directed against the hepatitis C virus E2 protein. **J Virol** 82(2): 1047-52, 2008.

PERZ, J. F.; ARMSTRONG, G. F.; FARRINGTON, L. A.; HUTIN, Y. J. F.; BELL B. P. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. **J Hepatol** 45: 528-38, 2006.

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

PUIG, M.; MIHALIK, K.; TILTON, J. C.; WILLIAMS, O.; MERCHLINSKY, M.; CONNORS, M.; FEINSTONE, S. M.; MAJOR, M. E. CD4 immune escape and subsequent T-cell failure following chimpanzee immunization against hepatitis C virus. **Hepatol** 44(3): 736-745, 2006.

RAGHURAMAN, S.; PARK, H.; OSBURN, W. O.; WINKELSTEIN, E.; EDLIN, B. R.; REHERMANN, B. Spontaneous clearance of chronic hepatitis C virus infection is associated with appearance of neutralizing antibodies and reversal of T-cell exhaustion. **J Infect Dis** 205(5): 763-71, 2012.

RAY, R.; MEYER, K.; BANERJEE, A.; BASU, A.; COATES, S.; ABRIGNANI, S.; HOUGHTON, M.; FREY, S. E.; BELSHE, R. B. Characterization of antibodies induced by vaccination with hepatitis C virus envelope glycoproteins. **J Infect Dis** 202(6): 862-6, 2010.

Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease. Centers for Disease Control and Prevention. **MMWR Recomm Rep**, v. 47, p. 1-39, 1998.

REHERMANN, B.; NASCIMBENI, M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. **Nat Rev** 5: 215-229, 2005.

REHERMANN B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. **J Clin Invest** 119(7): 1745-1754, 2009.

ROCCASECCA, R.; FOLGORI, A.; ERCOLE, B. B.; PUNTORIERO, G.; LAHM, A.; ZUCHELLI, S.; TAFI, R.; PEZZANERA, M.; GALFRE, G.; TRAMONTANO, A.; MONDELLI, M. U.; PESSI, A.; NICOSIA, A.; CORTESE, R.; MEOLA, A. Mimotopes of the hyper variable region 1 of the hepatitis C virus induce cross-reactive antibodies directed against discontinuous epitopes. **Mol Immunol** 38(6): 485-92, 2001.

ROINGEARD, P.; HOURIOUX, C.; BLANCHARD, E.; BLAND, D.; AIT-GOUGHOLTE, M. Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. **Biology of the Cell** 96(2): 103-8, 2004.

ROSA, D. S.; RIBEIRO, S. P.; ALMEIDA, R. R.; MAIRENA, E. C.; POSTO, 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** 6(2): e16921, 2011.

SALA, M.; WAIN-ROBSON, S. Are RNA viruses adapting or merely changing? **J Mol Evol** 51(1): 12-20, 2000.

SAMBROOK, J.; e RUSSELL, D. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T.; WIGG, M.D. **Introdução à virologia humana**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. Cap. 1, p. 1-38.

SCARSELLI, E.; ANSUINI, H.; CERINO, R.; ROCCASECCA, R. M.; ACALI, S.; FILLOCAMO, G.; TRABONI, C.; NICOSIA, A.; CORTESE, R.; VITELLI, A. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. **EMBO J** 21(19): 5017-25, 2002.

SCHEEL, T. K. H.; GOTTWELN, J. M.; JENSEN, T. B.; PRENTOE, J. C.; HOEGH, A. M.; ALTER, H. J.; OLSEN, J. E.; BUKH, J. Development of JFH1-based cell culture systems for hepatitis C virus genotype 4a and evidence for cross-genotype neutralization. **PNAS** 105(3): 997-1002, 2008.

SHARMA, S. D. Hepatitis C virus: Molecular biology & current therapeutic options. **Indian J. Med. Res** 131: 17-34, 2010.

SMITH, D. B.; BUKH, J.; KUIKEN, C.; MUERHOFF, A. S.; RICE, C. M.; STAPLETON, J. T.; SIMMONDS, P. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67

subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. **Hepatology** 59(1): 318-27, 2014.

THIMME, R.; OLDACH, D.; CHANG, K. M.; STEIGER, C.; RAY, S. T.; CHISARI, F. V. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. **J Exp Med** 194(10): 1395-1406, 2001.

TORRESI, J.; JOHNSON, D.; WEDEMEYER, H. Progress in development of preventive and therapeutic vaccines for hepatitis C virus. **Journal of Hepatology** 54: 1273-85, 2011.

TORRES-PUENTE, M.; CUEVAS, J. M. JIMÉNEZ-HERNÁNDEZ, N.; BRACHO, M. A.; GARCÍA-ROBLES, I.; WROBEL, B. Using evolutionary tools to refine the new hypervariable region within the envelope 2 protein of hepatitis C virus. **Infect. Genet. Evol** 8(1): 74-82, 2008.

TROESCH, M.; MEUNIER, I.; LAPIERRE, P.; LAPOINTE, N. ALVAREZ, F.; BOUCHER, M.; SOUDEYNS, H. Study of a novel hypervariable region in hepatitis C virus (HCV) E2 envelope glycoprotein. **Virology** 352(2): 357-67, 2006.

VIETHEER, P. T.; BOO, I.; DRUMMER, H. E.; NETTER, H. J. Immunizations with chimeric hepatitis B virus-like particles to induce potential anti-hepatitis C virus neutralizing antibodies. **Antiviral Therapy** 12(4): 477-87, 2007.

VON HAHN, T.; YOON, J. C.; ALTER, H.; RICE, C. M.; REHERMANN, B.; BALFE, P.; MCKEATING, J. A. Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. **Gastroenterology** 132(2): 667-78, 2007.

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. **Nature Medicine** 11(7): 791-6, 2005.

WEDEMEYER, H.; SCHULLER, E.; SCHLAPHOFF, V.; STAUBER, R. E.; WIEGAND, J.; SCHIEFKE, I.; FIRBAS, C.; JILMA, B.; THURSZ, M.; ZEUZEM, S.; HOFMANN, W. P.; HINRICHESEN, H. Therapeutic vaccine IC41 as late add-on to standard treatment in patients with chronic hepatitis C. **Vaccine** 27: 15142-51, 2009.

WORLD_HEALTH_ORGANIZATION. Global surveillance and control of hepatitis C. Immunization, vaccines and biologicals, 2013.

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** 40(3): 355-66, 2000.

YI, M.; VILLANUEVA, R. A.; THOMAS, D. L.; WAKITA, T.; LEMON, S. M. Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. **PNAS** 103(7): 2310-15, 2006.

YI, M.; MA, Y.; YATES, J.; LEMON, S. M. Trans-complementation of na NS2 defect in a late step in hepatitis C virus (HCV) particle assembly and maturation. **Plos Pathogen** 5(5): 1-15, 2009.

YOUN, J. W.; HU, Y. W.; TRICOCHÉ, N.; PFAHLER, W.; SHATA, M. T.; DREUX, M.; COSSET, F. L.; FOLGORI, A.; LEE, D. H.; BROTMAN, B.; PRINCE, A. M. Evidence for protection against chronic hepatitis C virus infection in chimpanzees by immunization with replicating recombinant vaccinia virus. **J Virol** 82(21): 10896-905, 2008.

ZANETTI, A. R.; ROMANO, L.; BIANCHI, S. Primary prevention of hepatitis C virus infection. **Vaccine** 21(7-8): 692-5, 2003.

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** 13: 4824-30, 2007.

ZHANG, P.; WU, C. G.; MIHALIK, K.; THEIMER, M. L. V.; YING, M.; YU, W.; ALTER, H. J.; FEINSTONE, S. M. Hepatitis C virus epitope-specific neutralizing antibodies in Igs prepared from human plasma. **PNAS** 104(20): 8449-54, 2007.

ZHANG, P.; ZHONG, L.; STRUBLE, E. B.; WATANABE, H.; KACHKO, A.; MIHALIK, K.; THEIMER, M. L. V.; 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. **PNAS** 106(18): 1537-41, 2009.

ANEXO A



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 137/11 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 023/11

Projeto Pesquisa: "Estudo da indução da produção de anticorpos através da imunização de camundongos Balb-C com antígenos recombinantes expressos em bactérias e levedura 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.

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, 21 de setembro de 2011

Prof. Dr. Evandro de Abreu Fernandes
 Presidente da CEUA/UFU

Universidade Federal de Uberlândia
 Prof. Evandro de Abreu Fernandes
 Presidente da CEUA - Comissão de Ética na Utilização de
 Animais - Portaria R. N.º 1220/2009