MARCOS ALEXANDRE NOBRE LEMOS

**EXPRESSÃO GÊNICA DA PROTEÍNA NÃO ESTRUTURAL 3 DO
VÍRUS DA HEPATITE C EMPREGANDO PSEUDOPARTÍCULAS
VIRAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em
Biotecnologia.

São Paulo
2014

MARCOS ALEXANDRE NOBRE LEMOS

**EXPRESSÃO GÊNICA DA PROTEÍNA NÃO ESTRUTURAL 3 DO
VÍRUS DA HEPATITE C EMPREGANDO PSEUDOPARTÍCULAS
VIRAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Soraia Attie Calil Jorge

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Lemos, Marcos Alexandre Nobre.

Expressão gênica da proteína não estrutural 3 do vírus da hepatite C empregando pseudopartículas virais / Marcos Alexandre Nobre Lemos. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Soraia Attie Calil Jorge.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Imunologia viral.

Versão do título para o inglês: Gene expression of the nonstructural protein 3 hepatitis C virus using viral pseudoparticles.

1. HCVpp 2. Pseudopartículas virais 3. Proteína não estrutural 3 (NS3) 4. Hepatite C 5. Semliki Forest Virus (SFV) 6. HCV I. Jorge, Profa. Dra. Soraia Attie Calil II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0124/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Marcos Alexandre Nobre Lemos.

Título da Tese: Expressão gênica da proteína não estrutural 3 do vírus da hepatite C empregando pseudopartículas virais.

Orientador(a): Profa. Dra. Soraia Attie Calil Jorge.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da imunogenicidade de glicoproteína do vírus da raiva (GPV) e de proteínas não estruturais do vírus da hepatite C (HCVNS3). Estudo da expressão gênica empregando pseudopartículas virais", **protocolo nº 648/09**, sob a responsabilidade de Carlos A. Pereira e Soraia A. C. Jorge, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de **13/10/2009**.

"We certify that the Research entitled "Study of immunogenicity of the rabies virus glycoprotein (GPV) and of non structural proteins of the hepatitis C virus (HCVNS3). Study of gene expression using viral pseudoparticles", protocol nº 648/09, under the responsibility of Carlos A. Pereira and Soraia A. C. Jorge, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 10/13/2009".

Vigência do Projeto: 10/2009 – 10/2011	Nº de animais/espécie
Laboratório de Imunologia Viral	80/camundongo/(Macho e Fêmea)

São Paulo, 15 de outubro de 2009.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

À Thais Helena Borges Crespo, amada esposa e companheira, que sempre esteve me dando forças e apoio, sem os quais não teria conseguido concluir esta jornada.

Obrigado!

AGRADECIMENTOS

À Dra. Soraia Attie Calil Jorge, pela amizade, orientação, discussão, apoio e compreensão durante todos esses anos de trabalho juntos.

Ao Dr. Carlos Augusto Pereira, pelo fundamental auxílio neste projeto e por suas contribuições nas discussões.

Ao Dr. Renato Mancini Astray, não só por suas orientações e colaborações no desenvolvimento do trabalho, mas também pela confiança e reconhecimento do meu trabalho.

Ao Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan, pelo acolhimento, discussões, oportunidades, compreensão e auxílios constantes.

À M^a. Daniella Cristina Ventini Monteiro, por sua amizade, colaboração, implicâncias, parceria e, principalmente, paciência nesses anos de trabalho.

Aos colegas de laboratório: Dra. Marilena M. Pamboukian, M^a. Sandra F. S. Patiño, Me. Alexandre G. de Rezende, M^a. Ana Lia P. Puglia, M^a. Juliana F. B. Paschoal, Thaissa C. Bernadino, Polyana A. V. M. de Sousa, Nayara G. L. Santos, Roselane P. Gomes, Maria Lucia da S. Gomes, Vera L. L. Boldorini e demais LIVs, pela colaboração, discussão, descontração e convívio durante tantos anos.

Aos Droutores François-Loïc Cosset e Renaud Wagner, pela disponibilização dos materiais necessários à formação das pseudopartículas utilizadas nesse trabalho.

À Dra. Mariza Gerdulo dos Santos, por sempre estar disposta a ajudar para a realização desse projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro e bolsa de estudos (153619/2010-4).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

Ao programa de pós-graduação Interunidades em Biotecnologia.

“Tudo aquilo que o homem ignora, não existe pra ele. Por isso o universo de cada um, se resume no tamanho de seu saber.”

Albert Einstein

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.”

Paulo Freire

RESUMO

Lemos MAN. Expressão gênica da proteína não estrutural 3 do vírus da hepatite C empregando pseudopartículas virais [tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

A hepatite viral causada pelo vírus da hepatite C (HCV), atualmente, é um problema à saúde mundial e afeta cerca de 170 milhões de pessoas e, no Brasil, são detectados entorno de 10 mil casos ao ano. O caso crônico da doença resulta em cirrose hepática que é tratada com interferon gama e ribavirina, entretanto, a maioria dos pacientes tratados não desenvolve uma resposta imune satisfatória. Para auxiliar a resposta imunológica à infecção viral, além da resposta imune humoral às proteínas de superfície E1 e E2 do vírus, a proteína não estrutural 3 (NS3) do HCV pode estimular uma resposta celular. Nosso trabalho desenvolveu duas pseudopartículas virais não que carregavam um material genético codificante para a porção da protease da NS3 do HCV. Um dos sistemas apresenta a pseudopartícula de HCV (HCVpp) que é constituída por proteínas do vírus da leucemia murina e outras do HCV, o outro sistema apresenta uma partícula viral baseada no *Semliki Forest Virus* (SFV). As células HEK293T e BHK-21 foram transfectadas por eletroporação para a formação das pseudopartículas HCVpp-NS3p1a e SFV-NS3p1a, respectivamente. Essas partículas foram quantificadas pela presença por qRT-PCR atingindo uma produção aproximada de 400 partículas HCVpp-NS3p1a por microlitro e $2,5 \times 10^4$ partículas SFV-NS3p1a por microlitro. Essas partículas foram utilizadas para infecção de células HuH-7.0 e BHK-21.

Palavras-chave: Hepatite C. HCV. Pseudopartículas virais. HCVpp. SFV. Expressão heteróloga. NS3. Proteína não estrutural 3 do HCV.

ABSTRACT

Lemos MAN. Gene expression of the nonstructural protein 3 of hepatitis C virus using viral pseudoparticles. [Thesis (PhD thesis in Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Viral hepatitis caused by the hepatitis C virus (HCV) currently is a global health problem, affecting about 170 million people, and in Brazil, around 10 000 cases per year are detected. The chronic case of the disease resulting in hepatic cirrhosis is treated with gamma interferon and ribavirin, however, most patients do not develop a satisfactory immune response. To assist the immune response to viral infection, the virus nonstructural protein 3 (NS3) can stimulate a cellular response. Our work has developed two non replicative viral pseudoparticles that carried a genetic material coding for the HCV NS3 protease. One of the systems has the pseudoparticles HCV (HCVpp) consisting of proteins of murine leukemia virus and other HCV. Another viral particle provides a system based on the *Semliki Forest Virus* (SFV). The HEK293T and BHK-21 cells were transfected for the formation of the pseudoparticles HCVpp-NS3p1a and SFV-NS3p1a, respectively. These particles were quantified by qRT-PCR reaching a production of about 400 HCVpp-NS3p1a particles per microliter and 2.5×10^4 SFV-NS3p1a particles per microliter. These particles were used for infection of Huh-7.0 and BHK-21 cells.

Keywords: Hepatitis C. HCV. Viral pseudoparticles. HCVpp. SFV. Heterologous expression. NS3. HCV nonstructural protein 3.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Microfotografia do vírus da hepatite C.....	17
Figura 2. Esquema do genoma do HCV e proteínas virais.....	17
Figura 3. Esquema do processo de replicação do HCV modificado de SBASSE Biology Seminars.	20
Figura 4. Mecanismo de ação dos linfócitos T citotóxicos (CTLs).....	22
Figura 5. Esquema do processo de estímulo de T_H1 e sua resposta imune.	23
Figura 6. Esquema da pseudopartícula de HCV (HCVpp).....	29
Figura 7. Mapa dos amplicons obtidos pelos pares de iniciadores neste trabalho.	37
Figura 8. Esquema da construção do vetor pCMV-NS3p1a.	41
Figura 9. Esquema da construção do vetor pSFV-NS3p1a.	43
Figura 10. Esquema dos vetores pCMV-E1E2-1a, pCMV-GAG/POL e pCMV-NS3p1a.....	45
Figura 11. Esquema dos vetores pSFV-Helper e pSFV-NS3p1a.	46
Figura 12. Esquema simplificado de imunoenaios.	50
Figura 14. Porcentagens de células BHK-21 ou HEK293T transfectadas por eletroporação com o vetor pTG13077 que apresentam fluorescência.	55
Figura 15. Análise em eletroforese dos fragmentos gerados por PCR das amostras das partículas pp-A, pp-B, pp-C e pp-D.	59
Figura 16. Análise em eletroforese dos fragmentos gerados por PCR das amostras das partículas pp-C, pp-D, pp-E24h, pp-E48h, sfv-A24h, sfv-A48h, sfv-B24h e sfv-B48h.	60
Figura 17. Análise em eletroforese dos fragmentos gerados por PCR das amostras das partículas pp-F e sfv-C.	61
Figura 18. Análise em eletroforese dos fragmentos gerados por PCR das amostras das partículas pp-G, sfv-D e sfv-E.....	62
Figura 19. Gráficos da amplificação em tempo real (qRT-PCR) para quantificação das partículas virais.....	63
Figura 20. Gráfico da quantificação das partículas pp-F, pp-G, sfv-C, sfv-D e sfv-E.	64
Figura 21. Gráfico da quantificação das pseudopartículas HCVpp-NS3p1a e SFV-NS3p1a filtradas ou não.	65
Figura 22. <i>Dotblotting</i> de células HuH-7 infectadas com HCVpp-NS3p1a.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Epítomos para CTLs mapeados na NS3 entre 1027 e 1258.	25
Tabela 2. Sequência dos iniciadores utilizados nas reações de amplificação.	37
Tabela 3. Configurações para co-transfecção por eletroporação das células.	44
Tabela 4. Resumo das infecções com HCVpp-NS3p1a em células HuH-7 em relação à concentração de partículas por célula.	48
Tabela 5. Resumo das infecções com SFV-NS3p1a em células HuH-7 ou BHK-21 em relação à concentração de partículas por célula.	49
Tabela 6. Condições de eletroporação dependendo da linhagem celular e cubeta utilizada. ..	55
Tabela 7. Resumo das co-transfecções para formação de HCVpp-NS3p1a com os agentes de transfecção e tempos de coleta das partículas.	57
Tabela 8. Resumo das co-transfecções para formação de SFV-NS3p1a com os agentes de transfecção e tempos de coleta das partículas.	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC – Célula Apresentadora de Antígenos (*“Antigen Presentation Cell”*)

cDNA – DNA complementar

CTLs – Linfócitos T Citotóxicos (*“Cytotoxic T Lymphocytes”*)

HCV – Vírus da Hepatite C

HRP – *“Horseradish”* Peroxidase

INF- γ – Interferon-gama

MHC – Complexo Maior de Histocompatibilidade (*“Major Histocompatibility Complex”*)

MLV – Vírus da Leucemia Murina

mRNA – RNA mensageiro

NS3 – Proteína não estrutural 3 do HCV

NS3p – Porção protease da NS3

PBS – Solução tampão salina fosfatada

PCR – Reação de polimerase em cadeia

HCVpp – Pseudopartícula de HCV

HCVpp-NS3p1a – Pseudopartícula de HCV que contém o RNA para codificar a NS3p genótipo 1a com os epítomos de reconhecimento de anticorpos de camundongo.

qRT-PCR – Quantificação em reação de polimerase em cadeia com transcriptase reversa

RT - Transcriptase reversa

RT-PCR – Reação de polimerase em cadeia com transcriptase reversa

SFB – Soro Fetal Bovino

SFV – *“Semliki Forest Virus”*

SFV-NS3p1a – Partícula de SFV que contém o RNA para codificar a NS3p genótipo 1a com epítomos de reconhecimento de anticorpos de camundongo.

VLPs – Partículas semelhantes a vírus (*“Viral Like Particles”*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Vírus da hepatite C (HCV)	16
1.1.1 Tratamento do infectado com o vírus da hepatite C	18
1.1.2 Mecanismo da transmissão e replicação do vírus da hepatite C	19
1.1.3 Mecanismo da resposta imune à infecção com vírus da hepatite C	21
1.1.4 Proteína não estrutural 3 do vírus da hepatite C (NS3)	24
1.2 Sistema de expressão de proteínas heterólogas com pseudopartículas virais	25
1.2.1 Pseudopartícula derivadas do Semliki Forest Virus (SFV)	26
1.2.2 Pseudopartícula derivadas de MLV e HCV (HCVpp)	28
1.3 Justificativa	29
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivos gerais	32
2.2 Objetivos específicos	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Cultura de bactérias	34
3.2 Introdução do DNA plasmidial em bactérias	34
3.2.1 Obtenção de bactérias competentes	34
3.2.2 Transformação de bactérias competentes	35
3.3 Preparo de DNA de plasmídeo	35
3.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	37
3.4.1 Sequenciamento	38
3.4.2 Validação e alinhamento das sequências	38
3.5 Cultura de células	39
3.6 Construção dos vetores contendo o gene da NS3p	39
3.6.1 Vetor pCMV-NS3p1a	39
3.6.2 Vetor pSFV-NS3p1a	41
3.7 Produção das partículas	43
3.7.1 Pseudopartículas de HCVpp-NS3p1a	44
3.7.2 Partículas de SFV-NS3p1a	45
3.8 Detecção e quantificação das partículas	46

3.9 Infecção de cultura de células.....	47
3.9.1 Infecção com pseudopartículas de HCVpp-NS3p1a	47
3.9.2 Infecção com partículas de SFV-NS3p1a	48
3.10 Produção de anticorpos policlonais	49
3.11 Imunoensaios	50
3.11.1 Detecção da NS3 - Dotblotting	50
4 RESULTADOS	53
4.1 Padronização da transfecção das células por eletroporação	54
4.2 Produção das pseudopartículas	56
4.2.1 HCVpp-NS3p1a	56
4.2.2 SFV-NS3p1a	58
4.3 Detecção e quantificação das pseudopartículas	58
4.3.1 PCR.....	59
4.3.2 qRT-PCR.....	62
4.4 Detecção da expressão da NS3p	65
4.4.1 Produção de anticorpos anti-NS3	65
4.4.2 Dotblotting.....	66
5 DISCUSSÃO.....	68
6 CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS	76
APÊNDICES	86
APÊNDICE A - Sequenciamento da NS3p no vetor pCMV-NS3p1a	87
APÊNDICE B - Sequenciamento da NS3p no vetor pSFV-NS3p1a	91
APÊNDICE C – Artigo de Periódico	98

1 INTRODUÇÃO

A hepatite crônica causada pelo vírus da Hepatite C (HCV) constitui um grave problema de saúde pública mundial. Estima-se que, aproximadamente, 170 milhões de pessoas (aproximadamente 3% da população mundial) estejam infectadas pelo HCV, sendo esta a causa mais comum de hepatite crônica, cirrose e hepatocarcinoma (Chou et al., 2013; Chou et al., 2012; Mehta et al., 2013; World Health Organization, 2013). No Brasil são detectados, aproximadamente, 10 mil novos casos anualmente (Pereira, 2012).

A infecção aguda é na maioria dos casos, benigna e assintomática, dificultando assim, o seu diagnóstico. Entretanto, cerca de 70% destes pacientes evoluem para a infecção crônica, podendo progredir para o estágio de cirrose (entre 5 a 20%), doença hepática terminal e até hepatocarcinoma causando a morte (entre 1 a 5%) (Lavanchy, 2011; World Health Organization, 2013).

A ausência de uma vacina e terapia eficazes, bem como a existência de portadores assintomáticos, faz com que a prevenção seja de extrema importância nesta infecção. A identificação de pessoas infectadas e o conhecimento de fatores de risco, associados ao conhecimento dos mecanismos de infecção e multiplicação do HCV podem levar ao desenvolvimento de estratégias para reduzir a incidência da infecção pelo HCV (Alvarez-Uria et al., 2010; Alvarez-Uria et al., 2009; Lavanchy, 2011; Mehta et al., 2013; World Health Organization, 2013).

1.1 Vírus da hepatite C (HCV)

O vírus da hepatite C foi identificado em 1989 por Choo et al. (1989). O HCV pertence à família *Flaviviridae* e constitui um gênero isolado (*Hepacivirus* (Shukla et al., 1995)), uma vez que sua sequência genômica não se aproxima de nenhum dos outros gêneros pertencentes à família *Flaviviridae*.

A partícula viral do HCV mede entre 55 e 65 nm de diâmetro (figura 1) (Kaito et al., 1994) e é formada por um envelope lipídico, onde se encontram as glicoproteínas virais E1 e E2, um capsídeo proteico formado pela proteína viral Core e o genoma viral constituído por um ácido ribonucleico (RNA) linear, de fita simples, com polaridade positiva (Imbert et al., 2004). Este RNA viral possui cerca de 9600 nucleotídeos com uma única fase de leitura aberta (ORF “open reading frame”), a qual inclui quase todo o genoma e codifica uma poliproteína com pouco mais de 3000 aminoácidos. Esta poliproteína é clivada posteriormente por proteases celulares e virais, dando origem às proteínas do vírus (figura 2).

Figura 1. Microfotografia do vírus da hepatite C.

Fonte: The C. Everett Koop Institute (2014).

Figura 2. Esquema do genoma do HCV e proteínas virais.

Fonte: Adaptado de Wikimedia Foundation (2014).

No genoma viral ainda encontram-se regiões não traduzidas (UTR, “untranslated region”) nas extremidades 5’ e 3’ (Smith et al., 1995; Umlauf et al., 1996). A região 5’UTR é uma região bem conservada e possui papel fundamental na replicação viral. Esta região contém um sítio de entrada interno para o ribossomo, conhecido como IRES (“internal ribosomal entry site”) responsável pelo estabelecimento da tradução do RNA viral de forma independente do CAP5’ (o qual é fundamental para a tradução de mRNA celulares). A eficiência do sítio IRES varia entre os diferentes genótipos de HCV (Buratti et al., 1997; Kamoshita et al., 1997).

Essa poliproteína originada após a infecção será clivada e dará origem a três proteínas estruturais e sete não estruturais. As proteínas estruturais são: Core (C) e as glicoproteínas de envelope (E1 e E2) (Chambers et al., 1990; Sakai et al., 2003). As sete proteínas não estruturais chamadas NS (NS1, 2, 3, 4A, 4B, 5A e 5B) estão envolvidas principalmente nos processos de clivagem da poliproteína e na replicação viral (Chou et al., 2013; Mancini et al., 2009; Mello et al., 2009). As glicoproteínas do envelope E1 e E2 são caracterizadas como proteínas trans-membrânicas do tipo I e parecem ser essenciais para a entrada da partícula viral na célula hospedeira (Bartosch et al., 2003c; Deleersnyder et al., 1997; Hijikata et al., 1991; Ploss, Evans, 2012).

O HCV possui uma ampla heterogeneidade genética, apresentando pelo menos seis grupos geneticamente diferentes. A variação de nucleotídeos do genoma completo está entre 30 e 35% (Simmonds, 2004), sendo as regiões E1, E2 e V3 da proteína NS5A as que possuem maiores taxas de mutação, enquanto a região da proteína core e da proteína NS3 são as mais conservadas. Cada um desses grupos de HCV ainda possui subtipos, com uma variabilidade nucleotídica de 20 a 25%, entre eles (Mello et al., 2009; Simmonds, 2004).

1.1.1 Tratamento do infectado com o vírus da hepatite C

O tratamento atual aplicado em pacientes portadores do vírus da hepatite C se dá com o uso de α -interferon (peguilado) associado com a ribavirina por 24 a 48 semanas, dependendo do genótipo viral (European Association for the Study of the Liver, 2014; World Health Organization, 2013). Apesar desse tratamento longo, somente cerca de 40% dos pacientes infectados pelo genótipo 1 respondem de forma sustentável, atingindo níveis não detectáveis de RNA em circulação ao final do tratamento e após seis meses. Já para os genótipos 2 e 3 os níveis de pacientes com resposta sustentada chega a 80% (Coelho et al., 2011; European Association for the Study of the Liver, 2014; Ghany et al., 2011; Ghany et al., 2009; Stoll-Keller et al., 2009).

Muitos dos pacientes que recebem interferon peguilado associado à ribavirina apresentam reações colaterais ao tratamento, desenvolvendo sintomas semelhantes aos de gripe (como fadiga, cefaleia e febre) e também sintomas psiquiátricos (como depressão, irritabilidade e insônia) (European Association for the Study of the Liver, 2014). A ocorrência desses efeitos colaterais causa um abandono de aproximadamente 10% dos pacientes antes do

término do tratamento (Coelho et al., 2011; Ghany et al., 2009), isso faz com que seja mais difícil o controle desta forma de hepatite.

Por conta disso, atualmente alguns estudos estão sendo desenvolvidos na busca de vacinas que possam proteger a população. Uma das possibilidades que estão sendo estudadas é a utilização de DNA em conjunto com proteínas virais e partículas virais recombinantes (Alavian et al., 2013; Arnaud et al., 2010; Brinster, Inchauspé, 2001; Chou et al., 2013; Chou et al., 2012; Mehta et al., 2013; World Health Organization, 2002).

1.1.2 Mecanismo da transmissão e replicação do vírus da hepatite C

Quando foi descoberto o vírus da hepatite C, a principal forma de infecção era a transfusão sanguínea, que chegou a ser considerada como fator de transmissão de 70% dos casos (European Association for the Study of the Liver, 2014; Stramer, 2007). Atualmente, a infecção pelo HCV ocorre principalmente devido ao uso de drogas injetáveis (relacionado com o compartilhamento de seringas ou canudos no caso de uso de cocaína), tatuagens, acupuntura, hemodiálise, entre outros. A transmissão vertical (da mãe para o filho) e sexual são consideradas raras, ocorrendo somente em algumas situações (European Association for the Study of the Liver, 2014; Sy, Jamal, 2006).

A figura 3 representa o ciclo de vida do vírus da hepatite C quando infecta uma célula. Após a infecção, o vírus libera seu RNA no interior do citoplasma desencadeando a síntese da poliproteína, essa será clivada por proteases celulares e pelas proteínas não estruturais NS3/4A do HCV. No processamento final do ciclo de replicação viral, as proteínas NS5A e B realizam a síntese do RNA viral passando por um RNA negativo e ocorre o empacotamento e maturação dos vírus que saem da célula por brotamento (Pawlotsky et al., 2007).

Figura 3. Esquema do processo de replicação do HCV modificado de SBASSE Biology Seminars.

Modificado de: SBASSE Biology Seminars – 2013 (Date: Friday, February 8, 2013) – Lahore University of Management Sciences LUMS

Por conta da dificuldade em obter um sistema de cultura celular capaz de amplificar eficientemente o HCV, os estudos de replicação e multiplicação viral dependem da criação de outros sistemas (Lindenbach, Rice, 2001). Lohmann et al. (1999) e Blight et al. (2000) estabeleceram um modelo para o estudo da replicação do HCV utilizando um mecanismo de autorreplicação de “minigenomas” em culturas celulares. Este sistema tem sido utilizado para o estudo da replicação viral, porém não permite a formação de partículas virais. Neste sentido, algumas partículas virais (VLPs “*viral like particles*”) têm sido obtidas em culturas de células utilizando “pseudovírus” formados por partículas virais do vírus influenza ou vesiculovírus e contendo as proteínas E1 e E2 do HCV (Baumert et al., 1998; Buonocore et al., 2002; Flint et al., 1999; Lagging et al., 1998).

Em estudos com esse tipo de partículas virais observou-se que o mecanismo de entrada do vírus da hepatite C na célula hospedeira depende da interação com proteínas da superfície celular que favorecem a endocitose da partícula viral no processo de infecção (Bartosch, Cosset, 2006; Castet, Moradpour, 2003; Dubuisson et al., 2008; Ploss, Evans, 2012). As glicoproteínas de superfície do vírus da hepatite C vêm sendo estudadas a fim de identificar a complexa interação desse vírus com as células hospedeiras. Inicialmente, a proteína E2 solubilizada mostrou alguma interação com a proteína CD81 tetraspanina, considerando essa proteína como potencial receptor para o HCV (Bartosch et al., 2003c;

Dreux et al., 2009; Ploss, Evans, 2012). Além dessa proteína, outras moléculas como lipoproteínas de baixa densidade de classe B tipo I (receptor *scavenger* – SR-BI), lipoproteínas de alta densidade e manose que se ligam às lectinas (DC-SING e L-SING) também são consideradas como potenciais receptores para o vírus da hepatite C (Bartosch et al., 2003c; Bartosch, Cosset, 2006; Castet, Moradpour, 2003; Ploss, Evans, 2012).

1.1.3 Mecanismo da resposta imune à infecção com vírus da hepatite C

Células dos organismos são susceptíveis a infecções virais e nos mamíferos o sistema de defesa adquirida a essas infecções depende de uma sinalização através da associação de peptídeos celulares ou não com os complexos maiores de histocompatibilidade (MHC). Essa sinalização é capaz de gerar uma resposta imune adequada ao tipo de infecção que está ocorrendo. A resposta adquirida dependente da apresentação de antígenos pode resultar em uma resposta imunológica celular ou humoral, dependendo do MHC utilizado para essa apresentação. Quando apresentado com MHC de classe II a resposta é mediada por linfócitos T CD4+, e quando apresentado com MHC de classe I a resposta é mediada por linfócitos T CD8+ (Abbas et al., 2008; Earnshaw, Pollard, 2006).

As respostas mediadas por linfócitos T CD4+ estão relacionadas com as células apresentadoras de antígenos (macrófagos, linfócitos B, entre outras) e promovem uma resposta imunológica humoral com a produção de anticorpos. Já as respostas mediadas por linfócitos T CD8+ resultam em uma resposta celular pelos linfócitos T citotóxicos (CTLs), pois promovem a lise da célula infectada (figura 4) e consequente digestão de todo material genético presente, sendo celular ou patogênico. Essa resposta mediada por CTLs é uma das defesas que ocorre quando há uma infecção por vírus (Abbas et al., 2008; Earnshaw, Pollard, 2006).

Figura 4. Mecanismo de ação dos linfócitos T citotóxicos (CTLs)

Fonte: Adaptado de Abbas e Lichtman (2007).

Quando uma célula está infectada são produzidas proteínas provenientes do agente dessa infecção. As proteínas heterólogas (virais ou de outros patógenos intracelulares) ao serem sintetizadas pelas células infectadas são processadas pelas organelas celulares e serão associadas ao MHC de classe I. Caso ocorra uma apresentação de peptídeos heterólogos, irá resultar em uma ativação do sistema imune voltado aos linfócitos T CD8⁺ através da liberação de diversas citocinas, principalmente interferon- γ (INF- γ) diferenciando e ativando CTLs (Abbas et al., 2008; Earnshaw, Pollard, 2006).

Apesar dessa diferenciação entre a função das células T CD4⁺ e T CD8⁺ em resposta humoral e celular, algumas células T CD4⁺ podem se diferenciar em células T auxiliares T_H1 ou T_H2 dependendo das citocinas envolvidas no processo de apresentação de antígeno. Essas células auxiliam o sistema imune estimulando a resposta celular ou humoral. Se durante a diferenciação dessas células auxiliares o processo envolver as citocinas interferon- γ (INF- γ) e IL-12, irá resultar em estímulos de células T_H1 (auxiliar de resposta celular) e na presença de IL-4 irá resultar em T_H2, para auxiliar respostas humorais (Abbas et al., 2008).

A figura 5 esquematiza a especialização das células T CD4⁺ quando estimulada por uma célula apresentadora de antígeno (APC) através de MHC de classe II resultando em uma célula T_H1, quando esse estímulo ocorre na presença de IL-12 (liberado por macrófagos ou células dendríticas) e INF- γ . Uma vez que ocorreu essa diferenciação as células T_H1 irão estimular, dependendo das citocinas envolvidas, a ativação de macrófagos, produção de anticorpos opsonizadores (IgG) ou proliferar a diferenciação de linfócitos T CD8⁺ em CTLs (Abbas et al., 2008).

Figura 5. Esquema do processo de estímulo de T_H1 e sua resposta imune.

Fonte: Adaptado de Abbas e Lichtman (2007).

Sabendo que a melhor resposta a uma infecção pelo HCV é mediada por CTLs, muitos trabalhos vem sendo realizados com a utilização de pseudopartículas, partículas semelhantes a vírus e também vírus recombinantes em infecções de células de mamíferos. Vários estudos demonstraram alguns dos mecanismos de entrada e replicação virais, e trazem a possibilidade de que esses sistemas podem auxiliar o direcionamento da resposta para a ativação de linfócitos T $CD8^+$ (Bartosch et al., 2003a; Bartosch et al., 2003b; Bartosch et al., 2003c; Bartosch, Cosset, 2006; Berger et al., 2009; Brinster et al., 2001; Castet, Moradpour, 2003; Greive et al., 2002; Meunier et al., 2005; Owsianka et al., 2001; Rollier et al., 2005; Triyatni et al., 2002; Vidalin et al., 2000; Wellnitz et al., 2002; Wen et al., 2013; Zhao et al., 2004; Zhao et al., 2003).

A infecção por partículas virais recombinantes têm como característica a não replicação destas após a infecção, resultando em uma infecção controlada e dependente da quantidade de partícula aplicada. Quando há nessas partículas um material genético codificante para proteínas virais ou repórteres, essa infecção apresenta a produção da proteína heteróloga nas células que foram infectadas por essas partículas (Benmaamar et al., 2009; Coller et al., 2009; Mihailova et al., 2006).

Nessas condições, as células infectadas por pseudopartículas podem apresentar um metabolismo semelhante ao que ocorre em infecções virais, formando complexos de apresentação de antígenos através de MHC de classe I, estimulando resposta imunológica celular de CTLs inclusive com a ação de células T_H1 nos organismos quando infectados por essas partículas virais (Ip et al., 2014; Wen et al., 2013). Esse tipo de resposta imunológica é mais comum quando o patógeno é um vírus ou um parasita intracelular em que o sistema imune irá combater o patógeno através da lise celular com células T citotóxicas.

Ip et al. (2014) e Wen et al. (2013) demonstraram ainda que as pseudopartículas virais, baseadas no Semliki Forest Virus (SFV) ou no vírus da leucemia murina (MLV) associado com o HCV, podem induzir a produção de INF- γ e estímulos às células CD8⁺. Esses resultados sugerem que o funcionamento desses dois tipos de pseudopartículas pode estimular o sistema imune visando uma resposta T_H1 adequada e direcionada ao tipo de resposta imune às infecções virais.

1.1.4 Proteína não estrutural 3 do vírus da hepatite C (NS3)

As proteínas do HCV que apresentam possibilidade de direcionar o sistema imune a uma resposta celular adequada são as proteínas não estruturais. Dentro destas, a proteína não estrutural 3 (NS3) é uma das proteínas que tem boas possibilidades de apresentar esse resultado devido à sua conservação genotípica dentro do genótipo 1 (Mehta et al., 2013; Mello et al., 2009; Peres-da-Silva et al., 2012; Sillanpää et al., 2009).

Em nosso estudo, escolhemos a região da protease da NS3 entre os aminoácidos 1027 e 1258 do HCV por conter muitos epítomos mapeados para reconhecimento do sistema imune para estímulos de CTLs (tabela 1) e somente dois epítomos para o sistema imune humoral de camundongos (Los Alamos National Security, 2012), que será utilizado para a detecção da proteína produzida pelas células infectadas.

Tabela 1. Epítomos para CTLs mapeados na NS3 entre 1027 e 1258.

Epítopo CTL	Localização no genoma do HCV	Espécie
AYSQQTRGL	1031-1039	Humano
GLLGCIITSL	1038-1047	Humano e camundongo transgênico
VEGEVQIVSTAAQTF	1055-1069	Humano
QTFLATCINGVCWTV	1067-1081	Humano
ATCINGVCWTVYHGAGTRTI	1071-1090	Humano
CINGVCWTV	1073-1081	Humano, chimpanzé e camundongo transgênico
AGTRTIASPKGPVIQM	1085-1100	Humano
TRTIASPKGPVIQMY	1087-1101	Humano
DLVGWPAPQGSRSLT	1107-1121	Humano
CTCGSSDLY	1123-1131	Chimpanzé
RRRGDSRGSLLSPRP	1143-1157	Humano
LLCPAGHAV	1169-1177	Humano e camundongo transgênico
CPAGHAVGIFRAAVCTRGA	1171-1190	Humano
HAVGLFRAA	1175-1183	Humano
AYAAQGYKVL	1243-1252	Humano

Fonte: Los Alamos National Security, 2012

1.2 Sistema de expressão de proteínas heterólogas com pseudopartículas virais

Atualmente muitos sistemas de vacinação são utilizados para gerar uma resposta protetora contra diversos antígenos, desde as vacinas inativadas ou atenuadas até vacinas que utilizam tecnologias de DNA recombinante. Todos os sistemas apresentam características distintas e são utilizadas para patógenos diferentes. Com o surgimento da biotecnologia uma grande parte das vacinas está sendo desenvolvida e melhorada através da recombinação gênica (Mackett, 2000).

Visando um melhor direcionamento do sistema imune para a resposta celular e T_H1 , vamos utilizar em nosso trabalho dois sistemas de expressão gênica baseados em vírus, o Semliki Forest Virus (SFV) e as pseudopartículas de HCV (HCVpp).

1.2.1 Pseudopartícula derivadas do Semliki Forest Virus (SFV)

A necessidade do desenvolvimento de sistemas de expressão em células de mamíferos que atingissem grandes quantidades de proteína recombinante em pouco tempo, levou ao desenvolvimento de sistemas utilizando vetores virais, como o sistema SFV. O SFV é um vírus envelopado de RNA positivo simples fita (Atkins et al., 1999; Karlsson, Liljeström, 2003; Smithburn, Haddow, 1944).

O vírus SFV foi isolado inicialmente em 1944, de mosquitos na floresta Semliki da Uganda por Smithburn e Haddow (1944) e pertence ao gênero *Alphavirus* da família *Togoviridae*. É um vírus com um RNA de fita simples e positiva com aproximadamente 12 mil bases que codifica para nove proteínas que formam o capsídeo icosaédrico e as glicoproteínas de superfície (E1, E2 e E3), o vírus apresenta também um envelope lipídico originário da célula hospedeira (Atkins et al., 1999; Liljeström, Garoff, 1991a; Smithburn, Haddow, 1944).

Para a construção do vetor de expressão, o cDNA correspondente a seu genoma foi dividido em dois plasmídeos diferentes: o plasmídeo de expressão, que contém os genes não estruturais do SFV e o promotor forte subgenômico SFV 26S, contendo ainda uma região de policlonagem para a introdução do gene de interesse, e um plasmídeo auxiliar, contendo as proteínas estruturais do envelope viral. Após um processo de co-transfecção dos mRNAs gerados *in vitro* referentes a ambos os plasmídeos, há a formação de 10^4 a 10^5 partículas infecciosas por microlitro. Essas partículas são capazes de infectar uma ampla gama de células animais, notadamente as células de mamíferos. Entretanto, devido à ausência do sinal de encapsidação no RNA codificante para as proteínas estruturais, apenas o RNA contendo o gene de interesse é empacotado, constituindo o único RNA presente na partícula viral, o que na prática faz com que essas partículas sejam infecciosas, mas não replicativas (Benmaamar et al., 2009; Karlsson, Liljeström, 2003; Liljeström, Garoff, 2001; Liljeström, Garoff, 1991a; Liljeström, Garoff, 1991b; Puglia et al., 2013). Em uma abordagem de engenharia genética posterior, visando aumentar a segurança do sistema, a proteína de envelope viral E2 foi mutada de forma que o vírus apenas pode realizar a fusão com a membrana plasmática da célula a ser infectada, quando previamente tratado com α -quimiotripsina (Lundstrom, 2003).

Diversas proteínas já foram expressas utilizando o sistema SFV. De maneira geral, qualquer molécula que já tenha sido expressa por um determinado tipo celular que possa ser infectado por SFV, pode também ser expressa pela utilização desse sistema. Esse sistema

apresenta níveis de expressão muito mais elevados para algumas proteínas, como GPCRs (Receptores celulares acoplados à proteína G), do que outros sistemas de expressão transiente em células de mamíferos, esses sistemas transientes resultaram em níveis de expressão da ordem de 1 a 5 pmol/mg enquanto os sistemas baseados no SFV chegaram a 100-300 pmol/mg (Hassaine et al., 2006).

Comparado com um sistema de expressão de características equivalentes, como a utilização de células de inseto Sf9 e infecção por baculovírus recombinante, o sistema SFV demonstrou a mesma capacidade de expressar o receptor da angiotensina II, ambos produzindo a proteína na ordem de 30 pmol/mg, com semelhante atividade. Com a vantagem da menor presença de produtos de degradação da proteína nas células BHK-21 que nas células Sf9 (Shukla et al., 2006).

Outro estudo da expressão de diversos receptores em ambos os sistemas, também encontrou uma relação muito similar da expressão em mg/L das proteínas de interesse, porém como o sistema de baculovírus em células Sf9 atinge maiores concentrações celulares e maior biomassa, constatou-se que a razão entre proteína de interesse e proteína total era cem vezes maior no sistema SFV, o que pode simplificar a etapa de purificação. Nesse mesmo trabalho, foram encontradas proteínas diferencialmente expressas e degradadas em diversas linhagens celulares. Seus resultados ainda sugeriram que quando a maioria das proteínas de membrana expressas estão ativas, o nível de expressão é consideravelmente baixo, na ordem de 0,2 a 0,4 mg/L, quando exclusivamente localizada na membrana plasmática, o que levanta a questão sobre a quantidade de proteína de membrana com conformação apropriada que uma célula é capaz de acomodar. Segundo os autores quando o nível de expressão é elevado (superior a 1 mg/L), a proteína estaria presente primariamente nas membranas internas (Eifler et al., 2007).

Como todo sistema de expressão, o sistema SFV também possui desvantagens, tendo sido descrito, por exemplo, a expressão do receptor tipo 2 da neuromedina U sem sua correta glicosilação (Shukla et al., 2006; Shukla et al., 2007), que pode ser causada devido à mecanismos da célula infectada. Também a sua titulação tem sido apontada como um dos principais pontos limitantes à sua utilização. Apesar de ser um sistema indutor de apoptose em cultivos *in vitro* (Glasgow et al., 1998) e dessa característica ser utilizada para a titulação viral em placas (Zusinaite et al., 2007). Sua titulação viral poder ser feita ainda por técnica de dotblotting utilizando sonda de DNA marcada radioativamente (Wahlfors, Morgan, 2002). De qualquer forma, a titulação viral do SFV ainda carece de uma nova técnica mais simples e mais precisa para a melhoria do controle do sistema, essa técnica pode ser a quantificação por

qRT-PCR, por exemplo (Benmaamar et al., 2009; Carapuça et al., 2007; Puglia et al., 2013; Zhao et al., 2006), a qual temos testado neste trabalho.

O sistema SFV é ainda estudado como um promissor vetor de imunização, tendo demonstrado atividade de estímulo das respostas imune celular e humoral. Sua utilização como sistema viral de replicação defectiva para uso em humanos é apoiada por diversas características como: produção de altos níveis da proteína de interesse; formação de corpos apoptóticos após 48-72h (após a rápida inibição da tradução do mRNA do hospedeiro pela captação da maquinaria traducional pelo mRNA viral) com altos níveis da proteína heteróloga, servindo como indutor de resposta imune via estímulo indireto (*cross-priming*); ativação dos sistemas imunes inato e adaptativo; produção de intermediários dsRNA, conhecidos imunopotencializadores (podem ser reconhecidos por receptores do tipo Toll-3 e estimular a produção de interferon tipo 1, sendo capazes ainda de ativar e induzir a maturação de células dendríticas); e finalmente o fato de que humanos geralmente não carregam anticorpos neutralizantes contra o vírus SFV (Riezebos-Brilman et al., 2005).

1.2.2 Pseudopartícula derivadas de MLV e HCV (HCVpp)

Outro sistema de expressão gênica capaz de formar vírus que carregam RNA são as chamadas pseudopartículas de HCV (HCVpp). Este sistema mistura características do retrovírus da Leucemia Murina (MLV) e do Flavivírus da Hepatite C (HCV). As HCVpp têm sido pouco estudadas em relação à expressão gênica, isto porque, originariamente o sistema foi desenvolvido na tentativa de se estudar o ciclo replicativo do HCV, uma vez que, como dito anteriormente, este não se replica em culturas celulares (Ashfaq et al., 2011; Baldick et al., 2010).

Neste sentido, algumas partículas virais (VLPs) têm sido obtidas em culturas de células utilizando “pseudovírus” formados por partículas virais do vírus influenza ou vesiculovírus e contendo as proteínas E1 e E2 do HCV (Ashfaq et al., 2011; Baumert et al., 1998; Buonocore et al., 2002; Flint et al., 1999; Flint, McKeating, 1999; Lagging et al., 1998; Nègre et al., 2000). Estes estudos demonstraram uma baixa infecciosidade dos pseudovírus. Assim, novos estudos na tentativa de compreender a formação da partícula viral do HCV têm sido realizados, entre eles a utilização do MLV para a formação da pseudopartícula viral, contendo também proteínas estruturais do HCV, nomeadas de HCVpp (Ashfaq et al., 2011; Bartosch et al., 2003b; Bartosch et al., 2003c; Bartosch, Cosset, 2006).

Bartosch e colaboradores (2003b) desenvolveram um sistema de pseudopartículas de HCV formadas por proteínas do nucleocapsídeo e polimerase do MLV, glicoproteínas E1 e E2 do HCV e, além disso, desenvolveram a internalização de um RNA simples de polaridade positiva no interior dessa partícula (figura 6), que após a infecção será transcrito reversamente e iniciará a síntese da proteína heteróloga. Esse sistema apresenta uma afinidade por células hepáticas, devido à presença das proteínas E1 e E2 do HCV, sendo uma ferramenta muito importante para os estudos sobre a hepatite C.

Figura 6. Esquema da pseudopartícula de HCV (HCVpp)

1.3 Justificativa

Nosso objetivo neste projeto é estabelecer metodologia e avaliar a expressão de proteínas heterólogas através de pseudopartículas virais que em seu genoma carreguem um RNA.

Como proteína alvo do estudo, utilizamos uma porção da NS3 do HCV que apresenta possibilidades de estímulo imune mais adequado ao combate à infecção viral causada pelo vírus C da hepatite. A tecnologia de produção de pseudopartículas virais recombinantes foi estabelecida e a expressão da proteína em culturas celulares foi avaliada.

A importância desta abordagem de expressão de um RNA que codifica para uma proteína viral poderá, com base em trabalhos futuros, possibilitar a imunização contra uma proteína viral que não compõe a partícula viral (proteínas virais não estruturais), mas que seja capaz de induzir resposta imunológica, sobretudo, celular, essencial na proteção à infecção natural. Assim, esta nossa proposta de desenvolvimento de pseudopartículas virais recombi-

nantes representa um primeiro passo para um estudo futuro de uma abordagem inovadora e tem centralizado atenções dos projetos mais recentes em vacinologia.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Neste trabalho, estudamos dois sistemas de infecção de células de mamíferos com pseudopartículas virais recombinantes baseados no *Alphavirus* (SFV) e no vírus da Hepatite C com o vírus da leucemia murina (HCVpp), ambos contendo um RNA para a protease da proteína não estrutural 3 (NS3p) do vírus da hepatite C genótipo 1a, contendo epítomos para anticorpos em camundongo (NS3p1a). É nossa expectativa que este sistema seja capaz de produzir partículas virais que carreguem um RNA do gene alvo, permitindo a expressão da proteína NS3p nas células infectadas.

2.2 Objetivos específicos

1. Construir vetores para produção de pseudopartículas virais SFV (SFV-NS3p1a) e HCV (HCVpp-NS3p1a).
2. Padronizar um método de co-transfecção por eletroporação para a formação dos dois tipos de pseudopartículas.
3. Estabelecer método de titulação/quantificação das pseudopartículas para aperfeiçoar infecção viral e expressão das proteínas heterólogas.
4. Analisar a expressão da NS3p nos diferentes sistemas de expressão utilizando imunoensaaios.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura de bactérias

Nos experimentos de transformação bacteriana utilizamos a cepa de *Escherichia coli* DH5 α (genótipo: *supE44* Δ *lacU* 169(ϕ 80 *lacZ* Δ M15) *hasd* R17 *rec* A1 *endA*1 *gyrA*96 *thi*-1 *relA*1).

Os meios de cultura utilizados foram: LB (1% bactotripton, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl, pH 7,4), LB-agar (acrescido de 16 g de agar por litro e distribuído em placas de petri de 100 mm de diâmetro), SOB (2% bactotripton, 0,5% extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, pH 6,8 -7,0), e SOC (meio SOB acrescido de 20 mM de glucose). Todos os meios foram preparados com água destilada e esterilizados por autoclavagem por 15 minutos a 121 °C.

Foram acrescentados os antibióticos ampicilina ou canamicina dependendo do gene de resistência que o vetor contém.

3.2 Introdução do DNA plasmidial em bactérias

O protocolo experimental utilizado para transformação de bactéria foi baseado na técnica descrita por Hanahan (1983):

3.2.1 Obtenção de bactérias competentes

As bactérias competentes para transformação foram obtidas da seguinte maneira: após a bactéria ter sido estriada por esgotamento em placa LB agar e incubadas a 37 °C por 20 horas, uma colônia foi inoculada em 2 mL de meio SOB e mantida a 37 °C sob agitação. Após 2 horas, foram adicionados 50 mL de meio SOB e as bactérias foram novamente incubadas a 37 °C com agitação, por aproximadamente 2 horas, até que a cultura atingiu uma DO entre 0,3 e 0,5 a 600 nm.

Quando a DO foi atingida, foram adicionados 500 μ L de MgCl₂ 1 M e as bactérias foram mantidas no gelo por 15 minutos. Em seguida foram precipitadas por centrifugação a 1.200 g por 17 minutos a 4 °C (centrífuga eppendorf 5804R). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 10 mL de solução RFI (30 mM acetato de potássio, 50 mM MnCl₂, 100 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 15% glicerol, pH 5,8), mantendo os tubos no gelo por 15 minutos.

Uma nova centrifugação a 1.200 g por 17 minutos a 4 °C foi feita e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em 2 mL de solução RFII (10 mM Na-MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 15% glicerol, pH 6,8), previamente resfriada no gelo, e alíquotas de 400 µL foram estocadas em microtubos no freezer -80 °C, após congelamento rápido em nitrogênio líquido.

3.2.2 *Transformação de bactérias competentes*

As bactérias competentes, obtidas como descrito acima, foram descongeladas em gelo e aliquotadas em 50 µL. Adicionamos a cada alíquota 1 a 2 µL de solução contendo DNA do plasmídeo (ou da ligação se for o caso). Após 30 minutos no gelo, as bactérias foram submetidas a um choque térmico a 42 °C por 40 segundos e imediatamente resfriadas e mantidas no gelo por 5 minutos. Em seguida as bactérias foram espalhadas em placas com meio sólido LB e os antibióticos apropriados para seleção do plasmídeo.

3.3 Preparo de DNA de plasmídeo

A extração de DNA foi feita por lise alcalina, adaptada da técnica elaborada por Birnboim e Doly (1979).

Para as extrações em pequena escala (miniprep), uma colônia bacteriana contendo o plasmídeo foi inoculada em 1,5 mL de meio LB contendo antibiótico e incubada a 37 °C com agitação por 16 horas.

Passada a incubação, as bactérias foram centrifugadas a 10.000 g por 2 minutos (microcentrífuga Eppendorf) e o sobrenadante descartado. O precipitado das células foi ressuspenso em 50 µL de GTE (50 mM glicose, 25 mM Tris-base e 10 mM EDTA) e em seguida adicionou-se 100 µL de NaOH/SDS (0,2 N NaOH e 1% SDS) homogeneizado por eversão. Após 5 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 100 µL de Acetato de amônio 8 M e o tubo colocado em gelo por 10 minutos.

O material foi centrifugado a 20.000 g por 15 minutos após a incubação em gelo. O sobrenadante, então, foi transferido para um novo tubo.

O DNA foi precipitado com adição de 0,6 volumes de isopropanol e centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de DNA lavado com etanol 70%, seco, ressuspenso em 50 µL de tampão TE e guardado a -20 °C.

Vetor construído nesse trabalho (pCMV-NS3p1a ou pSFV-NS3p1a) linear indicando a região da NS3p e seu tamanho; Amplicon A, apresenta uma parte do vetor clonado e a NS3p tendo aproximadamente 790 nucleotídeos; Amplicon B, com uma parte do vetor pCMV-NS3p1a e com aproximadamente 280 nucleotídeos; Amplicon C, região da NS3p com aproximadamente 440 nucleotídeos; Amplicon D, região da NS3p com aproximadamente 140 nucleotídeos.

3.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O gene da NS3p foi amplificado pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se a enzima *Platinum Taq* DNA polimerase ou *Taq* DNA polimerase (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Foram utilizados iniciadores (“*primers*”) específicos para a amplificação de parte dos vetores construídos ou do próprio gene da NS3p (tabela 2 e figura 7).

Tabela 2. Sequência dos iniciadores utilizados nas reações de amplificação.

Iniciadores	Sequência (5' → 3')
pCMV-F1	TCGTTTAGTGAACCGTCAGAT
pCMV-R1	GTTACTGCGGCTATCAGGCT
pSFV-F1	GACTACAAGGACGATGACGATAA
pSFV-R1	GGTGATGGTGATGGTGATGG
NS3p-R	CGTTGGTGTACATCTGGAT
NS3p1a-83F	TGACCGGCAGAGACAAGAAC
NS3p1a-152F	TGGCCACCTGTATCAACG
NS3p1a-295R	GTGCAAGGGGTCAGGCTTCT
NS3p1a-521R	TTCCACGGGGATGAAGTCCA

Figura 7. Mapa dos amplicons obtidos pelos pares de iniciadores neste trabalho.

As reações foram realizadas com volume final de 50 µL nas seguintes condições: 20 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP (10 mM), 0,4 pmol/µL de cada iniciador, 2,5 unidades da enzima *Platinum Taq* DNA polimerase e 5 µL de DNA. Os reagentes utilizados foram da marca InvitrogenTM.

Os ciclos de variação de temperatura utilizados na PCR foram: 94 °C por 30 segundos, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, de 50 a 62 °C por 30 segundos e de 60 a 72 °C por 45 segundos com uma extensão final de 10 minutos de 60 a 72 °C.

3.4.1 Sequenciamento

Para as reações de sequenciamento o produto da amplificação foi identificado e quantificado em gel de agarose 1% com brometo de etídeo (0,5 µg/mL). A quantificação foi realizada por comparação de bandas com padrão de massa, High DNA Mass Ladder (InvitrogenTM), conforme orientação do fabricante.

A concentração de DNA utilizado nas reações de sequenciamento foi determinada de acordo com o tamanho do produto de PCR e seguindo as orientações do kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para o tamanho do fragmento sequenciado (~790 pb) foram utilizados 15 ng de DNA por reação.

Foi utilizada a técnica de sequenciamento por PCR modificada da metodologia de Sanger et al. (1977), com dideoxynucleotídeos (ddNTPs) marcados com fluorescência. Para o sequenciamento foram utilizados os iniciadores pCMV-F1 e pCMV-R1 ou pSFV-F1 e pSFV-R1 indicados na tabela 2.

3.4.2 Validação e alinhamento das sequências

As sequências de nucleotídeos obtidas do gene NS3p foram analisadas e validadas utilizando os programas *Pher-Pharp-Consed* (Ewing et al., 1998; Ewing, Green, 1998; Gordon et al., 1998). Em seguida as sequências foram alinhadas no programa *Clustal X* (Thompson et al., 1997) juntamente com a sequência da NS3p do vírus da hepatite C do genótipo 1a (GenBank: AF009606) inserida nos vetores utilizados.

3.5 Cultura de células

Para realização dos experimentos utilizamos diferentes linhagens de células de mamíferos. As pseudopartículas de HCV foram produzidas e infectadas, respectivamente, em culturas de células de rim de embrião humano (HEK293T) e de células de hepatócitos humanos (HuH-7.0). E as partículas de SFV foram produzidas e infectadas em culturas de células de rim de hamster (BHK-21) ou HuH-7.0. Todas as células foram mantidas em cultura com meio DMEM (Gibco[®], Carlsbad, CA, USA) 10% de SFB a 37 °C em estufa com 5% de CO₂.

3.6 Construção dos vetores contendo o gene da NS3p

Para a construção dos vetores contendo o gene da NS3p, escolhemos somente a região da protease desse vírus que apresenta mais de dez epítomos para reconhecimento de células T citotóxicas (CLT) e apresenta grande conservação perante estudos filogenéticos (Bartoschek et al., 2003; Mello et al., 2009). Além desses CLTs, dois epítomos para reconhecimento de anticorpos em camundongo (necessários para reconhecimento por técnicas de imunquímica) foram incluídos na sequência da NS3p utilizada nesse trabalho, a região está mapeada entre os aminoácidos 1027 e 1287 (Los Alamos National Security, 2012).

A sequência da NS3p do vírus da hepatite C do genótipo 1a (GenBank: AF009606) foi sintetizado pela GeneArt[®] (Carlsbad, CA, USA) em vetor contendo uma sequência ATG no início e um TAG no final. Além desses códons, foram incluídos, externamente ao gene, sítios para as enzimas de restrição *AgeI*, *SpeI* e *SfoI* necessários para a realização das clonagens.

Foram construídos dois vetores contendo a sequência gênica da NS3p sendo um deles para a formação das pseudopartículas de HCV (pCMV-NS3p1a) e outro para a formação das partículas de SFV (pSFV-NS3p1a).

3.6.1 Vetor pCMV-NS3p1a

Para a formação das HCVpp-NS3p1a foi necessária a construção do vetor pCMV-NS3p1a. Essa construção foi realizada a partir do vetor pTG13077 (figura 8B) que continha o gene da proteína verde fluorescente – GFP (gentilmente cedido pelo Dr François-Loïc Cosset INSERM/França). Esse vetor foi digerido com as enzimas *AgeI* e *SfoI* para remoção do gene GFP.

O inserto contendo o gene da NS3p foi obtido através da digestão do vetor sintetizado (figura 8A) pela digestão com as enzimas *AgeI* e *PvuII* e purificado do gel de agarose 0,8%. Após a purificação, o gene (figura 8C) foi ligado ao vetor (figura 8D) sob o controle do promotor do citomegalovírus (CMV) com a enzima T4 DNA ligase (Promega, Madison, WI, USA) formando o vetor pCMV-NS3p1a (figura 8E).

A construção foi confirmada com a análise de padrão de restrição e sequenciamento do vetor pCMV-NS3p1a, a digestão foi realizada com as enzimas *SfoI* e *NotI* originando dois fragmentos com os tamanhos aproximados de 3943 pb e 2395 pb (figura 8F). O sequenciamento foi realizado (apêndice A), gentilmente, no laboratório de Hormônios e Genética Molecular do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Figura 8. Esquema da construção do vetor pCMV-NS3p1a.

A – Vetor NS3p1a sintetizado; B – vetor pTG13077; C – fragmento da NS3p1a; D – vetor pCMV; E – vetor pCMV-NS3p1a; F – gel de agarose 0,8%, vetor pCMV-NS3p1a não digerido (1), vetor digerido com as enzimas *SfoI* e *NotI* (2), marcador lambda HindIII (M).

Esse vetor foi utilizado para a produção das pseudopartículas virais através de transfecção do DNA em associação com outros vetores que complementam os elementos necessários para a partícula de HCVpp, conforme descrições da seção 3.7.1.

3.6.2 Vetor pSFV-NS3p1a

Para a formação das partículas SFV-NS3p1a foi necessária a construção do vetor pSVF-NS3p1a. Essa construção foi realizada a partir do vetor pSVF2genC (gentilmente

cedido pelo Dr. Renaud Wagner da Universidade de Strasburgo) – (figura 9B). Esse vetor foi digerido com as enzimas *XmaI* e *SpeI* para clonagem.

O inserto contendo o gene da NS3p foi obtido através da digestão do vetor sintetizado (figura 9A) pela digestão com as enzimas *AgeI* e *SpeI* e purificado do gel de agarose 0,8%. Após a purificação o gene (figura 9C) foi ligado ao vetor (figura 9D) sob o controle do promotor para transcrição *in-vitro* SP6 com a enzima T4 DNA ligase (Promega) formando o vetor pSFV-NS3p1a (figura 9E).

A construção foi confirmada com a análise de padrão de restrição e sequenciamento do vetor pSFV-NS3p1a, a digestão foi realizada com as enzimas *AgeI* e *NotI* originando dois fragmentos com os tamanhos aproximados de 8527 pb e 3197 pb (figura 9F). O sequenciamento foi realizado (APÊNDICE B), gentilmente, no laboratório de Hormônios e Genética Molecular do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) pela Dra. Mariza Gerdulo dos Santos.

Figura 9. Esquema da construção do vetor pSFV-NS3p1a.

A – Vetor NS3p1a sintetizado; B – vetor pSFV2genC; C – fragmento da NS3p1a; D – vetor pSFV; E – vetor pSFV-NS3p1a; F – gel de agarose 0,8%, vetor pSFV-NS3p1a não digerido (1), vetor digerido com as enzimas *AgeI* e *NotI* (2), marcador lambda HindIII (M).

Esse vetor foi utilizado para a produção das partículas virais através de transfecção do mRNA transcrito *in vitro* em associação com outro vetor que complementa os elementos necessários para a partícula de SFV, conforme descrições da seção 3.7.2.

3.7 Produção das partículas

A produção das partículas foi realizada através de co-transfecção dos vetores de DNA ou de mRNAs transcrito *in vitro* por eletroporação em equipamento Gene Pulser Xcell™ (Bio-

Rad, Hercules, CA, USA) com dois pulsos, seguindo as configurações dependendo da linhagem celular a ser transfectada, conforme mostrado na tabela 3.

Tabela 3. Configurações para co-transfecção por eletroporação das células.

Linhagem celular	Cubeta (cm)	Voltagem (V)	Capacitância (μ F)	Resistência (Ω)	Tempo (s)
BHK-21	0,2	140	--	--	0,025 *
	0,2	360	75	∞	0,6 – 0,8
	0,4	850	25	∞	0,6 – 0,8
	0,4	1500	25	∞	0,6 – 0,8
HEK293T	0,2	110	--	--	0,025 *
	0,2	280	75	∞	0,6 – 0,8
	0,4	650	25	∞	0,6 – 0,8
	0,4	1150	25	∞	0,6 – 0,8

As condições utilizadas para a eletroporação das células BHK-21 foram as descritas por Karlsson e Liljeström (2003) ou Benmaamar et al. (2009).

* configuração prévia do Gene Pulser Xcell™

3.7.1 Pseudopartículas de HCVpp-NS3p1a

Para a produção das pseudopartículas, as células HEK293T cultivadas em garrafas T-75 foram tripsinizadas quando em 80% de confluência. Essas células, após lavagem com DMEM suplementado com 10% de SFB e com PBS, foram ressuspensas em 800 μ L de PBS. A essas células foram adicionados, nas proporções de uma ou duas vezes, os vetores pCMV-GAG/POL, pCMV-NS3p1a e pCMV-E1E2-1a (figura 10), nas quantidades de:

- 8,1 μ g de pCMV-GAG/POL
- 8,1 μ g de pCMV-NS3p1a
- 2,7 μ g de pCMV-E1E2-1a

Figura 10. Esquema dos vetores pCMV-E1E2-1a, pCMV-GAG/POL e pCMV-NS3p1a.

Está indicado nesses vetores o promotor do citomegalovírus (prom CMV), o gene de resistência à ampicilina (amp), o gene de resistência à higromicina (hph), a origem de replicação em bactéria (ori), sequência de repetição não codificada do MLV (LTR), sequência sinal de encapsidação do MLV (Ψ), gene da E1E2 do HCV genótipo 1a (E1/E2-1a), gene da GAG e POL do MLV (GAG/POL) e gene da NS3p1a (NS3p).

As células juntamente com o DNA foram transferidos para uma cubeta de eletroporação na qual receberam os pulsos (conforme tabela 3) e em seguida foram adicionados à 10 mL de DMEM suplementado com 10% de SFB em uma garrafa T-25 e incubadas a 37 °C, 5% CO₂ por 24 horas.

As pseudopartículas HCVpp-NS3p1a foram filtradas com membrana 0,45 μ m, aliquotadas em tubos com meio mililitro e mantidas no freezer -80 °C para quantificação (seção 3.8) ou infecção (seção 3.9).

3.7.2 Partículas de SFV-NS3p1a

Para a produção das partículas de SFV, as células BHK-21 cultivadas em garrafas T-75 foram tripsinizadas quando em 80% de confluência. Essas células, após lavagem com DMEM suplementado com 10% de SFB e com PBS, foram ressuspensas em 800 μ L de PBS.

RNAs mensageiros foram adicionados às células na proporção de 2:1 do vetor pSFV-NS3p1a para o vetor pSFV-Helper (figura 11), obtidos a partir da transcrição *in vitro* de 2,5 μ g de cada vetores linearizado. Para a transcrição dos vetores pSFV-Helper e pSFV-NS3p1a (figura 11) utilizamos o kit The Ambion® MAXIscript® SP6/T7 In Vitro Transcription Kit (Invitrogen™), segundo as instruções do fabricante.

Figura 11. Esquema dos vetores pSFV-Helper e pSFV-NS3p1a.

Está indicado nesses vetores o promotor SP6 (SP6), o promotor SFV26S (26S), o gene de resistência à ampicilina (amp), a origem de replicação em bactéria (ori), os genes do nucleocapsídeo, proteína 62 e E1 do SFV (Core – p63 – E1), os genes das proteínas não estruturais 1 a 4 do SFV (nsP 1-4) e gene da NS3p1a (NS3p).

As células juntamente com os mRNAs foram transferidos para uma cubeta de eletroporação na qual receberam os pulsos (conforme tabela 3) e em seguida foram adicionados à 10 mL de DMEM suplementado com 10% de SFB em uma garrafa T-25 e incubadas a 37 °C, 5% CO₂ por 24 horas.

As partículas SFV-NS3p1a foram filtradas com membrana 0,22 µm, aliquotadas em tubos com meio mililitro e mantidas no freezer -80 °C para futura quantificação (seção 3.8) ou infecção (seção 3.9).

3.8 Detecção e quantificação das partículas

A quantificação das partículas formadas foi feita utilizando técnicas de qRT-PCR. Para essas análises o RNA das partículas foi extraído com o kit QIAamp® (Qiagen®, Gaithersburg, MD, USA), tratado com DNase (Invitrogen™) por 15 minutos à 25 °C e, então, a síntese do cDNA pode ser realizada com a enzima M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen™) utilizando o NS3p1a-521R para quantificação a partir do gene da NS3 (tabela 2).

Uma vez obtido o cDNA, as amostras foram amplificadas por PCR, para verificação do tratamento com DNase e da síntese do cDNA, conforme descrito anteriormente (seção 3.4). A temperatura de anelamento utilizada foi de 60 °C nas reações com os iniciadores NS3p1a-198F e NS3p1a-295R (tabela 2). Em seguida, as amostras de cDNA foram submetidas a análise de PCR em tempo real com os mesmos iniciadores e temperaturas já descritas.

Para a quantificação das amostras foi preparada uma curva padrão com o vetor pTGNS3p1a linearizado com a enzima *ClaI* e aliqotados em 8 concentrações, variando de 6×10^8 até 60 moléculas de NS3p. Para a realização da quantificação cada amostra ou ponto da curva foi analisado em triplicata pelo StepOne™ System da Applied Biosystems®.

Os valores obtidos a partir da quantificação foram corrigidos devido às diluições realizadas durante o processo de extração e tratamento do material genético segundo a fórmula: $N \times ((V_{tRT}/V_{aRT}) \times (V_{tDNAse}/V_{aDNAse}) \times (V_{tEx}/V_{aEx}) \div V_{Sb})$, onde V_{tRT} (volume total da RT), V_{aRT} (volume da amostra utilizada da RT), V_{tDNAse} (volume total do tratamento com a DNase), V_{aDNAse} (volume da amostra utilizada da do tratamento com a DNase), V_{tEx} (volume total da extração), V_{aEx} (volume da amostra utilizada da extração) e V_{Sb} (volume do sobrenadante utilizado para realizar a extração).

3.9 Infecção de cultura de células

Para a infecção das células com as partículas formadas 7×10^5 células BHK-21 ou HuH-7.0 foram cultivadas em placas de 6 poços com 1,5 mL de DMEM suplementado com 10% de SFB em estufa a 37 °C, com 5% de CO₂ por 24 horas, atingindo aproximadamente 70 a 80% de confluência. No momento da infecção o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com PBS para então receber as partículas conforme descrito a seguir.

3.9.1 Infecção com pseudopartículas de HCVpp-NS3p1a

As células HuH-7.0, cultivadas em placas de 6 poços com 2 mL de meio de cultura, após a lavagem com PBS foram infectadas com pseudopartículas HCVpp-NS3p1a em diferentes concentrações (conforme tabela 4) e as placas foram centrifugadas a 400 g por 1 hora a 37 °C. Em seguida, o meio de cultura foi completado para 1,5 mL com DMEM suplementado com 10% de SFB e as células foram incubadas por 48 horas a 37 °C em estufa com 5% de CO₂.

Tabela 4. Resumo das infecções com HCVpp-NS3p1a em células HuH-7 em relação à concentração de partículas por célula.

Experimento de infecção	Concentração de partícula por célula
inf-A	10
	20
inf-B	0,5
	1

Ao final da infecção as células foram coletadas e os precipitados foram aliquotados e armazenados à -80 °C para análise da expressão da NS3 (seção 3.11).

3.9.2 Infecção com partículas de SFV-NS3p1a

Para a ativação das partículas SFV-NS3p1a foi utilizado 0,26 mg/mL de α -quimiotripsina (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA) por 30 minutos à temperatura ambiente, em seguida, a α -quimiotripsina foi inativada com 0,1 mg/mL de aprotinina (Sigma-Aldrich[®]) por 5 minutos a mesma temperatura. Uma vez ativada, as partículas foram utilizadas para a infecção das células BHK-21 ou HuH-7.0 cultivadas em placas de 6 poços com 2 mL de meio de cultura.

Após a lavagem das células com PBS foi adicionado 500 μ L de DMEM sem SFB e infectadas com pseudopartículas SFV-NS3p1a em diferentes concentrações (conforme tabela 5). As placas foram incubadas por 1 hora a 37 °C em estufa com 5% de CO₂. Em seguida, o meio de cultura foi completado para 2 mL com DMEM suplementado com 10% de SFB e as células foram incubadas por 24 ou 48 horas a 37 °C em estufa com 5% de CO₂.

Tabela 5. Resumo das infecções com SFV-NS3p1a em células HuH-7 ou BHK-21 em relação à concentração de partículas por célula.

Experimento de infecção	Concentração de partícula por célula	Linhagem celular utilizada
inf-C	10	BHK-21
	20	
	50	
inf-D	1	BHK-21
	10	e
	20	HuH-7
inf-E	1	BHK-21
	2	
	5	e
	10	HuH-7

Ao final da infecção as células foram coletadas e os precipitados foram aliquotados e armazenados à -80 °C para análise da expressão da NS3 (seção 3.11).

3.10 Produção de anticorpos policlonais

A produção de anticorpos policlonais foi realizada por imunização de camundongos com a porção proteína NS3 do HCV genótipo 1a (ProSpec-HCV246 – ProSpec, East Brunswick, NJ, USA) entre os aminoácidos 1192 a 1459 que contém quatro epítomos mapeados, sendo que dois deles estão incluídos na região da NS3p que estamos trabalhando.

Essa proteína juntamente com o adjuvante (hidróxido de alumínio – AlOH_3) foram inoculados, em dois camundongos BALB/c com 6 a 8 semanas de idade, em três doses subcutâneas nos dias 0, 7 e 21 (Harlow, Lane, 1988). Cada dose continha 300 ng de NS3 e 0,5 mg de AlOH_3 em um volume de 100 μL . Após sete dias da última imunização, os camundongos foram sacrificados e foi realizada a sangria total.

Como controle do processo de imunização, foi feito um ensaio de ELISA para IgG de camundongo dos soros coletado dos animais nos dias 0, 14 e 28. A análise foi realizada por comparação dos níveis de anticorpos nos animais tendo como base o soro coletado antes das

imunizações. O soro coletado no final da imunização foi inativado a 56 °C por 30 minutos, aliquotado em tubos com 30 µL e armazenados à - 20 °C.

3.11 Imunoensaios

Os imunoensaios permitem a detecção e/ou quantificação de proteínas através da ligação com anticorpos específicos e anticorpos associados a enzimas. Essas irão emitir um sinal químico (fluorescente ou radioativo) que será medido por diferentes técnicas. A figura 12 representa um esquema desse tipo de ensaio, no qual o anticorpo secundário está conjugado com uma enzima (peroxidase).

Figura 12. Esquema simplificado de imunoensaios.

3.11.1 Detecção da NS3 - Dotblotting

Após a infecção das células BHK-21 e HuH-7.0, essas foram coletadas e a expressão na NS3 foi analisada por *dotblotting*. O pellet celular foi lisado com tampão de lise (50 mM Tris, 150 mM NaCl e 1% Nonidet P-40) por 10 minutos. As amostras foram colocadas em uma membrana de nitrocelulose e deixadas até secar. Como controle positivo utilizamos uma proteína comercial NS3 (ProSpec).

Em seguida, a membrana foi lavada com PBS-Tween (0,05% de Tween 20 em PBS) e bloqueada por 1 hora com solução de bloqueio (3% de leite desnatado em PBS-Tween) à temperatura ambiente e sob agitação. Após enxaguar e lavar a membrana 3 vezes por 5 minutos em PBS-Tween, foi aplicado o anticorpo primário (monoclonal anti-NS3-1B6 (AG-

20B-0001, AdipoGen[®], San Diego, CA, USA) ou policlonal anti-NS3, produzido no laboratório – item 3.10) diluído em PBS-Tween e incubado à temperatura ambiente por 30 minutos.

A membrana foi novamente enxaguada e lavada 3 vezes por 5 minutos com PBS-Tween e o anticorpo secundário associada com *horseradish* peroxidase (HRP) (anti-IgG de camundongo – invitrogen[™]) foi incubado na membrana à temperatura ambiente por 30 minutos. Ao término da incubação a membrana foi lavada com PBS-Tween e aplicada a solução de revelação (Thermo Scientific SuperSignal West Pico - Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) por 5 minutos antes de ser revelado em filme de raio-X.

A figura 13 representa o processo de realização simplificado do *dotblotting*. Após a aplicação das amostras ocorre à lavagem da membrana e aplicação do anticorpo primário. Em seguida realiza-se a aplicação do anticorpo secundário após lavagem. E a finalização do processo ocorre após remoção do excesso de anticorpo secundário, aplicação do substrato da peroxidase e revelação em filme de raio-X.

Figura 13. Esquema do processo da detecção por *dotblotting*.

4 RESULTADOS

Foram construídos os vetores pCMV-NS3p1a e pSFV-NS3p1a, conforme descrito no item 3.6, para a formação das pseudopartículas HCVpp-NS3p1a e SFV-NS3p1a e antes de estabelecer o melhor modo para a produção das pseudopartículas (item 4.2), foi necessário realizar uma padronização do processo de transfecção por eletroporação das células BHK-21 e HEK293T (4.1).

Para testar o funcionamento das partículas, realizamos a detecção e quantificação destas por RT-PCR (resultados apresentados no item 4.3) e produzimos anticorpos policlonais específicos para a proteína NS3 (item 4.4.1). Por fim, infectamos células com as pseudopartículas e por, dotblotting, detectamos a NS3p produzida por essas células (0).

4.1 Padronização da transfecção das células por eletroporação

Para padronizarmos as condições de transfecção por eletroporação, realizamos um experimento utilizando células BHK-21 e HEK293T e 20 µg do vetor de pTG13077 (figura 8B), que contém o gene da GFP (*Green Fluorescent Protein*).

As condições estabelecidas para este experimento foram estabelecidas de acordo com as utilizadas por Karlsson e Liljeström (2003) e Benmaamar et al. (2009) para as células BHK-21 e estimadas em cerca de 80% desses valores para as células HEK293T de acordo com as condições D, que foram pré-estabelecidas pelo fornecedor do aparelho Gene Pulser Xcell™ (tabela 6).

Tabela 6. Condições de eletroporação dependendo da linhagem celular e cubeta utilizada.

Condições	BHK-21	HEK293T
A	Cubeta de 0,4 cm - Pulso de 1500 V, 25 μ F e $\infty\Omega$ em onda exponencial	Cubeta de 0,4 cm - Pulso de 1150 V, 25 μ F e $\infty\Omega$ em onda exponencial
B	Cubeta de 0,4 cm - Pulso de 850 V, 25 μ F e $\infty\Omega$ em onda exponencial	Cubeta de 0,4 cm - Pulso de 650 V, 25 μ F e $\infty\Omega$ em onda exponencial
C	Cubeta de 0,2 cm - Pulso de 360 V, 75 μ F e $\infty\Omega$ em onda exponencial	Cubeta de 0,2 cm - Pulso de 280 V, 75 μ F e $\infty\Omega$ em onda exponencial
D	Cubeta de 0,4 cm - Pulso de 140 V em onda quadrada	Cubeta de 0,4 cm - Pulso de 110 V em onda quadrada

As condições utilizadas para a eletroporação das células BHK-21 foram as descritas por Karlsson e Liljeström (2003) ou Benmaamar et al. (2009) e no aparelho da BioRad (condição D).

As células transfectadas com esse vetor foram incubadas por 24 horas a 37 °C em estufa com 5% de CO₂. A porcentagem de células fluorescentes foi estimada por contagem visual em microscopia de fluorescência (figura 14).

Figura 14. Porcentagens de células BHK-21 ou HEK293T transfectadas por eletroporação com o vetor pTG13077 que apresentam fluorescência.

As condições A, B, C e D estão descritas na tabela 6.

A análise dos resultados sugere que as melhores condições de eletroporação para cada uma das linhagens celulares é a condição C, descrita na tabela 6, que resultou em aproximadamente 40% das células HEK293T e 50% das células BHK-21 fluorescentes. Esses resultados foram comparados com outros trabalhos desenvolvidos no laboratório e demonstraram que as melhores condições para a produção das pseudopartículas em célula HEK293T foram as condições C e B, nesta ordem.

A partir desses resultados, as co-transfecções para a produção das partículas virais foram realizadas com os protocolos B ou C para as células HEK293T e A ou C para as células BHK-21 dependendo do tamanho da cubeta utilizada para a transfecção.

4.2 Produção das pseudopartículas

Para realizar a produção das pseudopartículas de HCVpp realizamos uma padronização da transfecção utilizando diferentes condições (seção 4.1) e, para produzir as pseudopartículas de SFV, realizamos diferentes transfecções em cubetas diferentes (seção 4.2.2). Uma vez que os sobrenadantes das células foram coletados e filtrados, as pseudopartículas foram armazenadas em alíquotas à -80 °C para posterior quantificação (seção 4.3.2) ou infecção (seção 4.4).

4.2.1 HCVpp-NS3p1a

A padronização da transfecção para produção das pseudopartículas HCVpp-NS3p1a foi realizada a partir de sete co-transfecções dos vetores em diferentes condições, conforme indicado na tabela 7.

Tabela 7. Resumo das co-transfecções para formação de HCVpp-NS3p1a com os agentes de transfecção e tempos de coleta das partículas.

Experimento	Agente de transfecção	Quantidade de DNA	Tempo de coleta
pp-A	Lipofectamine [®]	8,2 µg de pCMV-GAG/POL 2,7 µg de pCMV-E1E2-1a 8,2 µg de pCMV-NS3p1a	48 horas
pp-B	FuGENE [®] HD	8,2 µg de pCMV-GAG/POL 2,7 µg de pCMV-E1E2-1a 8,2 µg de pCMV-NS3p1a	48 horas
pp-C	FuGENE [®] HD	8,2 µg de pCMV-GAG/POL 2,7 µg de pCMV-E1E2-1a 8,2 µg de pCMV-NS3p1a	48 horas
pp-D	Eletroporação (cubeta 0,2 cm)	8,2 µg de pCMV-GAG/POL 2,7 µg de pCMV-E1E2-1a 8,2 µg de pCMV-NS3p1a	48 horas
pp-E	Eletroporação (cubeta 0,2 cm)	8,2 µg de pCMV-GAG/POL 2,7 µg de pCMV-E1E2-1a 8,2 µg de pCMV-NS3p1a	24 e 48 horas
pp-F	Eletroporação (cubeta 0,2 cm)	4,1 µg de pCMV-GAG/POL 1,35 µg de pCMV-E1E2-1a 4,1 µg de pCMV-NS3p1a	24 horas
pp-G	Eletroporação (cubeta 0,2 cm)	4,1 µg de pCMV-GAG/POL 1,35 µg de pCMV-E1E2-1a 4,1 µg de pCMV-NS3p1a	48 horas

Inicialmente as transfecções ocorreram com Lipofectamine[®] Transfection Reagent (Invitrogen[™]) ou FuGENE[®] HD (Promega), seguindo os protocolos de cada um dos modos de transfecção (experimentos pp-A, pp-B e pp-C). Após a análise por RT-PCR (resultados na seção 4.3.1), que sugerem a presença de DNA nas amostras (possivelmente, restante dos vetores transfectados), optamos por realizar novas transfecções, utilizando protocolos de eletroporação mantendo ou não a concentração final de vetor a ser transfectado (experimentos pp-D, pp-E e pp-F). Os resultados do experimento pp-F sugerem que o modo de transfecção e análise havia sido efetivo, decidimos realizar outra transfecção com o mesmo protocolo da última (pp-G).

Os resultados das transfecções utilizando a condição dos experimentos pp-F e pp-G sugerem que esse protocolo, dentre os testados, é o que produziu maior quantidade de pseudopartículas (resultados apresentados no item 4.3.2). Sendo assim, passou a ser utilizado como referência neste trabalho nas transfecções para formação de HCVpp-NS3p1a.

4.2.2 SFV-NS3p1a

Foram realizadas cinco co-transfecções por eletroporação dos mRNAs para a formação das partículas SFV-NS3p1a, conforme as configurações descritas na seção 3.7.2. A tabela 8 resume os experimentos de co-transfecções, o modo de transfecção, a cubeta utilizada e o tempo de coleta das pseudopartículas.

Tabela 8. Resumo das co-transfecções para formação de SFV-NS3p1a com os agentes de transfecção e tempos de coleta das partículas.

Experimento	Agente de transfecção	Tempo de coleta
sfv-A	Eletroporação (cubeta 0,2 cm)	24 e 48 horas
sfv-B	Eletroporação (cubeta 0,2 cm)	24 e 48 horas
sfv-C	Eletroporação (cubeta 0,2 cm)	24 horas
sfv-D	Eletroporação (cubeta 0,2 cm)	24 horas
sfv-E	Eletroporação (cubeta 0,4 cm)	24 horas

Nas primeiras co-transfecções (sfv-A e B) não foi possível detectar o RNA das pseudopartículas por RT-PCR. Os resultados das transfecções sfv-C, D e E sugerem que houve a formação de pseudopartículas e que, ao utilizar a cubeta de 0,4 cm, houve a maior quantidade de vírus produzida. Por conta disso, essa condição passou a ser utilizada como referência neste trabalho para a síntese de SFV-NS3p1a.

4.3 Detecção e quantificação das pseudopartículas

A detecção das partículas produzidas nos dois sistemas foi realizada em quatro etapas. Primeiramente foram extraídos os materiais genéticos contido no sobrenadante das culturas co-transfectadas, em seguida, essas amostras foram tratadas com DNase e então submetida à

síntese de cDNA por transcrição reversa (RT). A última etapa foi a amplificação do gene da NS3p por PCR.

Para que fosse realizada a quantificação das pseudopartículas por PCR em tempo real, foi preciso padronizar o processo de extração, tratamento com DNase e RT. Durante essa padronização foram trocados os kits de extração de RNA viral, DNase e o par de iniciadores das PCRs conforme descrito nas seções seguintes.

4.3.1 PCR

As partículas HCVpp-NS3p1a dos experimentos pp-A, pp-B, pp-C e pp-D (tabela 7) foram extraídas com Invisorb[®] Spin Virus RNA Mini Kit (STRATEC Molecular, Newbury Park, CA, USA), segundo instruções do fabricante. Do volume final obtido da extração, 10 µL foram tratados com DNase (Biolabs, Ipswich, MA, USA) por 50 minutos e, deste tratamento, 7 µL foram aplicados para a transcriptase reversa (RT) com o iniciador NS3p-R (tabela 2).

Após a síntese do cDNA, realizamos uma amplificação por PCR das amostras da extração, do tratamento com DNase e da RT de cada experimento com o par de iniciadores NS3p-R e pTG-F1 (tabela 2). Realizamos, então, uma eletroforese em gel de agarose (figura 15) para analisar as amplificações obtidas das partículas e de seus tratamentos.

Figura 15. Análise em eletroforese dos fragmentos gerados por PCR das amostras das partículas pp-A, pp-B, pp-C e pp-D.

Amplificação da extração (1 - pp-A, 2 - pp-B, 3 - pp-C e 4 - pp-D), amplificação do tratamento com DNase (5 - pp-A, 6 - pp-B, 7 - pp-C e 8 - pp-D), amplificação da RT (9 - pp-A, 10 - pp-B, 11 - pp-C e 12 - pp-D), marcador de peso molecular 100 bp (M) e controle negativo (B).

Podemos notar que na maioria dos tratamentos (extração, DNase e RT) houve amplificação com o tamanho esperado (~280 nt), isso sugere que nessas amostras havia DNA com o gene da NS3 e que o tratamento com DNase não foi eficiente em eliminar parte do DNA usado para transfecção.

Visando eliminar essa contaminação realizamos novos experimentos para obtenção das HCVpp-NS3p1a (pp-E 24h e 48h) e realizamos a produção das partículas SFV-NS3p1a (sfv-A 24h e 48h, sfv-B 24h e 48h). Além disso, realizamos extrações, tratamentos com DNase, transcriptase reversa e amplificação por PCR de cada uma desses tratamentos do mesmo modo descrito anteriormente (figura 16).

Figura 16. Análise em eletroforese dos fragmentos gerados por PCR das amostras das partículas pp-C, pp-D, pp-E24h, pp-E48h, sfv-A24h, sfv-A48h, sfv-B24h e sfv-B48h.

Amplificação da extração (1 - pp-E24h, 2 - pp-E48h, 3 - sfv-A24h, 4 - sfv-A48h, 5 - sfv-B24h e 6 - sfv-B48h), amplificação do tratamento com DNase (7 - pp-E24h, 8 - pp-E48h, 9 - sfv-A24h, 10 - sfv-A48h, 11 - sfv-B24h e 12 - sfv-B48h), amplificação da RT (13 - pp-E24h, 14 - pp-E48h, 15 - sfv-A24h, 16 - sfv-A48h, 17 - sfv-B24h e 18 - sfv-B48h), marcador de peso molecular 100 bp (M) e controle negativo (B).

A partir da análise da eletroforese das amplificações das amostras pp-E24h, pp-E48h, sfv-A24h, sfv-A48h, sfv-B24h e sfv-B48h, acreditamos que a extração do RNA as pseudopartículas ou o tratamento com DNase não ocorreram corretamente, além disso, a amplificação das amostras de RT não parecem indicar que houve a produção de partículas nesses ensaios.

Com a finalidade de confirmar essas hipóteses, realizamos novamente as extrações (com o kit da Qiagen® – QIAamp®), os tratamentos com DNase, as transcrições reversas (com iniciador NS3p1a-521R – tabela 2) e as amplificações (utilizando outros iniciadores: NS3p1a-83F, NS3p1a-152F, NS3p1a-295R e NS3p1a-521R – tabela 2). Entretanto, não obtivemos resultados diferentes dos apresentados.

A partir daí optamos por realizar novas transfeções para a formação de HCVpp-NS3p1a (experimento pp-F) e SFV-NS3p1a (experimento sfv-C), conforme descrito nas tabelas 7 e 8. Essas novas partículas virais foram extraídas com o kit da Qiagen® e 40 µL

dessa extração foi tratado com DNase (InvitrogenTM). Após a quantificação do RNA contido na amostra tratada, 10 ng de RNA foi transcrito reversamente com o iniciador NS3p1a-521R (tabela 2).

Para aumentar a sensibilidade da detecção das partículas virais realizamos uma amplificação (PCR) com os iniciadores externos NS3p1a-83F e NS3p1a-521R (tabela 2) e em sequência uma amplificação interna (Nested PCR) com os iniciadores NS3p1a-152F e NS3p1a-295R (tabela 2). As amplificações das amostras de partículas, extração, tratamento com DNase e RT foram analisadas em eletroforese (figura 17).

Figura 17. Análise em eletroforese dos fragmentos gerados por PCR das amostras das partículas pp-F e sfv-C.

Amplificação da mostra das partículas (1 - pp-F e 2 - sfv-C), amplificação da extração (3 - pp-F e 4 - sfv-C), amplificação do tratamento com DNase (5 - pp-F e 6 - sfv-C), amplificação da RT (7 - pp-F e 8 - sfv-C), marcador de peso molecular 100 bp (M) e controle negativo (B).

A partir da observação dos fragmentos obtidos por PCR e Nested PCR das amostras dos experimentos pp-F e sfv-C, podemos sugerir que houve eficiência na extração, no tratamento com DNase e que pode ser encontrado as partículas virais nos sobrenadantes das células transfectadas. Sendo assim, essas pseudopartículas foram quantificadas por PCR em tempo real (dado apresentado na seção 4.3.2). Contudo, houve uma amplificação inespecífica

de fragmentos na amplificação interna, podendo ser causado por restos de iniciadores da primeira amplificação.

Esse último tratamento com DNase e RT parecem ser os mais adequados para a detecção do RNA contido nas partículas formadas, servindo como referência para a detecção das novas partículas produzidas HCVpp-NS3p1a (experimento pp-G) e SFV-NS3p1a (experimento sfv-D e sfv-E). As amplificações desses experimentos estão apresentadas na figura 18 e indicam que esse tratamento com DNase e RT foi realmente eficiente para analisar nossas amostras de pseudopartículas.

Figura 18. Análise em eletroforese dos fragmentos gerados por PCR das amostras das partículas pp-G, sfv-D e sfv-E.

Amplificação da extração (1 - pp-G; 2 - sfv-D e 3 - sfv-E), amplificação do tratamento com DNase (4 - pp-G; 5 - sfv-D e 6 - sfv-E), amplificação da RT (7 - pp-G; 8 - sfv-D e 9 - sfv-E), marcador de peso molecular 100 bp (M) e controle negativo (B).

4.3.2 *qRT-PCR*

Para a quantificação das pseudopartículas detectadas na seção anterior, as amostras de RT foram amplificadas por *qRT-PCR* com os iniciadores NS3p1a-152F e NS3p1a-295R (tabela 2), juntamente com uma curva padrão de um DNA da NS3p. A figura 19 apresenta os resultados gerados pelo equipamento a cada quantificação.

Figura 19. Gráficos da amplificação em tempo real (qRT-PCR) para quantificação das partículas virais.

Gráficos representativos da amplificação dos fragmentos por ciclo (Curva de Amplificação), da curva padrão em quantidade de moléculas por CT (Curva Padrão) e da curva de denaturação (Curva de Denaturação).

A partir da curva padrão de cada experimento o equipamento pode quantificar as pseudopartículas HCVpp-NS3p1a (pp-F e pp-G) e SFV-NS3p1a (sfv-C, sfv-D e sfv-E)

sugerindo que as mudanças realizadas em cada um dos processos de transfecção resultaram em um aumento da produção de partículas, ou cópias do RNA, por microlitro (figura 20).

Figura 20. Gráfico da quantificação das partículas pp-F, pp-G, sfv-C, sfv-D e sfv-E.

Os valores calculados pelo programa StepOne™ foram corrigidos devido as diluições dos tratamentos aplicados apresentados resultando nos valores apresentados no gráfico.

Apesar dos protocolos de pseudoprodução das partículas sugerirem que as partículas produzidas sejam filtradas em filtros com poros de 0,22 μm ou 0,45 μm para as partículas SFV ou HCVpp, respectivamente (Bartosch et al., 2003b; Liljeström, Garoff, 2001), decidimos verificar se esse processo acarretava em retenção de partículas devido à filtragem. Para isso, realizamos a quantificação das partículas não filtradas e filtradas.

Todo processo de extração, tratamento com DNase, transcrição reversa e quantificação foi realizado do mesmo modo já descrito, a única diferença é que as amostras foram filtradas ou não antes da extração. A figura 21 mostra a quantidade de partículas presentes nas amostras filtradas ou não e diferentemente do previsto, as amostras filtradas apresentaram uma quantidade de 0,5 a 2 logs maiores do que as amostras não filtradas. Acreditamos que isso se deva à presença de restos da cultura celular (como pedaços de membrana, proteínas celulares, material genético, etc.) que podem inibir a reação de extração e transcrição reversa.

Figura 21. Gráfico da quantificação das pseudopartículas HCVpp-NS3p1a e SFV-NS3p1a filtradas ou não.

Os valores calculados pelo programa StepOne™ foram corrigidos devido as diluições dos tratamentos aplicados apresentados resultando nos valores em log apresentados no gráfico.

A fim de verificar a eficácia das partículas formadas, essas foram utilizadas para infecção das células HuH-7 ou BHK-21 (seção 4.4).

4.4 Detecção da expressão da NS3p

Uma vez quantificadas, as partículas HCVpp-NS3p1a foram utilizadas para infectar células HuH-7 e as partículas SFV-NS3p1a para infectar as células BHK-21 com diferentes concentrações de partículas por célula, conforme descrito nas seções 3.9.1 e 3.9.2, respectivamente. Após a infecção, as células foram armazenadas a -80 °C para posterior análise da síntese da NS3p por *dotblotting*.

4.4.1 Produção de anticorpos anti-NS3

Durante a padronização do *dotblotting* para a detecção da NS3p percebemos que o anticorpo primário 1B6 (AdipoGen®) específico para a proteína NS3 e/ou NS3/NS4 do HCV não reconheceu a proteína NS3 (ProSpec) utilizada no controle positivo. Por isso, decidimos que iríamos produzir anticorpos policlonais em camundongo para a NS3 em nosso laboratório para garantir o reconhecimento da proteína expressa pelas células infectadas.

Para produção desses anticorpos policlonais, imunizamos dois camundongos com 300 ng da proteína NS3 num esquema de vacinação nos dias 0, 7 e 21. No 28º dia, os animais foram sacrificados e o soro total foi coletado, inativado, alicotado e armazenado à -20 °C para utilização nas análises de detecção da NS3p.

4.4.2 Dotblotting

A detecção da proteína NS3p expressa pelas células infectadas foi realizada por *dotblotting*. As células infectadas foram lisadas e 100 µL foram aplicados na membrana. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário (anti-NS3p monoclonal ou policlonal). O anticorpo secundário associado com a peroxidase foi incubado na membrana e essa foi revelada com o kit SuperSignal West Pico (Thermo Scientific).

As primeiras análises não resultaram em nenhuma marcação, nem mesmo do controle positivo (proteína NS3 da ProSpec), sugerindo problemas técnicos. Decidimos então testar se o anticorpo primário monoclonal estava sendo reconhecido pelo secundário. Fizemos um *dotblotting* aplicando, além do controle positivo, uma amostra dos anticorpos primários. Nesse ensaio houve a marcação dos anticorpos primários, mas nenhuma outra amostra apresentou marcação.

Resolvemos, então, realizar os ensaios utilizando o anticorpo primário policlonal. Inicialmente testamos o reconhecimento desse anticorpo pelo anticorpo secundário, em seguida testamos com a proteína NS3 controle. Esses testes apresentavam marcações muito fracas, por isso, decidimos mudar a diluição dos anticorpos até encontrar uma combinação mais eficiente.

Com as diluições dos anticorpos definidas em 1:400 para o anticorpo primário policlonal e 1:4000 do anticorpo secundário, seguindo o protocolo apresentado na seção 3.11.1 deste trabalho, realizamos um ensaio com as células HuH-7 infectadas com 1 partícula HCVpp-NS3p1a por célula cultivadas por 48 horas (figura 22).

Figura 22. *Dotblotting* de células HuH-7 infectadas com HCVpp-NS3p1a.

Controle negativo, células HuH-7 não infectadas (A); controle positivo, proteína NS3 (B); e célula HuH-7 infectada com 1 partícula de HCVpp-NS3p1a por célula (C).

Esse resultado sugere que essas partículas foram bem formadas e são capazes de infectar as células hepáticas humanas e induzir a produção da proteína não-estrutural 3 do HCV.

Os ensaios de infecção de células BHK-21 com SFV-NS3p1a apresentaram uma marcação no controle negativo com células não infectadas, portanto, os dados não estão sendo apresentados. Acreditamos que essa marcação pode ser devido a algum anticorpo presente nos camundongos que reconheça proteínas das células BHK-21.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foram construídos os vetores genéticos pCMV-NS3p1a e pSFV-NS3p1a (figuras 8E e 9E). Esses vetores contêm uma porção do gene da protease da NS3 do vírus da hepatite C do genótipo 1a. Após a construção, esses vetores foram utilizados para a produção das pseudopartículas HCVpp-NS3p1a em células HEK293T ou partículas SFV-NS3p1a em células BHK-21.

Para a formação das pseudopartículas HCVpp-NS3p1a, três vetores genéticos (figura 10) foram co-transfectados em células HEK293T, dois deles com genes para estrutura viral e para a polimerase. O terceiro vetor contém o gene da NS3p para ser transcrito e o RNA encapsidado nas partículas.

O processo de transfecção para a formação dessas partículas que foi descrito por Wellnitz et al. (2002) e Bartosch et al. (2003b) foi baseado na utilização de fosfato de cálcio como agente de transfecção, mas as novas tecnologias apresentam vantagens nesse processo e menos efeitos citotóxicos (Abul-Hassan et al., 2000; Nowling et al., 2002). Por isso, decidimos comparar a eficiência da transfecção e formação das partículas HCVpp utilizando três diferentes métodos: lipossomo, polímero não lipídico ou eletroporação.

Nas transfecções com lipossomo ou polímero não lipídico para a formação dessas pseudopartículas foram realizadas conforme indicação dos fornecedores. E quando transfectado por eletroporação foi realizado uma padronização utilizando um plasmídeo o gene da GFP (seção 4.1). Nossos resultados indicam que o melhor método de transfecção das células HEK293T para a formação das HCVpp-NS3p foi utilizando a eletroporação (seção 4.3) em cubetas de 0,2 cm (nas configurações descritas anteriormente na tabela 6). Além de melhor produção das partículas o método de transfecção por eletroporação é mais viável financeiramente do que os métodos com lipossomos ou polímeros não lipídicos (custando cerca de 70% a menos por transfecção, tirando o custo do aparelho).

A formação das partículas baseadas no SFV foi realizada pela co-transfecção dos mRNAs transcritos *in vitro*, de dois vetores genéticos (figura 11), em células BHK-21. Assim como nas pseudopartículas de HCVpp, um dos vetores contém o gene da NS3p que irá ser encapsidado nessas partículas. Contudo, para a formação dessas partículas utilizamos somente co-transfecção por eletroporação, pois segundo Karlsson e Liljeström (2003) e Benmaamar et al. (2009) essa é a forma de transfecção mais eficiente. Ainda assim, realizamos a padronização desse método de transfecção para as células BHK-21 conforme descrito anteriormente (seção 4.1), sugerindo que as melhores condições para a eletroporação dessas

células e formação das pseudopartículas foram as mesmas descritas por Benmaamar et al. (2009) e Rezende (2014).

Em nosso trabalho realizamos a produção de sete lotes de pseudopartículas HCVpp-NS3p1a (tabela 7) e cinco de SFV-NS3p1a (tabela 8). Todos esses lotes foram analisados por RT-PCR e pudemos observar que os lotes pp-A até pp-E, sfv-A e sfv-B apresentaram contaminação com o DNA. É possível que essa contaminação seja devido ao DNA do vetor utilizado no processo de transfecção, que não foi eliminado no tratamento com DNase (figuras 15 e 16).

Algumas mudanças no protocolo de transfecção (com a redução da quantidade de DNA transfectado para a formação das HCVpps), extração (mudança do kit), tratamento com DNase (aumento do volume tratado e volume final) e transcriptase reversa (controle da amostra de RNA para a síntese de cDNA) permitiram a amplificação das amostras com duas PCRs. Como observamos na figura 17, a PCR interna apresentou amplificação de muitos fragmentos, o que pode ter ocorrido devido à presença do iniciador utilizado na primeira PCR, gerando outras bandas não esperadas. Contudo, como as amostras do tratamento com DNase não apresentaram nenhuma amplificação, pudemos inferir que conseguimos detectar o RNA presente nas amostras das partículas de HCVpp-NS3p1a (pp-F) e SFV-NS3p1a (sfv-C). E em seguida, com os mesmos protocolos pudemos detectar as partículas pp-G, sfv-D e sfv-F (figura 18).

Além de detectar as partículas analisamos também a influência da filtragem na quantificação das partículas produzidas. Nossos resultados (figura 21) sugerem que o processo de filtragem apresenta um ganho na qualidade das pseudopartículas formadas, possivelmente, devido à eliminação de elementos que possam prejudicar a extração ou transcrição reversa do material genético das partículas. É possível ainda que esse processo elimine fatores que também possam influenciar na capacidade infectiva dessas pseudopartículas.

As amostras das partículas virais geradas após as co-transfecções e detectadas por RT-PCR foram quantificadas por RT-PCR em tempo real utilizando o gene da NS3p como alvo da amplificação. Nossos melhores resultados indicam que obtivemos aproximadamente 400 partículas/ μL de HCVpp-NS3p1a e $2,5 \times 10^4$ partículas/ μL de SFV-NS3p1a (figura 20). Essas quantidades são inferiores às de outros grupos, uma vez que já foram relatados por Sharma e colaboradores (2011) a obtenção de 3×10^4 partículas de HCVpp por microlitro e, por Puglia e colaboradores (2013), de 8×10^5 partículas de SFV recombinante por microlitro.

Notamos que a produção de partículas baseadas no SFV foi levemente menor ao encontrado em trabalhos com diferentes proteínas (Benmaamar et al., 2009; Puglia et al., 2013; Rezende, 2014), com variação de 1 log. Apesar dessa diferença acreditamos que ainda podemos melhorar as condições e atingir quantidades virais mais próximas às encontradas por outros pesquisadores.

Entretanto, a comparação entre as quantidades de pseudopartículas HCVpp que nós produzimos com os outros trabalhos deve ser realizada com cautela, pois as metodologias de quantificação são muito diferentes. Nossa metodologia de quantificação das pseudopartículas por qRT-PCR é pouco utilizada nas publicações, essas em grande parte realizam quantificações por estimativa a partir de efeitos citológicos ou pela presença de proteínas na superfície das partículas virais (Sharma et al., 2011; Wen et al., 2013). Acreditamos que ao quantificar o gene da NS3p no RNA presente nas partículas pode-se realizar infecções mais controladas em relação à expressão da proteína heteróloga, favorecendo a resposta imune desejada uma vez que sabemos a quantidade de cópias do material genético estaremos utilizando por célula.

A fim de verificar a expressão da NS3p por células HuH-7.0 ou BHK-21 realizamos infecções dessas células pelas pseudopartículas produzidas de acordo com uma quantidade de partículas por células conforme descrito na seção 3.9. A análise da expressão foi realizada por imuno ensaios de *dotblotting* utilizando anticorpos monoclonais ou policlonais. Nesses ensaios utilizamos a proteína NS3 da ProSpec como controle positivo e células não infectadas como controle negativo.

Tivemos algumas dificuldades na padronização dessa técnica, pois as amostras positivas não estavam sendo reconhecidas pelo anticorpo primário monoclonal (seção 4.4). Por isso, decidimos trabalhar com anticorpo primário policlonal (produzidos no laboratório conforme descrito na seção 4.4.1) na diluição de 1:400 e diluindo a proteína controle no tampão de lise. Após essas mudanças, conseguimos marcar o controle positivo e, com isso, passar para analisar a expressão da NS3p produzida pelas células infectadas.

A expressão da NS3p das células HuH-7.0 infectadas com as pseudopartículas HCVpp-NS3p1a e das células BHK-21 infectadas com as pseudopartículas SFV-NS3p1a foram detectadas por *dotblotting*, indicando que as pseudopartículas foram capazes de entregar o RNA à célula infectada. Entretanto, não foi possível a detecção da NS3p expressa pelas células BHK-21 infectadas com as partículas SFV-NS3p1a, pois houve marcação no controle negativo com células não infectadas. Possivelmente ocorreu algum reconhecimento

inespecífico do anticorpo primário com as proteínas presentes nas células BHK-21, o que não nos permitiu detectar a expressão da NS3p a partir da infecção com SFV-NS3p1a.

É possível que essas partículas SFV-NS3p1a induzam a expressão da NS3p em cultura de células uma vez que outras construções de pseudopartículas de SFV demonstraram altos níveis de expressão das proteínas heterólogas (Puglia et al., 2013). Assim, nossa construção poderá ser testada para infectar células HuH-7.0 e a expressão da NS3p, possivelmente, poderá ser detectada através de imuno ensaios.

Portanto, podemos inferir que nossas pseudopartículas foram construídas de modo a serem capazes de induzir uma expressão heteróloga do gene da proteína não estrutural 3 que está no genoma dessas partículas. Acreditamos que essa expressão seja capaz de mimetizar uma infecção viral e induzir uma resposta imune celular.

Alguns estudos utilizando diferentes técnicas demonstraram que a expressão de algumas proteínas não estruturais do vírus da hepatite C, dentre elas a NS3, é capaz de induzir uma resposta celular adequada ao combate da infecção viral. Esses estudos utilizam diferentes técnicas para chegar a esse resultado, como a administração oral de bactérias modificadas, o uso de partículas virais, ou vacinas de DNA (Honegger et al., 2014; Takei et al., 2014; Yu et al., 2014; Zingaretti et al., 2014).

Esses estudos ganham muita importância, pois atualmente há uma preocupação crescente com o desenvolvimento de vacinas para a hepatite C. Isso se deve ao crescimento dos números de infectados e dos gastos governamentais nos últimos anos. Alguns tratamentos com drogas mais específicas e seguras apresentam custo quase quatro vezes maior do que o tratamento padrão com α -interferon e ribavirina, que é de aproximadamente 20.000 dólares por ano por paciente (Verma et al., 2014). Com isso, algumas vacinas estão entrando em testes clínicos, dentre elas algumas a partir de vírus recombinantes que apresentam em seu genoma a proteína NS3, ou parte dela em combinação ou não com outras proteínas virais (Honegger et al., 2014; Zingaretti et al., 2014).

Nesse direcionamento de vacinas, a proteína NS3 vem sendo utilizada para gerar resposta imune celular. Kuhs et al. (2012) e Wen et al. (2013), demonstraram que proteína NS3, associada ou não com a NS4 do HCV, foi capaz de induzir uma resposta mediada por células T_{CD8+} utilizando vírus recombinante ou vacina de DNA para a expressão em primatas. Em outra abordagem Ip et al. (2014) demonstraram que vacinas baseadas no alfavírus (SFV) com proteínas não estruturais do vírus da hepatite C, inclusive a NS3, são capazes de induzir uma resposta eficiente e protetiva mediada por células T em camundongos.

Em contraponto, o estudo de Wen et al. (2013) utilizando uma pseudopartícula de HCV que também continha em seu genoma a NS3, demonstra que essa HCVpp não apresentava um estímulo ao sistema imune celular semelhante aos outros vírus recombinantes utilizados para imunização dos macacos. Mas o sistema foi capaz de induzir uma resposta celular às proteínas de superfície presentes.

Dentro da possibilidade dos dois sistemas terem a capacidade de induzir a expressão da proteína não estrutural 3 do HCV por células de mamíferos, podemos sugerir que esses sistemas seriam bons candidatos para uma indução de uma resposta imune celular persistente, mas ainda precisam ser melhor estudados.

6 CONCLUSÃO

Realizamos a construção dos vetores pCMV-NS3p1a e pSFV-NS3p1a a partir da clonagem do gene da NS3p sintetizado nos vetores pTG13077, do qual foi removido o gene da GFP, e pSFV2genC. Esses vetores foram utilizados para a formação das pseudopartículas HCVpp-NS3p1a e SFV-NS3p1a.

Estabelecemos um protocolo para eletroporação das células HEK293T utilizando o vetor pTG13077 para síntese da proteína fluorescente como repórter. A partir dos resultados, sugerimos como melhores condições de transfecção a realização de dois pulsos elétricos em onda exponencial com 280V, 75 μ F e resistência infinita em cubetas de 0,2 cm. Quando usando cubetas de 0,4 cm as melhores condições se deram em onda exponencial com 650V, 25 μ F e resistência infinita.

Produzimos as pseudopartículas através de sistema utilizando a eletroporação de três vetores de DNA ou de dois de RNA para a formação das HCVpp-NS3p1a e SFV-NS3p1a, respectivamente. Para detectar a formação das partículas, tivemos que padronizar os métodos de detecção por RT-PCR, utilizando um kit de extração de RNA viral seguido do tratamento com DNase para eliminação de qualquer DNA restante da transfecção. Então, as amostras eram transcritas reversamente e o cDNA da NS3p foi amplificado por PCR.

Desenvolvemos ainda uma metodologia para quantificar as partículas formadas por amplificação em tempo real do gene de interesse a partir do cDNA e comparado com uma curva padrão preparada com um dos vetores construídos neste trabalho. Desta forma, detectamos a quantidade de RNA presente nas amostras de sobrenadante das células co-transfectadas, podendo inferir a quantidade de partículas presentes por volume.

Preparamos anticorpos policlonais para a detecção da proteína NS3 pela imunização de camundongos com essa proteína. O soro dos animais foi inativado e armazenado para a realização de imunoenaios.

Induzimos a expressão da NS3p em células HuH-7 pela infecção com as pseudopartículas HCVpp-NS3p1a e detectamos essa proteína por *dotblotting* utilizando os anticorpos monoclonais produzidos no trabalho.

A partir dos resultados desse trabalho e em colaboração com outros trabalho do grupo de pesquisa, elaboramos um manuscrito intitulado: “Production and quantification of pseudoparticles of SFV and HCVpp containing a portion of the HCV NS3 gene” que será submetido à publicação.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. 576 p.
- Abul-Hassan K, Walmsley R, Boulton M. Optimization of non-viral gene transfer to human primary retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res*. 2000;20(5):361–6.
- Alavian S-M, Mahboobi N, Mahboobi N, Karayiannis P. Oral conditions associated with hepatitis C virus infection. *Saudi J Gastroenterol*. 2013;19(6):245–51.
- Alvarez-Uria G, Day JN, Nasir AJ, Russell SK, Vilar FJ. Factors associated with treatment failure of patients with psychiatric diseases and injecting drug users in the treatment of genotype 2 or 3 hepatitis C chronic infection. *Liver Int*. 2009;29(7):1051–5.
- Alvarez-Uria G, Day JN, Nasir AJ, Russell SK, Vilar FJ. Reduction in neutrophil count during hepatitis C treatment: drug toxicity or predictor of good response? *Dig Sci*. 2010;55(7):2058–62.
- Arnaud N, Dabo S, Maillard P, Budkowska A, Kalliampakou KI, Mavromara P, et al. Hepatitis C virus controls interferon production through PKR activation. *PLoS One*. 2010;5(5):e10575.
- Ashfaq UA, Khan SN, Nawaz Z, Riazuddin S. In-vitro model systems to study Hepatitis C Virus. *Genet Vaccines Ther*. 2011;9:7.
- Atkins GJ, Sheahan BJ, Liljeström P. The molecular pathogenesis of Semliki Forest virus: a model virus made useful? *J Gen Virol*. 1999;80(9):2287–97.
- Baldick CJ, Wichroski MJ, Pendri A, Walsh AW, Fang J, Mazzucco CE, et al. A novel small molecule inhibitor of hepatitis C virus entry. *PLoS Pathog*. 2010;6(9):e1001086.
- Bartosch B, Bukh J, Meunier JC, Granier C, Engle RE, Blackwelder WC, et al. In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003a;100(24):14199–204.
- Bartosch B, Cosset F. Cell entry of hepatitis C virus. *Virology*. 2006;348(1):1–12.
- Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1–E2 envelope protein complexes. *J Exp Med*. 2003b;197(5):633–42.
- Bartosch B, Vitelli A, Granier C, Goujon C, Dubuisson J, Pascale S, et al. Cell entry of hepatitis c virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem*. 2003c;278(43):41624–30.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

- Bartoschek S, Buurman G, Geierstanger BH, Lapham J, Griesinger C. Measurement and ab initio calculation of CSA/dipole–dipole cross-correlated relaxation provide insight into the mechanism of a H₂-forming dehydrogenase. *J Am Chem Soc.* 2003;125(44):13308–9.
- Baumert T, Ito S, Wong D, Liang T. Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *J Virol.* 1998;72(5):3827–36.
- Benmaamar R, Astray RM, Wagner R, Pereira CA. High-level expression of rabies virus glycoprotein with the RNA-based Semliki Forest Virus expression vector. *J Biotechnol.* 2009;139(4):283–90.
- Berger A, Giroglou T, Leutz A, Ogbomo H, Pfaff K, Teuber G, et al. Measurements of HCV neutralizing antibodies and of HCV-specific CD4⁺ and CD8⁺ cells using hepatitis C virus pseudo-particles (HCVpp). *J Clin Virol.* 2009;46(1):55–60.
- Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979;7(6):1513–23.
- Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science.* 2000;290(5498):1972–4.
- Brinster C, Inchauspé G. DNA vaccines for hepatitis C virus. *Intervirology.* 2001;44(2-3):143–53.
- Brinster C, Muguet S, Lone Y, Boucreux D, Renard N, Fournillier A, et al. Different hepatitis C virus nonstructural protein 3 (Ns3)-DNA-expressing vaccines induce in HLA-A2.1 transgenic mice stable cytotoxic T lymphocytes that target one major epitope. *Hepatology.* 2001;34(6):1206–17.
- Buonocore L, Blight KJ, Rice CM, Rose JK. Characterization of vesicular stomatitis virus recombinants that express and incorporate high levels of hepatitis C virus glycoproteins. *J Virol.* 2002;76(14):6865–72.
- Buratti E, Gerotto M, Pontisso P, Alberti A, Tisminetzky SG, Baralle FE. In vivo translational efficiency of different hepatitis C virus 5'-UTRs. *FEBS Lett.* 1997;411(2–3):275–80.
- Carapuça E, Azzoni AR, Prazeres DMF, Monteiro GA, Mergulhão FJM. Time-course determination of plasmid content in eukaryotic and prokaryotic cells using Real-Time PCR. *Mol Biotechnol.* 2007;37(2):120–6.
- Castet V, Moradpour D. A model for the study of hepatitis C virus entry. *Hepatology.* 2003;38(3):771–4.
- Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol.* 1990;44(1):649–88.
- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science.* 1989;244(4902):359–62.

- Chou R, Cottrell EB, Wasson N, Rahman B, Guise J-M. Screening for hepatitis C virus infection in adults. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2012 Nov p. 19. Report No.: 69.
- Chou R, Hartung D, Rahman B, Wasson N, Cottrell EB, Fu R. Comparative effectiveness of antiviral treatment for hepatitis C virus infection in adults: a systematic review. *Ann Intern Med*. 2013;158(2):114–23.
- Coelho DL, Miyazaki MC de OS, Domingos NAM, Scamardi SN, Machado CM, Junior S, et al. Tratamento da hepatite C: impacto sobre o cuidador. *Rev Bras Ter Cogn*. 2011;7(2):32–6.
- Coller K, Berger K, Heaton N, Cooper J, Yoon R, Randall G. RNA interference and single particle tracking analysis of hepatitis C virus endocytosis. *PLoS Pathog*. 2009;5(12):e1000702.
- Deleersnyder V, Pillez A, Wychowski C, Blight K, Xu J, Hahn YS, et al. Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J Virol*. 1997;71(1):697–704.
- Dreux M, Dao Thi V, Fresquet J, Guérin M, Julia Z, Verney G, et al. Receptor complementation and mutagenesis reveal SR-BI as an essential HCV entry factor and functionally imply its intra- and extra-cellular domains. *PLoS Pathog*. 2009;5(2):e1000310.
- Dubuisson J, Helle F, Cocquerel L. Early steps of the hepatitis C virus life cycle. *Cell Microbiol*. 2008;10(4):821–7.
- Earnshaw WC, Pollard TD. *Biologia celular*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006. 928 p.
- Eifler N, Duckely M, Sumanovski LT, Egan TM, Oksche A, Konopka JB, et al. Functional expression of mammalian receptors and membrane channels in different cells. *J Struct Biol*. 2007;159(2):179–93.
- European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 2014;60(2):392–420.
- Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res*. 1998;8(3):186–94.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res*. 1998;8(3):175–85.
- Flint M, McKeating JA. The C-terminal region of the hepatitis C virus E1 glycoprotein confers localization within the endoplasmic reticulum. *J Gen Virol*. 1999;80(8):1943–7.
- Flint M, Thomas JM, Maidens CM, Shotton C, Levy S, Barclay WS, et al. Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J Virol*. 1999;73(8):6782–90.
- Ghany MG, Nelson DR, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB, American Association for Study of Liver Diseases. An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2011;54(4):1433–44.

- Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB, American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: An update. *Hepatology*. 2009;49(4):1335–74.
- Glasgow GM, McGee MM, Tarbatt CJ, Mooney DA, Sheahan BJ, Atkins GJ. The Semliki Forest virus vector induces p53-independent apoptosis. *J Gen Virol*. 1998;79 (Pt 10):2405–10.
- Gordon D, Abajian C, Green P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res*. 1998;8(3):195–202.
- Greive SJ, Webb RI, Mackenzie JM, Gowans EJ. Expression of the hepatitis C virus structural proteins in mammalian cells induces morphology similar to that in natural infection. *J Viral Hepat*. 2002;9(1):9–17.
- Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 1983;166(4):557–80.
- Harlow E, Lane D. *Antibodies: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1988. 748 p.
- Hassaine G, Wagner R, Kempf J, Cherouati N, Hassaine N, Prual C, et al. Semliki Forest virus vectors for overexpression of 101 G protein-coupled receptors in mammalian host cells. *Protein Expr Purif*. 2006;45(2):343–51.
- Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Shimotohno K. Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88(13):5547–51.
- Honegger JR, Zhou Y, Walker CM. Will there be a vaccine to prevent HCV infection? *Semin Liver Dis*. 2014;34(1):79–88.
- Imbert I, Dimitrova M, Wolf M, Schuster C. Réplication du virus de l'hépatite C: systèmes d'étude, avantages et limites. *Virologie*. 2004;8(4):281–95.
- Ip PP, Boerma A, Regts J, Meijerhof T, Wilschut J, Nijman HW, et al. Alphavirus-based vaccines encoding nonstructural proteins of Hepatitis C virus induce robust and protective T cell responses. *Mol Ther*. 2014;22(4):881–90.
- Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, Konishi M, et al. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol*. 1994;75(7):1755–60.
- Kamoshita N, Tsukiyama-Kohara K, Kohara M, Nomoto A. Genetic analysis of internal ribosomal entry site on hepatitis C virus RNA: implication for involvement of the highly ordered structure and cell type-specific transacting factors. *Virology*. 1997;233(1):9–18.
- Karlsson GB, Liljeström P. Live Viral Vectors. In: Robinson A, Hudson MJ, Cranage MP, editors. *Vaccine Protoc*. Humana Press; 2003. p. 69–81.

- Kuhs KAL, Ginsberg AA, Yan J, Wiseman RW, Khan AS, Sardesai NY, et al. Hepatitis C virus NS3/NS4A DNA vaccine induces multiepitope T cell responses in rhesus macaques mimicking human immune responses [corrected]. *Mol Ther*. 2012;20(3):669–78.
- Lagging LM, Meyer K, Owens RJ, Ray R. Functional role of hepatitis C virus chimeric glycoproteins in the infectivity of pseudotyped virus. *J Virol*. 1998;72(5):3539–46.
- Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(2):107–15.
- Liljeström P, Garoff H. A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Nat Biotech*. 1991a;9(12):1356–61.
- Liljeström P, Garoff H. Internally located cleavable signal sequences direct the formation of Semliki Forest virus membrane proteins from a polyprotein precursor. *J Virol*. 1991b;65(1):147–54.
- Liljeström P, Garoff H. Expression of proteins using Semliki Forest virus vectors. In: Ausubel FM, editor. *Curr. Protoc. Mol. Biol*. 2001. p. 1–16.
- Lindenbach BD, Rice CM. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virol*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers; 2001. p. 991–1042.
- Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*. 1999;285(5424):110–3.
- Los Alamos National Security. CTL Epitope Summary [Internet]. HCV Immunology Database. 2012 [cited 2013 Nov 19]. Available from: http://hcv.lanl.gov/content/immuno/tables/ctl_summary.html
- Lundstrom K. Alphavirus vectors for vaccine production and gene therapy. *Expert Rev Vaccines*. 2003;2(3):445–59.
- Mackett M. Vaccination and Gene Manipulation. *Mol. Biol. Biotechnol*. 4th ed. Royal Society of Chemistry; 2000. p. 317–55.
- Mancini N, Diotti RA, Perotti M, Sautto G, Clementi N, Nitti G, et al. Hepatitis C virus (HCV) infection may elicit neutralizing antibodies targeting epitopes conserved in all viral genotypes. *PloS One*. 2009;4(12):e8254.
- Mehta B, Kumar V, Chawla S, Jindal H, Bhatt B. Hepatitis C: Is a vaccine the solution? *Hum. Vaccines Immunother*. 2013;10(3).
- Mello I, Thumann C, Schvoerer E, Soulier E, Pinho J, Silvestre D, et al. Conservation of hepatitis C virus nonstructural protein 3 amino acid sequence in viral isolates during liver transplantation. *J Viral Hepat*. 2009;16(10):732–7.
- Meunier J, Engle R, Faulk K, Zhao M, Bartosch B, Alter H, et al. Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(12):4560–5.

- Mihailova M, Boos M, Petrovskis I, Ose V, Skrastina D, Fiedler M, et al. Recombinant virus-like particles as a carrier of B- and T-cell epitopes of hepatitis C virus (HCV). *Vaccine*. 2006;24(20):4369–77.
- Nègre D, Mangeot PE, Duisit G, Blanchard S, Vidalain PO, Leissner P, et al. Characterization of novel safe lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) that efficiently transduce mature human dendritic cells. *Gene Ther*. 2000;7(19):1613–23.
- Nowling T, Desler M, Kuszynski C, Rizzino A. Transfection of embryonal carcinoma cells at high efficiency using liposome-mediated transfection. *Mol Reprod Dev*. 2002;63(3):309–17.
- Owsianka A, Clayton R, Loomis-Price L, McKeating J, Patel A. Functional analysis of hepatitis C virus E2 glycoproteins and virus-like particles reveals structural dissimilarities between different forms of E2. *J Gen Virol*. 2001;82(Pt 8):1877–83.
- Pawlotsky J-M, Chevaliez S, McHutchison JG. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology*. 2007;132(5):1979–98.
- Pereira GFM. Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais [Internet]. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais; 2012. Report No.: 1 - Ano III. Available from: http://www.aids.gov.br/publicacao/2012/boletim_de_hepatites_virais_2012
- Peres-da-Silva A, Almeida AJ, Lampe E. Genetic diversity of NS3 protease from brazilian HCV isolates and possible implications for therapy with direct-acting antiviral drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(2):254–61.
- Ploss A, Evans MJ. Hepatitis C virus host cell entry. *Curr Opin Virol*. 2012;2(1):14–9.
- Puglia ALP, Rezende AG, Jorge SAC, Wagner R, Pereira CA, Astray RM. Quantitative RT-PCR for titration of replication-defective recombinant Semliki Forest virus. *J Virol Methods*. 2013;193(2):647 – 652.
- Rezende AG de. Avaliação da expressão gênica em células de mamíferos utilizando o Semliki Forest vírus [Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.
- Riezebos-Brilman A, Regts J, Freyschmidt E-J, Dontje B, Wilschut J, Daemen T. Induction of human papilloma virus E6/E7-specific cytotoxic T-lymphocyte activity in immune-tolerant, E6/E7-transgenic mice. *Gene Ther*. 2005;12(18):1410–4.
- Rollier C, Verschoor EJ, Paranhos-Baccala G, Drexhage JA, Verstrepen BE, Berland JL, et al. Modulation of vaccine-induced immune responses to hepatitis C virus in rhesus macaques by altering priming before adenovirus boosting. *J Infect Dis*. 2005;192(5):920–9.
- Sakai A, Claire MS, Faulk K, Govindarajan S, Emerson SU, Purcell RH, et al. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(20):11646–51.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74(12):5463–7.

- Sharma NR, Mateu G, Dreux M, Grakoui A, Cosset F-L, Melikyan GB. Hepatitis C virus is primed by CD81 protein for low pH-dependent fusion. *J Biol Chem*. 2011;286(35):30361–76.
- Shukla AK, Haase W, Reinhart C, Michel H. Functional overexpression and characterization of human bradykinin subtype 2 receptor in insect cells using the baculovirus system. *J Cell Biochem*. 2006;99(3):868–77.
- Shukla AK, Haase W, Reinhart C, Michel H. Heterologous expression and comparative characterization of the human neuromedin U subtype II receptor using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(5):931–42.
- Shukla DD, Hoyne PA, Ward CW. Evaluation of complete genome sequences and sequences of individual gene products for the classification of hepatitis C viruses. *Arch Virol*. 1995;140(10):1747–61.
- Sillanpää M, Melén K, Porkka P, Fagerlund R, Nevalainen K, Lappalainen M, et al. Hepatitis C virus core, NS3, NS4B and NS5A are the major immunogenic proteins in humoral immunity in chronic HCV infection. *Virol J*. 2009;6:84.
- Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on. *J Gen Virol*. 2004;85(11):3173–88.
- Smith DB, Mellor J, Jarvis LM, Davidson F, Kolberg J, Urdea M, et al. Variation of the hepatitis C virus 5' non-coding region: implications for secondary structure, virus detection and typing. The International HCV Collaborative Study Group. *J Gen Virol*. 1995;76 (Pt 7):1749–61.
- Smithburn KC, Haddow AJ. Semliki Forest Virus I. Isolation and Pathogenic Properties. *J Immunol*. 1944;49(3):141–57.
- Stoll-Keller F, Barth H, Fafi-Kremer S, Zeisel MB, Baumert TF. Development of hepatitis C virus vaccines: challenges and progress. *Expert Rev Vaccines*. 2009;8(3):333–45.
- Stramer SL. Current risks of transfusion-transmitted agents: a review. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131(5):702–7.
- Sy T, Jamal MM. Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci*. 2006;3(2):41–6.
- Takei S, Omoto C, Kitagawa K, Morishita N, Katayama T, Shigemura K, et al. Oral administration of genetically modified *Bifidobacterium* displaying HCV-NS3 multi-epitope fusion protein could induce an HCV-NS3-specific systemic immune response in mice. *Vaccine*. 2014;32(25):3066–74.
- The C. Everett Koop Institute. Hepatitis C :: The Facts : Therapy for hepatitis C [Internet]. *Hepat. C Endem. Anyone*. 2014 [cited 2014 Jan 19]. Available from: <http://www.epidemic.org/theFacts/therapy/>
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 1997;25(24):4876–82.

- Triyatni M, Saunier B, Maruvada P, Davis A, Ulianich L, Heller T, et al. Interaction of hepatitis C virus-like particles and cells: a model system for studying viral binding and entry. *J Virol*. 2002;76(18):9335–44.
- Umlauf F, Wong DT, Oefner PJ, Underhill PA, Cheung RC, Wright TL, et al. Hepatitis C virus detection by single-round PCR specific for the terminal 3' noncoding region. *J Clin Microbiol*. 1996;34(10):2552–8.
- Verma R, Khanna P, Chawla S. Hepatitis C vaccine: Need of the hour. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(8):0–1.
- Vidalin O, Fournillier A, Renard N, Chen M, Depla E, Boucreux D, et al. Use of conventional or replicating nucleic acid-based vaccines and recombinant Semliki forest virus-derived particles for the induction of immune responses against hepatitis C virus core and E2 antigens. *Virology*. 2000;276(2):259–70.
- Wahlfors J, Morgan RA. Minigene-containing retroviral vectors using an alphavirus/retrovirus hybrid vector system. Production and use. *Methods Mol Med*. 2002;69:173–86.
- Wellnitz S, Klumpp B, Barth H, Ito S, Depla E, Dubuisson J, et al. Binding of hepatitis C virus-like particles derived from infectious clone H77C to defined human cell lines. *J Virol*. 2002;76(3):1181–93.
- Wen B, Deng Y, Chen H, Guan J, Chuai X, Ruan L, et al. The novel replication-defective vaccinia virus (Tiantan strain)-based hepatitis C virus vaccine induces robust immunity in Macaques. *Mol Ther*. 2013;21(9):1787–95.
- Wikimedia Foundation, editor. Hepatitis C virus [Internet]. Wikipedia Free Encycl. 2014 [cited 2014 Jul 3]. Available from: http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Hepatitis_C_virus&oldid=610679291
- World Health Organization. Hepatitis C [Internet]. WHO. 2002 [cited 2014 Jan 19]. Available from: <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whodcscrlyo2003/en/index.html>
- World Health Organization. Hepatitis C Fact sheet N°164 [Internet]. WHO. 2013 [cited 2014 Jan 18]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>
- Yu W, Grubor-Bauk B, Gargett T, Garrod T, Gowans EJ. A novel challenge model to evaluate the efficacy of hepatitis C virus vaccines in mice. *Vaccine*. 2014;32(27):3409–16.
- Zhao W, Liao G, Jiang Y, Jiang S. No requirement of HCV 5'NCR for HCV-like particles assembly in insect cells. *World J Gastroenterol*. 2003;9(10):2226–31.
- Zhao W, Liao G, Jiang Y, Jiang S. Expression and self-assembly of HCV structural proteins into virus-like particles and their immunogenicity. *Chin Med J Engl*. 2004;117(8):1217–22.
- Zhao YM, Chen X, Sun H, Yuan ZG, Ren GL, Li XX, et al. Effects of histone deacetylase inhibitors on transcriptional regulation of the hsp70 gene in *Drosophila*. *Cell Res*. 2006;16(6):566–76.

Zingaretti C, De Francesco R, Abrignani S. Why is it so difficult to develop a hepatitis C virus preventive vaccine? *Clin Microbiol Infect.* 2014;20:103–9.

Zusinaite E, Tints K, Kiiver K, Spuul P, Karo-Astover L, Merits A, et al. Mutations at the palmitoylation site of non-structural protein nsP1 of Semliki Forest virus attenuate virus replication and cause accumulation of compensatory mutations. *J Gen Virol.* 2007;88(Pt 7):1977–85.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Sequenciamento da NS3p no vetor pCMV-NS3p1a

pCMV-NS3p1a Região sequenciada	10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 GCGGCCGCTCAATATTGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAAATGTACATTATATTGGCTCATGTCCAACTTACCGCATGTTGAC
pCMV-NS3p1a Região sequenciada	110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 ATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGTTCATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCCGCTTACATAACTTACGGTAAATGGCCC
pCMV-NS3p1a Região sequenciada	210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 GCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATTAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGAGCTTTCCATTGACGTCAATGGGTG
pCMV-NS3p1a Região sequenciada	310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 GAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGC
pCMV-NS3p1a Região sequenciada	410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 ATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCCTACTTGGCAGTACATCTACGTTATTAGTTCATCGCTATTACCATGGTGTATCGGGTTTGGCAGTACAT
pCMV-NS3p1a Região sequenciada	510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 CAATGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGCCACCAAAATCAACGGGACTTT
pCMV-NS3p1a Região sequenciada	610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 CCAAAAATGTCGTAACTCCGCCCATTTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAGGCGCGCCA
pCMV-NS3p1a Região sequenciada	710 720 730 740 750 760 770 780 790 800 GTCCCTCCGATAGACTGAGTCGCCCGGGTACCGGTGTATCCAATAAATCCTCTTGCTGTTGCATCCGACTCGTGGTCTGCTGTTCCCTTGGGAGGGTCTCC
pCMV-NS3p1a Região sequenciada	810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 TCAGAGTGATTGACTACCCGTCTCGGGGTCTTTCAATTTGGGGGTCTGTCGGGATCGGGAGACCCCTGCCCGGGACCAACCCAGCCACCACCGGAGGC
pCMV-NS3p1a Região sequenciada	910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000 AAGCCGGCGCGCTTTGTCTGTGTGTGTTGTCTTGTCTGTGAACGATGATCAATAGGCTCAGATCTGGGGACTATCTGGCGGGCCAGAGAGGAGC
pCMV-NS3p1a Região sequenciada	1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100 TGACGAGCTCGGACTTCTCCCCCGACCCCTGGAAGACGTTCCAAGGTTGGTTGGAGGAGAGGAGATCCGGATCCGTGGCACCTCCGTCCGTTTTCGGA
pCMV-NS3p1a Região sequenciada	1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 GGGATCCGCAACCCTTGATGACTCCGTCTGAATTTTGTGTTTCAGTTTGGTACCGAAGCTGCGCGGCGCGCTGCTTGTACTTGTGTTGACTGTTGGAATTG
pCMV-NS3p1a Região sequenciada	1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 TTTGTCTTCTTTGTGACCTGACTGTGGTTTTCTGGACGTGTTGTGTCTGTTAGTGTCTTTTGTGACTTTTGTTCGTGTTGAAATTTGGACTGACGACTGT
pCMV-NS3p1a Região sequenciada	1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400 GTTTAAATCTTAGACCGACGACTGTGTTTGAATCATGAACTGTTTGTCTTCGTCGAAGAGTTTACTTGTCCCTTAACGCTTAGTGAGTAAG
pCMV-NS3p1a Região sequenciada	1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500 AAACTTAATTTTGTAGACCCCGCTTAGTGGCAGTGTGTTGGTTGATAGCCAAAGTTAATTTTAAATCATAGTGTTTTGGGGGTGAAGCTCATTTAAA
pCMV-NS3p1a Região sequenciada	1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600 TAAGCTTCGAATTCTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCC
pCMV-NS3p1a Região sequenciada	1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700 CGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATTAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGAGCTTTCCATTGACGTCAATGGGT
pCMV-NS3p1a Região sequenciada	1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800 GGAGTATTTACGGTAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGG

APÊNDICES

pCMV-NS3pla Região sequenciada	1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900 CATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATCGGGTTTGGCAGTACA
pCMV-NS3pla Região sequenciada	1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000 TCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCAGCGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAGAAATCAACGGGACTT
pCMV-NS3pla Região sequenciada	2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100 TCCAAATGTCTGTAACTCCGCCCATTTGACGCAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAG
pCMV-NS3pla Região sequenciada	2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200 ATCCAGCTGGCTACCGGTGCCACCATGGCCCCCATCAGCGCTACGCCAGCAGACAAGAGGCCTGCTGGGCTGCATCATCACCAGCCTGACCGGCAGAG
pCMV-NS3pla Região sequenciada	2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300 ACAAGAACCCAGGTGGAAGGCGAGGTGCAGATCGTGTCTACAGCGCCCGACACCTTCCTGGCCACCTGTATCAACGGCGTGTGCTGGACCGTGTACACCGG
pCMV-NS3pla Região sequenciada	2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400 CGCTGGCACCCGGACAATCGCCAGCAGCAGAGGGCCCCGTGATCCAGATGTACACCAACGTGGACCAGGACCTGGTGGGATGGCCTGCCCTCAGGGCGCC
pCMV-NS3pla Região sequenciada	2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500 AGAAGCCTGACCCCTTGCACCTGTGGCAGCAGCGACCTGTACCTGGTGACACGGCACGCCGACGTGATCCCCGTGCGGAGAAGAGGCGACGGCAGAGGCA
pCMV-NS3pla Região sequenciada	2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600 GCCGTGCTGAGCCCCAGACCATCAGCTACCTGAAGGGCAGCAGCGCGGACCTCTGCTGTGTCTCTGCCGGACATGCGCTGGGCATCTTCAGAGCGCGGT
pCMV-NS3pla Região sequenciada	2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700 GTGTACCAAGGCGTGGCCCAAGGCGGTGGACTTCATCCCGGTGGAAGGCGCTGGAAACCAACCATGCGGAGCCCCGTGTTGAGCGACAACAGCAGCCCCCT
pCMV-NS3pla Região sequenciada	2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800 GCCGTGCCAGAGCTATCAGGTGGCCCATCTGCACGCCCCACCGCAGCGGCAAGTCTACAAAGGTGCCCGCTGCCACGCCCGCCAGGGCTATAAGG
pCMV-NS3pla Região sequenciada	2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890 2900 TGCTGGTGTGAACCCCTCTGACAGCCCCCGGCGACTAGTCGACCAATTGCTAGCCACAATAAATAAAGATTTTATTAGTTTCCAGAAAAAGGGGGGA
pCMV-NS3pla Região sequenciada	2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000 ATGAAAGACCCCAACCAATTGCTTAGCCTGATAGCCGAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAAATACCAAAACCAAGATAGAGAAATTCAGATCAA
pCMV-NS3pla Região sequenciada	3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100 GGGCGGGGTACACGAAACAGCTAACGTTGGGCCAAACAGGATATCTGCGGTGAGCAGTTTCGGCCCCGGCCCCGGGGCCAGAACAGATGGTGCACCGCGGT
pCMV-NS3pla Região sequenciada	3110 3120 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200 TCGGCCCCGGCCCCGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATATGGCCCCAACCCTCAGCAGTTTCTTAAGACCCATCAGATGTTTCCAGGCCTCCCCCAAGGA
pCMV-NS3pla Região sequenciada	3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290 3300 CCTGAAATGACCTGTGCCTTATTTGAATTAACCAATCAGCCTGCTTCTCGCTTCGTTTCGCGCGCTTCTGCTTCCCGAGCTATATAAAGAGCTCACAA
pCMV-NS3pla Região sequenciada	3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370 3380 3390 3400 CCCCCTCACTCGGCGCGCCAGTCTCCGATAGACTGAGTCGCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAATCCTCTTGCTGTGCATCCGACTCGTGGTCTCGCT
pCMV-NS3pla Região sequenciada	3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500 GTTCTTGGGAGGGTCTCCTCAGAGTGATTGACTACCCGTCTCGGGGCTCTTTCATTTGGGGGTTTAAACGAGCTCCAGCTTTTGTTCCCTTTAGTGAGG
pCMV-NS3pla Região sequenciada	3510 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600 GTTAATTCGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAATTTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAG

APÊNDICES

pCMV-NS3pla Região sequenciada	3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690 3700 TGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCAGATTAAATTGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGCGTGCCAGCTGCATT
pCMV-NS3pla Região sequenciada	3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780 3790 3800 AATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATTTGGGCGCTCTTCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCGTTCCGGCTCGGGG
pCMV-NS3pla Região sequenciada	3810 3820 3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890 3900 AGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAAACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAGAACAATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGG
pCMV-NS3pla Região sequenciada	3910 3920 3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990 4000 AACCCTAAAAGGCCGCTTGTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCAGCGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGA
pCMV-NS3pla Região sequenciada	4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080 4090 4100 CAGGACTATAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCGTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCCTTTCCTCC
pCMV-NS3pla Região sequenciada	4110 4120 4130 4140 4150 4160 4170 4180 4190 4200 TTCGGGAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCAGCGTGTAGGTATCTCAGTTCCGTTAGGTGCTTCGCTCCAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGCGTT
pCMV-NS3pla Região sequenciada	4210 4220 4230 4240 4250 4260 4270 4280 4290 4300 CAGCCGACCCGCTGCGCTTATCCGGTAACATATCTGTTGAGTCCAAACCCGGTAAGACACGACTTATGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTA
pCMV-NS3pla Região sequenciada	4310 4320 4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4400 GCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTGGTATCTGCGCTCTGCTGAA
pCMV-NS3pla Região sequenciada	4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480 4490 4500 GCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCAACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTCAGAGCAGCAGATTACGCGC
pCMV-NS3pla Região sequenciada	4510 4520 4530 4540 4550 4560 4570 4580 4590 4600 AGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAACCTCAGCTTAAGGGATTGTGGTCATGAGATTAT
pCMV-NS3pla Região sequenciada	4610 4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680 4690 4700 CAAAAAGGATCTTCACTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTT
pCMV-NS3pla Região sequenciada	4710 4720 4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790 4800 AATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCTGACTCCCGCTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGTTACCA
pCMV-NS3pla Região sequenciada	4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880 4890 4900 TCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAAGCCAGCCGGAGGGGCCGAGCGCAGAAATG
pCMV-NS3pla Região sequenciada	4910 4920 4930 4940 4950 4960 4970 4980 4990 5000 GTCTGTCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTGCCAT
pCMV-NS3pla Região sequenciada	5010 5020 5030 5040 5050 5060 5070 5080 5090 5100 TGCTAGAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTTGGTATGGCTTCATTCACTCCGGTTCCTCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGC
pCMV-NS3pla Região sequenciada	5110 5120 5130 5140 5150 5160 5170 5180 5190 5200 AAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTA
pCMV-NS3pla Região sequenciada	5210 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280 5290 5300 CTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGC
pCMV-NS3pla Região sequenciada	5310 5320 5330 5340 5350 5360 5370 5380 5390 5400 GTCAATAAGGGATAATAACCGGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTTGGAACAGCTTCTTCGGGGCGAAACCTCTCAGGATCTTACCGCTG

	5410	5420	5430	5440	5450	5460	5470	5480	5490	5500
pCMV-NS3pla										
Região sequenciada	TTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGGACCCCACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACGAGCGTTCTGGGTGAGCAAAACAGGAAGGCAAA									
	5510	5520	5530	5540	5550	5560	5570	5580	5590	5600
pCMV-NS3pla										
Região sequenciada	ATGCCGCAAAAAGGGGATAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTCTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCAT									
	5610	5620	5630	5640	5650	5660	5670	5680	5690	5700
pCMV-NS3pla										
Região sequenciada	GAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCGAAAAAGTCCACCTGGGAAATTTTAAACGTTAATA									
	5710	5720	5730	5740	5750	5760	5770	5780	5790	5800
pCMV-NS3pla										
Região sequenciada	TTTTGTTAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTAAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCGTTTAAATCAAAAGAAATAGACCGA									
	5810	5820	5830	5840	5850	5860	5870	5880	5890	5900
pCMV-NS3pla										
Região sequenciada	GATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAACAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACTGCAAAAGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGC									
	5910	5920	5930	5940	5950	5960	5970	5980	5990	6000
pCMV-NS3pla										
Região sequenciada	CCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGAC									
	6010	6020	6030	6040	6050	6060	6070	6080	6090	6100
pCMV-NS3pla										
Região sequenciada	GGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTTCACGCTCGCGTTAACAC									
	6110	6120	6130	6140	6150	6160	6170	6180	6190	6200
pCMV-NS3pla										
Região sequenciada	CACACCCGCGCGCTTAATGCCCGCTACAGGGCGCGTCGCGCATTCGCCATTTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCG									
	6210	6220	6230	6240	6250	6260	6270	6280	6290	6300
pCMV-NS3pla										
Região sequenciada	CTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACACACGGCCAGTG									
	6310	6320	6330							
pCMV-NS3pla										
Região sequenciada	AATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACC									

APÊNDICE B - Sequenciamento da NS3p no vetor pSFV-NS3p1a

pSFV-NS3p1a Região sequenciada	10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 GATGGCGGATGTGTGACATACACGACGCCAAAGATTTTGTTCAGCTCCTGCCACCTCCGCTACGCGAGAGATTAAACCACCCACGATGGCCGCCAAAGT
pSFV-NS3p1a Região sequenciada	110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 GCATGTTGATATTGAGGCTGACAGCCATTTCATCAAGTCTTTGCAGAAGGCATTTCCTGCTTCGAGGTGGAGTCAATTGCAAGGTACACCCAAATGACCAT
pSFV-NS3p1a Região sequenciada	210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 GCAAAATGCCAGAGCATTTTCGACCTGGCTACCAAAATGATCGAGCAGGAGACTGACAAAGACACACTCATCTTGGATATCGGCAAGTGGCCTTCCAGGA
pSFV-NS3p1a Região sequenciada	310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 GAATGATGTCTACGCACAAATACCACTGCGTATGCCCTATGCGCGACGCGAGAAGACCCCGAAAGGCTCGATAGCTACGCAAAAGAAATGGCAGCGGCTC
pSFV-NS3p1a Região sequenciada	410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 CGGGAAAGTGTGGATAGAGAGATCGCAGGAAAAATCACCGACCTCGAGACCGTCAATGGCTACGCCAGACGCTGAATCTCCTACCTTTTGCTGCATACA
pSFV-NS3p1a Região sequenciada	510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 GACGTCACTGTCTACGGCAGCCGAAGTGGCCGTATACAGGACCGTGTATGCTGTACATGCACCAACATCGGTGTACCATCAGGCGATGAAGGTTGCA
pSFV-NS3p1a Região sequenciada	610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 GAACGGCGTATTGGATTGGTTTACACCAACCCGTTTATGTTTGAACCGCTAGCAGGCGGTATCCAACCTACGCCCAAACTGGGCGGACGAGCAGGT
pSFV-NS3p1a Região sequenciada	710 720 730 740 750 760 770 780 790 800 GTTACAGGCCAGGAACATAGGACTGTGTGCAGCATCCTTGAAGGGAAGACTCGGCAAACTGTCCATTCTCCGCAAGAAGCAATTGAAACCTTGCGAC
pSFV-NS3p1a Região sequenciada	810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 ACAGTCATGTTCTCGGTAGGATCTACATTGTACACTGAGAGCAGAAAGCTACTGAGGAGCTGGCATTACCTCCGTATTCCACCTGAAAGGTAAACAAAT
pSFV-NS3p1a Região sequenciada	910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000 CCTTTACCTGTAGGTGCGATACCATCGTATCATGTGAAGGGTACGTAGTTAAGAAATCACTATGTGCCCGGCGCTGTACGGTAAACGGTAGGGTACGC
pSFV-NS3p1a Região sequenciada	1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100 CGTGACGTATCACCGGAGGGATTCTAGTGTGCAAGACCAACAGACACTGTCAAAGGAGAAAGAGTCTCATTCCCTGTATGCACCTACGTCCCTCAACC
pSFV-NS3p1a Região sequenciada	1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 ATCTGTGATCAAAATGACTGGCATACTAGCGACCCGACGTACACCCGGAGGACGCACAGAAGTTGTTAGTGGGATTGAATCAGAGGATAGTTGTGAACGGAA
pSFV-NS3p1a Região sequenciada	1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 GAACACAGCGAAACACTAACACGATGAAGAACTATCTGCTCCGATTGTGGCCGTCCGATTAGCAAGTGGGCGAGGGAATACAAAGGCAGACCTTGATGA
pSFV-NS3p1a Região sequenciada	1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400 TGAAAAACCTCTGGGTGTCGAGAGAGGTCACCTACTTCTGCTGCTGCTTGTGGCCATTTAAACGAGGAAGATGCACACCATGTACAAGAAACGAGACACC
pSFV-NS3p1a Região sequenciada	1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500 CAGACAATAGTGAAGGTGCCCTTCAGAGTTTAACCTCGTTCATCCCGAGCCTATGGTCTACAGGCCTCGCAATCCCAGTCAGATCACGCATTAAAGATGC
pSFV-NS3p1a Região sequenciada	1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600 TTTTGGCCAAAGAAAGCAAGCGAGAGTTAATACCTGTTCTCGACGCGTCTGAGCCAGGGATGCTGAACAAGAGGAGAAAGGAGAGGTTGGAGGCCGAGCT
pSFV-NS3p1a Região sequenciada	1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700 GACTAGAGAAGCCCTTACCAACCCCTCGTCCCAATCGCCCGGCGGAGACGGGAGTCTGTCGACGTGACGCTTGAAGAACTAGAGTATCACGCAGGTGCGAGGG
pSFV-NS3p1a Região sequenciada	1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800 GTGTTGGAAACCTCGCAGCGCTTGAAAGTCAACCGCAGCCGAACGACGTACTACTAGGAATACGTAGTTCTGTCCCGCAGACCGTGTCTAAGA

APÊNDICES

pSFV-NS3pla Região sequenciada	1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900 GCTCCAAGTTGGCCCCCGTGCACCTCTAGCAGAGCAGGTGAAATAATAACACATAACGGGAGGGCCGGGTTACCAAGTTCGACGGATATGACGGCAG
pSFV-NS3pla Região sequenciada	1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000 GGTCCCTACTACCATGTGGATCGGCCATTCCGGTCCCTGAGTTTCAGGCTTTGAGCGAGAGCGCCACTATGGTGTACCAAGAAAGGAGTTCGTCAACAGG
pSFV-NS3pla Região sequenciada	2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100 AAACTATACCATATTGCCGTTACCGGACCTCGCTGAACACCGACGAGGAGAACTACGAGAAAGTCAGAGCTGAAAGAACTGACGCCGAGTACGTGTTCCG
pSFV-NS3pla Região sequenciada	2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200 ACGTAGATAAAAATGCTGCGTCAAGAGAGAGGAAGCGTCGGGTTTGGTGTGGTGGGAGAGCTAACCAACCCCCCGTCCATGAATTCGGCTACGAAGG
pSFV-NS3pla Região sequenciada	2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300 GCTGAAGATCAGGCCCTCGGCACCATATAAGACTACAGTAGTAGGAGTCTTTGGGGTTCCGGGATCAGGCAAGTCTGCTATTATTAAGAGCCTCGTGACC
pSFV-NS3pla Região sequenciada	2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400 AAACCGATCTGTCTCACCAGCGGCAAGAAAGGAGAACTGCCAGGAATAGTTAACGACGTGAAGAAGCACCCGGGAAGGGGACAAAGTAGGGAAGAAACAGTG
pSFV-NS3pla Região sequenciada	2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500 ACTCCATCCTGCTAAACGGGTGTCGTCGTCGGTGGACATCCTATATGTGGACGAGGCTTTCGCTTGCCATCCCGGTACTCTGCTGGCCCTAATTGCTCT
pSFV-NS3pla Região sequenciada	2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600 TGTTAAACCTCGGAGCAAGTGGTGTATGGGAGACCCCAAGCAATGCGGATTCCTCAATATGATGCAGCTTAAGGTGAACCTTCAACCAACATCTGC
pSFV-NS3pla Região sequenciada	2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700 ACTGAAGTATGTCATAAAAGTATATCCAGACGTTGCCACGCTCCAGTCAAGGCTTCGTGTCTACGTTGCACCTACGGAGGCAAGATGCGCACGACCAACC
pSFV-NS3pla Região sequenciada	2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800 CGTGCAACAAACCCATAATCATAGACACCCAGGACAGCCAAAGCCCAAGGAGACATCGTGTAAACATGCTTCGAGGGCTGGGGCAAGCAGGTGCA
pSFV-NS3pla Região sequenciada	2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890 2900 GTTGGACTACCGTGGACACGAAGTCATGACAGCAGCAGCATCTCAGGGCTCACCCGCAAGGGGTATACCGCTAAGGCAGAAAGGTGAATGAAATCC
pSFV-NS3pla Região sequenciada	2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000 TTGTATGCCCTGCGTCGGAGCACGTGAATGTACTGCTGACGCGCATGAGGATAGGCTGGTGTGGAAACCGTGGCCGGCGATCCCTGGATTAAAGGTCC
pSFV-NS3pla Região sequenciada	3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100 TATCAAACTTCCACAGGGTAACCTTACGGCCACATTGGAAGAAATGGCAAGAAGAACACGACAAATAATGAAGGTGATTGAAGGACCGGCTGCGCCTGT
pSFV-NS3pla Região sequenciada	3110 3120 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200 GGACGCGTTCCAGAACAAAGCGAACGTGTGTTGGGCGAAAGCCTGGTGCCTGTCTGGACACTGCCGAATCAGATTGACAGCAGAGGAGTGGAGCACCC
pSFV-NS3pla Região sequenciada	3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290 3300 ATAATTACAGCATTAAAGGAGACAGAGCTTACTCTCCAGTGGTGGCCTTGAATGAAATTTGCACCAAGTACTATGGAGTTGACCTGGACAGTGGCCTGT
pSFV-NS3pla Região sequenciada	3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370 3380 3390 3400 TTTCTGCCCGAAGGTGTCCCTGTATTACGAGAACCACTGCGGATTAACAGACCTGGTGGAAAGGATGTATGGATTCAATGCCGCAACAGCTGCCAGGCT
pSFV-NS3pla Região sequenciada	3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500 GGAGCTAGACATACCTTCCTGAAGGGGCGTGGCATAGGGCGAAGCAGGCGATTATCGCAGAAAGAAATCCAAACCGCTTTCTGTCTGGACAAATGTA
pSFV-NS3pla Região sequenciada	3510 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600 ATTCTCTATCAACCGCAGGCTGCCGACGCGCTGTTGGCTGAGTCAAGACGGTTAAAGGCAGTAGGGTTGAGTGGCTGGTCAATAAAGTAAGAGGGGTACC

APÊNDICES

pSFV-NS3pla Região sequenciada	3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690 3700 ACGTTCCTGCTGGTGAGTGAGTACAACTGGCTTGGCTCGACGCGACGTCACTTGGTTGTACCCGCTGAATGTACAGGCGCCGATAGGTGCTACGACCT
pSFV-NS3pla Região sequenciada	3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780 3790 3800 AAGTTTAGGACTGCCGGCTGACGCGGCGAGGTTCGACTTGGTCTTTGTGAACATTACACGGAAATTCAGAAATCCACCCTACCGCAGTGTGTGCGACCC
pSFV-NS3pla Região sequenciada	3810 3820 3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890 3900 GCCATGAAGCTGCAGATGCTTGGGGGAGATGCGCTACGACTGCTAAAACCCGCGGCTCTTGATGAGAGCTTACGGATACGCCGATAAAATCAGCGAAG
pSFV-NS3pla Região sequenciada	3910 3920 3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990 4000 CCGTTGTTTCTCCTTAAGCAGAAAGTTCTGCTCTGCAAGAGTGTTCGCCCGGATTTGTGTACCCAGCAATCAGAAAGTGTCTTGTCTTCTCCAACTT
pSFV-NS3pla Região sequenciada	4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080 4090 4100 TGACAAACGGAAGAGAGACCTCTACGCTACACCGAGATGAATACCAAGCTGAGTGCCGTGTATGCCGGAGAAAGCCATGCACAGCGCCGGGTGTGCACCATCC
pSFV-NS3pla Região sequenciada	4110 4120 4130 4140 4150 4160 4170 4180 4190 4200 TACAGAGTTAAGAGAGCAGACATAGCCAGTGCACAGAAAGCGGCTGTGGTTAAACGCAGCTAACGCCCTGGAAGCTGTAGGGGATGGCGTATGCAGGGCCGG
pSFV-NS3pla Região sequenciada	4210 4220 4230 4240 4250 4260 4270 4280 4290 4300 TGGCGAAGAAATGGCGTCAGCCTTTAAGGGAGCAGCAACCCAGTGGGCACAATTAAAACAGTCATGTGCGGCTCGTACCCCGTCATCCACGCTGTAGC
pSFV-NS3pla Região sequenciada	4310 4320 4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4400 GCCATAATTTCTGCCACGACTGAGCGGAGGGGACCCGCAATTGGCCGCTGTCTACCGGGCAGTGGCCGCCGGAAGTAAACAGACTGTCACTGAGCAGC
pSFV-NS3pla Região sequenciada	4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480 4490 4500 GTAGCCATCCCGCTGCTGTCCACAGGAGTGTTCAGCGGCGGAAGAGATAGGCTGCAGCAATCCCTCAACCATCTATTACAGCAATGGACGCCACGGAAG
pSFV-NS3pla Região sequenciada	4510 4520 4530 4540 4550 4560 4570 4580 4590 4600 CTGACGTGACCATCTACTGCAGAGACAAAGTTGGGAGAGAAATCCAGGAAGCCATTGACATGAGGACGGGTGTGGAGTTGCTCAATGATGACGTGGA
pSFV-NS3pla Região sequenciada	4610 4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680 4690 4700 GCTGACCCAGACTTGGTGAGAGTGCACCCGGAAGCAGCAGCCTGGTGGGTCTGTAAGGGCTACAGTACCACTGACGGGTGCGTGTACTGCTACTTTGAAGGT
pSFV-NS3pla Região sequenciada	4710 4720 4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790 4800 ACGAAATTCAACAGGCTGCTATTGATATGGCAGAGATACTGACGTTGTGGCCAGACTGCAAGAGGCAACGAAACAGATATGCCTATACGCGCTGGGGG
pSFV-NS3pla Região sequenciada	4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880 4890 4900 AAACAATGGACAACATCAGATCCAAATGTCCGGTGAACGATTCCGATTTCATCAACACCTCCAGGACAGTGCCCTGCTGTGCCGCTACGCAATGACAGC
pSFV-NS3pla Região sequenciada	4910 4920 4930 4940 4950 4960 4970 4980 4990 5000 AGAACGGATCGCCGCTTAGGTTCACACCAAGTTAAAAGCATGGTGGTTTGTCTATCTTTTCCCTCCCGAAATACCATGTAGATGGGGTCAGAGAGTA
pSFV-NS3pla Região sequenciada	5010 5020 5030 5040 5050 5060 5070 5080 5090 5100 AAGTGGGAGAGGTTCTCCTGTTGACCCGACGGTACCTTCAGTGGTTAGTCCGCGGAAGTATGCCGCATCTACGACGGACCACTCAGATCGGTCTGTAC
pSFV-NS3pla Região sequenciada	5110 5120 5130 5140 5150 5160 5170 5180 5190 5200 GAGGGTTTGACTTTGGAAGTGGACCAACGACTGCTCTTCCACTGCCAGCGATACCATGTGCTACCCAGTTTGAGTCTGTGTGACATCGACTCGATCTACGA
pSFV-NS3pla Região sequenciada	5210 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280 5290 5300 GCCAATGGCTCCCATAGTAGTAGTGACGGCTGACGTACACCTGAAACCCGAGGCATCGCGGACCTGGCGGAGATGTGCACCTGAACCCGCGAGACCATGTG
pSFV-NS3pla Região sequenciada	5310 5320 5330 5340 5350 5360 5370 5380 5390 5400 GACCTGGAGAACCCGATTCTCCACCGCGCCGAGAGAGCTGCTATACCTTGCCTCCCGCGCGGCGAGCGAACCGGTCCCGGCGCGGAGAAAGCCGACGC

APÊNDICES

pSFV-NS3pla Região sequenciada	5410 5420 5430 5440 5450 5460 5470 5480 5490 5500 CTGCCCAAGGACTGCGTTTAGGAACAAGCTGCCTTTGACGTTTCGGGACCTTTGACGAGCACGAGGTCGATGCGTTGGCCTCCGGGATTACTTTTCGGAGA
pSFV-NS3pla Região sequenciada	5510 5520 5530 5540 5550 5560 5570 5580 5590 5600 CTTCGACGACGTCCTGCGACTAGGCCGCGGGTGCATATATTTTCTCCTCGGACACTGGCAGCGGACATTTACAAACAAAATCCGTTAGGCAGCACAAT
pSFV-NS3pla Região sequenciada	5610 5620 5630 5640 5650 5660 5670 5680 5690 5700 CTCCAGTCGCGACAACCTGGATGCGGTCCAGGAGGAGAAAATGTACCCGCCAAAATTTGGATACTGAGAGGGAGAAGCTGTTGCTGCTGAAAATGCAGATGC
pSFV-NS3pla Região sequenciada	5710 5720 5730 5740 5750 5760 5770 5780 5790 5800 ACCCATCGGAGGCTAATAAGAGTCGATACCGATCTCGCAAGTGGAGAACATGAAAGCCACGGTGGTGGCAGGCTCACATCGGGGGCCAGATTGTACAC
pSFV-NS3pla Região sequenciada	5810 5820 5830 5840 5850 5860 5870 5880 5890 5900 GGGAGCGGACGTAGGCCGCATACCAACATACCGGTTCCGGTACCCCGCCCGGTGTACTCCCTACCGTGATCGAAGATTCTCAAGCCCCGATGTAGCA
pSFV-NS3pla Região sequenciada	5910 5920 5930 5940 5950 5960 5970 5980 5990 6000 ATCGCAGGCTGCAACGAATACCTATCCAGAAATTAACCAACAGTGGCGTCGTACCCAGATAACAGATGAATACGACGCATACCTGGACATGGTTGACGGGT
pSFV-NS3pla Região sequenciada	6010 6020 6030 6040 6050 6060 6070 6080 6090 6100 CGGATAGTTGCTTGGACAGAGCGACATTCTGCCCGCGCAAGCTCCGGTGCTACCCGAAACATCATGCGTACCACCCAGCCGACTGTACGCACTGCCGTCCC
pSFV-NS3pla Região sequenciada	6110 6120 6130 6140 6150 6160 6170 6180 6190 6200 GTCAACCTTTGAGAACACACTACAGAACGTGTAGCGGTGCGCACCAAGAGAACTGCAACGTCAACGCAATCGAGAACCTACCCACCATGGACTCGGCA
pSFV-NS3pla Região sequenciada	6210 6220 6230 6240 6250 6260 6270 6280 6290 6300 GTGTTCAACGTGGAGTGCTTCAAGCGCTATGCCGTGCTCCGGGAGATATTGGGAAGAAATATGCTAAACAACTATCCGGATAACCACTGAGAACATCACTA
pSFV-NS3pla Região sequenciada	6310 6320 6330 6340 6350 6360 6370 6380 6390 6400 CCTATGTGACCAATTTGAAAGGCCGGAAGCTGTGCGCTTGTTCGCTAAGACCCACAACTTTGGTTCCGCTCGAGAGGTTCCCATGGACAGATTACCGGT
pSFV-NS3pla Região sequenciada	6410 6420 6430 6440 6450 6460 6470 6480 6490 6500 CGACATGAAACGAGATGTCAAAGTCACTCCAGGGACGAAACACACAGAGGAAAGACCCAAAGTCCAGGTAAATTAAGCAGCGGAGCCATTGGCGACCGGT
pSFV-NS3pla Região sequenciada	6510 6520 6530 6540 6550 6560 6570 6580 6590 6600 TACCTGTGCGGCATCCACAGGGAATTAGTAAGGAGACTAAATGCTGTGTGTTACGCCCTAACGTGCACACATTGTTTATATGTCGGCGGAAGACTTTGAGC
pSFV-NS3pla Região sequenciada	6610 6620 6630 6640 6650 6660 6670 6680 6690 6700 CGATCATGCGCTCTCACTTCCACCCAGGAGACCCGGTTCTAGAGACGGACATTGCATCATTCGACAAAAGCCAGGACGACTCCTTGGCTCTTACAGGTTT
pSFV-NS3pla Região sequenciada	6710 6720 6730 6740 6750 6760 6770 6780 6790 6800 AATGATCCTCGAAGATCTAGGGTGGATCAGTACCTGCTGGACTTGATCGAGGCAGCCTTTGGGAAATATCCAGCTGTCACCTACCAACTGGCAGCGGC
pSFV-NS3pla Região sequenciada	6810 6820 6830 6840 6850 6860 6870 6880 6890 6900 TTCAAGTTCGGAGCTATGATGAAATCGGGCATGTTTCTGACTTTGTTTATTAACACTGTTTTGAACATCACCATAGCAAGCAGGGTACTGGAGCAGAGAC
pSFV-NS3pla Região sequenciada	6910 6920 6930 6940 6950 6960 6970 6980 6990 7000 TCACTGACTCCGCCTGTGCGGCCTTCATCGGCGACGACAACTCGTTTCAGGAGTGATCTCCGACAAAGCTGATGGCGGAGAGGTGCGCGTCGTGGGTCAA
pSFV-NS3pla Região sequenciada	7010 7020 7030 7040 7050 7060 7070 7080 7090 7100 CATGGAGGTGAAGATCATTGACGCTGTCTATGGGCGAAAACCCCCATATTTTGTGGGGGATTCTAGTTTTTGTACAGCGTCACACAGACCGCCTGCCGT
pSFV-NS3pla Região sequenciada	7110 7120 7130 7140 7150 7160 7170 7180 7190 7200 GTTTCAGACCCACTTAAGCGCCTGTTCAAGTTGGGTAAAGCCCTTAACAGCTGAAGACAAGCAGGACGAAGACAGGCGAGCAGACTGAGTGACGAGGTTA

APÊNDICES

pSFV-NS3pla Região sequenciada	7210 7220 7230 7240 7250 7260 7270 7280 7290 7300 GCAAGTGGTTCCGGACAGGCTTGGGGGCCGAACGGAGGTGGCACTAACATCTAGGTATGAGGTAGAGGGCTGCAAAAGTATCCTCATAGCCATGGCCAC
pSFV-NS3pla Região sequenciada	7310 7320 7330 7340 7350 7360 7370 7380 7390 7400 CTTGGCGAGGGACATTAAAGGCGTTAAGAAATTGAGAGGACCTGTTATACACCTCTACGGCGTCTAGATTGGTGGCTTAATACACAGAATTGTGATTG
pSFV-NS3pla Região sequenciada	7410 7420 7430 7440 7450 7460 7470 7480 7490 7500 GATCGAAACCATGAAGGCAATAATTGTACTACTCATGGTAGTAACATCCAATGCAGACTACAAGGACGATGACGATAAGGAAAACCTGTACTTTCAAGGT GTC...TC...
pSFV-NS3pla Região sequenciada	7510 7520 7530 7540 7550 7560 7570 7580 7590 7600 GGATCCCCCGGTGCCACCATGGCCCCCATACCCGCTACGCCACGAGACAAGAGGCCCTGCTGGGCTGCATCATCACCAGCCTGACCCGACAGAGACAAGA
pSFV-NS3pla Região sequenciada	7610 7620 7630 7640 7650 7660 7670 7680 7690 7700 AACCAGGTGGAAGGCGAGGTGCAGATCGTGTCTACAGCCGCCAGACCTCTGGCCACCTGTATCAACGGCGTGTCTGGACCGGTACCCACGGCGCTGG
pSFV-NS3pla Região sequenciada	7710 7720 7730 7740 7750 7760 7770 7780 7790 7800 CACCCGGACAATCGCCAGCAGCAAGGGCCCCGTGATCCAGATGTACACCAACCTGGACCCAGGACCTGGTGGGATGGCGTGGCCCTCAGGGCGCCAGAAGC
pSFV-NS3pla Região sequenciada	7810 7820 7830 7840 7850 7860 7870 7880 7890 7900 CTGACCCCTTGCACCTGTGGCAGCAGGACCTGTACCTGGTGACACGGCACGCCGACGTGATCCCGTGGGAGAGAGGCGACGGCAGAGGCAGCCTGC
pSFV-NS3pla Região sequenciada	7910 7920 7930 7940 7950 7960 7970 7980 7990 8000 TGAGCCCCAGACCCATCAGCTACCTGAAGGGCAGCAGCGCGGACCTCTGCTGTCTCTGCCGACATGCCGTGGGCATCTTCAGAGCCGCGGTGTAC
pSFV-NS3pla Região sequenciada	8010 8020 8030 8040 8050 8060 8070 8080 8090 8100 CAGAGGCGTGGCCAAGGCCGTGGACTTCATCCCCGTGGAAGGCCCTGGAAACCAACCATGGGAGCCCCGTGTTAGCGACAACAGCAGCCCCCTGCCGTG
pSFV-NS3pla Região sequenciada	8110 8120 8130 8140 8150 8160 8170 8180 8190 8200 CCCCAGAGCTATCAGGTGGCCCATCTGCACGCCGCCACCGGCAGCGGCAAGTCTACAAAGGTGCCCGTGCCTACGCCGCCACGGGCTATAAGGTGCTGG
pSFV-NS3pla Região sequenciada	8210 8220 8230 8240 8250 8260 8270 8280 8290 8300 TGCTGAACCCCTCCTGACAGCTGACTAGTGAAGAACCTGTACTTTCAAGGTGATACCCATCACCATCACCATCACGAATTGGCGGCGGCACCGG
pSFV-NS3pla Região sequenciada	8310 8320 8330 8340 8350 8360 8370 8380 8390 8400 CGCGCGCGCGCACCGGCAGCAGGTGGCGCAGGCGCGGTAAGGCCGAGAGGGCGAGATTCCCGCTCCGCTGGCGCGCACCGTCTCCAAAGATCCTCGTG
pSFV-NS3pla Região sequenciada	8410 8420 8430 8440 8450 8460 8470 8480 8490 8500 AAGGAGGGTGACACGGTCAAGGCTGGTGCAGACCTGCTGTTCTCGAGGCCATGAAGATGGAGACCGAGATCAACGCTCCCACCGACGGCAAGGTGAGAG
pSFV-NS3pla Região sequenciada	8510 8520 8530 8540 8550 8560 8570 8580 8590 8600 AGGTCTGGTCAAGGAGCGTGACGCGGTGCAGGGCGGTGAGGGTCTCATCAAGATCGGCTGAAGCTTGCGCGCGCTTTGAACTAGGCAAGCATGCGGG
pSFV-NS3pla Região sequenciada	8610 8620 8630 8640 8650 8660 8670 8680 8690 8700 CCCGAGTGGGTAAATTAATTGAATTACATCCCTACGCAACGTTTTACGGCCGCGGTTGGCGCCGCGCCGCGCGCCGCTCCTTGGCCGTTGCAGGCCAGT
pSFV-NS3pla Região sequenciada	8710 8720 8730 8740 8750 8760 8770 8780 8790 8800 CCGGTGGCTCCCGTCTCCCGACTTCAGGCCAGCAGATGCAGCAACTCATCAGCGCGTAATGCGCTGACAATGAGACAGAACGCAATTGCTCCTG
pSFV-NS3pla Região sequenciada	8810 8820 8830 8840 8850 8860 8870 8880 8890 8900 CTAGGAGCTTAATTCGACGAATAATTGGAATTTTATTTTATTTTGCATTGGTTTTTAATTTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
pSFV-NS3pla Região sequenciada	8910 8920 8930 8940 8950 8960 8970 8980 8990 9000 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTAGAAATCGGAGTTTCTAGTCTGCATTAAATGAATCGGCCAACCGCGGGGAGAGGCGGTTTC

APÊNDICES

pSFV-NS3pla Região sequenciada	9010 9020 9030 9040 9050 9060 9070 9080 9090 9100 GTATTGGGCGCTCTTCGCTTCCTCGCTCACTGAGTCGCTGCGCTCGGTCTGCTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAAATACGGTT
pSFV-NS3pla Região sequenciada	9110 9120 9130 9140 9150 9160 9170 9180 9190 9200 ATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAGAATCATGTAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAGAGGCCGCTTGGTGGCTTTTCCAT
pSFV-NS3pla Região sequenciada	9210 9220 9230 9240 9250 9260 9270 9280 9290 9300 AGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGAGATACCAAGCGTTTCCCGCTGGAA
pSFV-NS3pla Região sequenciada	9310 9320 9330 9340 9350 9360 9370 9380 9390 9400 GCTCCCTCGTGGCTCTCTCGTTCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCGCCCTTCTCCCTTCGGGAGCGGTGGCGCTTCTCAATGCTCGCGCTG
pSFV-NS3pla Região sequenciada	9410 9420 9430 9440 9450 9460 9470 9480 9490 9500 TAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGCTTCAGCCGACCGCTGCCCTTATCCGGTAACATGCT
pSFV-NS3pla Região sequenciada	9510 9520 9530 9540 9550 9560 9570 9580 9590 9600 CTTGAGTCCAAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGATTCT
pSFV-NS3pla Região sequenciada	9610 9620 9630 9640 9650 9660 9670 9680 9690 9700 TGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAGAGTTGGTAGCTCTTG
pSFV-NS3pla Região sequenciada	9710 9720 9730 9740 9750 9760 9770 9780 9790 9800 ATCCGGCAACAAACCCCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGCAAGCAGCAGATTACCGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAGATCCCTTTGATCTTT
pSFV-NS3pla Região sequenciada	9810 9820 9830 9840 9850 9860 9870 9880 9890 9900 TCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAATCAGCTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCCTTTAAATTAAA
pSFV-NS3pla Região sequenciada	9910 9920 9930 9940 9950 9960 9970 9980 9990 10000 AATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATT
pSFV-NS3pla Região sequenciada	10010 10020 10030 10040 10050 10060 10070 10080 10090 10100 TCCGTTCAATCATAGTTGCCTGACTCCCGCTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCGCAGTGTGCAATGATACCCGAGACCCA
pSFV-NS3pla Região sequenciada	10110 10120 10130 10140 10150 10160 10170 10180 10190 10200 CGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGGTCCGTGCAACTTTATCCGCCCTCCATCCAGTCTATTA
pSFV-NS3pla Região sequenciada	10210 10220 10230 10240 10250 10260 10270 10280 10290 10300 ATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTGGTTTGG
pSFV-NS3pla Região sequenciada	10310 10320 10330 10340 10350 10360 10370 10380 10390 10400 TATGGCTTCATTCACTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCCAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTAGCTCCTTCGTTCCGATCGTT
pSFV-NS3pla Região sequenciada	10410 10420 10430 10440 10450 10460 10470 10480 10490 10500 GTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTG
pSFV-NS3pla Região sequenciada	10510 10520 10530 10540 10550 10560 10570 10580 10590 10600 GTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAAATAGTGTATGCGGCGACCCAGTTGCTCTTGCCCGCGCTCAATACGGGATAATACCGCCACATAGCAGAAC
pSFV-NS3pla Região sequenciada	10610 10620 10630 10640 10650 10660 10670 10680 10690 10700 TTTAAAGTGCTCATCTATTGAAAAACGTTCTTCGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCCACTCGTGACCC
pSFV-NS3pla Região sequenciada	10710 10720 10730 10740 10750 10760 10770 10780 10790 10800 AAGTATCTTCAGCATCTTTTACTTTCAACGCGCTTTCTGGGTGAGCAAAACAGGAAGGCATAATGCCGCAAAAAGGGAATAGGGCGACACGGAAAT

	10810	10820	10830	10840	10850	10860	10870	10880	10890	10900	
pSFV-NS3pla		GTTGAATACTCATACCTCTCTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAA									
Região sequenciada	-----	-----									
	10910	10920	10930	10940	10950	10960	10970	10980	10990	11000	
pSFV-NS3pla		ACAAATAGGGGTTCCGGCGCACATTTCCCGGAAAAAGTGCCACCTGACGCTCTAAGAAACCATTTATTATCATGACATTAAACCTATAAAAAATAGGCGGTATCAGC									
Região sequenciada	-----	-----									
	11010	11020	11030	11040	11050	11060	11070	11080	11090	11100	
pSFV-NS3pla		AGGCCCTTTCTGTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTCTGTCTAAGCGGATGCCGGGA									
Região sequenciada	-----	-----									
	11110	11120	11130	11140	11150	11160	11170	11180	11190	11200	
pSFV-NS3pla		GCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGCTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTTCGGCTTAACCTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCCACCATAT									
Região sequenciada	-----	-----									
	11210	11220	11230	11240	11250	11260	11270	11280	11290	11300	
pSFV-NS3pla		CGACGCTCTCCCTTATGCCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCAGTACTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCCGCCGCAAGGAATGGTGCAATGCCAAGGAGA									
Região sequenciada	-----	-----									
	11310	11320	11330	11340	11350	11360	11370	11380	11390	11400	
pSFV-NS3pla		TGGCGCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGCCGAACCAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGCGGAGCCCGATCTTCCCCATCGGT									
Região sequenciada	-----	-----									
	11410	11420	11430	11440	11450	11460	11470	11480	11490	11500	
pSFV-NS3pla		GATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCTGGCTAGCGATGACCCCTGCTG									
Região sequenciada	-----	-----									
	11510	11520	11530	11540	11550	11560	11570	11580	11590	11600	
pSFV-NS3pla		ATTGGTTCGCTGACCATTTCCGGGGTGCGGAACGGCGTTACCAGAACTCAGAAGGTTCTGCCAACCAACCGACTCTGACGGCAGTTTACGAGAGAGAT									
Região sequenciada	-----	-----									
	11610	11620	11630	11640	11650	11660	11670	11680	11690	11700	
pSFV-NS3pla		GATAGGGTCTGCTTCAGTAAGCCAGATGCTACACAATTAGGCTTGACATATTGTCTTAGAACCGCGGCTACAATTAAATACATAACCTTATGTATCATAC									
Região sequenciada	-----	-----									
	11710	11720									
pSFV-NS3pla		ACATACGATTTACCTCACACTATA									
Região sequenciada	-----	-----									

APÊNDICE C – Artigo de Periódico

Artigo 1

Lemos MAN, Bernadino TC, Astray RM, Pereira CA, Jorge, SAC.
Production and quantification of pseudopartículas of SFV and
HCVpp containing the protease portion of the HCV NS3 gene (em
fase de elaboração).

Production and quantification of pseudoparticulas of SFV and HCVpp containing the protease portion of the HCV NS3 gene

Marcos Alexandre Nobre Lemos¹

Thaissa Consoni Bernadino¹

Renato Mancini Astray¹

Carlos Augusto Pereira¹

Soraia Attie Calil Jorge¹

¹ Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Butantan, Avenida Vital Brasil, 1500, São Paulo Brasil.

KEYWORD

HCVpp, SFV particles, NS3, HCV

ABSTRACT

Viral hepatitis caused by hepatitis C virus affects millions of people worldwide and does not show a scheme of treatment or therapy that results in a solution for those infected. The target of many therapeutic studies are one of the most conserved proteins in HCV, the nonstructural protein 3 (NS3). Because of this protein present many CTL epitopes, the most appropriate way to make the presentation of this protein to the immune system is the synthesis of it inside the cells, therefore, as a tool for this kind of presentation we use two systems of viral pseudoparticles, one based the SFV and the other in HCVpp who carry the protease portion of the NS3 gene. Besides producing the particles we develop a form of quantify them using qRT-PCR, which resulted in the production of approximately 2.4×10^4 pseudoparticles of SFV-NS3p per microliter and 4×10^2 pseudoparticles of HCVpp-NS3p per microliter. The HUH-7 cells infected with the HCVpp-NS3p pseudoparticles have expressed NS3 protein, showing the functionality of this system.

INTRODUCTION

Infection with the hepatitis C virus is now considered a worldwide problem. Currently 170 million people are infected with hepatitis C in the world with approximately 60% of those

people will develop chronic hepatitis and may reach a liver cirrhosis, it makes this disease a problem of global health (Alter and Seeff 2000; Pearlman 2004; World Health Organization 2011; Chou et al. 2012; Chou et al. 2013; Mehta et al. 2013).

The hepatitis C virus belongs to Flaviviridae family, genre Hepacivirus (Shukla et al. 1995; Lindenbach and Rice 2001), this viral particle measures between 55 and 65 nm in diameter (Kaito et al. 1994; Lindenbach and Rice 2001) and is formed by a lipid envelope, where they are the viral glycoproteins E1 and E2, the protein capsid is formed by viral core protein and the viral genome consists of a linear + ssRNA (Lindenbach and Rice 2001; Imbert et al. 2004). The viral RNA has approximately 9400 nucleotides with a single open reading frame encoding a polyprotein with little more than 3,000 amino acids, and is subsequently cleaved by cellular and viral proteases, giving rise to proteins of the virus (three structural proteins - Core, E1 and E2, and seven non-structural proteins - p7, NS2, NS3, NS4A, NS5A, and NS5B) (Lindenbach and Rice 2001; Mello et al. 2009; Mancini et al. 2009; Di Lorenzo et al. 2011; Chou et al. 2013).

The current standard treatment for infected are based on weekly injections of pegylated interferon (PEG-INF) in combination with daily oral ribavirin pills for 24 to 48 weeks (Pearlman 2004; Stoll-Keller et al. 2009; Mello et al. 2009; Mehta et al. 2013). Apart from this treatment has many side effects and not assure a sustainable response, there is still no vaccine to protect people established. Currently some studies are being developed in the search for vaccines using DNA together with viral proteins (Brinster and Inchauspé 2001; Arnaud et al. 2010; Chou et al. 2012; Chou et al. 2013; Mehta et al. 2013; Alavian et al. 2013).

The cellular immune response results in an endogenous interferon production (Abbas and Lichtman 2007), this is the type of sustained response. Several studies are being developed using viral pseudoparticles as a way of stimulating the cells with different goals including of generating immunity (Liljeström and Garoff 1991; Baumert et al. 1998; Brinster et al. 2002; Hourieux et al. 2007; Benmaamar et al. 2009; Berger et al. 2009; Ashfaq et al. 2011; Wen et al. 2013; Deest et al. 2013).

In search of greater stimulation of this response we are using two viral pseudoparticles of SFV and HCV (HCVpp) that contains genetic material modified with the gene for a non-structural proteins of HCV. As the gene to stimulate cellular immune response we choose to work with the protease of nonstructural protein 3 (NS3p) of HCV because this protein has a wide conservation in the viral population (Brinster et al. 2001; Bartoschek et al. 2003; Mello et al. 2009; Peres-da-Silva et al. 2012; Mehta et al. 2013) and, furthermore, is a region that has many epitopes to the immune system cell (LANSLC 2007).

OBJECTIVES

Our study aimed produce, test and quantify two systems of pseudoparticles (HCVpp and SFV) for the expression of the protease HCV NS3 gene in cell culture.

MATERIALS E METHODS

Cell Culture

In this study, we used cultures of human cells (HEK-293T, and HUH-7) or hamster (BHK-21). All cells were grown in DMEM culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum at 37 °C with 5% CO₂.

Construction of plasmids containing the gene of interest

The sequence of the protease of non-structural protein 3 (NS3p) used in this work is mapped between nucleotides 3420 and 4113 of hepatitis C virus of genotype 1a genome (GenBank: AF009606.1 - Figure 1) and was synthesized by GeneArt® in a vector containing the start codon (ATG), stop codon (TAG) and sites for restriction enzymes necessary for cloning.

The NS3p gene was digested and extracted from the agarose gel to be cloned into the vector pTG13077 (kindly provided by PhD Thomas Baumert INSERM / France) after removal of the GFP (green fluorescent protein) gene, resulting in the vector PTG-NS3p (figure 2A). The same gene was also cloned in vector pSFV2genC (kindly provided by PhD Renaud Wagner, University of Strasbourg), forming the vector pSFV-NS3p (Figure 3A).

After cloning vectors were amplified in DH5- α bacteria and purified with QIAGEN Plasmid Maxi Kit.

Transcription in vitro

For *in vitro* transcription vectors pSFV-NS3p (Figure 3A) and pSFV-Helper (Fig. 3B), were linearized with restriction enzymes *NruI* and *SpeI* (respectively), and then, were transcribed in vitro using MAXIscript SP6® Kit (Invitrogen™) using the manufacturer's

instructions and NTP mix (10 mM ATP, CTP, UTP GTP, and 5 mM each). After transcription we performed a treatment with TURBO™ DNase (Ambion®) for 15 minutes to eliminate DNA.

Electroporation

Protocols for transfection were established of HEK-293T cells or BHK-21 cells by electroporation using the Gene Pulser Xcell Electroporation Systems™ with a vector containing the gene of GFP (green fluorescent protein) under control of the cytomegalovirus promoter or by quantification of pseudoparticles produced in different conditions (table 1). From this, we define the conditions for electroporation of these cells according were defined in table 2 depending on the cuvette used.

For the formation of the pseudoparticles HCVpp-NS3p 3×10^7 HEK-293T cells were cultured in T-75 flask for 24 hours at 37 °C with 5% CO₂. They were then washed with PBS and resuspended in 400 or 800 µL of PBS, varying according to the used cuvette. Was added to the cells 4 µg vector pCMV-Gag/Pol, 1.35 µg vector pCMV-E1E2 (vectors kindly provided by PhD Thomas Baumert INSERM / France - Figure 2B) and 4 µg vector PTG-NS3p (Nègre et al. 2000; Bartosch et al. 2003) and two subsequent shocks were applied. After that, the cells were incubated in T-25 flask with 10 mL DMEM supplemented with 10% FBS for 48 hours at 37 °C with 5% CO₂.

The procedure for the formation of pseudoparticles SFV-NS3p was similar to the production of HCVpp-NS3p but were co-transfected BHK-21 cells with the RNAs produced in vitro starting with 2.5 µg vector pSFV-Helper (kindly provided by PhD Renaud Wagner of the University of Strasbourg - figure 3B) and 5 µg vector pSFV-NS3p (Robinson et al. 2003; Benmaamar et al. 2009; Puglia et al. 2013).

Primers

For the sequencing of the pSFV-NS3p vector we used primers SFV-seq-F (5' GACTACAAGGACGATGACGATAA 3') and SFV-seq-R (5' GGTGATGGTGATGGTGATGG 3') that amplified the region named "amplicon A" of figure 4. For the sequencing of the PTG-NS3p vector we used primers PTG-seq-F (5' TCGTTTAGTGAACCGTCAGAT 3') and PTG-seq-R (5' GTTACTGCGGCTATCAGGCT 3') that amplified the region named "amplicon A" of figure 4. And for the molecular analysis of two types of pseudoparticles we used primers NS3p-152-F (5' TGGCCACCTGTATCAACG 3') and NS3p-295-R (5' GTGCAAGGGTCAGGCTTCT 3') that amplified the region named "amplicon B" of figure 4.

Extraction and treatment of genetic material

RNA extraction of pseudoparticles was performed using QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen®) using 140 µL or 280 µL of the supernatant containing the viral particles and elution volume of 80 µL. After extraction 40 µL were used for treatment with DNase I Amplification Grade (Invitrogen™) and, of these, between 3 and 12 µL were subjected to reverse transcriptase with M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen™) using primer NS3p-295-R.

PCR and sequencing

After getting the cDNA of samples, these were amplified by PCR using Taq DNA Polymerase (Invitrogen™) and 200 nM of primers NS3p-F-152 and 295-NS3p-R for 35 cycles (denaturation at 94 °C for 30 seconds, annealing at 58 °C for 20 seconds, and polymerization at 72 °C for 20 seconds, followed by a final extension at 72 °C for 7 minutes).

Sequencing was kindly performed by PhD Mariza Gerdulo dos Santos of Laboratory of Hormones and Molecular Genetics, Department of Endocrinology and Metabolism, Hospital das Clínicas, Faculty of Medicine, University of São Paulo (FMUSP) with primers SFV-seq-F and SFV-seq-R or PTG-seq-F and PTG-seq-R.

qPCR

The quantification of pseudoparticles was performed with 3 µL of the RT samples by real-time PCR performed on StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®) using Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®) with 50 nM of primers NS3p-F-152 and 295-NS3p-R and 40 cycles (denaturation at 95 °C for 15 seconds, annealing at 58 °C for 10 seconds, and polymerization at 60 °C for 20 seconds), and the fluorescence measurement during polymerization. After all cycles of a melt curve was performed with measurements of 0.3°C.

The calibration curve was established from the linearized vector PTG-NS3p and diluted to provide 6×10^7 molecules per microliter vector and then a serial dilution of 10 samples was performed forming 6×10^7 molecules/µL to 6×10^2 molecules/µL.

The values obtained from the quantification were corrected due to dilutions performed during the extraction and treatment of the genetic material of the formula: $N_x((VtRT/Vart)_x(VtDNase/VaDNase)_x(VtEx/VaEx) \div VSb)$, where N (number of copies); VtRT

(total volume of RT); Vart (volume of sample used on RT); VtDNase (total volume of treatment with DNase); VaDNase (sample volume used in the treatment with DNase); VtEx (total extraction volume), VaEx (volume of sample used extraction); and VSb (volume of supernatant used to perform the extraction.)

Infection with pseudoparticles

After determining the amount of pseudoparticles produced per microliter, 3×10^4 HuH-7 cells were grown for 24 hours in 6-well plate with 2 ml of DMEM supplemented with 10% FBS and incubated at 37 °C with 5% CO₂. After this period, the cells were washed with PBS and the entire solution was removed for application of 1 pseudoparticles HCVpp-NS3p per cell. After centrifuging the plate at 400 g for 1 hour at 37 °C was completed well volume to 2 mL with DMEM supplemented with 10% FBS and the plate was incubated at 37 °C with 5% CO₂ again by 48 hours to produce the NS3p protein.

Dot-blotting

The sample preparation for analysis of the expression of NS3 by dot-blotting occurred by treating the infected cells or NS3 protein (ProSpecBio - HCV-246) for 20 minutes in lysis buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl and 1% Nonidet P-40) and centrifuged at 3000 g for 15 minutes.

These samples were applied to protein blotting membrane (Amersham™ Hybond™-ECL), allowed to dry for 10 minutes and washed with TBS. It was then applied blocking solution (TBS + 3% of nonfat milk) for 60 minutes. After blocking the membrane was incubated for 60 minutes with anti-NS3 polyclonal antibody, washed with TBS + 0.05% tween and again incubated for 60 minutes with secondary antibody linked to HRP (anti-mouse antibody). After washing the membrane was incubated with the SuperSignal® West Pico (Thermo) and exposed on an x-ray film for 3 minutes, then it was revealed.

RESULTS

Padronization of eletroporation of HEK-293T cells

We performed electroporation of HEK-293T cells in the four conditions described in Table 1 with the vector pTG13077 and also for the formation of HCVpp. The estimate of fluorescent cells and the relative amount of particles formed are shown in figure 5.

These data suggest that all conditions tested, the better for transfection in 0.2 cm cuvettes is the conditions B and in 0.4 cm cuvettes is the condition C.

Pseudoparticles HCVpp-NS3p e SFV-NS3p

For the formation of pseudoparticles HCVpp-NS3p the HEK-293T cells were electroporated with vectors pCMV-Gag/Pol, pCMV-E1E2 and PTG-NS3p. After that the cells were cultured for 48 hours at 37 °C with 5% CO₂ in DMEM supplemented with 10% FBS. Then, the supernatant obtained from cell culture was centrifuged at 1000 g for 10 minutes, filtered with filter 0.45 µm and 500 µL of samples were stored at -80 °C.

To the formation of pseudoparticles SFV-NS3p the BHK-21 cells were electroporated with in vitro produced RNA vector pSFV-Helper and vector pSFV-NS3p. After that the cells were cultured for 48 hours at 37 °C with 5% CO₂ in DMEM supplemented with 10% FBS. Then, the supernatant obtained from cell culture was centrifuged at 1000 g for 10 minutes, filtered with filter 0.22 µm and 500 µL of samples were stored at -80 °C.

The pseudoparticles were then submitted to the extraction of genetic material, treatment with DNase and reverse transcriptase. These samples were amplified by PCR and analyzed on an agarose gel to identify any remaining DNA of transcription (data not shown).

The samples were quantified by qPCR following verification that there was no DNA in the samples that were treated with DNase and had cDNA after reverse transcriptase.

Quantification of pseudoparticles

cDNA extracted from pseudoparticles was quantification by qPCR in comparison with a calibration curve (Figure 6A). We note that the melt curves of all samples are about the same temperature, 87.1 °C, corresponding to the amplified region NS3p this procedure (figure 6B).

Using the calibration curve, the pseudoparticles formed were quantified. Figure 6C summarizes our findings that indicate a production of approximately 400 pseudoparticles HCVpp-NS3p per microliter of the supernatant collected after transfection with 0.2 cm cuvettes. When transfection was performed in cuvettes of 0.4 cm, there was no detection of pseudoparticles HCVpp-NS3p.

For SFV-NS3p pseudoparticles that were produced after transfection in 0.2 cm cuvettes were quantified in approximately 1.1×10^4 pseudoparticles per microliter and in relation to the cuvettes of 0.4 cm by about 2.4×10^4 pseudoparticles microliter (figure 6C).

Analysis of the expression of NS3p in cells infected with pseudoparticles

After infection of HuH-7 cells by pseudoparticles HCVpp-NS3p, these cells were lysed and dot blotting was performed. The NS3p production by infected cells was observed (figure 7C). This result indicates that the produced particles are able to infect cells and which are carrying the necessary genetic material for production of the heterologous protein.

DISCUSSION

Although many authors describe the production of HCVpps by chemical transfection agents, such as FuGENE®, calcium phosphate or lipofectamine® (Russell et al. 2009; Baldick et al. 2010; Bonnafous et al. 2010; Deest et al. 2013). We decided to perform transfection by electroporation of HEK-293T cells, in our study this method was efficient for producing the HCVpp-NS3p only in transfections with 0.2 cm cuvettes.

After transfection HCVpp-NS3p were quantified by qPCR using a method with specific primers for the heterologous gene and showed quantities of 400 pseudoparticles per microliter of supernatant. This quantity is lower than that described by Sharma et al. (2011) that estimated the concentration of particles at approximately 1.5×10^4 pseudoparticles/ μ L and above that found by Deest et al. (2013), which is approximately 200 pseudoparticles/ μ L. Unlike the cited studies that estimated the amount of pseudoparticles through the heterologous protein activity, our quantification takes into account the amount of heterologous mRNA, which is probably a more accurate way to quantify the HCVpp.

The infection of HuH-7 cells with 1 pseudoparticles HCVpp-NS3p per cell indicates that the particles formed are effective production of the portion of the HCV NS3 protein. Better studies are still needed to identify the optimal proportion of pseudoparticles per cell for the synthesis of this protein in infection with HCVpp-NS3p and *in vivo* studies to analyses the immune response.

About the SFV pseudoparticles according Benmaamar et al. (2009) and Puglia et al. (2013) the pseudoparticles were produced by electroporation in 0.2 cm cuvettes. In our work we performed transfections with two types of cuvettes and our results indicate that the production

of SFV-NS3p was twice as high when using cuvettes of 0.4 cm, reaching levels of 2.4×10^4 pseudoparticles/ μL .

Unlike the cited work, who carried out the measurements of pseudoparticles using the SFV NS1 gene as a target for qPCR, our work carried out directly by quantifying the gene of interest and the amount of virus obtained was close to that reported by the authors that was between 8×10^4 and 8×10^5 pseudoparticles/ μL .

In this work it was not possible to identify the NS3p expressed by BHK-21 cells infected with SFV-NS3p due to some protein present in BHK-21 cells that were recognized by the polyclonal anti-NS3 (data not shown). Further study were to be conducted to verify production NS3p protein in cells infected with the SFV-NS3p pseudoparticles.

CONCLUSION

After obtaining the construction of vectors we performed transfection by electroporation of the genetic for the formation of pseudoparticles "HCVpp-NS3p" or SFV-NS3p in HEK-293T or BHK-21 (respectively) cell materials. We obtained similar amounts of pseudoparticles those that had already been described. And the HCVpp-NS3p pseudoparticles were able to infect HUH-7 cells and express NS3p.

Our system of quantification by qPCR using the gene of interest was efficient in both systems to quantify the pseudoparticles developed in this work.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank PhD Thomas Baumert INSERM / France and PhD Renaud Wagner of the University of Strasbourg for providing the vectors for the production of pseudoparticles, and PhD Mariza Gerdulo dos Santos for performing the sequencing of the vectors constructed in his laboratory.

REFERENCES

- Abbas AK, Lichtman AH (2007) *Imunologia Básica: funções e distúrbios do sistema imunológico*. Elsevier, Rio de Janeiro
- Alavian S-M, Mahboobi N, Mahboobi N, Karayiannis P (2013) Oral conditions associated with Hepatitis C virus infection. *Saudi J Gastroenterol* 19:245–251. doi: 10.4103/1319-3767.121032

- Alter HJ, Seeff LB (2000) Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin Liver Dis* 20:17–35.
- Arnaud N, Dabo S, Maillard P, et al. (2010) Hepatitis C virus controls interferon production through PKR activation. *PLoS One* 5:e10575. doi: 10.1371/journal.pone.0010575
- Ashfaq UA, Khan SN, Nawaz Z, Riazuddin S (2011) In-vitro model systems to study Hepatitis C Virus. *Genet Vaccines Ther* 9:7. doi: 1479-0556-9-7 [pii] 10.1186/1479-0556-9-7
- Baldick CJ, Wichroski MJ, Pendri A, et al. (2010) A novel small molecule inhibitor of hepatitis C virus entry. *PLoS Pathog* 6:e1001086. doi: 10.1371/journal.ppat.1001086
- Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL (2003) Infectious Hepatitis C Virus Pseudo-particles Containing Functional E1–E2 Envelope Protein Complexes. *J Exp Med* 197:633–642. doi: 10.1084/jem.20021756
- Bartoschek S, Buurman G, Geierstanger BH, et al. (2003) Measurement and ab Initio Calculation of CSA/Dipole–Dipole Cross-Correlated Relaxation Provide Insight into the Mechanism of a H2-Forming Dehydrogenase. *J Am Chem Soc* 125:13308–13309. doi: 10.1021/ja029953i
- Baumert T, Ito S, Wong D, Liang T (1998) Hepatitis C Virus Structural Proteins Assemble into Viruslike Particles in Insect Cells. *J Virol* 72:3827–3836.
- Benmaamar R, Astray RM, Wagner R, Pereira CA (2009) High-level expression of rabies virus glycoprotein with the RNA-based Semliki Forest Virus expression vector. *J Biotechnol* 130:283–290. doi: 10.1016/j.jbiotec.2008.12.009
- Berger A, Giroglou T, Leutz A, et al. (2009) Measurements of HCV neutralizing antibodies and of HCV-specific CD4+ and CD8+ cells using hepatitis C virus pseudo-particles (HCVpp). *J Clin Virol* 46:55–60. doi: 10.1016/j.jcv.2009.05.036
- Bonnafous P, Perrault M, Le Bihan O, et al. (2010) Characterization of hepatitis C virus pseudoparticles by cryo-transmission electron microscopy using functionalized magnetic nanobeads. *J Gen Virol* 91:1919–1930. doi: 10.1099/vir.0.021071-0
- Brinster C, Chen M, Boucreux D, et al. (2002) Hepatitis C virus non-structural protein 3-specific cellular immune responses following single or combined immunization with DNA or recombinant Semliki Forest virus particles. *J Gen Virol* 83:369–381.
- Brinster C, Inchauspé G (2001) DNA vaccines for hepatitis C virus. *Intervirology* 44:143–53. doi: int44143 [pii]
- Brinster C, Muguet S, Lone Y, et al. (2001) Different hepatitis C virus nonstructural protein 3 (Ns3)-DNA[ndash]expressing vaccines induce in HLA-A2.1 transgenic mice stable cytotoxic T lymphocytes that target one major epitope. *Hepatol Baltim Md* 34:1206–1217. doi: 10.1053/jhep.2001.29304
- Chou R, Cottrell EB, Wasson N, et al. (2012) Screening for Hepatitis C Virus Infection in Adults. 19.
- Chou R, Hartung D, Rahman B, et al. (2013) Comparative Effectiveness of Antiviral Treatment for Hepatitis C Virus Infection in Adults: A Systematic Review. *Ann Intern Med* 158:114–123. doi: 10.7326/0003-4819-158-2-201301150-00576
- Deest M, Westhaus S, Steinmann E, et al. (2013) Impact of single nucleotide polymorphisms in the essential HCV entry factor CD81 on HCV infectivity and neutralization. *Antiviral Res.* doi: 10.1016/j.antiviral.2013.10.018

- Hourieux C, Ait-Goughoulte M, Patient R, et al. (2007) Core protein domains involved in hepatitis C virus-like particle assembly and budding at the endoplasmic reticulum membrane. *Cell Microbiol* 9:1014–1027. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00848.x
- Imbert I, Dimitrova M, Wolf M, Schuster C (2004) Réplication du virus de l'hépatite C: systèmes d'étude, avantages et limites. *Virologie* 8:281–95.
- Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, et al. (1994) Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol* 75 (Pt 7):1755–60.
- LANSLLC (2007) CTL Epitope Summary. Los Alamos National Security, LLC
- Liljeström P, Garoff H (1991) A New Generation of Animal Cell Expression Vectors Based on the Semliki Forest Virus Replicon. *Bio/Technology* 9:1356–1361. doi: 10.1038/nbt1291-1356
- Lindenbach BD, Rice CM (2001) Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM (eds) *Fields Virol.*, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 991–1042
- Di Lorenzo C, Angus AGN, Patel AH (2011) Hepatitis C Virus Evasion Mechanisms from Neutralizing Antibodies. *Viruses* 3:2280–2300. doi: 10.3390/v3112280
- Mancini N, Diotti RA, Perotti M, et al. (2009) Hepatitis C Virus (HCV) Infection May Elicit Neutralizing Antibodies Targeting Epitopes Conserved in All Viral Genotypes. *PLoS ONE* 4:e8254. doi: 10.1371/journal.pone.0008254
- Mehta B, Kumar V, Chawla S, et al. (2013) Hepatitis C: Is a vaccine the solution? *Hum Vaccines Immunother.* doi: 10.4161/hv.26970
- Mello I, Thumann C, Schvoerer E, et al. (2009) Conservation of hepatitis C virus nonstructural protein 3 amino acid sequence in viral isolates during liver transplantation. *J Viral Hepat* 16:732–737. doi: 10.1111/j.1365-2893.2009.01125.x
- Nègre D, Mangeot PE, Duisit G, et al. (2000) Characterization of novel safe lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) that efficiently transduce mature human dendritic cells. *Gene Ther* 7:1613–1623. doi: 10.1038/sj.gt.3301292
- Pearlman BL (2004) Hepatitis C infection: a clinical review. *South Med J* 97:364–373; quiz 374.
- Peres-da-Silva A, Almeida AJ, Lampe E (2012) Genetic diversity of NS3 protease from Brazilian HCV isolates and possible implications for therapy with direct-acting antiviral drugs. *Memórias Inst Oswaldo Cruz* 107:254–261. doi: S0074-02762012000200016 [pii]
- Puglia ALP, Rezende AG, Jorge SAC, et al. (2013) Quantitative RT-PCR for titration of replication-defective recombinant Semliki Forest virus. *J Virol Methods* 193:647 – 652. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.07.058>
- Robinson A, Hudson MJ, Cranage MP (2003) *Vaccine Protocols*. Springer
- Russell RS, Kawaguchi K, Meunier JC, et al. (2009) Mutational analysis of the hepatitis C virus E1 glycoprotein in retroviral pseudoparticles and cell-culture-derived H77/JFH1 chimeric infectious virus particles. *J Viral Hepat* 16:621–632. doi: 10.1111/j.1365-2893.2009.01111.x
- Sharma NR, Mateu G, Dreux M, et al. (2011) Hepatitis C virus is primed by CD81 protein for low pH-dependent fusion. *J Biol Chem* 286:30361–30376. doi: 10.1074/jbc.M111.263350
- Shukla DD, Hoyne PA, Ward CW (1995) Evaluation of complete genome sequences and sequences of individual gene products for the classification of hepatitis C viruses. *Arch Virol* 140:1747–61.

- Stoll-Keller F, Barth H, Fafi-Kremer S, et al. (2009) Development of hepatitis C virus vaccines: challenges and progress. *Expert Rev Vaccines* 8:333–45. doi: 10.1586/14760584.8.3.333
- Wen B, Deng Y, Chen H, et al. (2013) The novel replication-defective vaccinia virus (Tiantan strain)-based hepatitis C virus vaccine induces robust immunity in macaques. *Mol Ther* 21:1787–1795. doi: 10.1038/mt.2013.122
- World Health Organization (2011) Hepatitis C. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>. Accessed 11 May 2013

Nucleotide		1	2 2	3	5 5	6	7	9 9			
3	9	4	5 7	4	3 4	2	6	3 6			
4	1	9	8 6	2	1 7	5	0	7 4			
1	2	5	0 9	0	3 5	8	2	8 6

5'UTR	C	E1	E2	P7	NS2	NS3	NS4A	NS4B	NS5A	NS5B	3'UTR
1	1	3	7 8	1	1	1	1	1	2	3	
	9	8	4 1	0	6 7	9	4	4	2	0	
	2	4	7 0	2	5 1	7	2	2	1	1	
Amino Acid				7	8 2	3	1			2	

Figure 1. Representation of the location of the sequence used in the work inside the HCV genotype 1a genome (generated at: <http://hcv.lanl.gov/content/index> - accessed on 11/19/2013) (LANSLC 2007).

Figure 2. Scheme of vectors PTG-NS3p (A); pCMV-Gag/Pol and pCMV-E1E2 (B) used for the formation of pseudoparticles HCVpp-NS3p.

Figure 3. Scheme of vectors pSFV-NS3p (A) constructed in this work and pSFV-Helper (B) developed by Liljeström and Garoff (1991) with sites of the restriction enzymes NruI and SpeI.

Table 1. Conditions for padronization of electroporation of HEK-293T.

Coditions	Cuvette	Voltage (V)	Capacitance (μ F)	Resistance (Ω)
A	0,2 cm	110	75	∞
B	0,2 cm	280	75	∞
C	0,4 cm	650	25	∞
D	0,4 cm	1150	25	∞

Table 2. Conditions for electroporation of HEK-293T and BHK-21 cells.

Cell	Cuvette	Voltage (V)	Capacitance (μ F)	Resistance (Ω)
HEK-293T	0,2 cm	280	75	∞
	0,4 cm	650	25	∞
BHK-21	0,2 cm	360	75	∞
	0,4 cm	1500	25	∞

Figure 4. Scheme of the vectors containing the NS3p and amplified regions resulting primer pairs used for sequencing, PCR or qPCR.

Figure 5. Relative amount of pseudoparticles produced according to the condition used for transfection.

Figure 6. Real-time PCR of pseudoparticles HCVpp-NS3p and SFV-NS3p. Amplification curve (A); melt curve (B); and quantification by qPCR of pseudoparticles in 10^3 particles per microliter varying according to the used cuvette (C).

Figure 7. Dot-blotting analysis of the expression of NS3p by HUH-7 cells infected. Control uninfected cells (A), control of HCV NS3 protein ProSpecBio (B) and NS3p protein synthesized by HUH-7 cells infected with 1 MOI of HCVpp-NS3p.