



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS REATIVOS AOS SOROS DE PACIENTES
HCV⁺ E SUA INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO DA FIBROSE
HEPÁTICA**

XAIANE MARTINS SILVA FREITAS

MANAUS – AMAZONAS

2021

XAIANE MARTINS SILVA FREITAS

**SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS REATIVOS AOS SOROS DE PACIENTES
HCV⁺ E SUA INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO DA FIBROSE
HEPÁTICA**

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Malheiro Alle Marie

Coorientadora: Dra. Andréa Monteiro Tarragô

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

MANAUS – AMAZONAS

2021

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

F866s Freitas, Xaiane Martins Silva
Seleção de peptídeos reativos aos soros de pacientes HCV+ e sua influência no desenvolvimento da fibrose hepática. / Xaiane Martins Silva Freitas . 2021
85 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Adriana Malheiro Alle Marie
Coorientadora: Andréa Monteiro Tarragô
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Hepatite C. 2. Fibrose. 3. Phage Display. 4. Proteína F (ARPF).
I. Marie, Adriana Malheiro Alle. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Dedico a Deus que tem me sustentado todos os dias e a minha família, em especial a minha mãe Sirley Martins e ao meu amado esposo Lucas Gaspar que em tudo me apoiaram.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Sem dúvida minha maior gratidão ofereço ao meu *Deus* que nem por um momento me deixou sozinha. A Ele seja dada toda hora e glória.

Agradeço a minha amada família, na pessoa de minha mãe *Sirley Martins* mulher guerreira que sempre lutou pelo sucesso de seus filhos, ao meu querido esposo *Lucas Gaspar* pelo companheirismo e paciência e aos meus tios *Gilson Ferreira* e *Neide Silveira* pelo apoio que sempre me deram.

As minhas queridas amigas *Yasmim Vasconcelos* e *Laynah Pimenta*, pela amizade e companheirismo.

A minha orientadora *Dr^a Adriana Malheiro Alle Marie*, pela oportunidade, aprendizado, apoio e por toda paciência dedicados a mim, orientando de forma exemplar.

A minha coorientadora *Dr^a Andrea Monteiro Tarragô*, que mais que orientação profissional me ofereceu um colo de mãe, nunca mediu esforços para me ajudar e foi fundamental nessa caminhada, agradeço a Deus por sua vida e por Ele ter te colocado em meu caminho.

Ao Prof. *Dr^o Luiz Goulart (in memorian)* e toda sua equipe pela ajuda e por disponibilizar o *laboratório de Nanotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia- UFU* para execução de parte do projeto. Em especial a *Emília Vaz* por todo o aprendizado que me proporcionou.

A *Universidade Federal do Amazonas* e ao *Programa de Pós-graduação em Biotecnologia* pela oportunidade e estrutura a mim concedida para me tornar Mestre em Biotecnologia.

A *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)* pela Bolsa de Mestrado e auxílio financeiro, a *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (Fapeam)* e pelo apoio financeiro e ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)* pelo financiamento da pesquisa.

A *Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas* pelo espaço e equipamentos oferecidos no laboratório para execução deste projeto. Também a todos da equipe pelo apoio e amizade, em especial *Juliana Affonso e Regiane Costa*.

Por fim a todos os indivíduos que aceitaram participar desse estudo, *pacientes* da *Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourados* e *doadores* da *Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas*, sem vocês o estudo não seria possível.

Confie no Senhor de todo o coração e não se apoie na sua própria inteligência. Lembre-se de Deus em tudo o que fizer, e ele lhe mostrará o caminho certo.

Provérbios 3:5-6

RESUMO

A hepatite C é um problema de saúde pública que afeta mais de 185 milhões de pessoas no mundo. É uma doença de prognóstico muito variável que pode evoluir para cura ou para o desenvolvimento de hepatite C crônica, cirrose hepática, carcinoma hepatocelular e morte. Apesar da elevada sensibilidade e especificidade dos métodos de triagem para o vírus da Hepatite C, há uma grande necessidade de desenvolver marcadores que sejam capazes de prever cronificação da doença, com percentuais aceitáveis de sensibilidade e especificidade. A identificação de novos epítomos de superfície, do HCV, e seus mimétopos é de grande valia para o desenvolvimento de plataformas nanotecnológicas que poderão ser utilizadas como novas estratégias de diagnóstico rápido e específico, para esta e outras patologias em populações de risco. A tecnologia de *Phage Display* tem sido proposta como uma das ferramentas promissoras para desenvolver novos testes de diagnóstico em virtude da capacidade de interagir com biomoléculas, além de poder gerar produtos que atendam às exigências dos laboratórios clínicos com relação custo-eficácia. Essa proposta teve por objetivo identificar peptídeos miméticos aos antígenos de HCV que sejam imunorreativos e que possam ser usados em novas plataformas nanobiotecnológicas para fins de diagnóstico, por meio da (a) seleção de peptídeos miméticos aos antígenos de HCV reativos contra IgG total purificada de pacientes com diferentes estágios de doença hepática; (b) verificação da reatividade dos clones obtidos contra IgG em *pools* de soros de pacientes com fibrose hepática grave; (c) comparação da similaridade de peptídeos encontrados com outras proteínas do vírus da Hepatite C em uma análise *in silico*. Foram selecionados 83 clones significativamente reativos ao soro de pacientes com Fibrose Grave. Deste, 6 clones se relacionavam com a Proteína F, uma proteína potencialmente envolvida na cronicidade da Hepatite C. Após realizar a análise *in silico* identificou-se um mimétopo de um possível epítomo da proteína F do HCV que pode está interagindo com enzima glutathione S-transferase A3 (GSTA3), conhecida por inibir o processo fibrogênico em células estreladas do fígado. Com o desenvolvimento do projeto, verificou-se que os peptídeos miméticos reativos aos soros de pacientes HCV⁺ selecionados pela técnica *Phage Display* parecem ser promissores para a utilização em ensaios de diagnóstico em fibrose hepática.

Palavras-chaves: Hepatite C, Fibrose, *Phage Display*, Proteína F.

ABSTRACT

Hepatitis C is a public health problem that affects more than 185 million people worldwide. It is a disease with very variable prognosis that can progress to cure or to the development of chronic hepatitis C, liver cirrhosis, hepatocellular carcinoma and death. Despite the high sensitivity and specificity of screening methods for the hepatitis C virus, there is a great need to reject markers that are capable of predicting disease chronicity, with acceptable percentages of sensitivity and specificity. The identification of new surface epitopes and their mimotopes is of great value for the development of nanotechnology platforms that can be used as new rapid and specific diagnostic strategies for this and other pathologies in populations at risk. Phage Display technology has been proposed as one of the promising tools to develop new diagnostic tests due to its ability to interact with biomolecules, in addition to being able to generate products that meet the requirements of clinical laboratories in a cost-effective way. This proposal aimed to: a) select mimetic peptides to HCV antigens reactive against total purified IgG from patients with different stages of liver disease; b) verify the reactivity of the clones obtained against IgG in pooled sera from patients with severe hepatic fibrosis; c) compare the similarity of peptides found with other Hepatitis C virus proteins in a silica analysis. Through the biofilling process, 83 incomplete clones reactive to patients with Severe Fibrosis were selected. Of these, 6 clones were related to an F protein, one potentially involved in the chronicity of hepatitis C. After performing the in-silico analysis, a mimetopes of a possible epitope of the HCV F protein that may be interacting with the glutathione S-transferase A3 (GSTA3), known to inhibit the fibrogenic process in liver stellate cells. With the development of the project, it was found that mimetic peptides reactive to sera from HCV patients selected by the Phage Display technique seems to be promising for use in diagnostic assays in liver fibrosis.

Keywords: Hepatitis C, Fibrosis, Phage Display, Protein F.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do vírus da hepatite C.....	23
Figura 2: Organização do genoma viral, estrutura polipeptídica e funções proteicas.....	26
Figura 3: Organização do genoma viral. a) sequência aberta de leitura (ORF). b) processo de <i>frameshift</i> que origina a proteína F e as posições de cada aminoácido de início para cada isomorfa.....	27
Figura 4: O gráfico de antigenicidade da proteína F (aminoácido 1-161). Valores positivos indicam áreas hidrofílicas ou antigênicas.....	28
Figura 5: Prevalência de cada genótipo do HCV no mundo.....	29
Figura 6: Representação do Ciclo de vida do HCV.	31
Figura 7: Associação do HCV com lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e muito baixa densidade (VLDL), alta densidade (HDL) e apolipoproteína. Partícula de HCV compartilhando o envelope com a lipoproteína de baixa densidade (LDL)	31
Figura 8: Esquema do ciclo de vida do vírus da hepatite C.....	33
Figura 9: Cálculos matemáticos para a realização APRI (<i>AST to Platelet Ratio Index</i>) e FIB4 (<i>Fibrosis-4</i>).....	35
Figura 10: a) Condições Hepáticas no início da infecção b) Alterações associadas à fibrose hepática avançada.....	42
Figura 11: Representação esquemática da partícula viral M13. O gene codificador do peptídeo está inserido no genoma do fago e é expresso junto com a proteína pIII no capsídeo.....	43
Figura 12: Ciclo de infecção do bacteriófago M13.....	44
Figura 13: <i>Biopanning</i> : Ciclo de seleção por <i>phage display</i>	45
Figura 14: Estratégia do <i>biopanning</i> para seleção de peptídeos miméticos ao HCV.....	54
Figura 15: Titulação dos fagos. Formação das colônias azuis indicam as linhagens transformadas.....	55
Figura 16: Pré-validação dos fagos por Phage– Elisa utilizando pools de amostras do grupo de pacientes com Fibrose Grave e Controle negativo a fim de verificar a reatividade dos fagos. Primeira metade das placas contém Fibrose Grave e a segunda metade das placas contém Controle negativo. as amostras foram testadas em duplicatas.....	60
Figura 17: Phage-ELISA dos clones selecionados por <i>biopanning</i> , pacientes positivos a Fibrose Grave em comparação a indivíduos saudáveis (grupo controle)	61

Figura 18: Produtos da extração visualizados por separação eletroforética em gel de agarose (8%). Seleção aleatória dos fagos para demonstração.....	61
Figura 19: Melhor modelo obtido por meio da predição da estrutura tridimensional por meio <i>software on-line I-Tasser</i> para a sequência dos clones F1, C7 e G11.....	66
Figura 20: Melhor modelo obtido por meio da predição da estrutura tridimensional por meio <i>software on-line I-Tasser</i> para a sequência do clone E4.....	66
Figura 21: Melhor modelo obtido por meio da predição da estrutura tridimensional por meio <i>software on-line I-Tasser</i> para a sequência do clone D6.....	67
Figura 22: Melhor modelo obtido por meio da predição da estrutura tridimensional por meio <i>software on-line I-Tasser</i> para a sequência do clone H8.....	67
Figura 23: Melhor modelo obtido por meio da predição da estrutura tridimensional por meio <i>software on-line I-Tasser</i> para a sequência do clone H11.....	68
Figura 24: Melhor modelo obtido por meio da predição da estrutura tridimensional por meio <i>software on-line I-Tasser</i> para a sequência do clone G5.....	68
Figura 25: Modelo que demonstra o local de ligação do ligante previsto. As esferas verde-amarelas indicam os ligantes de ligação previstos e os palitos azuis indicam os resíduos de ligação ao ligante.....	69
Figura 26: Alinhamento tridimensional realizado <i>software on-line Pepitope Server</i> . Pontuação de alinhamento: 11,3002 <i>p</i> -valor: 0,001.....	70
Figura 27: Contribuição da proteína F no carcinoma hepatocelular.....	73
Figura 28: Efeito da proteína F nas células imunológicas.....	74

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Caracterização de fibrose hepática conforme valores de APRI e FIB4 (Pag. 36)

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Sequências identificadas a partir da biblioteca de (PhD-c7c) alinhados com proteínas do banco de dados NCBI/BLAST com número de acesso e porcentagem da cobertura e identidade. (Freq) corresponde a frequências de cada sequência encontrada. (*) corresponde aos aminoácidos da sequência e foi usado para manter o sigilo das sequências selecionadas. (Pag. 62)

Quadro 2: Peptídeos identificados a partir da biblioteca de (PhD-12) alinhados com proteínas do banco de dados NCBI/BLAST com número de acesso e porcentagem da cobertura e identidade. (Freq) corresponde a frequências de cada sequência encontrada. (*) corresponde aos aminoácidos da sequência e foi usado para manter o sigilo das sequências selecionadas. (Pag. 63)

Quadro 3: Sequências identificadas e alinhadas com Proteínas F no banco de dados NCBI/BLAST com número de acesso e região de alinhamento. Os aminoácidos grafados em negrito e sublinhados fazem referência as sequências que são homólogas às encontradas no banco de dados do *GenBank*. Query corresponde a sequência identificadas e Sbjct corresponde a sequência já existente no banco de dados. (*) corresponde aos aminoácidos da sequência e foi usado para manter o sigilo das sequências selecionadas. (Pag. 63)

Quadro 4: Alinhamento linear pelo *software on-line Clustal Omega*. (*) resíduos de aminoácidos idênticos, (:) substituição conservada com características básicas, ácidas ou neutras conservadas. (#) na coluna de sequência corresponde aos aminoácidos da sequência e foi usado para manter o sigilo das sequências selecionadas. (Pag. 64)

FLUXOGRAMA

Fluxograma 1: Fluxograma apresenta as etapas da pesquisa de forma resumida para a melhor compreensão da metodologia e dos resultados. (Pag. 49)

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

anti-F – anticorpo contra proteína F

anti-HCV - anticorpo contra vírus da Hepatite C

HCV-RNA – RNA do HCV

ALT – Alanina Aminotransferase

ARPF- Proteína derivada de um quadro alternativo (proteína F)

APC - Célula Apresentadora de Antígeno

APRI - AST to Platelet Ratio Index

AP-1- Proteína adaptadora 1

AST – Aspartato Aminotransferase

CD - Célula Dendrítica

D1 – ciclina, proteína que promove a inativação da proteína supressora de tumor

CD81 - Receptor Tetraspanina

CLDN1 - Claudina -1

C1 -Proteína do complemento

C- score- pontuação de confiança

COFACTOR- prevê as possíveis funções

C-MYC- oncogene

E1 - Glicoproteína do envelope 1

E2 - Glicoproteína do envelope 2

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

ELISA – Ensaio imunoenzimático

EUA - Estados Unidos da América

FIB4 - Fibrosis-4

FMT-HVD - Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado

FoxP3+ - Fator de transcrição

GSK-3- Quinase do receptor acoplado à proteína G

GAGs – Glicosaminoglicanos

HCC - Carcinoma Hepatocelular

HCV - Vírus da hepatite C

HEMOAM - Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas

HSCs – Células estreladas hepáticas

HVR - Região hipervariável

HEMOAM – Fundação Hospitalar em Hematologia e Hemoterapia do Amazonas

HLA -Antígeno leucocitário humano

HSCs - Células Estreladas

IFN– Interferon

IFN- γ – Interferon-gama

IL – Interleucina

ISG – Genes estimuladores de Interferon

LT CD4+ - Linfócitos T auxiliares ou T Helper

LT CD8 - Linfócitos T citotóxicos

LTC- candidatos a transplante de fígado

I-TASSER- Iterative Threading Assembly Refinement (Refinamento do Conjunto de Rosqueamento Iterativo)

MAPK- proteína quinase ativada por mitógeno

MEC – Matriz Extra Celular

M13 – Bacteriófago M13

MM-1- Proteína de ligação a c-Myc

MIP-1 β - proteína inflamatória em macrófago-1beta

METAVIR - Meta-análise de dados histológicos em hepatite viral

MMPs – Metaloproteinases

NAT – Teste de Amplificação de Ácidos Nucléicos

NK - Natural Killer

NKT – Natural Killer T

NS - Não estrutural

N-terminal - Extremidade amino - terminal (NH₂) da proteína

NF- κ B -factor nuclear κ B

NCBI/BLAST- Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local

OCLN - Ocludina

OMS - Organização Mundial de Saúde

ORF - Fase de leitura aberta

PAMPs - Padrões Moleculares Associados aos Patógenos

PBMCs - células mononucleares do sangue periférico

PDCs - células dendríticas plasmocitoides

Pepsurf- algoritmo de mapeamento de epítipo

Ph.D.-C7C / Ph.D.-12M – Biblioteca com sequências randômicas

PD – *Phage Display*

Pb - Pares de bases

PBS-W – Solução Tamponada com Fosfato e Albumina

PRRs - Receptores de Reconhecimento Padrão

P7 - Proteína P7

P53- gene supressor tumoral

p21- proteína que regula a transição da fase G1 para S no ciclo celular

PCR - proteína C-reativa

RdRp - RNA dependente de RNA Polimerase

RE - Retículo Endoplasmático

RNA - Ácido ribonucléico

SRBI – Receptor Scavenger B tipo I

SGA3 - glutationa S-transferase A3

T CD4+CD25+ - Célula T efetora

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGF- β – Fator de Crescimento Transformador-beta

Th1 - Célula T auxiliar

Th2 - Célula T auxiliar

TLR - Receptor do Tipo Toll

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral-alfa

TIMPS - inibidores específicos das metaloproteinases

TGF- β - Fator de crescimento tumoral

TM-score- mede a similaridade estrutural entre duas estruturas

UNIFESO -Centro Universitário Serra dos Órgãos

UFAM - Universidade Federal do Amazonas

VEGF- fator de crescimento endotelial vascular

UFPA - Universidade Federal do Pará

UFAM – Universidade Federal do Amazonas

UFU - Universidade Federal de Uberlândia

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	20
2.0 REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	22
2.1 Descoberta e dados Epidemiológicos da Hepatite C.....	22
2.2 Classificação, estrutura e organização genômica do vírus.....	22
2.2.1 Proteínas Estruturais e Não Estruturais.....	24
2.2.1.1 Proteína F.....	26
2.2.2 Genótipos e subgenótipos.....	28
2.3 Ciclo de vida.....	30
2.4 Modos de Transmissão do vírus da hepatite C.....	33
2.5 Abordagem Diagnóstica.....	34
2.6 Aspectos Clínicos.....	36
2.7 Imunopatogenicidade da infecção por HCV.....	38
2.8 <i>Phage Display</i> (PD)	42
2.8.1 <i>Phage Display</i> : A descoberta de novos alvos biológicos.....	46
3.0 OBJETIVOS	48
3.1 Objetivo Geral	
3.2 Objetivos específicos	
4.0 METODOLOGIA.....	49
4.1 Desenho do estudo.....	50
4.2 Casuística.....	50
4.3 Considerações éticas.....	51
4.4 Variáveis Sócio-demográficas, Clínicas e Laboratoriais Avaliadas.....	51
4.5 Métodos não invasivos para detecção da fibrose hepática.....	51
4.6 Coleta de Dados e Material Biológico.....	52
4.7 <i>Phage Display</i> : Seleção de Peptídeos.....	52
4.7.1 Acoplamento das IgG nas microesferas com proteína G.....	52
4.7.2 <i>Biopanning</i> : Seleção de fagos.....	53

4.7.3 Titulação.....	55
4.7.4 Amplificação e purificação de fagos.....	56
4.7.5 Pré-validação de peptídeos por <i>PHAGE ELISA</i>	56
4.7.6 Extração de DNA.....	57
4.7.7 Sequenciamento.....	58
4.7.8Análise de Bioinformática.....	58
4.7.9 Estatística.....	59
5.0 RESULTADOS.....	60
6.0 DICUSSÃO.....	71
7.0 CONCLUSÃO.....	77
8.0 REFERÊNCIAS.....	78

Desde sua descoberta, em 1989, o vírus da hepatite C (HCV) é a principal causa de doença hepática crônica nos países industrializados e emergentes (WESTBROOK; DUSHEIKO, 2014). Segundo a estimativa mais recente da Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de 3% da população mundial, 71 milhões de pessoas, está infectada por esse vírus, resultando em aproximadamente 400 mil mortes por ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde (2019), por meio do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), entre os anos de 1999 a 2018 foram confirmados 228.695 casos de Hepatite C no país, com prevalência de 57,7% dos casos no sexo masculino e 42,3% no sexo feminino. As faixas etárias com maiores detecção estão entre 55-59 anos em ambos os sexos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Em 2018 o Estado do Amazonas notificou cerca de 8 casos para cada 100 mil habitantes, com exceção da capital do estado, Manaus, que notificou cerca de 12,6 casos para cada 100 mil habitantes. Quanto ao coeficiente de mortalidade por hepatite C como causa básica, observou-se aproximadamente 0,7 óbito por 100.000 habitantes entre os anos de 2007 a 2017 (BRASIL, 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

A hepatite C, se dá, na maioria dos casos, de forma assintomática ou apresenta sintomas inespecíficos, o que pode propiciar, através da falta de tratamento, a evolução da doença de forma lenta e no longo período de tempo para suas formas crônicas: fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Dos casos crônicos, 20% evoluem para cirrose hepática, no decorrer do tempo, e 1% a 5% dos pacientes desenvolvem carcinoma hepatocelular a cada ano (WESTBROOK; DUSHEIKO, 2014).

A cronicidade da doença está relacionada à alterações histológicas e vasculares que levam o paciente a quadros de icterícia, hemorragia varicosa, ascite e encefalopatia portossistêmica, entre outras complicações que resultam na insuficiência hepática podendo levar o mesmo ao óbito (COLLETTA *et al.*, 2005).

Esse quadro fibrótico pode ser diagnosticado através de testes invasivos e não invasivos que além de diagnosticar, classificam o estadiamento da doença. A biópsia hepática percutânea, apesar de invasiva, representa o “padrão-ouro” para o diagnóstico da fibrose hepática. No entanto, nem sempre é possível a realização dela já que exige estrutura apropriada e hospitalização do paciente. Outras alternativas são os métodos não invasivos

como elastografia hepática, e escalas de estadiamento histológico, como o escore APRI (*AST to Platelet Ratio Index*) e FIB-4 (*Fibrosis-4*) que permitem estratificar, em ordem crescente, o diagnóstico de fibrose hepática (WHO, 2014).

Entretanto, ao nos referirmos ao Estado do Amazonas, sabemos que tais procedimentos não são disponibilizados pela maioria dos municípios do estado, seja por falta de profissionais, equipamentos ou locais adequados, sendo esse um potencial motivo que leva o paciente ao desconhecimento da doença. Além disso, sabe-se que o território amazonense é de grande extensão e possui muitas comunidades isoladas, nos quais, inúmeros pacientes não possuem condições socioeconômicas para deslocar-se aos grandes centros de atendimento na capital do Amazonas, Manaus. Em vista disso, propomos que apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento da hepatite C, esses não se estendem à cura ou regressão dos danos causados ao tecido hepático, tornando o diagnóstico precoce da fibrose uma etapa fundamental para o combate da evolução da doença para suas formas mais graves.

Atualmente, uma das técnicas mais promissoras que visam o desenvolvimento de novas tecnologias para o diagnóstico de doenças infecciosas e parasitárias é a técnica de *Phage Display* (PD), baseada na expressão de peptídeos exógenos na superfície do fago codificados pelo DNA exógeno inserido em fusão com o gene do capsídeo viral (BARBAS *et al.*, 2001).

Desse modo, a aplicação da tecnologia PD pode contribuir significativamente na identificação de novos epítomos que podem ser utilizados em novos ensaios para diagnóstico da fibrose, para fins de prevenção e tratamento da hepatite C. Além disso, a busca por métodos diagnósticos mais acessíveis é de grande relevância, principalmente para o Estado do Amazonas, em detrimento da dificuldade no acesso às regiões mais isoladas e ao difícil deslocamento dos pacientes aos grandes centros de saúde.

2.0 Revisão Bibliográfica

2.1 Descoberta e dados Epidemiológicos da Hepatite C

A descoberta do agente etiológico responsável pela da Hepatite C (HCV) se deu no ano de 1989 por Qui-Lim-Choo e os seus colaboradores Michel Houghton, George Kno e Daniel Bradley, através de experimentos em modelos animal que possibilitaram, por meio de estudos e técnicas da biologia molecular, a construção de uma biblioteca de DNA complementar (cDNA) derivada de plasma infectado com o vírus, até então conhecido como não-A, não-B (HNANB) (CHOO *et al.*, 1989). A partir disso, foi possível identificar um antígeno associado especificamente a esse vírus que passou a ser denominado como vírus da hepatite C (HCV), e assim, clonar partes dele e desenvolver um teste sorológico capaz de identifica-lo em indivíduos infectados (ALTER *et al.*, 1989; CHOO *et al.*, 1989).

Atualmente, segundo o Ministério da Saúde, 2018, a infecção pelo HCV já é a principal causa de cirrose e transplante hepático no mundo ocidental (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2018), infectando cronicamente cerca de 7 milhões de pessoas nas Américas e 71 milhões em todo o mundo. Em relação ao Brasil, esse quantitativo está estimado em cerca de 1,4 a 1,7 milhão de indivíduos infectados (BARBOSA *et al.*, 2019).

Em relação ao Estado do Amazonas, em 2018, foram notificados cerca de 8 casos para cada 100 mil habitantes, com exceção da capital do estado, Manaus, que notificou cerca e 12 casos para cada 100 mil habitantes. Quanto ao coeficiente de mortalidade por hepatite C como causa básica, observou-se aproximadamente 0,7 óbitos por 100.000 habitantes entre os anos de 2007 a 2017 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

É importante observar, que essa diferença no quantitativo de notificações entre os 61 municípios e a capital pode estar relacionada a falta de estrutura que a maioria desses municípios apresentam na realização dos exames, principalmente quanto a biópsia hepática que requer a hospitalização do paciente, a estrutura apropriada e profissionais capacitados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

2.2 Classificação, estrutura e organização genômica do vírus

O vírus da hepatite C pertence à família *Flaviviridae*, e está inserido no gênero *Hepacivirus*. Essa família é representada por pequenos vírus que medem cerca de 30 a 60nm

de diâmetro. O HCV, especificamente, é constituído por um capsídeo proteico (C), envolto por um envelope de natureza lipídica, onde estão inseridas as proteínas de membrana (M) e glicoproteínas (E), (Figura 1) (CATANESE *et al.*, 2013).

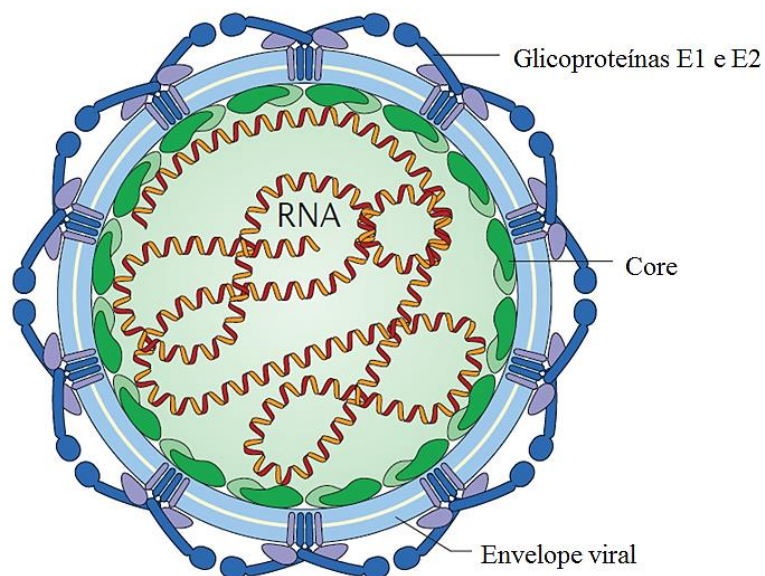


Figura 1: Representação esquemática do vírus da hepatite C.
Fonte: Adaptado LINDENBACH e RICE, 2013.

O seu genoma é composto por um ácido ribonucleico (RNA) de fita simples com polaridade positiva de aproximadamente 9.600 nucleotídeos. Nele há duas regiões não traduzidas (UTRs), regiões 5' e 3', que desenvolvem funções importantes na tradução e replicação do vírus. Além disso, a região mais conservada da 5'UTR é muito utilizada para a determinação de diagnóstico (CATANESE *et al.*, 2013; CHOO *et al.*, 1989; SMITH *et al.*, 2016).

Entre essas duas regiões altamente conservadas, encontra-se uma sequência aberta de leitura (*open reading frame* – ORF) com cerca de 10.233 nucleotídeos que codificam uma poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos, que quando clivada por peptidases e proteases dão origem a duas regiões distintas que codificam cerca de dez proteínas, região estrutural - localizada na porção aminoterminal, e a região não estrutural que representa a extremidade carboxiterminal do genoma viral (HOUGHTON *et al.*, 1991; LAUER; WALKER, 2001).

A região estrutural codifica três das proteínas estruturais do vírus, a proteína Core e as duas proteínas do envelope viral E1 (gp33) e E2 (gp72) que estão relacionadas com a

organização da partícula viral. A região não estrutural codifica cinco proteínas não estruturais (NS): NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B, que desempenham funções reguladoras e de expressão do vírus, como a replicação, virulência e patogenicidade. Além dessas, existe uma membrana peptídica p7 que além de separar as proteína estruturais das não estruturais também participa da montagem do vírus (CATANESE *et al.*, 2013; SMITH *et al.*, 2016).

2.2.1 Proteínas Estruturas e Não Estruturais

A primeira proteína produzida durante a síntese da poliproteína é chamada de Core, composta por 191 aminoácidos e com o peso molecular de aproximadamente 21 KDa, está envolvida na formação do nucleocapsídeo, através da sua ligação ao RNA. Ela é processada por peptidases sinalizadoras da célula hospedeira clivando-a na região C-terminal liberando sua forma imatura. O peptídeo de sinal da região C-terminal é posteriormente processado e resulta na forma madura da proteína, com um domínio hidrofílico maior na porção N-terminal, responsável por sua associação com as membranas do retículo endoplasmático (ER) e gotículas lipídicas, e um domínio hidrofóbico menor na porção C-terminal (GAWLIK; GALLAY, 2017; SANTOLINI, *et al.*, 1994; SUZUKI *et al.*, 2005).

As proteínas de envelope, E1 e E2, possuem pesos moleculares de aproximadamente 35 kDa e 70 kDa, respectivamente, são glicoproteínas responsáveis pela entrada e montagem do vírus nas células hospedeiras. Interagem entre si de forma não covalente e formam heterodímeros localizados no retículo endoplasmático da célula. Por causa das funções que desenvolvem são importantes alvos no desenvolvimento de terapias antivirais que visam bloquear a entrada do vírus na célula (BARTOSCH; COSSET, 2006; BARTOSCH *et al.*, 2003).

A glicoproteína E2 apresenta na sua extremidade C-terminal, entre a região estrutural e não estrutural, uma pequena proteína de membrana conhecida como p7; essa é liberada da poliproteína por peptidases do hospedeiro. Já na sua extremidade N-terminal essa proteína possui duas regiões hipervariável (HVR1 e HVR2) que apresentam alta variabilidade, sofrem constante seleção por mutações o que dificulta a eficácia da resposta imunológica do hospedeiro. Além disso, a glicoproteína E1 também possui uma região com variabilidade moderada e acredita-se ela pode estar envolvida na fusão intra-citoplasmática da membrana do vírus (PENIN *et al.*, 2001; SAEED *et al.*, 2014).

Em relação as proteínas não estruturais temos a autoprotease NS2, uma proteína transmembrana de 23 kDa, que apesar de ainda não ter suas atividades bem descritas, sabe-se que, quando estimulada, ela participa juntamente com a proteína NS3, da clivagem entre NS2-NS3, além de provavelmente exercer alguma função na montagem do vírus. Já a NS3, de 70 KDa, é uma protease do tipo serina e atua como ATPase /helicase na liberação das proteínas não estruturais NS4A, NS4B, NS5A e NS5B do complexo poliproteico (LINDENBACH; RICE, 2005; STAPLEFORD *et al.*, 2011).

A NS4A é um pequeno polipeptídeo hidrofóbico, de aproximadamente 8 KDa, que atua como um cofator para serina protease NS3, além disso, pode ser mediadora na associação da NS3 com a membrana do retículo endoplasmático. Também atua na formação do complexo viral associando o RNA viral e as proteínas durante o processo de replicação e serve como âncora de membrana para o complexo de replicação (GRETTON *et al.*, 2005; SAEED *et al.*, 2014).

A proteína NS5A é capaz de modular a resposta ao interferon (IFN), reprimindo a atividade da proteína quinase, e outros processos da célula do hospedeiro, interferindo no mecanismo que confere resistência ao efeito antiviral do interferon nas células infectadas. Além disso, ela interage com várias proteínas celulares e está envolvida na replicação do HCV (PELLERIN *et al.*, 2004; SAEED *et al.*, 2014).

Por fim, a proteína NS5B é uma enzima, com função de RNA polimerase dependente de RNA, responsável pela replicação viral. Hwang *et al.* (1997) demonstraram que esta proteína tem uma localização perinuclear e sua interação com as membranas sugere que a replicação ocorra associada às membranas do retículo endoplasmático ao redor do núcleo. Além disso, Naka e colaboradores (2006) sugerem que a proteína NS5B pode ter um papel adicional na patogênese do HCV, pois está relacionada ao atraso na progressão do ciclo celular dos hepatócitos através da indução de interferon-beta (HWANG *et al.*, 1997; NAKA *et al.*, 2006).

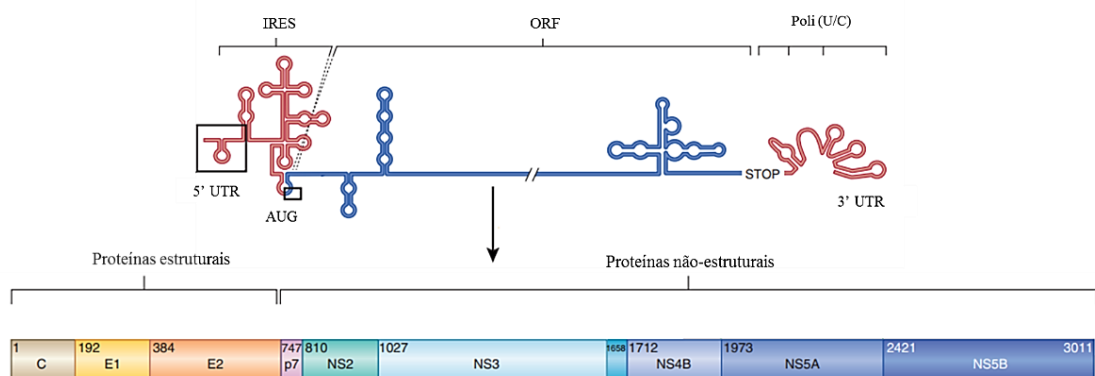


Figura 2: Organização do genoma viral, estrutura polipeptídica e funções proteicas.

Fonte: Adaptado de LINDENBACH; RICE, 2013.

2.2.1.1 Proteína F

A Proteína F (ARFP) é uma proteína derivada de um quadro alternativo de leitura da sequência de codificação da proteína core, proteína principal do HCV (XU *et al.*, 2003). Um dos primeiros estudos que demonstraram evidências de sua descoberta foi descrito por Walewski e colaboradores que detectou a presença de quatro peptídeos ARFP em soros de pacientes HCV crônicos e concluíram em seus experimentos que essa nova proteína estaria, possivelmente, associada ao processo de replicação viral, patogênese e carcinogênese do vírus induzindo resposta imunológicas específicas (WALEWSKI *et al.*, 2001).

Desde então, pesquisas vêm sendo desenvolvidas buscando elucidar a composição, estrutura e função da proteína F. Atualmente, já é confirmado que a sua codificação se dá a partir da abertura de um segundo quadro de leitura (*frameshift* ribossômico $-2/+1$) dentro da região do núcleo rica em adenosina, nos códons 8-11, compartilhando o mesmo códon de iniciação AUG, por esse motivo também é denominada ARPF (proteína de quadro alternativo de leitura) ou core +1. Já se sabe também que seu comprimento pode variar de acordo com o genótipo do HCV apesar de possuir sua sequência bem conservada em todos os eles (MOHAMADI *et al.*, 2020; VASSILAKI *et al.*, 2003; XU *et al.*, 2003).

Outros mecanismos de codificação também foram sugeridos, o que produz uma forma mais curta da proteína (core +1) que é codificada, a partir de uma iniciação de leitura interna, nos códons 85/87 ou 26 e o mecanismo de deslocamento duplo (*double-frameshift*) que desloca (+1) no códon 42 e, em seguida, desloca novamente (-1) no códon 144 no genótipo 1b

do HCV (BOULANT *et al.*, 2003; MOROZOV; LAGAYE, 2018). Podemos compreender melhor o processo de *frameshift* para originar a ARFP na figura 3.

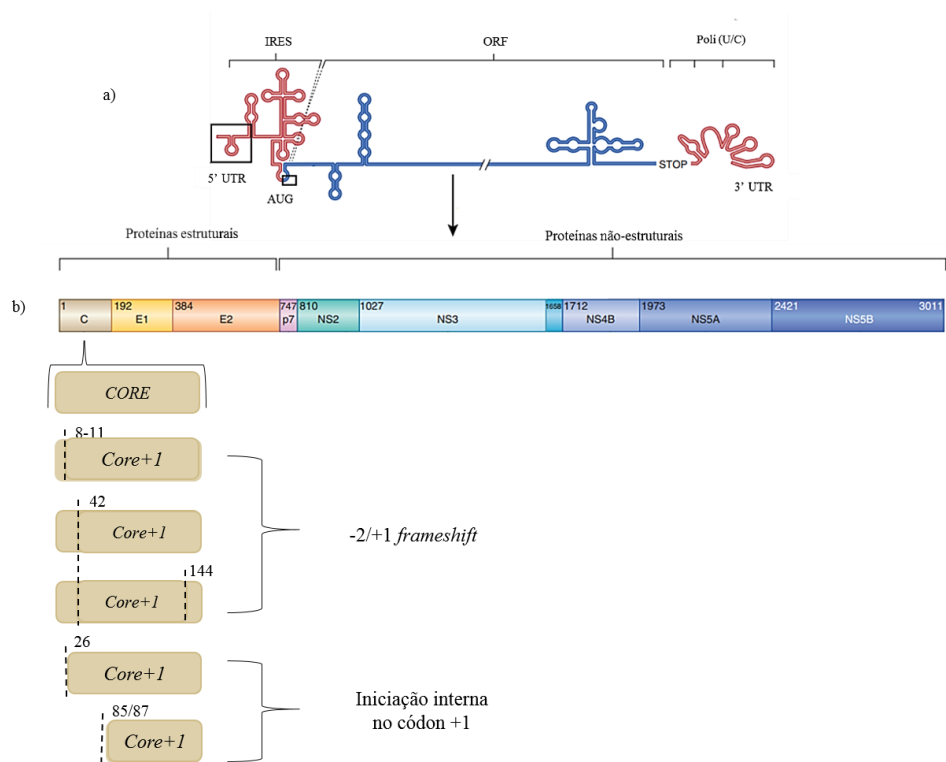


Figura 3: Organização do genoma viral. a) sequência aberta de leitura (ORF). b) processo de *frameshift* que origina a proteína F e as posições de cada aminoácido de início para cada isomorfa.

Fonte: Adaptado de VASSILAKE; MAVROMARA, 2009; LINDENBACH, 2013.

Ainda são poucos os trabalhos que apresentam experimentos que visam observar a antigenicidade da ARFP. Baghbani-arani *et al.* (2012), com o propósito determinar sua expressão e caracterizá-la, demonstrou a presença de três principais domínios antigênicos na parte inicial da proteína, nos resíduos 1-28, 48-75 e 85-98, esses resíduos representam um possível epítipo candidato a investigações imunológicas, como a produção de anticorpos monoclonais. Abaixo podemos observar um gráfico de antigenicidade demonstrado por eles (Figura. 4) (BAGHBANI-ARANI *et al.*, 2012).

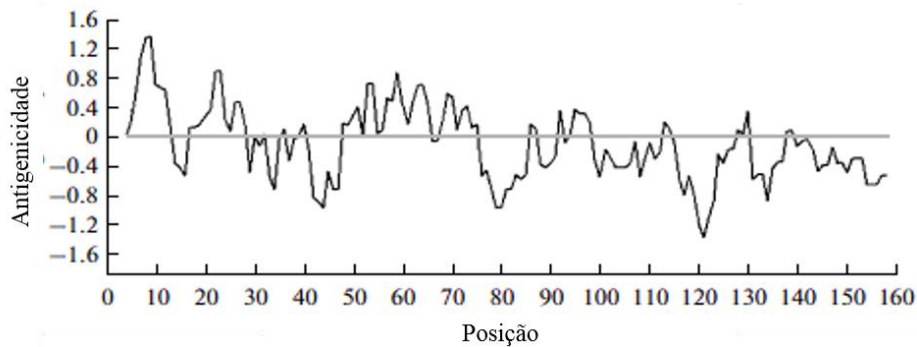


Figura 4: O gráfico de antigenicidade da proteína F (aminoácido 1-161). Valores positivos indicam áreas hidrofílicas ou antigênicas.

Fonte: Adaptado de BAGHBANI-ARANI *et al.* (2012).

2.2.2 Genótipos e subgenótipos

O vírus da Hepatite C está distribuído em todo o mundo, sua elevada amplitude se dá em decorrência de sua diversidade genotípica. Atualmente, já foram classificados sete diferentes genótipos, identificados de 1 a 7, que possuem uma grande heterogeneidade nas sequências genéticas, que estão principalmente associadas aos modos de transmissão e a distribuição geográfica (SMITH *et al.*, 2016).

Além desses sete genótipos já descritos, existe, ainda, uma classificação em subgenótipos que diferem entre 15-25% a nível de nucleotídeos dentro de um mesmo genótipo. Até o momento, já foram descritos 67 tipos. No entanto, apesar da grande diversidade, sabe-se que essas variantes apresentam bases biológicas similares, como: hepatotropismo, propensão à persistência e patogenicidade (SMITH *et al.*, 2014, 2016).

Alguns dos genótipos possuem prevalências em algumas localidades. Genótipos 1 e 2 são encontrados principalmente na África Ocidental, o 3 no Sul da Ásia, o 4 na África Central e no Oriente Médio, o 5 na África do Sul, e o 6 no Sudeste Asiático. O genótipo 7 foi descrito apenas uma vez, até o momento, o mesmo foi isolado no Canadá em um imigrante da África Central (MESSINA *et al.*, 2015; SMITH *et al.*, 2014).

Além disso, em relação a prevalência de cada genótipo, o genótipo 1 é responsável por cerca de 83,4 milhões de casos (46,2% de todos os casos de HCV). O genótipo 3 é o segundo mais prevalente no mundo (54,3 milhões, 30,1%); os genótipos 2, 4 e 6 são responsáveis por um total de 22,8% de todos os casos; o genótipo 5 compreende os restantes <1% (MESSINA *et al.*, 2015) (Figura 5).

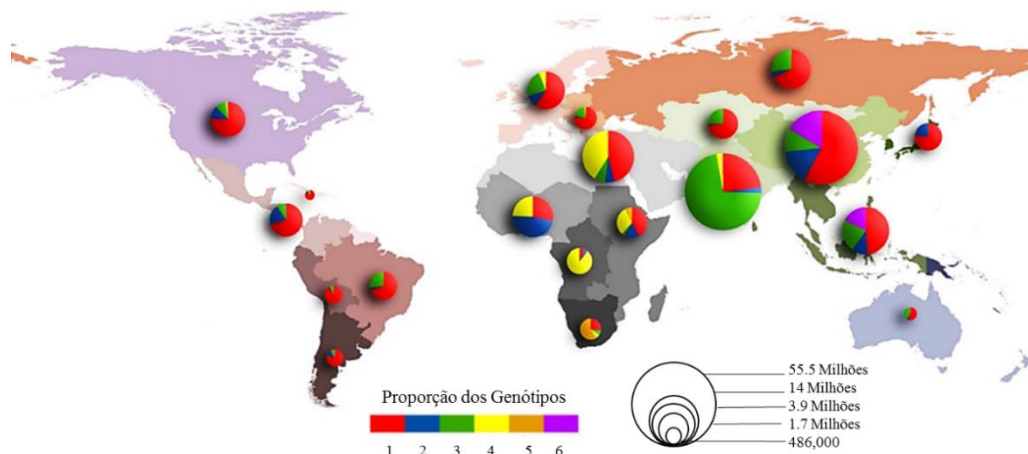


Figura 5: Prevalência de cada genótipo do HCV no mundo. A prevalência dos casos é representada pelo tamanho do gráfico de pizza, enquanto as fatias representam a abundância de genótipos.

Fonte: Adaptado de MESSINA *et al.*, 2015.

No Brasil, o genótipo mais recorrente é o genótipo 1, seguido pelo genótipo 3 e o 2 em terceira posição (Figura 5). Em um estudo desenvolvido por Lima *et al.* (2018) que buscou levantar o perfil clínico-epidemiológico das doenças hepáticas crônicas, no ambulatório de gastroenterologia do Centro Universitário Serra dos Órgãos (Unifeso), de 115 pacientes, 17,8% dos casos se tratava de pacientes portadores de cirrose hepática decorrente da infecção pelo HCV. Desses, 64% dos casos se tratava da infecção pelo genótipo 1 (LIMA *et al.*, 2018).

Amaral e colaboradores (2013) também comprovaram a prevalência do genótipo 1 seguido pelo 3, em um estudo que buscou descrever os aspectos clínicos e epidemiológicos dos portadores da hepatite C em Rio Branco, Acre, onde dos 46 indivíduos (HCV⁺) que possuíam genótipo já estabelecidos, 74% das infecções correspondiam ao genótipo 1, e 24% ao genótipo 3 (AMARAL *et al.*, 2013).

Outra pesquisa que corrobora os dados citados acima foi realizada com 69 pacientes (HCV⁺) residentes da cidade de Manaus, Amazonas, que visou caracterizar o vírus de pacientes com hepatite C crônica em relação aos seus genótipos. Este estudo demonstrou que o genótipo mais prevalente nessa população foi o genótipo 1, seguido do genótipo 3 e 2 respectivamente (ARAÚJO *et al.*, 2011).

Outro estudo que reafirma tais dados foi realizado por Torres *et al.* (2009) que buscou caracterizar o perfil sorológico e molecular de 154 doadores de sangue positivos para anticorpos para HCV-RNA da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas e

obteve como resultado que 87,1% desses indivíduos apresentavam infecção pelo genótipo 1 e os demais, 12,9%, estavam infectados pelo genótipo 3 (TORRES *et al.*, 2009). Além disso, é importante destacar que já é confirmado a ocorrência do genótipo 4 na região amazônica, apesar do mesmo ser mais prevalente no Oriente Médio, África, Índia e Caribe (TARRAGÔ *et al.*, 2017).

Vale ressaltar, por fim, que a identificação correta dos genótipos é de grande relevância para traçar as prováveis decisões terapêuticas a que cada paciente será exposto, tendo em vista que a gravidade da infecção está associada diretamente ao seu genótipo. Uma pesquisa desenvolvida por Gordon *et al.*, (2015) que buscou estimar a prevalência de cirrose hepática entre pacientes infectados pelo HCV demonstrou, entre outros fatores, que a infecção pelo genótipo 3 do HCV aumenta o risco de cirrose em comparação com a infecção pelo genótipo 1, e que a infecção pelo genótipo 2 do HCV está associada a um menor risco de cirrose (GORDON *et al.*, 2015).

Em outro estudo, Kanwal e colaboradores (2014) demonstraram que o genótipo 1 pode aumentar o risco de cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC) em comparação ao genótipo 2 em pacientes infectados cronicamente, além disso, afirmaram que aqueles infectados pelo genótipo 3 apresentam um maior risco desenvolver cirrose e CHC quando comparado ao genótipo 1 (KANWAL *et al.*, 2014).

2.3 Ciclo de vida

O ciclo de vida do HCV compreende várias etapas: a) entrada, b) tradução de RNA, c) processamento da poliproteína, d) replicação, e) montagem do vírus, f) liberação da partícula viral (Figura 6). Os hepatócitos, células do fígado, são os principais alvos dessa infecção, porém sabe-se que outras células como as células mononucleares do sangue periférico e células polimorfonucleares também estão suscetíveis a esse vírus (MORADPOUR *et al.*, 2007).

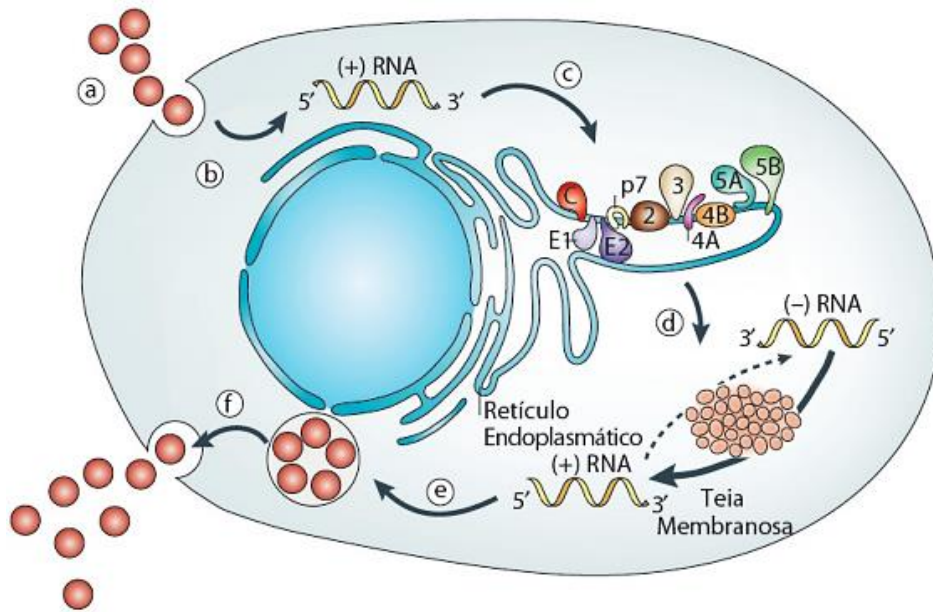


Figura 6: representação do Ciclo de vida do HCV.
Fonte: Adaptado MORADPOUR *et al.*, 2007.

É importante destacar, que a replicação do HCV está intimamente ligada ao metabolismo lipídico das células, pois se associam fortemente às lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e muito baixa densidade (VLDL), de alta densidade (HDL), e a polipoproteína (Apo) como ApoA-I, ApoB-48, ApoB-100, ApoC-I e ApoE, circulante no sangue. Essas associações facilitam a entrada do vírus no célula hepática, além de possivelmente conferir proteção contra anticorpos neutralizante (HERKER; OTT, 2012; LINDENBACH; RICE, 2013).

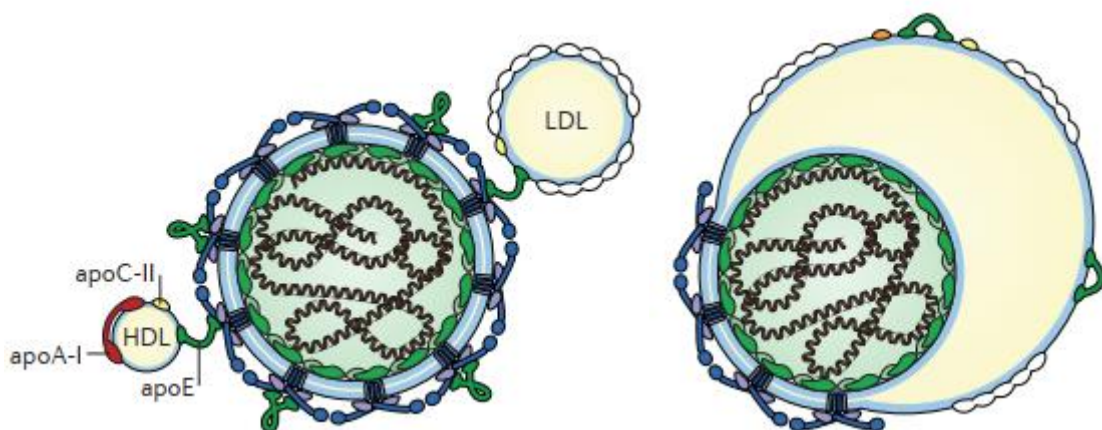


Figura 7: Associação do HCV com lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e muito baixa densidade (VLDL), alta densidade (HDL) e apolipoproteína. Partícula de HCV compartilhando o envelope com a lipoproteína de baixa densidade (LDL).
Fonte: LINDENBACH E RICE, 2013

A entrada do HCV nas células hospedeiras é mediada por interação de reconhecimento entre o complexo proteico E1/E2 do envelope viral e receptores de membrana, que induz o processo de fusão entre o envelope viral e a membrana celular. Os eventos de entrada podem ser simplificados da seguinte forma: a) inicialmente ocorre a ligação entre o receptor LDL (LDLR) e glicosaminoglicanos (GAG) à apolipoproteína ApoE, b) o receptor SRB1 (receptor scavenger classe B tipo I), considerado um co-receptor, se liga ao complexo E1/E2 e propicia a interação da proteína E2 com o receptor tetraspanina (CD81), c) a interação CD81/E1E2 associados às proteínas de junção claudina-1 (CLDN1) e Ocludina (OCLN) propicia a difusão do envelope com a membrana plasmática e o vírus entra na célula via endocítica dependente de clatrina (Figura 7) (DING *et al.*, 2014; LINDENBACH; RICE, 2013).

Sequentemente, o RNA viral é liberado e traduzido no retículo endoplasmático (RE) em uma poliproteína que é clivada por proteases do hospedeiro e viral, liberando as 10 proteínas virais. As proteínas não estruturais (NS3-NS5B) formam complexos de replicação de RNA dentro de estruturas membranosas derivadas do retículo endoplasmático, denominadas teia membranosas. A montagem e liberação das novas partículas virais ocorrem por meio de processos firmemente regulados com a síntese lipídica da célula. Após a clivagem da poliproteína, a Core se realoca na membrana do retículo endoplasmático em gotículas de lipídios, ao passo que ocorre interação NS5A/Core induzindo a formação do nucleocapsídeo, após a encapsulação do RNA recém-sintetizado, o mesmo brota no lúmen do RE. O amadurecimento e eventos de modificações pós-traducionais, realizado por glicosidases e glicosiltransferase do complexo de golgi, se dão à medida que as novas partículas virais percorrem pela via secretora até serem liberadas para o meio extracelular (Figura 8) (LANGE *et al.*, 2014; LINDENBACH; RICE, 2013; VIEYRES *et al.*, 2010).

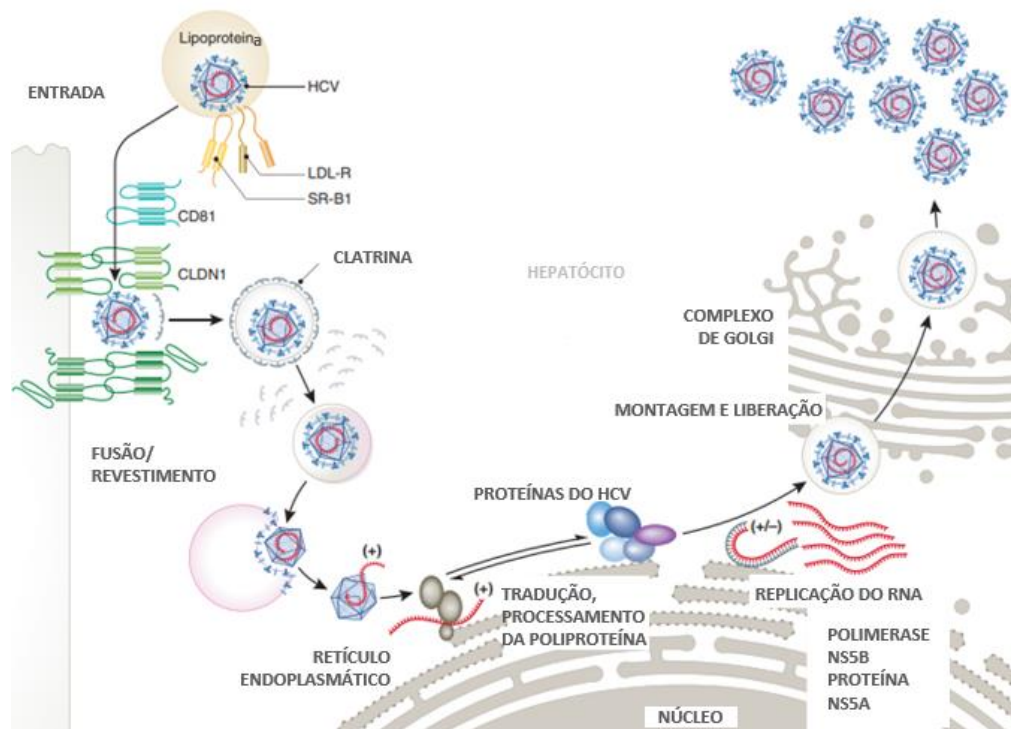


Figura 8: Esquema do ciclo de vida do vírus da hepatite C.
Fonte: LANGE *et al.* (2014).

2.4 Modos de Transmissão do vírus da hepatite C

A principal via de transmissão do HCV é a parental, principalmente, através do contato com o sangue infectado. O compartilhamento de agulhas e seringas contaminadas na realização de tatuagens, *piercings* e a troca desses materiais entre usuários de drogas ilícitas, é considerado uma das principais vias de transmissão do vírus. Além disso, a reutilização de equipamentos médicos que não são adequadamente esterilizados, em procedimentos cirúrgicos e ortodônticos e uso de sangue/derivados contaminados, também são formas relevantes de transmissão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Além disso, existe a possibilidade de transmissão por via sexual, apesar de ser pouco relatada, é mais propícia em pessoas de múltiplos parceiros que não se previnem corretamente. Segundo o Ministério da Saúde, no ano de 2018, a proporção de infecções por via sexual foi superior ao percentual de infecções relacionadas ao uso de drogas, e a proporção de infecções por via transfusional. A transmissão vertical, perinatal e através de secreções orgânicas são raramente relatadas (BRASIL, 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

2.5 Abordagem Diagnóstica

A inespecificidade ou falta de sintomas, principalmente durante os primeiros anos da infecção pelo HCV dificultam o diagnóstico da Hepatite C que, frequentemente, é diagnosticada através de exames ocasionais, triagem sorológica de doadores de sangue ou através de campanhas de detecção quando se tem suspeita epidemiológica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

O diagnóstico positivo se dá através da presença de anticorpos (anti-HCV) que surgem, em média, com oito a dez semanas após a exposição ao vírus, detectados através de testes sorológicos como: ensaio imunoenzimático (ELISA), ensaio de quimioluminescência ou teste rápidos como os por imunocromatografia de fluxo somados à detecção por meio de tecnologia desenvolvida para a detecção do ácido nucléico viral (NAT-HCV). Vale ressaltar, que o RNA viral pode ser detectado no soro ou plasma a partir da segunda semana após o contágio, constituindo-se a melhor ferramenta para diagnóstico precoce da infecção aguda (GUPTA *et al.*, 2014; HOUGHTON *et al.*, 1991).

Além disso, é importante salientar que a detecção desses marcadores moleculares, não indicam o curso da infecção, sendo preciso maior aprofundamento no diagnóstico para se obter maiores informações sobre a evolução do paciente, que pode ter evoluído para cura espontânea ou para um quadro de cronicidade (SILVA *et al.*, 2012).

Vale mencionar, que outros fatores que constituem o diagnóstico também podem ser detectados, tais como a carga viral, obtida por meio de teste moleculares quantitativos que indicam o número de cópias de genomas virais circulantes e a genotipagem do vírus, que visa identificar os genótipos, subtipos e populações mistas do HCV, importante para o estabelecimento das decisões terapêutica que cada paciente será submetido (GUPTA *et al.*, 2014).

Como já mencionado, o diagnóstico é geralmente realizado durante a fase crônica da infecção, sendo necessário estabelecer o grau de acometimento do tecido hepático. Desse modo, biópsia hepática é considerada o exame padrão-ouro para essa avaliação, porém, é um método invasivo que requer a hospitalização do paciente, sendo necessário a estrutura apropriada para sua realização (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Apesar de considerada o exame padrão-ouro, atualmente, a biópsia hepática não é o exame mais indicado para o diagnóstico. Os exames não invasivos, como a elastografia

hepática associada ao APRI (*AST to Platelet Ratio Index*) ou FIB4 (*Fibrosis-4*) são os mais indicados solicitados. Através da elastografia hepática, pode-se identificar o estágio da fibrose, permitindo a avaliação de uma área maior do parênquima quando comparada a avaliação por fragmento de biópsia hepática (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Os escore APRI e FIB4 também são exames não invasivos, que visam estabelecer o estadiamento da fibrose e um esquema terapêutico a que cada paciente será exposto. Seus valores são obtidos através de cálculos matemáticos baseados em exames laboratoriais, levando em conta: os níveis de AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase), contagem de plaquetas e a idade do paciente durante o tratamento e acompanhamento do paciente com hepatite C crônica. Abaixo estão demonstradas as equações para a realização dos cálculos matemáticos para cada teste: (MINISTERIO DA SAUDE, 2018).

Para *APRI*:

$$APRI = \frac{\frac{\text{Valor de AST (U/L)}}{\text{Limite Superior Normal de AST (U/L)}}}{\text{Contagem de Plaquetas (10}^9\text{)}} \times 100x$$

Para *FIB4*:

$$FIB4 = \frac{\text{Idade (anos)} \times \text{AST (U/L)}}{\text{Contagem de Plaquetas (10}^9\text{)} \times \sqrt{\text{ALT (U/L)}}}$$

Figura 9: Cálculos matemáticos para a realização APRI (*AST to Platelet Ratio Index*) e FIB4 (*Fibrosis-4*).

Fonte: Adaptado de MINISTERIO DA SAUDE, 2018.

Finalmente, para caracterizar o estadiamento da fibrose e da cirrose hepática deve-se correlacionar os resultados derivados desses exames com a escala de METAVIR (*Meta-analysis of Histological Data in Viral Hepatitis*) obedecendo os pontos de cortes já preestabelecidos (Tabela 1) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Tabela 1: Caracterização de fibrose hepática conforme valores de APRI e FIB4

APRI (avaliação de fibrose hepática avançada)			
Resultado	< 0,5	0,5 – 1,49	≥ 1,5
Interpretação	Baixa probabilidade de fibrose hepática F2, F3 ou F4	Não é possível determinar o estágio de fibrose hepática	Alta probabilidade de fibrose hepática F3 ou F4
APRI (avaliação de cirrose hepática)			
Resultado	< 1,0	1,0 – 1,49	≥ 2,0
Interpretação	Baixa probabilidade de cirrose (F4)	Não é possível determinar o estágio de fibrose hepática	Alta probabilidade de cirrose (F4)
FIB-4 (avaliação de fibrose hepática avançada ou cirrose)			
Resultado	< 1,45	1,45 – 3,24	≥ 3,25
Interpretação	Baixa probabilidade de F2, F3 ou F4	Não é possível determinar o estágio de fibrose hepática	Alta probabilidade de F3 ou F4

Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde, 2018

Sabe-se que a realização desses exames apresenta limitações; a biópsia hepática, por exemplo, tem como principal limitação o erro de amostragem, relacionado ao tamanho do fragmento e ao local de sua coleta. Além disso, possui contraindicações relativas, quando o paciente possui ascite, obesidade mórbida, possibilidade de lesões hepáticas vasculares, amiloidose, incapacidade de cooperação do paciente, e contraindicações absolutas quando o paciente apresenta coagulopatia grave, infecção no parênquima hepático e obstrução biliar extra-hepática (BRASIL, 2016).

Em relação a elastografia hepática, suas principais limitações são as especificidades da tecnologia, a falta ou o inadequado treinamento dos profissionais de saúde, o alto custo do exame, além da necessidade de uma frequente manutenção de equipamentos. Além disso, esse exame possui distintos valores de referência, que variam de acordo com a origem da doença hepática (BRASIL, 2016; WONG, 2013).

Diante de tais limitações fica evidente que a busca por novos exames diagnóstico para fibrose hepática, que sejam mais práticos e mais acessíveis é de grande relevância, principalmente, para atender as necessidades das populações mais isolados do Estado do Amazonas.

2.6 Aspectos Clínicos

A infecção pelo HCV não é uma patologia de fácil detecção clínica, visto que é uma doença, frequentemente, assintomática e envolve muitos fatores como idade, sexo, etnia,

doenças metabólicas, doenças hepáticas concomitantes, fatores genéticos, fatores virais como genótipo e carga viral, fatores ambientais como o consumo de álcool, tabagismo, coinfeções com outros vírus como o da hepatite B (VHB) e vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (SILVA *et al.*, 2012).

Essa infecção pode ocorrer de duas formas distintas: a forma aguda e a crônica. De modo que, geralmente, a fase aguda apresenta uma evolução subclínica com ausência de sintomas ou com sintomas muito inespecíficos como anorexia, astenia, mal-estar e dor abdominal, sendo a elevação dos níveis da ALT uma das únicas manifestações clínicas da doença. Essa fase pode durar até seis meses, mas sua resolução costuma acontecer até a 12ª semana. Além disso, estima-se que cerca de 15% a 40% dos casos alcançam cura espontânea (PUOTI *et al.*, 2010; SHARMA; FELD, 2014; SILVA *et al.*, 2012).

No entanto, a detecção de marcadores anti-HCV e HCV-RNA por mais de seis meses caracteriza o quadro crônico da infecção, que somado a ausência de sintomas mais específicos e a falta de diagnóstico na fase inicial, pode propiciar a evolução da doença por décadas a quadros mais graves. Cerca de 60% a 85% dos casos não tratados evoluem para fase crônica da doença. E em média, 20% desses casos podem evoluir para cirrose hepática e 1% a 5% deles para carcinoma hepatocelular. Além disso, o risco de ocorrer descompensação hepática nesses indivíduos é de 3 a 6%, levando 20% deles ao risco de óbito nos 12 primeiros meses após o evento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

A principal característica da fase crônica é uma persistente inflamação no tecido hepático, proveniente da resposta imunológica do hospedeiro, que realiza o recrutamento das células de defesa ao local de infecção, afim de combatê-la, acarretando uma constante deposição de matriz extracelular fibrótica que resulta em graves lesões no tecido hepático substituindo-o por um tecido fibroso e não funcional (BERARDIS *et al.*, 2015).

Esse quadro inflamatório pode evoluir para uma fibrose hepática, cirrose até alcançar a forma mais grave da doença, o hepatocarcinoma celular, que acarretam vários tipos de complicações, tais como: a insuficiência hepatocelular, hipertensão portal (varizes gástricas, hemorragia digestiva alta, ascite), encefalopatia hepática entre outras (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Somado ao acometimento hepático, existem também o risco de manifestações extra-hepáticas que provavelmente estão relacionadas a processos imunes, provavelmente devido à

possibilidade do vírus se replicar nas células linfoides e de depositar imunocomplexos nos diversos tecidos (LAUER; WALKER, 2001).

2.7 Imunopatogenicidade da infecção por HCV

O reconhecimento e combate a qualquer tipo de infecção é realizado pelo sistema imunológico, que tem a finalidade principal de defender o organismo contra agentes invasores ou qualquer corpo estranho causador de doença (antígenos). Esse sistema dispõe de uma complexa estrutura organizacional que cria mecanismo para detecção e eliminação desses antígenos. A primeira linha de defesa é conhecida como imunidade inata ou inespecífica, que consiste em um conjunto de reações bioquímicas e celulares que induzem as células a um estado antiviral, visando inibir a replicação viral (ABBAS *et al.*, 2019).

Esses mecanismos são ativados por estímulos específicos, provenientes de estruturas moleculares de microorganismos, regiões conservadas e específicas do HCV. Essas estruturas são conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que são reconhecidos e interagem com diferentes receptores de reconhecimento padrão (PRRs), codificados por linha germinativa, como o gene indutível pelo ácido retinóico I (RIG-I), antígeno de diferenciação de melanoma 5 (MDA5) e o receptor do tipo toll 3 (TLR3), que estão presentes nas células natural killer, células dendríticas e células de Kupffer, por exemplo. A interação PAMPs/PRRs sinaliza a ativação de uma variedade de fatores de transcrição, como o fator regulador de interferon (IRF 3 e 7) e o fator nuclear kappa B (NF- κ B), que resulta na expressão imediata de genes de resposta do hospedeiro (REHERMANN, 2015).

Os receptores RIG-I e MDA5 reconhecem os padrões na região 3' UTR do genoma viral dentro do citoplasma, agindo como sensores virais citoplasmáticos por via citosólica. Por outro lado, TLR-3 reconhece as estruturas de RNA de fita dupla (dsRNA) e tem como alvos vírus liberados no ambiente extracelular pelas células infectadas. Muitos dos receptores da família dos *Toll-like* (TLR 3, TLR 7, TLR 8 e TLR 9), expressos no endossoma das células dendríticas, células de Kupffer e nos hepatócitos, quando ativados desempenham um papel central na ligação aos patógenos e no início da resposta inflamatória, ativando a via de sinalização do TLR, recrutando o IFN- β , indutor do adaptador do domínio receptor Toll/interleucina-I (TRIF), conduzindo uma via de sinalização e induzindo a produção de

diversas citocinas para realizar o recrutamento e direcionamento das células do sistema imunológico (CRUVINEL *et al.*, 2010).

Várias células do sistema imune fazem parte da resposta inata, tais como: neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, células natural killer (NK) e células NK T. As células dendríticas produzem interferon I (IFN-I - α e β) que visam inibir a replicação viral. Esse IFN-I aumenta a expressão de HLA (antígeno leucocitário humano) de classe I na superfície das células apresentadoras de antígenos e ativa as células NK e NKT para eliminar os hepatócitos infectados pelo VHC, esse processo estimula as células dendríticas mielóides a secretarem o IFN- γ que então ativa os macrófagos hepáticos (Células de Kupffer) e aumentam a inflamação local, iniciando-se assim o processo da hepatite (ABBAS *et al.*, 2019; HIROISHI *et al.*, 2008).

As defesas imunológicas inatas não envolvem apenas os eventos intracelulares das células infectadas, mas também extracelulares, como no papel das células natural killer (NK) e das células T natural killer (NKT) que ao serem ativadas via IFN-I desempenham papéis antivirais eliminando as células infectadas, seja de forma direta, através de processos citolíticos, ou de forma indireta por meio da produção de citocinas pró- inflamatórias como o TNF- α (Fator de Necrose Tumoral - alfa) que amplifica a resposta celular e aumenta a duração da produção de IFN, induzindo a maturação de células imunes efetoras e das células apresentadoras de antígenos, potencializando a modulação indireta de respostas imunes adaptativas e defesas mediadas por células, levando à produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células hepáticas (CRUVINEL *et al.*, 2010).

De modo que a partir do reconhecimento e captura dos antígenos do HCV pelas células dendríticas mielóides, no fígado, ocorre o seu processamento e apresentação aos linfócitos, levando à sua maturação, expressão de HLA (classe I e II) e de moléculas co-estimulatórias, induzindo a diferenciação das células T helper (naive) em células Th1 através da produção da interleucina 12 (IL-12), que por sua vez secretam interleucina 2 (IL-2) e IFN- γ induzindo a ativação e proliferação das células NK e de linfócitos T citotóxicos (CTLs), que realizam o reconhecimento de peptídeos do vírus via HLA de classe I, desencadeando uma cascata de evento que levam à morte das células infectadas através da liberação de perforinas, granzimas e TNF- α . É importante destacar que o TNF- α é um potente imunomodulador, regula a atividade das células NK através da produção de interleucina-15 (IL-15),

promovendo sua ativação, proliferação e prolongando sua sobrevivência (HIROISHI *et al.*, 2010).

Apesar dos linfócitos serem considerados as principais células envolvidas na resposta imune adquirida, as células apresentadoras de antígenos (APCs) desempenham papel fundamental em sua ativação. Desse modo, a partir da ativação dos linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺, através da sua interação com antígenos apresentados via HLA I e II pelas APCs, dar-se início a resposta imune adaptativa, que realiza o recrutamento e ativação de células imunes, através da produção de citocinas, induzindo uma inflamação para eliminar o patógeno (HIROISHI *et al.*, 2010).

Sabe-se, ainda, que a produção de citocinas está diretamente relacionada aos mecanismos de defesa que buscam levar o indivíduo a cura. Todavia, ao passo que essa resposta não se mostra eficaz a infecção desencadeia um processo inflamatório persistente, responsável pelo desenvolvimento de fibrose e cirrose, fases crônicas da doença. Assim sendo, fica evidente que a regulação da resposta imune é um importante fator no curso da doença (IRSHAD; GUPTA; IRSHAD, 2019 HALLIDAY *et al.*, 2011).

Essa regulação pode ser realizada pelas células T reguladoras (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ *Tregs*) que mediam a atividades das células T, alterando sua capacidade de produzir citocinas e desenvolver suas funções antivirais, aumentando o nível de citocinas anti-inflamatórias. A alta produção de citocinas anti-inflamatória, IL-10 e o fator de crescimento transformante (TGF-β), por exemplo, ou pro-inflamatórias como IL-17, TNF-α, IL-1β, IL-6 contribuem para a progressão e aumento da lesão no tecido hepático (REHERMANN, 2015).

A fibrose é o resultado de um grande acúmulo da matriz extracelular (MEC) no parênquima do fígado, é considerada um processo de cicatrização do tecido hepático em resposta às lesões causadas por um insistente quadro inflamatório promovido pela ação imunológica frente a um agente patogênico (BATALLER; BRENNER, 2005).

De modo geral, o processo fibrótico tem início com o aparecimento de lesões no tecido, onde hepatócitos e células danificadas liberam citocinas inflamatórias e fatores que ativam as células de *Kupffer*, principais produtoras de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) que estimulam e recrutam células T ativadas, que por sua vez induzem a ativação de células do parênquima responsáveis pela regeneração e substituição das células mortas do local lesionado. Quando essas lesões se tornam persistente, esse mecanismo de

regeneração pode não ser o suficiente para a reparação, sendo assim, as células mortas passam a ser substituídas por matriz extracelular (MEC). A MEC que é composta, principalmente, de colágeno tipos (I, III e IV), substâncias glicoconjugadas, como proteoglicanos, fibronectina e laminina. Ao passo que essas lesões persistem, ocorre acúmulo exacerbado de matriz extracelular no tecido dando início ao processo de fibrogênese (SEBASTIANI *et al.*, 2014).

Este processo regenerativo é regulado através de interações entre a síntese e a degradação da matriz extracelular, por meio das metaloproteinasas (MMPs) e de sua regulação, através dos seus inibidores específicos (TIMPs), vários fatores de crescimento, citocinas, hormônios, entre outros. As MMPs são endoenzimas de ação proteolítica produzidas pelos neutrófilos, hepatócitos, células de Kupffer e células estreladas (HSCs), que atuam na degradação do colágeno fibrilar modulando a regeneração do tecido durante a fibrogênese. As MMPs têm suas atividades reguladas, principalmente, pelos TIMPs (Inibidores teciduais de metaloproteínas), proteínas solúveis produzidas pelas HSCs, que modulam suas ações enzimáticas, inibindo suas atividades enzimáticas, propiciando o processo cicatricial. Em condições normais, esse mecanismo ocorre de forma equilibrada, todavia, diante de lesões persistentes, existe uma degradação excessiva das MMPs desencadeando um desequilíbrio entre essa razão e propiciando uma maior cicatrização do tecido (IREDALE *et al.*, 2013; RODERFELD, 2018).

O acúmulo contínuo e exacerbado da matriz extracelular no parênquima do fígado leva à fibrose, com a substituição do tecido funcional por não funcional, que podem progredir para quadros de cirrose hepática, onde ocorre a conversão da arquitetura normal do fígado em estruturalmente anormal com presença de nódulos, e carcinoma hepatocelular (HCC), consequência mais grave da fibrose, desencadeando insuficiência hepática com a necessidade de transplante hepático (Figura 10) (MARTÍNEZ-ESPARZA *et al.*, 2015; SEBASTIANI *et al.*, 2014).

As principais células responsáveis pela produção e deposição de MEC são as células estreladas (HSCs), normalmente encontradas nos espaços perissinusoidal de Disse, que em resposta as lesões teciduais, diferenciam-se em miofibroblastos proliferativos e adquirem capacidade pró-inflamatórias e fibrogênicas, a fim de regular a degeneração tecidual. A inflamação crônica também é modulada por meio de proteínas virais, que induzem respostas imunes antivirais do hospedeiro. Esse mecanismo se dá através do reconhecimento celular, que ativam vias intracelulares pró-mitogênicas e vias pró-inflamatórias das células, por

exemplo (SALAS-VILLALOBOS *et al.*, 2017). Além disso, vários outros fatores proliferativos influenciam na ativação dessas células (HSCs), fator de crescimento transformador α (TGF α), fator de crescimento transformador-beta (TGF- β), que medeiam o processo fibrótico ao induzirem nas HSC a expressão do gene de produção da MEC, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF / CCN2), citocinas anti-inflamatória IL-10 e pró-inflamatória IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-17, entre outros (AYDIN; AKCALI, 2018).

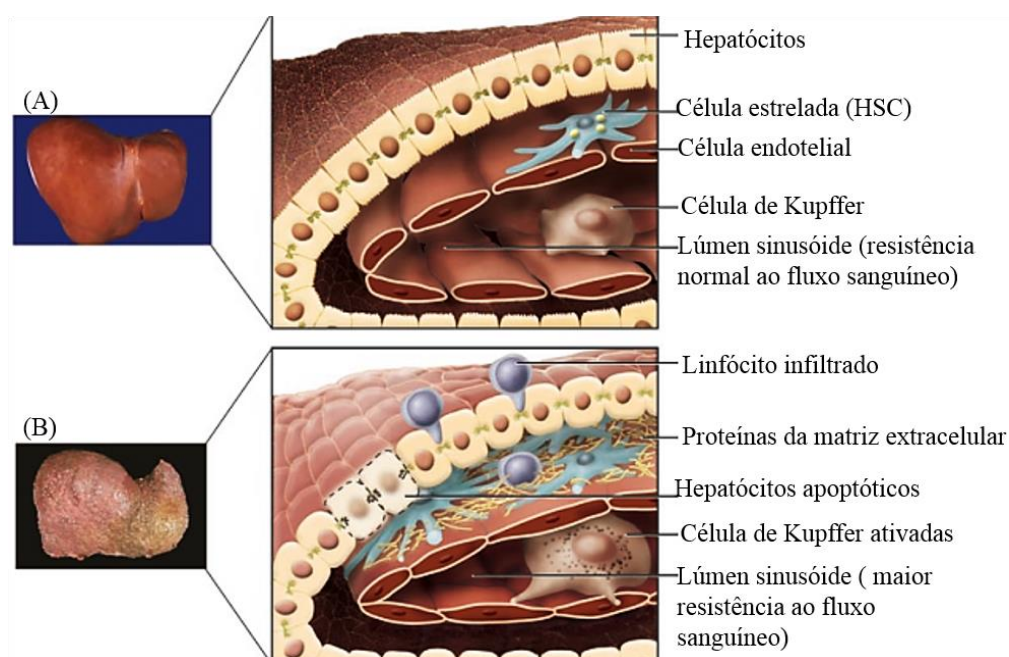


Figura 10: a) Condições Hepáticas no início da infecção b) Alterações associadas à fibrose hepática avançada.

Fonte: Adaptado de BATALLER; BRENNER, 2005.

2.8 Phage Display (PD)

A tecnologia de exibição de fagos (*Phage Display* - PD), desenvolvida George P. Smith em 1985, representa um grande avanço tecnológico no desenvolvimento de diagnóstico e tratamento de doenças infecciosas. George Smith teve sucesso na exibição de peptídeos recombinantes na extremidade da proteína pIII do fago M13, posteriormente, Gregory Winter, através da técnica, produziu anticorpos para o tratamento de doenças como esclerose múltipla e câncer. Por tais realizados George P. Smith e Gregory Winter foram laureados com o Prêmio Nobel de Química de 2018 (MIMMI *et al.*, 2019; SMITH; PETRENKO, 1997).

Essa técnica, é baseada na apresentação de uma biblioteca heterogênea de peptídeos ou proteínas, na superfície de um fago, por fusão com proteínas do capsídeo viral, e no armazenamento do material genético codificante no genoma do bacteriófago. Atualmente, vem sendo muito utilizada em estudos de biologia celular, imunologia, na descoberta de novas terapias, vacinas e teste diagnósticos (SMITH, 1985; MIMMI *et al.*, 2019).

Os métodos mais usados nessa metodologia, são baseados no uso de fagos filamentosos, geralmente o fago M13, que possui um DNA circular de fita simples (ss-DNA) de aproximadamente 6.407 bp, envolto por um capsídeo proteico e é constituído por cinco proteínas: pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX. Esse grupo de vírus infecta bactérias gram-negativas por meio do *pilus F* e possui um ciclo de vida lisogênico, liberando as partículas virais sem a lise da membrana plasmática das células hospedeiras. Essa técnica utiliza como padrão a cepa ER2738 da bactéria *Escherichia coli* que possui plasmídeo F' que codifica resistência ao antibiótico tetraciclina. (BARBA, 2001; OMIDFAR; DANESHPOUR, 2015).

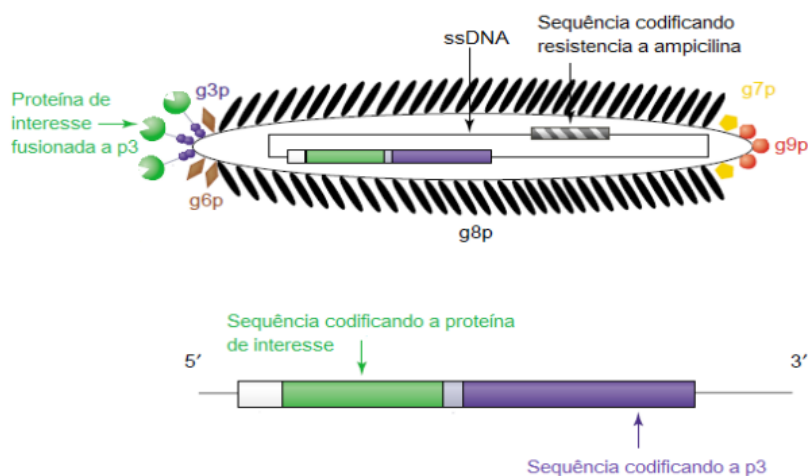


Figura 11: Representação esquemática da partícula viral M13. O gene codificador do peptídeo está inserido no genoma do fago e é expresso junto com a proteína pIII no capsídeo.

Fonte: Adaptado de FERNANDEZ-GACIO, 2003; PLOSS; KUHN, 2010.

A interação entre a região aminoterminal da proteína pIII e o *pilus F* bacteriano, propicia a transferência do DNA de fita simples do fago para bactéria, sendo esse convertido, por meio da maquinaria de replicação da célula, em uma forma replicativa de plasmídeo de fita dupla que sofre constantes replicações do DNA circular e gerar um DNA de fita simples que serve como molde para expressão das proteínas do fago. Os novos fagos são montados por empacotamento do DNA de fita simples em capsídeos proteicos e liberados da célula por exocitose (Figura 12) (BARBAS, 2001; RAKONJAC *et al.*, 2011).

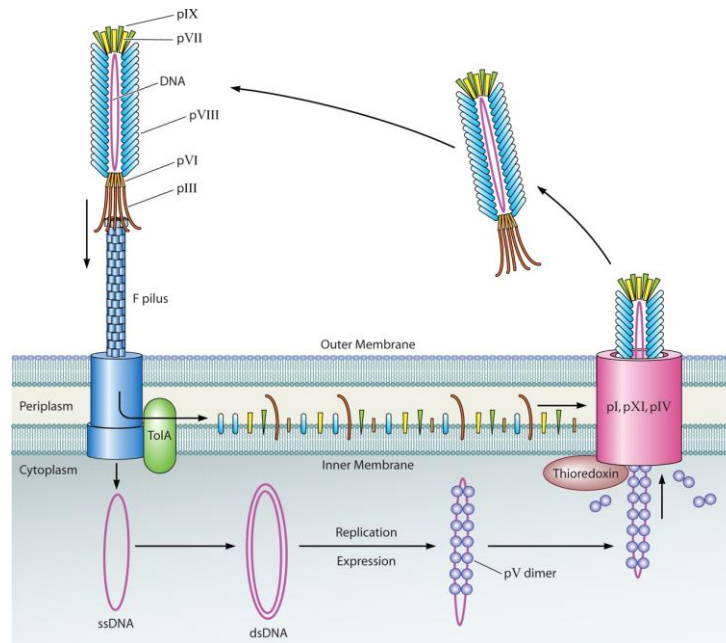


Figura 12: Ciclo de infecção do bacteriófago M13. Proteína pIII se liga ao pilus *F* da célula hospedeira. Proteína TolA despolimeriza as proteínas de revestimento do fago. Introdução do ssDNA que é convertido em dsDNA. Replicação. Maturação e Liberação do fago.
Fonte: JOHNNY X. HUANG *et al.* 2012.

Para se obter sucesso na realização dessa técnica é importante a utilização de bibliotecas que possuam uma grande variedade de sequências aleatórias de aminoácidos produzidas a partir de oligonucleotídeos degenerados, pois quanto maior for a diversidade de clones, maiores são as possibilidades de encontrar um que contenha uma sequência ligante, com alta afinidade, à um determinado alvo. Essas bibliotecas consistem na clonagem de diversos peptídeos de DNA exógeno no genoma de fagos filamentosos e na expressão de diferentes peptídeos em fusão às proteínas pIII e pVIII do capsídeo viral (TOLEDO-MACHADO *et al.*, 2015).

Em resumo, as bibliotecas randômicas têm como principal objetivo selecionar um ligante à molécula de interesse. No entanto, o rigor da seleção dependerá da finalidade do estudo, visto que se a finalidade for um mapeamento de possíveis ligantes a uma molécula alvo, a seleção ocorrerá de forma mais branda. Em contrapartida, se for para fins diagnósticos, por exemplo, essa deve ser realizada um maior rigor afim de eliminar fagos que interagem de forma inespecífica ou fraca (BARBA, 2001).

Atualmente, as bibliotecas de peptídeos podem ser adquiridas comercialmente, através da empresa *New England Biolabs* (Massachusetts, EUA) que fornece bibliotecas compostas

por 7 (PhD7) ou 12 (PhD12) resíduos de aminoácidos lineares, e também a de 7 resíduos conformacionais (PhD C7C-mer), o quantitativo de fagos de cada uma pode variar de 10^9 a 10^{15} sequência randômicas (BARBA, 2001; OMIDFAR; DANESHPOUR, 2015).

O processo de seleção dos clones é chamado de *biopanning* e tem início com a (a) exposição da biblioteca de peptídeos à molécula alvo, (b) favorecendo sua ligação com as sequências que apresentam afinidade e eliminando fagos não ligantes através de sucessivas lavagens. Logo, (c) os fagos ligantes são recuperados por meio de eluições, que desfazem sua interação com a molécula alvo, (d) e são reinfectados nas bactérias, para que ocorra sua amplificação. Ao final de cada ciclo, é realizado a titulação dos fagos. Por fim, são pré-validados, por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), para determinar sua especificidade de ligação ao alvo (Figura 13) (BARBAS, 2001; MIMMI *et al.*, 2019).

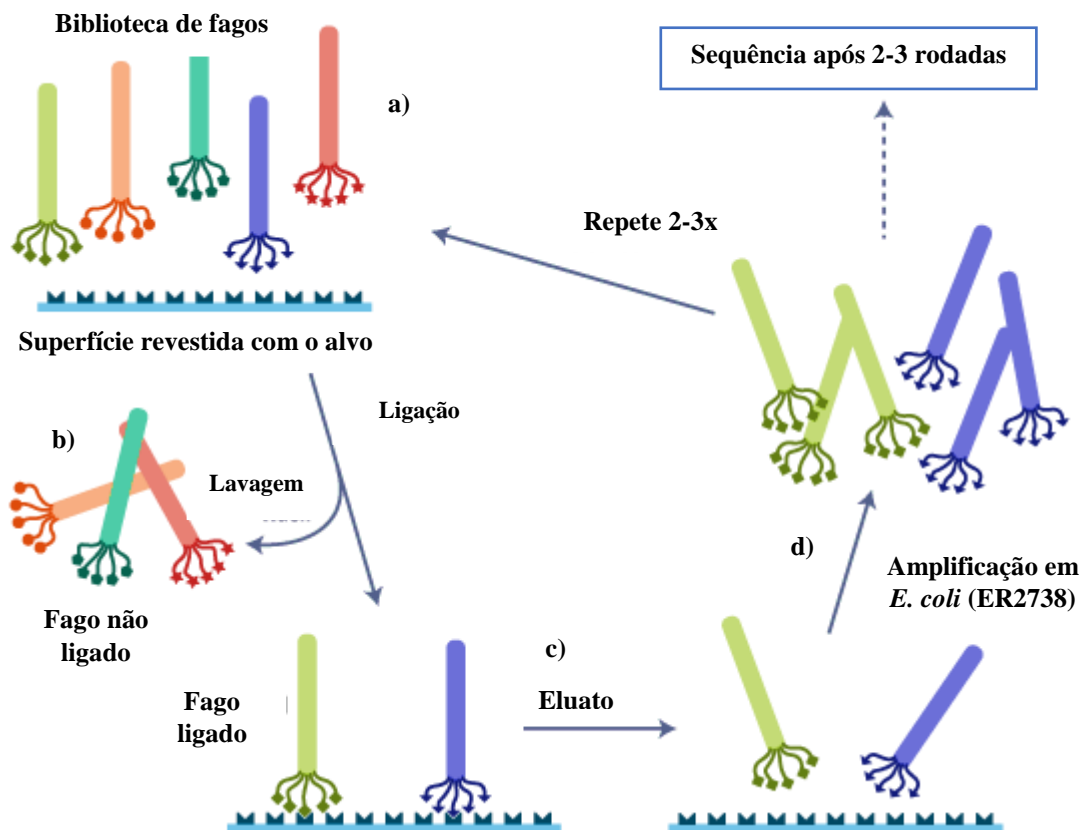


Figura 13: *Biopanning*: Ciclo de seleção por *phage display*.

Fonte: Adaptado de Instruction Manual Ph.D.TM Phage Display Libraries, 2017.

2.8.1 Phage Display: A descoberta de novos alvos biológicos.

A técnica de PD é amplamente utilizada nos processos de identificação e isolamento de peptídeos de alta afinidade/especificidade a alvos de interesse. Nas últimas décadas ela vem sendo aprimorada para auxiliar no desenvolvimento de novos diagnósticos e tratamentos, contra muitas doenças, por meio da produção de proteínas, peptídeos, e na seleção de anticorpos (mAbs). A exemplo disso, estudos já demonstraram a presença de anticorpos circulantes, após vacinação com mimetopos, contra diversos agentes patológicos incluindo o HCV (PUNTORIERO *et al.*, 1998).

Em um estudo desenvolvido por Paciello e colaboradores, visando a seleção e identificação de novos anticorpos (mAbs) anti-claudina 1 para inibição da infecção pelo HVC, foram gerados seis novos mAbs anti-CLDN-1 capazes de se ligar seletivamente a CLDN-1 e inibir a infecção *in vitro* de células Huh7.5 por diferentes isolados virais. Além disso, um dos mAbs selecionados, quando usado em combinação com o mAb anti-SRB1, aumentam a potência antiviral da célula, evidenciando o efeito sinérgico do uso de anticorpos direcionados a diferentes receptores de HCV (PACIELLO *et al.*, 2016).

Em outro estudo, que buscou selecionar anticorpos anti- NS3/NS4A do HCV a fim de inibir sua atividade de protease, foram produzidos, for meio da exposição a biblioteca de fagos, anticorpos humanos de cadeia única (scFvs) penetrantes em células, específicos para a proteína NS3/NS4A do HCV, que inibiram sua replicação em células hepáticas humanas restaurando a resposta imune inata do hospedeiro (JITTAVISUTTHIKUL *et al.*, 2016).

Mansun Law e colaboradores (2008) também buscaram selecionar anticorpos anti-HCV capazes de neutralizar diferentes genótipos do vírus. Como resultado do estudo foi possível selecionar anticorpos amplamente neutralizantes, que agem inibindo a ligação entre o complexo E1-E2 e o co-receptor de vírus CD81 bloqueando, assim, a interação do vírus com co-receptor CD81 inibindo a infecção (LAW *et al.*, 2008).

Além disso, existe grandes avanços nas descobertas de novos medicamentos por meio da técnica. Alguns exemplos de peptídeos em uso clínico, atualmente, são o ecallantide, um inibidor de caliceína (protease) usado no tratamento de angioedema hereditário, doença causada pela disfunção de uma proteína de inibição (C1) que regula a via de ativação clássica do complemento, romiplostim, um mimético funcional da trombopoietina usado no tratamento da trombocitopênica imune; e o tanzeum (albigutídeo), um receptor de um

peptídeo semelhante ao glucagon, usado no controle da glicemia em adultos com diabetes mellitus tipo 2 (FALA, 2015; FARKAS; VARGA, 2011; HAMZEH-MIVEHROUD *et al.*, 2013; MIMMI *et al.*, 2019).

Portanto, a tecnologia de PD pode ser considerada uma ferramenta pioneira no desenvolvimento de terapias peptídicas de uso clínico, assim como um grande avanço na identificação de novos epítomos que podem ser utilizados em ensaios para diagnóstico.

À vista disso, foi proposto por esse trabalho a seleção e identificação de peptídeos miméticos imunorreativos aos antígenos de HCV que possam ser utilizados em novas plataformas nanobiotecnológicas para fins de diagnóstico da fibrose hepática decorrente da hepatite C crônica.

3.0 Objetivos

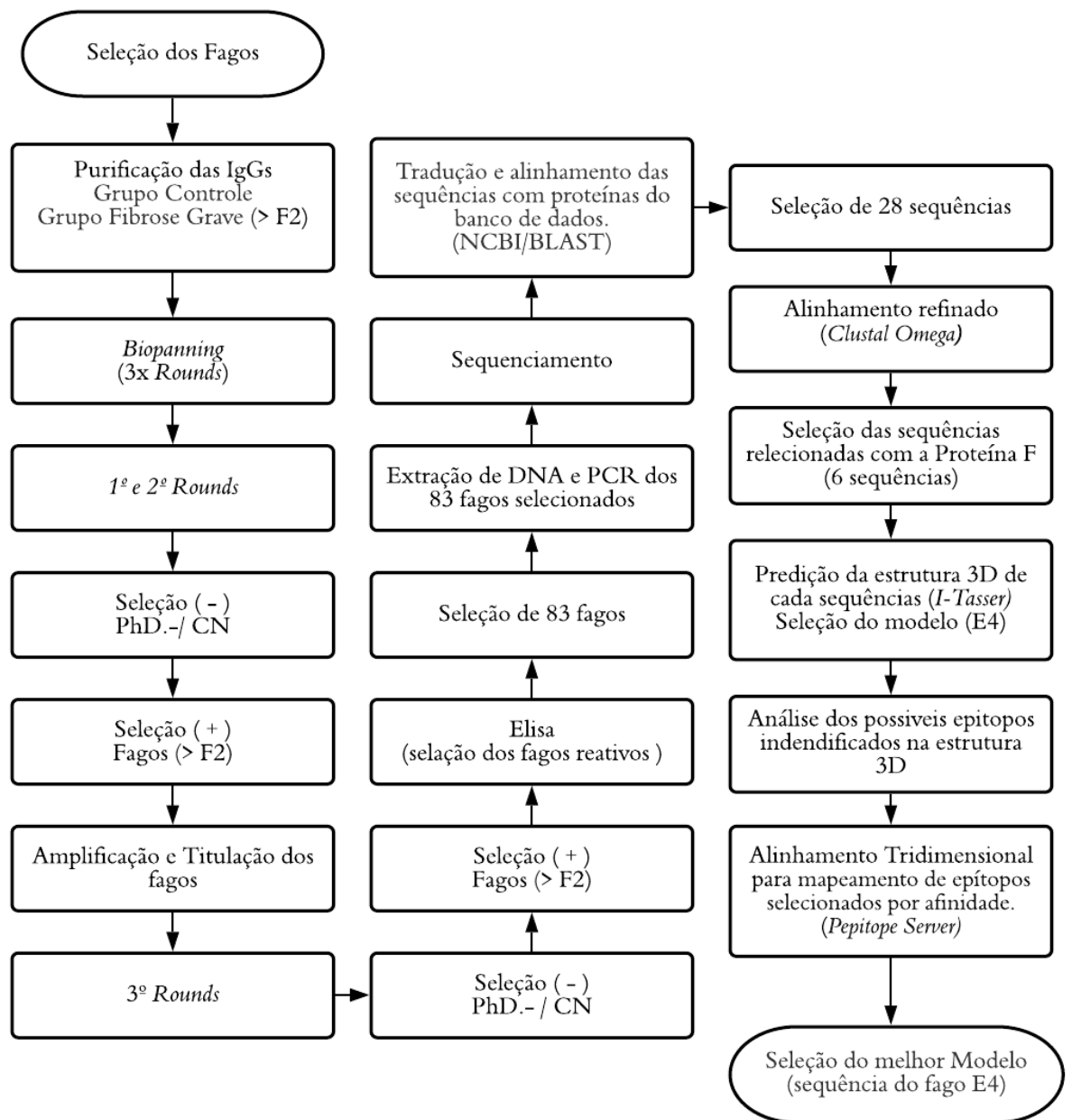
3.1 Objetivo Geral:

Identificar peptídeos miméticos aos antígenos de HCV que sejam imunorreativos e que possam ser usados em novas plataformas nanobiotecnológicas para fins de diagnóstico.

3.2 Objetivos específicos:

- ✓ Selecionar peptídeos miméticos aos antígenos de HCV reativos contra IgG total purificada de pacientes com diferentes estágios de doença hepática;
- ✓ Verificar a reatividade dos clones obtidos contra IgG em *pools* de soros de pacientes com fibrose hepática grave;
- ✓ Comparar à similaridade de peptídeos encontrados com outras proteínas do vírus da Hepatite C em uma análise *in silico*.

4.0 Metodologia



Fluxograma 1: Fluxograma apresenta as etapas da pesquisa de forma resumida para a melhor compreensão da metodologia e dos resultados.

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo descritivo, transversal apoiado pelo programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas em parceria com os grupos de “*Imunologia Básica e Aplicada*” da Universidade Federal do Amazonas e “*Nanotecnologia*” da Universidade Federal de Uberlândia- UFU.

Para a validação dos testes, foram utilizadas amostras biológicas coletadas dos seguintes segmentos populacionais:

- I) Pacientes diagnosticados com Hepatite C, com e sem fibrose, que procuraram atendimento na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), localizada na cidade de Manaus, estado do Amazonas.
- II) Candidatos a doadores de sangue de ambos os sexos, com idade mínima de 18 anos, reativos ou não no teste de triagem sorológica para anti-HCV. Foram excluídos, os doadores com sorologia positiva para marcadores de Hepatite B (anti-HBc, HBsAg), HIV (anti-HIV-1 e 2), HTLV (anti-HTLV-1 e 2), Doença de Chagas (teste de ELISA) e Sífilis (VDRL) e confirmados por PCR.

Para a construção da biblioteca de peptídeos, foram usadas o total de 20 amostras. Destas, 5 amostras foram de indivíduos anti-HCV reativos com PCR positivo com Fibrose em grau menor que F2, 5 amostras foram de indivíduos anti-HCV reativos com PCR positivo com Fibrose em grau maior que F2, 5 amostras foram de indivíduos anti-HCV reativos, PCR positivo e Hepatocarcinoma. Além destes, foram utilizadas 5 amostras de indivíduos controles.

A coleta de informações se deu por meio de um questionário simplificado com um mínimo de informações cadastrais, sócio-econômicas e comportamentais, como por exemplo, idade, sexo, nível de escolaridade, estado civil, número de parceiros por ano.

4.2 Casuística

Pacientes infectados pelo HCV, acompanhados no ambulatório de hepatologia da FMT-HVD foram convidados para participar deste projeto. Os pacientes foram atendidos por demanda espontânea. Todos os exames (bioquímicos, sorológicos e de biologia molecular) foram realizados em uma única coleta. Em cálculo amostral prévio, o total de 50 pacientes foram incluídos, admitindo teste de sensibilidade de 0.90 e especificidade de 0.70 com precisão (intervalo de confiança 95%).

4.3 Considerações éticas

Este estudo é parte de um projeto já aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da unidade de proponente deste projeto (HEMOAM) sob o número CAAE 49652815.8.0000.0009/2015, sendo conduzido de acordo com este protocolo e respeitando as diretrizes da Declaração de Helsinque e de Boas Práticas Clínicas (GCP).

4.4 Variáveis Sócio-demográficas, Clínicas e Laboratoriais Avaliadas

Dados pessoais e clínicos foram registrados na consulta agendada no momento da coleta dos exames e registrados em um arquivo sigiloso na FMT-HVD. Os formulários com dados clínicos e pessoais são armazenados em local seguro com acesso exclusivo dos investigadores.

Os dados coletados são confidenciais e de responsabilidade dos investigadores. A identidade dos pacientes incluídos é de conhecimento exclusivo dos investigadores. Conseqüentemente, o nome do paciente não é associado aos dados clínicos e pessoais coletados (completamente anônimo), para cada prontuário é utilizado o registro do paciente na Instituição.

Os dados sócio-demográficos (gênero, idade, naturalidade, procedência), clínicos (índice de massa corporal [IMC]), tratamento anti-viral [atual e prévio] para hepatite crônica C, Doenças crônicas e comorbidades associadas, fatores de risco para aquisição do HCV, Hábitos de vida [etilismo, tabagismo e uso de drogas], grau de fibrose (FIB-4 e APRI) e laboratoriais (ALT, AST, bilirrubina total e frações, carga viral do HCV [HCV-RNA], genótipo do HCV e citocinas pró-inflamatórias e regulatórias) avaliados foram tabulados em planilha de dados Microsoft Excel.

4.5 Métodos não invasivos para detecção da fibrose hepática

A detecção da fibrose hepática foi realizada pelo método APRI e FIB-4, preconizados pelo Ministério da Saúde. O cálculo para a identificação do grau de fibrose foi realizado utilizando parâmetros simples como transaminases e plaquetas. O cálculo do APRI foi realizado utilizando a fórmula: $AST (x LSN) / \text{contagem de plaquetas } (10^9/L) * 100$. A conversão do APRI para o estágio de fibrose METAVIR (1994) foi: ≥ 1.5 para F2; ≥ 2.0 para F4 (Wai, Greenson *et al.* 2003). O FIB-4 foi calculado conforme a seguinte fórmula: (Idade x

AST)/(contagem de plaquetas x (sqr (ALT))). A conversão do FIB-4 para o estágio de fibrose METAVIR (1994) foi: ≥ 1.45 para F2 (Vallet-Pichard, Mallet *et al.* 2007).

4.6 Coleta de Dados e Material Biológico

As amostras de sangue foram coletadas com sistema de coleta a vácuo, em três tubos de 5 mL, um com EDTA e dois tubos de 5 mL sem anticoagulante, com gel separador. As amostras foram transportadas ao Laboratório de Genômica da HEMOAM, para realização do *phage*-ELISA, além da realização de testes bioquímicos no Laboratório Central (LAC) da FMT-HVD, uma vez que os pacientes do estudo fazem parte da rotina do atendimento indivíduos com hepatite C crônica.

4.7 Phage Display: Seleção de Peptídeos

Esta etapa se refere à seleção de peptídeos contra anticorpos neutralizantes, utilizamos as bibliotecas de peptídeos randômicos conformacional (Ph.D.-C7C) e linear (Ph.D.-12). Na estratégia de *Phage Display* com peptídeos randômicos, almejamos obter mimétopos que reconheçam o parátipo dos anticorpos neutralizantes provenientes de soros de pacientes.

4.7.1 Acoplamento das IgG nas microesferas com proteína G

O acoplamento de IgG total dos pacientes de todos os grupos, grupo controle, fibrose leve ($\leq F2$), fibrose grave ($>F2$) e o grupo com hepatocarcinoma (HCC) foi realizado utilizando PBS-1x (pH 7.4) e microesferas recobertas com proteína G (*beads*).

Primeiramente, 125 μ L de *beads* foram lavadas três vezes com 200 μ L de PBS1x para sua ativação. Posteriormente foi realizado para dois grupos *pools* de 125 μ L, um *pool* de amostras do grupo controle e outro com amostras do grupo fibrose grave ($>F2$). Outros dois *pools* de 25 μ L foram realizados, um com o grupo fibrose leve ($\leq F2$) e por último outro com o grupo de hepatocarcinoma, todos eles foram colocados nos respectivos microtubos com as *beads* magnéticas e incubados por agitação moderada por 1 hora a 37°C. Em seguida, em uma rack magnética, a mistura foi lavada quatro vezes com 200 μ L PBS-Tween 0,05% que possibilita o aumento da afinidade. As IgGs ligadas as *beads* foram ressuspendidas com 125 μ L de PBS-1x e armazenadas a 4°C (BARBAS *et al.*, 2001).

4.7.2 *Biopanning*: Seleção de fagos de interesse

Para seleção dos peptídeos miméticos foram utilizados 10 μL (1×10^{11} de sequências randômicas) de uma biblioteca Ph.D.-C7C e a de Ph.D.-12M (New England BioLabs® Inc., Massachusetts, EUA) de peptídeos randômicos fusionados à proteína pIII de bacteriófagos filamentosos M13 diluída em 190 μL de PBS-Tween 0,05%. A biblioteca Ph.D.-C7C possui sete aminoácidos lineares flanqueados por duas cisteínas, com a capacidade de formar pontes dissulfídicas, através da oxidação dessas cisteínas durante a montagem do fago, o que permite uma conformação constricta ou rígida ao peptídeo em forma de *loop*. Na biblioteca consiste de 12 aminoácidos randômicos entre duas sequências espaçadoras curtas fusionadas à região N-terminal da proteína III (pIII) de bacteriófagos M13 (Barbas *et al.*, 2001).

O início da seleção, para cada biblioteca de forma individual, o primeiro *round* foi realizado com 20 μL de *beads* acopladas com IgGs do grupo controle e grupo fibrose grave (>F2). Para a seleção negativa, a biblioteca de peptídeos foi incubada por 30 minutos a 37°C com as *beads* acopladas com IgGs do grupo controle, sob agitação moderada, em seguida, as *beads* foram precipitadas e o sobrenadante foi transferido para um outro microtubo. Esse processo foi repetido três vezes para garantir que todos os fagos de não interesse, aqueles que se ligaram com IgGs grupo controle, sejam totalmente selecionados.

Na seleção positiva foi utilizado o sobrenadante da última passagem da seleção negativa. Isso foi incubado com as *beads* acopladas com IgGs do grupo fibrose grave (> F2) por 30 minutos a 37°C, sob agitação moderada. O processo foi repetido por três vezes e na última vez o sobrenadante foi passado em *beads* acopladas com IgGs do grupo fibrose leve e no grupo hepatocarcinoma, a fim de selecionar clones que também fossem reativos a eles. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado, e a *bead* residual foi ressuspensa em PBS-T 0,05%. Logo, as *beads* contendo os ligantes dos pacientes do grupo fibrose grave (> F2) ligadas aos fagos, foram lavadas 5 vezes com PBS-T 0,05% e os fagos selecionados foram eluídos com 200 μL de glicina (pH 2.2) incubado por 15 minutos, sob agitação e temperatura ambiente, a seguir foi transferido para um novo microtubo e neutralizada com 60 μL de Tris-HCl (1M pH 9.1). Enfim, o eluato foi separado para a realização da titulação e para amplificação dos fagos.

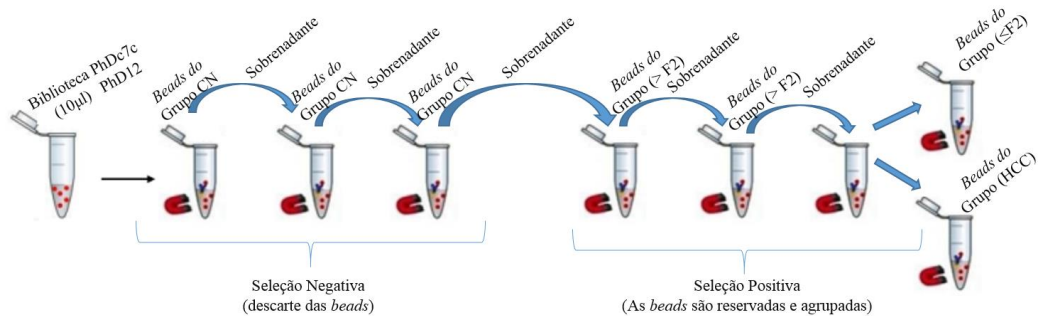


Figura 14: Estratégia do *biopanning* para seleção de fagos de interesse.

No processo de amplificação dos fagos, foi realizada a inoculação em um meio Luria Bertani (meio LB) de uma colônia isolada de *Escherichia coli* da linhagem ER2738. O meio foi incubado sob agitação a 37°C até a fase *early-log* (OD 600 ~ 0,3).

A cultura foi transferida para um tubo de centrifuga estéril e centrifugada a 15.000 rpm por 10 minutos, sob a temperatura de a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de centrifuga contendo uma solução de PEG/NaCl (20% de Polietilenoglicol 8000 e 2,5 M de NaCl) na proporção de 1/6 do volume do sobrenadante e a solução foi incubada overnight a 4°C para a precipitação do fago.

Após isso, o tubo foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi suspenso em 1 mL de PBS-1x e transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e adicionado 1/6 do seu volume de PEG/NaCl e incubado no gelo por 1 hora. O microtubo foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Por fim, foi realizado uma ressuspensão do precipitado em 200 µL de PBS-1x, obtendo-se então o eluato amplificado (BARBAS *et al.*, 2001).

4.7.3 Titulação

Para determinar a quantidade de partículas virais durante entrada e saída de cada ciclo do *biopanning* foi realizado o processo de titulação, no qual a solução de fagos foi submetida a diluições seriadas crescentes sob log₁₀ em meio LB.

Para as diluições de 10¹ até 10⁴ foram utilizados eluatos não amplificados de cada etapa, e para diluições entre 10⁷ a 10¹⁰ utilizou-se os eluatos amplificados. Para cada diluição foi acrescentado 200 µL da cultura de *E. coli* ER2738 (fase mid-log - OD 600 nm ~ 0,5) e esta solução foi agitada rapidamente e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente.

Foi feita a transferência das culturas infectadas para tubos falcon de 15 mL contendo 3 mL de Agarose-Top e espalhadas sobre uma placa de Petri contendo Ágar LB com IPTG/Xgal (1 µL/mL de Ágar LB) e tetraciclina (1 µL/mL de Ágar LB). Em seguida as placas foram incubadas a 37°C *overnight*. Após este período, houve a formação das colônias azuis (Figura 15), indicando as linhagens transformadas, as quais foram contadas e quantificadas, multiplicando-se cada valor obtido de colônias pelo fator de diluição com intuito de obter o título dos fagos.

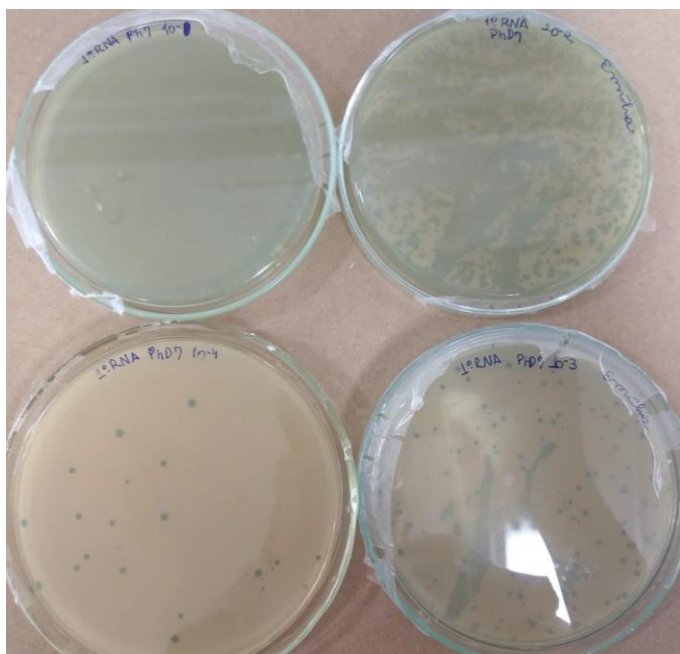


Figura 15: Titulação dos fagos. Formação das colônias azuis indicam as linhagens transformadas.

O backup do *biopanning* foi realizado através da distribuição de 1 mL da cultura de *E. coli* ER2738 (o início da fase log - OD 600nm ~ 0,3) em cada poço de uma placa *Deepwell*.

Com palitos de madeira esterilizados, as colônias azuis foram retiradas da placa de Petri e transferidas para a *Deepwell*.

A cada poço foi adicionado apenas uma colônia de fago isolado, totalizando 96 colônias. A placa foi vedada e incubada por 5 horas sob agitação a 37°C e após a incubação, a placa foi centrifugada por 20 minutos a 3.700 rpm. Posteriormente, 120 µL do sobrenadante de cada poço da *deepwell* foi transferido para uma microplaca nos respectivos poços e em seguida adicionado glicerol 50%. O backup foi armazenado em freezer a -20°C até o momento do uso (Barbas *et al.*, 2001).

4.7.4 Amplificação e purificação de fagos

Para a amplificação, distribui-se 1 mL da cultura de *E. coli* ER2738 no início de fase log (OD_{600nm}~0,3) em cada poço de uma placa *Deepwell*. Com palitos de madeira esterilizados, colônias azuis foram retiradas da placa de Petri (ciclos não-amplificados) e transferidas para a *Deepwell*. A cada poço foi adicionado apenas uma colônia de fago, totalizando 96 colônias em cada *Deepwell*, uma placa para cada biblioteca. As placas foram vedadas e incubadas *overnight* sob agitação a 37°C. Após isso, as placas foram centrifugadas todo o meio foi transferido para tubo de centrífuga e centrifugado por 10 minutos a 10000 rpm, após o sobrenadante foi transferido para outro tubo de centrífuga. A esta segunda placa adicionou-se 1/6 de PEG/NaCl (um sexto do volume total do sobrenadante), sendo incubada *overnight* a 4°C. Após esse tempo a placa foi centrifugada por 15 minutos a 10000 rpm, o sobrenadante foi dispensado e o precipitado ressuscitado em 1mL PBS 1X (0,15M de salina tamponada com fosfato). Logo depois esse meio foi passado para microtubos de 1,5 mL, centrifugado por 10 minutos a 14000 rpm, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e adicionou-se 1/6 de PEG/NaCl. Foi incubado por 1 hora no gelo, após centrifugada 10 minutos 14000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em 200 µL de PBS.

4.7.5 Pré-validação de peptídeos por PHAGE ELISA

Os fagos mais reativos ao HCV foram testados com soros individuais de pacientes e de controles negativos para analisar o valor preditivo positivo, negativo, sensibilidade e especificidade.

Nesse processo de pré-validação dos clones selecionados, foram utilizados *pools* de amostras do grupo de pacientes com Fibrose Grave a fim de verificar sua reatividade. Inicialmente as placas de microtitulação (*Nunc-Immune™ Plate MaxiSorp™ Surface*) foram sensibilizadas com 10µg/poço de anticorpo monoclonal anti-M13 (GE Healthcare) diluído em tampão carbonato 50mM, pH 9,6 (1:500) e incubado a 4°C.

No dia seguinte, as placas foram lavadas uma vez com PBS-Tween 0,05% e bloqueadas por 1 hora em tampão de bloqueio (PBS-1x suplementado com 5% de leite em pó desnatado) em temperatura de 37 °C. Após isso, foram lavadas por três vezes com PBS-Tween 0,05% e adicionados 50 µL/poço de sobrenadante dos fagos e incubadas por 1 hora a 37°C.

Posteriormente, as placas foram novamente lavadas por seis vezes com PBS-Tween 0,05% e foram adicionados os *pools* com soros dos grupos 2 e 4 e foram incubados a 37°C por 1 hora - os *pools* de soro foram diluídos 1:200 em PBS-1x suplementado com 5% de leite desnatado. Após este período, as placas foram lavadas seis vezes e incubadas com anti-IgG humana conjugado com peroxidase (Sigma/Aldrich), diluído 1:5000 em PBS-1x suplementado com 5% de leite em pó desnatado por 1 hora a 37°C.

Em seguida, as placas foram novamente lavadas seis vezes e a ligação antígeno/anticorpo foi detectada pela adição do tampão tetrametilbenzidina (TMB) na concentração de 1 mg/mL. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico a 4 N. A reatividade foi medida pelos valores de absorbância obtidos em leitor de placas EL800 Universal Microplate Reader (Bio-Tek Instruments, Inc.) com leitura no comprimento de onda de 450 nm. O linear de positividade foi definido como sendo a absorbância três vezes o valor de absorbância do grupo controle. O ponto de corte foi calculado a partir da média e do desvio padrão.

4.7.6 Extração de DNA

Na extração de DNA dos vetores recombinantes, colônias azuis provenientes do 3º ciclo de seleção (eluato não-amplificado), foram transferidas para placas *deepwell* contendo 1 mL de cultura de *E. coli* ER2738, sendo então incubadas. Após o tempo de incubação, seguiram-se os mesmos procedimentos da amplificação (descrito acima) até a última centrifugação de 1 hora, onde foi acrescentado ao precipitado tampão iodeto (10 mM de Tris-

HCl pH 8,0; 1mM de EDTA e 4 M de NaI). As placas foram agitadas vigorosamente por 1 minuto e, em seguida, adicionou-se 250 µL de etanol absoluto. Após, as placas foram centrifugadas (4°C, 40 minutos). Foram adicionados 150 µL de etanol a 70% e centrifugado por 10 minutos a 14000 rpm. Finalmente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de DNA foi diluído em 15 µL de água ultrapura e sua qualidade foi verificada pela corrida eletroforética em gel de agarose a 0,8% corado com solução de brometo de etídeo (10 mg/mL).

4.7.7 Sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada com 500 ng de DNA molde dos fagos recombinantes selecionados no *biopanning*, 5 pmol do *primer*- 96 gIII (5'-OH CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3' - Biolabs) e o pré-mix (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. - Amersham Biosciences). A reação de 35 ciclos foi feita em um termociclador de placas nas seguintes 40 condições: desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 58°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 60 segundos. Os amplicons gerados da reação de sequenciamento foram precipitados com 1 µL de acetato de amônio e 27,5 µL de etanol absoluto. A placa foi centrifugada por 45 minutos a 2432 g e o sobrenadante descartado. Foi adicionado ao pellet 150 µL de etanol a 70%, centrifugando-o por 10 minutos, a 2432 g, descartando posteriormente o sobrenadante. A placa permanecerá invertida sobre um papel toalha e nesta posição foi centrifugada a 486 g, durante 1 minuto. Em seguida, a placa foi coberta com papel alumínio, ficando assim por cinco minutos para evaporar o etanol remanescente. O precipitado resultante foi ressuspendido no tampão de diluição (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. - Amersham Biosciences) e a leitura foi realizada em um sequenciador automático MegaBace 1000 (Amersham Biosciences).

4.7.8 Bioinformática

A dedução *in silico* das sequências de aminoácidos foi realizada pelo programa DNA2PRO12, que é designado para dedução de sequências de insertos tanto de bibliotecas da New England Biolabs (Ph.D.-12TM ou Ph.D.-C7CTM) quanto de outras bibliotecas de interesse que contiverem as sequências inicial e final do vetor. O programa automaticamente localiza a posição do inserto, traduz o mesmo e indica os possíveis erros na tradução (tais

como códons inesperados ou erros na sequência próxima). As similaridades entre os peptídeos selecionados para as duas formas clínicas foram testadas utilizando o programa CLUSTAL W versão 1.83 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Os peptídeos foram alinhados com proteínas depositadas no NCBI/BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), que consta de um conjunto de programas que buscam similaridades entre diferentes sequências. O alinhamento das sequências investigadas foi realizado com o banco de dados de ácidos nucléicos e/ou proteínas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Dentro do BLAST a busca foi realizada no “Protein blast” utilizando como database o “swissprot protein sequence (swissprot)”, algoritmo - blastp (protein BLAST) e a pesquisa foi restrita ao HCV. Para obter informações mais detalhadas sobre as proteínas que alinharam com os peptídeos selecionados foi utilizado um segundo alinhamento no *software on-line Clustal Omega*, esse programa realiza o alinhamento de sequência múltipla que usa árvores-guia semeadas e técnicas de perfil-perfil HMM para gerar alinhamentos entre três ou mais sequências. A predição da estrutura 3D da proteína F foi realizada por meio *software on-line I-Tasser*, que realiza a previsão da estrutura e função da proteína baseada em sua estrutura, identificando modelos estruturais a partir do PDB por abordagem de segmentação múltipla LOMETS, com modelos atômicos de comprimento total construídos por simulações de montagem de fragmentos com base em modelo iterativo.(ROY; KUCUKURAL; ZHANG, 2010). O alinhamento tridimensional foi realizado no *software on-line Pepitope Server* por meio do programa *Pepsurf*, este programa tem como entrada um conjunto de proteínas no formato PDB. O algoritmo procura agrupar um subconjunto dos peptídeos para identifica uma região na proteína alvo que potencialmente é mimetizada por aquele grupo de peptídeos específicos (MAYROSE *et al*, 2007).

4.7.9 Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o *software GraphPad Prism 5.0*. Foi realizado o teste de normalidade dos dados (*D’Agostino - Pearson*) e aplicados testes paramétricos para variáveis com distribuição normal e testes não paramétricos para variáveis sem distribuição normal. Os testes estatísticos utilizados foram *One-Way ANOVA*, *Mann Whitney*, *Kruskal-Wallis*, *Fisher* e Teste t não pareado, e a significância foi considerada quando $p < 0,05$ com intervalo de confiança (IC) de 0,95. Foram utilizadas as correlações de *Spearman* e *Pearson*, respectivamente, para dados paramétricos e não paramétricos e os resultados são descritos como coeficientes de correlação e valores de *p*.

5.0 Resultados

No processo de *biopanning*, foram selecionados um total de 192 fagos, sendo 96 da biblioteca de 7 (Ph.D.-C7C) e 96 da biblioteca de 12 (Ph.D.-12). Todos esses foram submetidos a um ensaio de *Phage-ELISA*, com sobrenadante de fagos, com *pools* de soros de 5 pacientes portadores do HCV incluídos no grupo da Fibrose Grave e 5 amostras de indivíduos saudáveis, o grupo controle, para pré-validar a reatividade dos 192 fagos selecionados durante o processo de *biopanning*. Foi percebido que apenas o clone B4 da biblioteca de 12 mers (PhD12) foi reativo aos dois grupos (Figura 17).

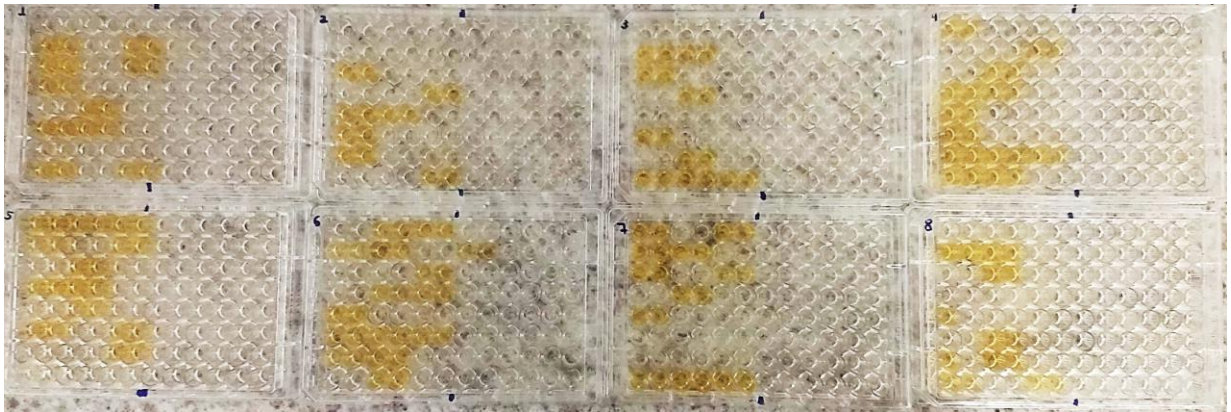


Figura 16: Pré-validação dos fagos por *Phage-Elisa* utilizando *pools* de amostras do grupo de pacientes com Fibrose Grave e Controle negativo a fim de verificar a reatividade dos fagos. Primeira metade das placas contém Fibrose Grave e a segunda metade das placas contém Controle negativo. As amostras foram testadas em duplicatas.

Desses 192 fagos submetidos ao ensaio de Eliza, 83 deles apresentaram diferença significativa entre absorbância dos indivíduos portadores da Fibrose Grave e aqueles do grupo controle (Figura 17). Como critério para seleção dos melhores clones foram selecionados aqueles que apresentaram o valor de absorbância três vezes maior que o valor do ponto de corte. Esses 83 fagos foram submetidos ao sequenciamento para se obter as sequências peptídicas correspondente a cada um deles.

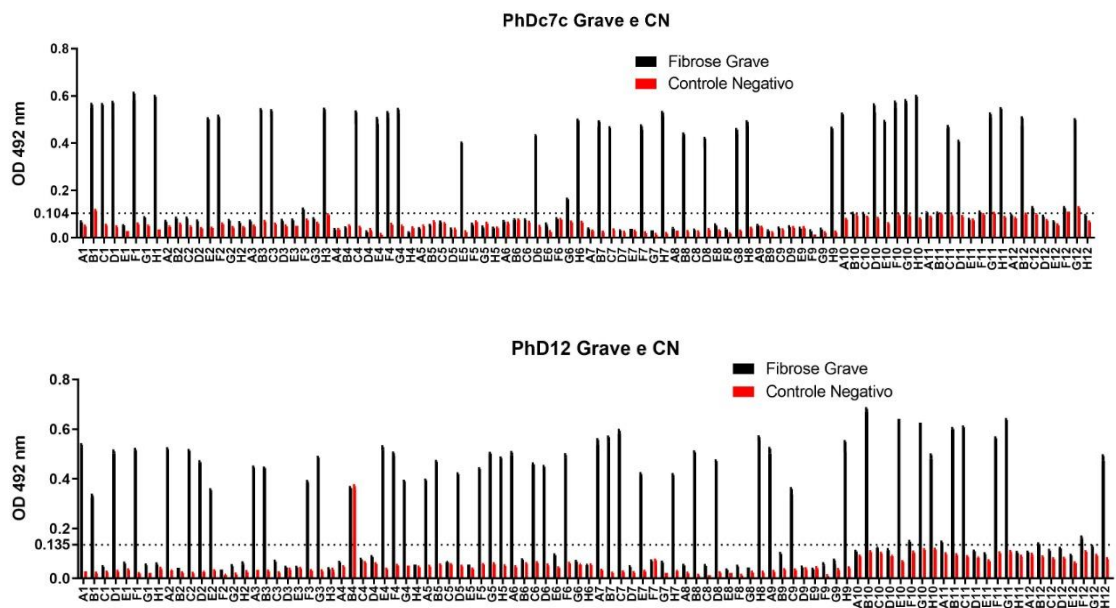


Figura 17: *Phage-ELISA* dos clones selecionados por *biopanning*, pacientes positivos a Fibrose Grave em comparação a indivíduos saudáveis (grupo controle). Ponto de corte 0.104 para PhDc7C e de 0.135 para PhD12.

Para a realização do sequenciamento, inicialmente foi realizada a extração de DNA dos 83 clones selecionados e sua qualidade foi verificada por meio de separação eletroforética em gel de agarose (0,8%) no qual foram selecionados, de forma aleatória, seis fagos de cada biblioteca para a realização do teste (Figura 18).



Figura 18: Produtos da extração visualizados por separação eletroforética em gel de agarose (0,8%). Seleção aleatória dos fagos para demonstração.

Após o sequenciamento foram obtidas as sequências peptídicas de todos os 83 clones submetidos. Todas as sequências foram traduzidas e alinhadas com proteínas do banco de dados de ácidos nucleicos e/ou proteínas NCBI/BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), onde consta de um conjunto de programas que buscam similaridades entre diferentes sequências proteicas. O alinhamento resultou na que seleção de 23 clones correspondem a 15 sequências distintas derivadas da biblioteca PhDc7c e 17 clones que correspondem a 13 sequências distintas derivadas da biblioteca PhD-12 (Quadro 1 e 2).

O número de clones foi reduzido pois foram selecionados apenas aqueles cuja as sequências apresentaram pelo menos 80% de identidade e cobertura quando alinhadas a sequência de referência do vírus. Isso garante uma boa homologia entre sequências selecionadas e as proteínas do HCV. O percentual de identidade representa o percentual de aminoácidos iguais e a cobertura representa o alinhamento correto entre os aminoácidos da sequência pesquisada e as proteínas depositadas no banco de dados. Abaixo pode-se observar as sequências dos aminoácidos dos clones que obtiveram um bom alinhamento e a quais proteínas elas estavam melhor relacionadas por meio do percentual de identidade e cobertura alinhamento.

Quadro 1 - Sequências identificadas a partir da biblioteca de (PhD-c7c) alinhados com proteínas do banco de dados NCBI/BLAST com número de acesso e porcentagem da cobertura e identidade. (Freq) corresponde a frequências de cada sequência encontrada. (*) corresponde aos aminoácidos da sequência e foi usado para manter o sigilo das sequências selecionadas.

Clones da Biblioteca de (PhD-c7c)						
Clones	Freq	Sequência	Cobertura	Identidade	Proteínas	GenBank
C1 e G10	2/23	S*****G	100%	80%	Poliproteína	AQW44737.1
D1 e G4	2/23	S*****S	100%	80%	Poliproteína	AQW44782.1
F1, C7 e G11	3/23	S*****A	85%	83.33%	Proteína F	AGC14518.1
H1	1/23	S*****S	85%	100%	Poliproteína	ADY38591.1
F2	1/23	S*****S	100%	100%	NS5a	ALN43441.1
C3	1/23	S*****A	85%	100%	Poliproteína	QQQ76469.1
C4, G8, H9 e C11	4/23	S*****S	85%	83.33%	Poliproteína	AAP30148.1
E4	1/23	S*****S	85%	83.33%	Proteína F	QGW53320.1
D6	1/23	S*****A	85%	83.33%	Proteína F	QPB71906.1
H6	1/23	S*****Q	85%	83.33%	Core	AXH64878.1
F7	1/23	S*****S	100%	85.71%	Poliproteína	AXF35725.1
H7	1/23	S*****A	85%	83.33%	Poliproteína	AAF25611.1
H8	1/23	S*****F	85%	83.33%	Proteína F	AGC14518.1
E10 e D11	2/23	S*****G	85%	83.33%	Poliproteína	ACA48614.1

H11	1/23	S*****P	100%	85.71%	Proteína F	QED93976.
-----	------	---------	------	--------	------------	-----------

Quadro 2 - Peptídeos identificados a partir da biblioteca de (PhD-12) alinhados com proteínas do banco de dados NCBI/BLAST com número de acesso e porcentagem da cobertura e identidade. (Freq) corresponde a frequências de cada sequência encontrada. (*) corresponde aos aminoácidos da sequência e foi usado para manter o sigilo das sequências selecionadas.

Clones da Biblioteca de (PhD-12)						
Clones	Freq.	Sequências	Cobertura	Identidade	Proteínas	GenBank
D1 e C7	2/17	N*****S	100%	83.33%	Poliproteína	ANN11861.1
A2 e F6	2/17	V*****P	100%	85.71%	Poliproteína	AQW44779.1
D2	1/17	A*****T	100%	85.71%	Poliproteína	BBC62263
E2	1/17	A*****N	91%	83.33%	Poliproteína	Q9QAX1.3
F3	1/17	G*****N	91%	100%	Poliproteína	ABR27360.1
G10	1/17	W*****M	100%	100%	Poliproteína	QTF98639.1
E4 e C11	2/17	N*****S	83%	80%	Poliproteína	AEF01077.1
G3	1/17	D*****N	91%	100%	Poliproteína	BAB18804.1
G5	1/17	I*****P	91%	87.50%	Proteína F	AGC14522.1
C6	1/17	A*****H	91%	80%	Poliproteína	BBC44630.1
H8	1/17	T*****R	83%	83.33%	Poliproteína	ABE98149.1
F11	1/17	H*****Y	91%	100%	Poliproteína	AXS76914.1
G11	1/17	R*****T	83%	85.71%	Poliproteína	BAK61626.1

Todos esses resultados sugerem várias interpretações, no entanto, buscando direcioná-los ao nosso objetivo principal que é selecionar e identificar, a partir da técnica *Phage Display*, peptídeos reativos aos soros de pacientes HCV⁺ com fibrose hepática, foram selecionadas as sequências potencialmente envolvidas no processo de fibrótico. Desta forma, as sequências de Proteína F foram selecionadas para dar continuidade a análise *in silico*. Adiante é possível observar, com detalhe, as seis sequências de proteína F alinhadas com amostras do banco de dados.

Quadro 3 - Sequências identificadas e alinhadas com Proteínas F no banco de dados NCBI/BLAST com número de acesso e região de alinhamento. Os aminoácidos grafados em negrito e sublinhados fazem referência as sequências que são homólogas às encontradas no banco de dados do *GenBank*. Query corresponde a sequência identificadas e Sbjct corresponde a sequência já existente no banco de dados. (*) corresponde aos aminoácidos da sequência e foi usado para manter o sigilo das sequências selecionadas.

Sequências potencialmente relacionadas a Proteína F			
Clones	Sequência	Alinhamento	GenBank

F1, C7 e G11	<u>S**H**A</u>	Query 1 S*****D 6 SPT+WD Sbjct 130 SPTSWD 135	AGC14518.1
E4	<u>S*T***S</u>	Query 1 S*****H 6 SP+HAH Sbjct 65 SPRHAH 70	QGW53320.1
D6	<u>S*T***A</u>	Query 2 P*****A 7 P+HLGA Sbjct 96 PAHLGA 101	QPB71906.1
H8	<u>S**H**F</u>	Query 1 S*****D 6 SPT+WD Sbjct 130 SPTSWD 135	AGC14518.1
H11	<u>S*P***P</u>	Query 1 S*****P 7 SP+HADP Sbjct 51 SPRHADP 57	QED93976.1
G5	<u>I***Y***THLP</u>	Query 1 I*****L 8 IPSH+ AAL Sbjct 120 IPSH - AAL 126	AGC14522.1

Após essa primeira triagem, foi realizado o alinhamento global entre as sequências lineares dos clones e a sequência da proteína alvo por meio do software on-line *Clustal Omega*. Essa etapa é realizada com o propósito de refinar o primeiro alinhamento (Quadro 4).

Quadro 4 - Alinhamento linear pelo *software on-line Clustal Omega*. (*) resíduos de aminoácidos idênticos, (:) substituição conservada com características básicas, ácidas ou neutras conservadas. (#) na coluna de **sequência** corresponde aos aminoácidos da sequência e foi usado para manter o sigilo das sequências selecionadas.

Clones	Sequência	Alinhamento Global		
F1, C7 G11	<u>S##H##A</u>	AGC14518.1 F1	RSSIPLRAASPTSDTSRSWAPLWVASPELWHTLEPNKGTGLTTQQGTSPVALSLSSSWH -----SPTHNDA----- *** **;	180 7
E4	<u>S#T###S</u>	QGW53320.1 E4	GVSLSPRHAHARAGPGPSLGLGPSMGMRRAAVGQDGFPPAALALVGAKMTPGVDPATIW ----SPTHAHS----- ** **;	120 7
D6	<u>S#T###A</u>	QPB71906.1 D6	RVGARAGPGLSPGTLGPSMVTRAAGGQGGSCPHVAPAHLGAQMTPGAGPAIWRSS -----SPTHLGA----- : * : ****	116 7
H8	<u>S##H##F</u>	AGC14518.1 H8	RSSIPLRAASPTSDTSRSWAPLWVASPELWHTLEPNKGTGLTTQQGTSPVALSLSSSWH -----SPTHMDF----- *** **	180 7
H11	<u>S#P###P</u>	QED93976.1 H11	PTAAHWTLSSRAVARSLVESTCCRAGAQNIVCARRERLQSGRNLVGGVNLSPRHADPRAG -----SPPHADP----- ** ****	60 7
G5	<u>I###Y### THLP</u>	AGC14522.1 G5	SPRRASPRADPGLSLGTHGPSWMRVAGGRDGSCLLAALDHLGAPMIPGEGRVIWKSSI -----I----- *	120 1
		AGC14522.1 G5	PSHAALPTSNDTSRS 135 PSHYAALTHLP---- 12 *** * *	

Após isso, a predição da estrutura 3D da proteína F foi realizada, já que a mesma ainda não possui estruturas cristalografada disponível no banco de dados. A predição foi feita por meio *software on-line I-Tasser*. Adiante é possível observar os melhores modelos preditos para cada sequência. É importante destacar que essa análise visa a seleção da sequência que apresenta maior potencial para seguir para os ensaios experimentais.

Diante disso, dentre os esses seis modelos apresentados, foram selecionados dois que apresentaram melhores *scores*, que correspondem aos modelos as sequências dos clones E4 e D6 (figuras 20 e 21 respectivamente). Em relação aos *scores*, o *C-score* indica a pontuação de confiança que estima a qualidade dos modelos previstos e deve estar na faixa de -5 a 2, sendo que a pontuação mais alta indica melhor qualidade do modelo. O *TM-score* mede a similaridade estrutural entre duas estruturas, que indica a precisão da modelagem de uma estrutura, onde *TM-score* > 0,5 indica uma topologia correta e um *TM-score* < 0,17 indica uma semelhança aleatória. O modelo E4 apresentou o *C-score* de -2,87 e um *TM-score* de 0,39 enquanto que o modelo D6 apresentou o *C-score* de -2,35 e um *TM-score* de 0,44. Esses foram os modelos que apresentaram os melhores *scores*, as análises seguiram baseadas neles.

Essa análise bioinformática prever modelos teóricos que norteiam e auxiliam na seleção de estruturas alvos, no entanto, esses modelos também podem apresentar limitações e por isso os testes experimentais são indispensáveis. É importante ressaltar que a cada ano os *softwares* de predição são atualizados e melhorados e tem apresentado resultados muito significativos no estudo de predição de estrutura proteica e suas possíveis interações.

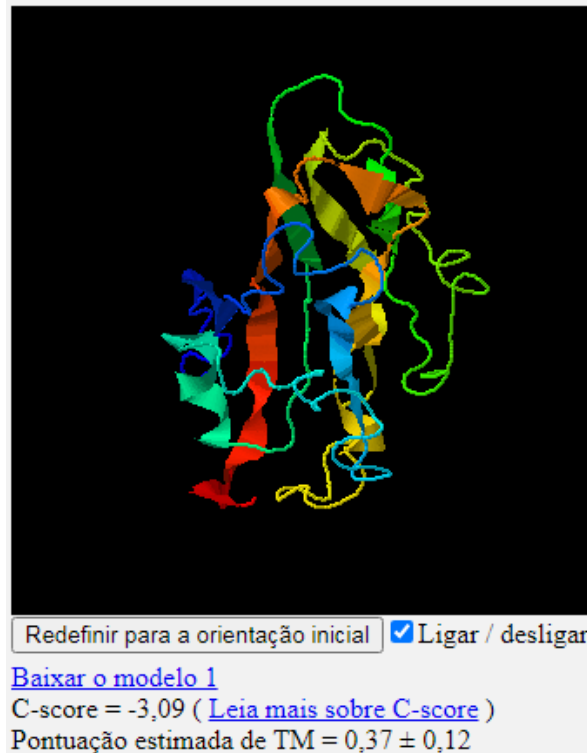


Figura 19: Melhor modelo obtido por meio da predição da estrutura tridimensional por meio *software on-line I-Tasser* para a sequência dos clones F1, C7 e G11.



Figura 20: Melhor modelo obtido por meio da predição da estrutura tridimensional por meio *software on-line I-Tasser* para a sequência do clone E4.

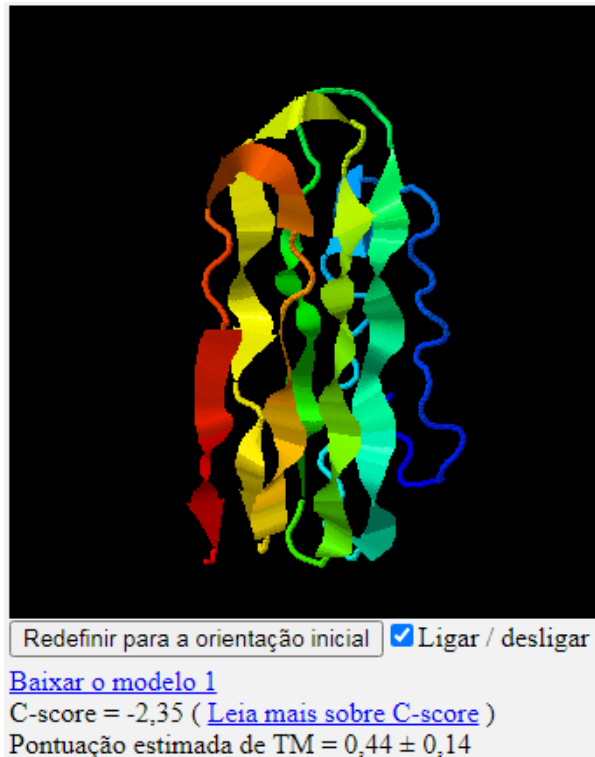


Figura 21: Melhor modelo obtido por meio da predição da estrutura tridimensional por meio *software on-line I-Tasser* para a sequência do clone D6.

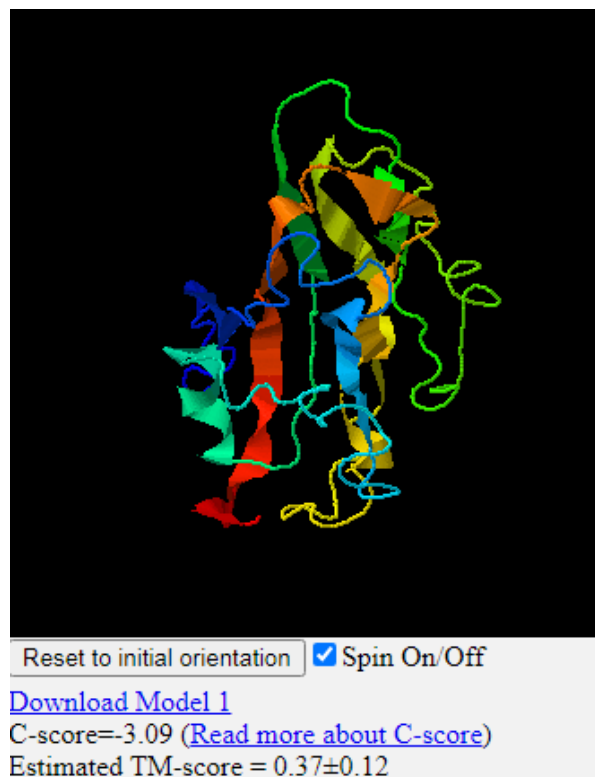


Figura 22: Melhor modelo obtido por meio da predição da estrutura tridimensional por meio *software on-line I-Tasser* para a sequência do clone H8.



Figura 23: Melhor modelo obtido por meio da predição da estrutura tridimensional por meio *software on-line I-Tasser* para a sequência do clone H11.

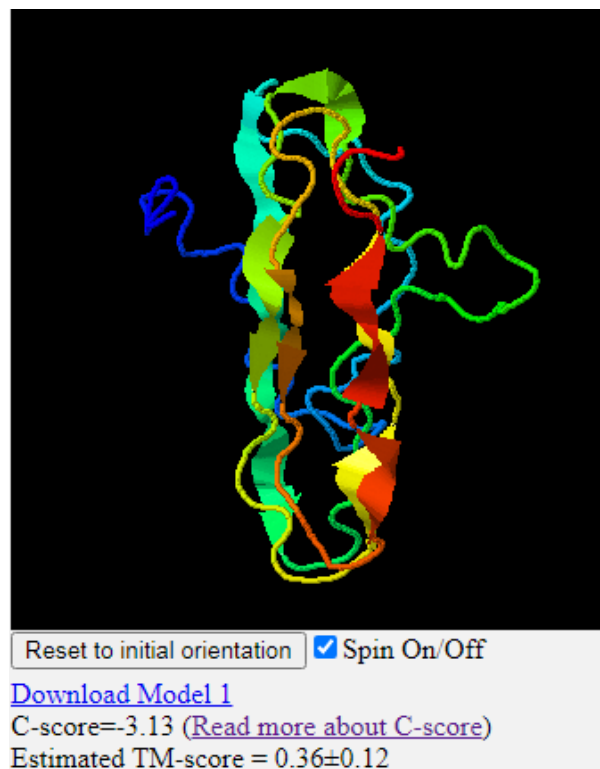


Figura 24: Melhor modelo obtido por meio da predição da estrutura tridimensional por meio *software on-line I-Tasser* para a sequência do clone G5.

O *software I-Tasser* também prediz, baseado no servidor *COFACTOR* que prevê as possíveis funções proteicas baseadas na estrutura, sítios de ligação do ligante que possam estar presentes no modelo construído. O modelo E4 apresenta um possível de sítio de ligante relevantes para nossa análise nos resíduos 44 e 89 que, possivelmente, pode estar interagindo com a enzima glutatona S-transferase A3, uma protease antioxidante envolvida no processo de inibição da fibrose hepática. Observe a seguir esse sítio de ligante (Figura 25).

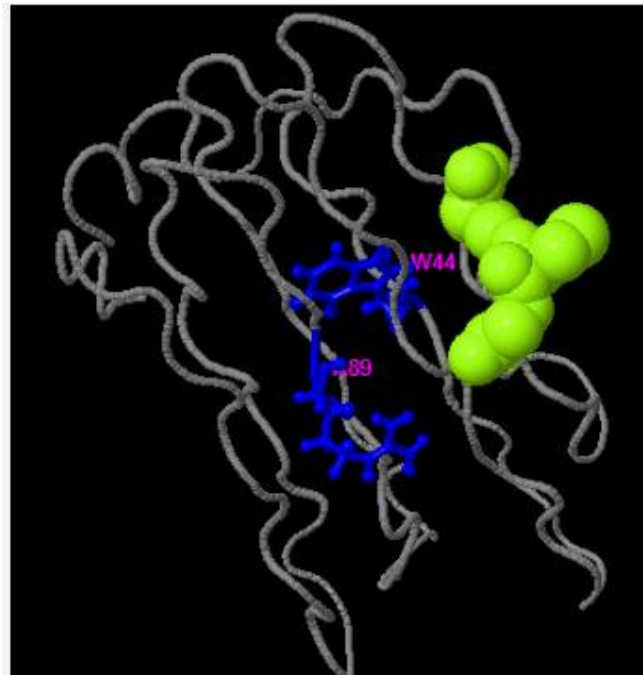


Figura 25: Modelo que demonstra o local de ligação do ligante previsto. As esferas verde-amarelas indicam os ligantes de ligação previstos e os palitos azuis indicam os resíduos de ligação ao ligante.

Por fim, após a predição da estrutura tridimensional e análise dos resultados, é possível prosseguir com a análise para a próxima etapa baseando-se no modelo predito para a sequência do clone E4. Foi realizado seu alinhamento tridimensional por meio do *software on-line Pepitope Server*, esse *software* se baseia no algoritmo *Pepsurf*, que permite o mapeamento de epítopos selecionados por afinidade. Assim, pode-se interpretar o alinhamento de acordo com a cor apresentada na imagem, onde a cor branca (*match*) indica o compartilhamento do mesmo aminoácido e a cor amarela indica aminoácidos (*mismatch*) diferentes indica incompatibilidade dos aminoácidos. **Figura 25:**

Dessa forma, é possível identificar o alinhamento de quatro aminoácidos idênticos e de três diferentes que possuem características conservadas não havendo aminoácidos

incompatíveis. É importante observar os valores da pontuação do alinhamento e o *p-value*. Quanto maior a pontuação melhor o alinhamento e o *p-value* não pode estar acima de 0,001. Pontuação desse alinhamento foi de 11,3002 e o *p-valor* foi igual a 0,001 (Figura 26).

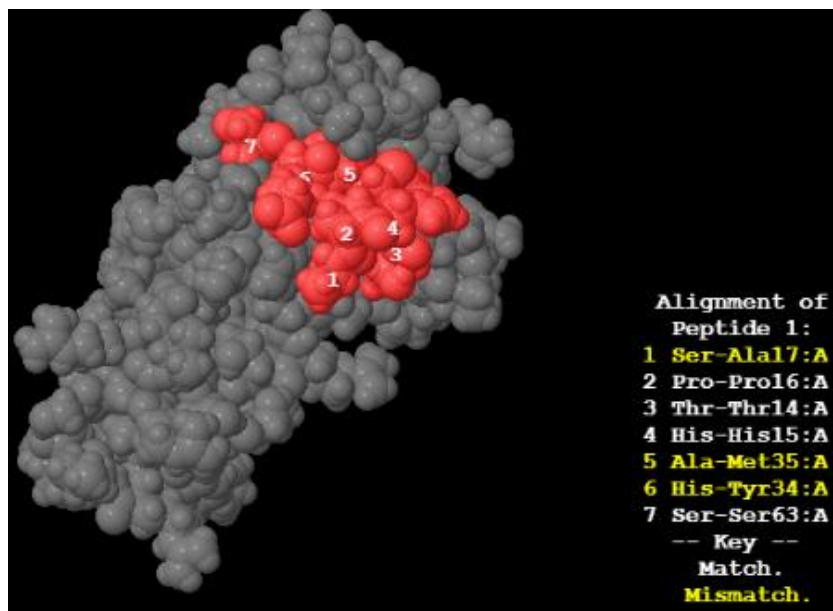


Figura 26: Alinhamento tridimensional realizado *software on-line Pepitope Server*. Pontuação de alinhamento: 11,3002 *p-valor*: 0,001.

6.0 Discussão

O vírus da hepatite C (HCV) é uma das principais preocupações da saúde pública no mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimativa que cerca de 170 milhões de pessoas são portadoras dele, levando 71 milhões delas a doenças hepáticas graves, como fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular, o que resulta em aproximadamente 400 mil mortes por ano (WESTBROOK; DUSHEIKO, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019; WHO, 2020).

O Brasil apresenta dados preocupantes relacionados a taxa de detecção de novos casos, cerca de 11,9 a cada 100.000 habitantes. Em relação ao estado do Amazonas as estatísticas são ainda mais alarmantes visto que a capital do estado, Manaus, foi uma das capitais que apresentou uma taxa de detecção superior a nacional, cerca de 12 novos casos a cada 100.000 habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Diante desses dados, é clara a necessidade do desenvolvimento de estratégias que busquem elucidar os mecanismos inflamatórios desenvolvidos durante a infecção, pois, estas visam não apenas evitar a progressão crônica da doença, mas também aprimorar e facilitar seu diagnóstico (MIMMI, S. *et al.*, 2019). Sem dúvida alguma, essa busca por métodos diagnósticos aprimorados e mais acessíveis é de grande relevância, principalmente para o Estado do Amazonas, em detrimento da dificuldade no acesso às regiões mais isoladas e ao difícil deslocamento dos pacientes aos grandes centros de saúde (GARNELO *et al.*, 2016).

Sob essa perspectiva, vários estudos têm sido direcionados à identificação de novos epítomos, altamente específicos a moléculas de interesse, por meio da tecnologia de *Phage Display* (PD) (MIMMI, S. *et al.*, 2019). Neste trabalho a tecnologia de PD foi utilizada para selecionar peptídeos miméticos reativos aos soros de pacientes crônicos, infectados pelo HCV. A seleção se deu a partir da utilização de duas bibliotecas de peptídeos randômicos a de PhD C7C e PhD-12. Dos seis peptídeos miméticos que apresentaram possíveis epítomos relacionados à proteína F do vírus do HCV. O peptídeo E4 parece ser o principal candidato à novos ensaios para diagnóstico da fibrose, para fins de prevenção e tratamento da Hepatite C crônica por apresentar um possível sítio de ligação que interage com a protease antioxidante glutatona S-transferase A3.

Ao se referir a cronicidade da doença sabe-se que a mesma é resultado do acúmulo da matriz extracelular e da cicatrização do tecido hepático em resposta às lesões causadas por um

quadro inflamatório persistente promovido por uma insistente ação imunológica frente ao vírus. (BATALLER; BRENNER, 2005).

Células hepáticas infectadas, células de *Kupffer* ativadas e leucócitos circulantes estão envolvidos nos principais mecanismos que induzem essa cronificação. Quando estimuladas, por meio da ativação de cascatas de sinalização celular, estresse oxidativo, apoptose ou ativação direta da imunidade inata e adaptativa, essas células induzem a produção de citocinas como: o Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α), Interleucinas 1 β (IL-1 β), IL-6 e IL-8, que estimulam a inflamação liberando vários mediadores fibrogênicos, que ativam as células estreladas (HSCs) e os miofibroblastos do fígado (IVANOV *et al.*, 2017).

Os estudos relacionados a proteína F (ARPF) do vírus HCV são pioneiros, apesar de seu papel ainda não estar bem definido, muitos deles já demonstraram seu envolvimento com os vários mecanismos imunológicos, como: sinalização celular, resposta imune inata, resposta humoral e celular (MOHAMADI *et al.*, 2020).

Sabe-se que a ARPF pode atuar na regulação dos genes c-myc e p53 e inibir a apoptose celular. Tais resultados são demonstrados por Wu *et al.* (2007) que afirmam que a ARPF aumenta a transcrição de c-myc e diminui a de p53, o que influencia diretamente na progressão da doença. Attallah *et al.* (2017) confirmam a participação desses genes no desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (CHC). Buscando determinar a expressão de c-myc e de p53 e avaliar sua importância no diagnóstico do CHC eles concluíram que myc e p53 são biomarcadores potenciais e o uso combinados deles pode melhorar a precisão do diagnóstico do carcinoma hepatocelular em pacientes com hepatite C crônica de alto risco (ATTALLAH *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2007).

Em outro estudo Hsin-Chieh *et al.* (2008) mostraram que a ARPF também interage com a proteína de ligação a c-myc (MM-1) responsável por inibir a atividade de transativação do gene c-myc, antagonizando seus efeitos inibitório sobre a transativação do c-myc induzindo o aumentando sua a atividade contribuindo para a formação do CHC por meio do aumento da proliferação celular (HSIN-CHIEH *et al.*, 2008). Também foi demonstrado que ela pode reprimir a p21, proteína que regula a transição da fase G1 para S no ciclo celular, e regula negativamente a proteína adaptadora 1 (AP-1) interrompendo o ciclo celular (BASU *et al.*, 2004; KOTTA-LOIZOU *et al.*, 2013).

observado que a prevalência de anticorpos anti-F foi significativamente maior em pacientes com CHC comparados a pacientes sem CHC. Além disso, houve redução, significativa, da proliferação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), secretoras de IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-5, diminuição dos níveis de IFN- γ e / ou IL-2 e aumento dos níveis de IL-4 e / ou IL-5, demonstrando a que a Proteína F pode enfraquecer a resposta celular e contribuir com a progressão da doença (YUE *et al.*, 2013).

XU e colaboradores (2014) também investigaram a resposta de citocinas frente a proteína F em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e células dendríticas plasmocitoides (PDCs) em pacientes crônicos. Eles observaram uma redução significativa dos níveis de interferon α (IFN- α), secretado por PBMCs, em pacientes positivos para o anticorpo anti- F comparados aos de pacientes negativos para o anticorpo. Além disso foi possível demonstrar o aumento da frequência de PDCs em pacientes negativos comparados a frequência no grupo positivo para o anti-F. Como conclusão eles sugeriram “que a proteína F pode inibir a secreção de IFN- α de PBMC ao regular a produção de IL-10 e pode contribuir para um aumento nas taxas de apoptose em PDCs” (XU *et al.*, 2014). Observe a seguir os processos descritos acima (figura 28).

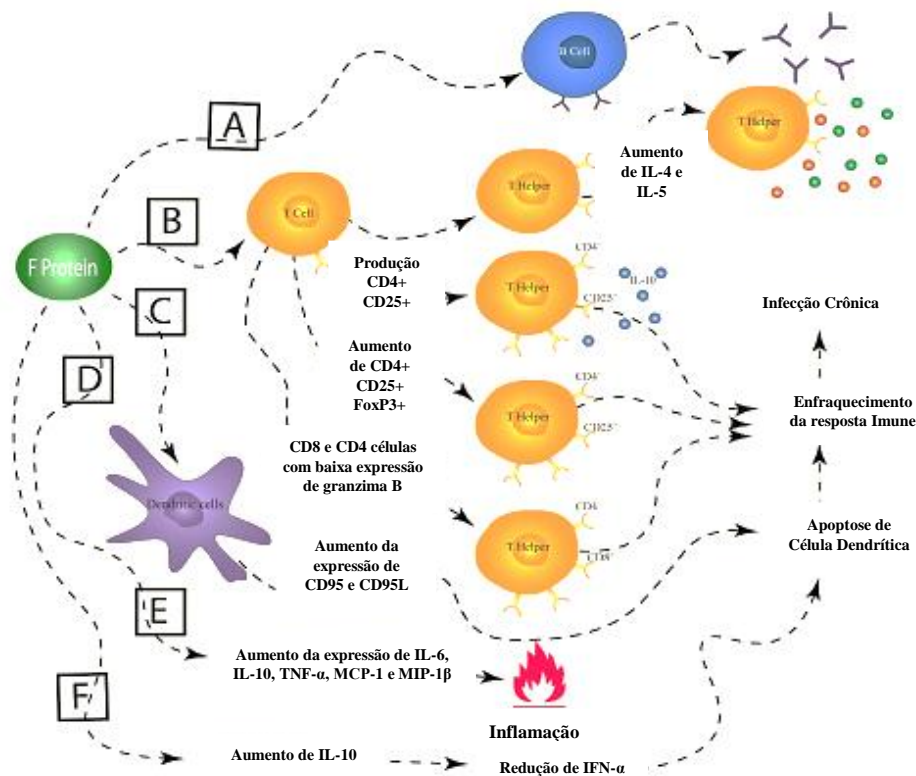


Figura 28: Efeitos da proteína F nas células imunológicas.
Fonte: Adaptado de MOHAMADI *et al.*, 2020.

Esses dados endossaram inúmeros estudos que vem, continuamente, relacionando a ARPF à persistência da infecção e quadros de cronicidade da doença. Ajorloo *et al.* (2015) buscando determinar o papel da ARPF em pacientes cirróticos e não cirróticos observaram a prevalência de anticorpo anti-F em todos os pacientes cirróticos testados, significativamente maior do que em pacientes não cirróticos, corroborando a ideia de associação da proteína F as fases crônicas da doença. Em outro estudo, Kassela *et al.* (2017) demonstraram uma alta prevalência de desses anticorpos em pacientes com cirrose avançada e com HCC (AJORLOO *et al.*, 2015; KASSELLA *et al.*, 2017).

Moustafa *et al.* (2018), com o propósito de obter informações sobre as propriedades funcionais e patológicas da ARPF demonstraram que ela também pode acelerar o ciclo celular pois induz a expressão de ciclina D1, proteína que promove a inativação da proteína supressora de tumor, por meio de sua fosforilação, o leva ao aumento da expressão de vários oncogenes e da carcinogênese hepática (MOUSTAFA *et al.*, 2018).

Recentemente, Musavi e colaboradores (2020), buscaram caracterizar a presença dos anticorpos anti-F em candidatos a transplante de fígado (LTC) e compara-los à pacientes cirróticos mas não LTC, foi possível observar a prevalência de anti-F em todos os pacientes LTC e de 94,3% nos pacientes cirróticos não LTC (MUSAVI *et al.*, 2020).

Desse modo, apesar da função da ARPF ainda não estar bem definida, há evidências de seu envolvimento em processos de respostas imunológicas, como imunomodulação de algumas vias, regulação das respostas relacionadas a fase crônica da doença, produção de anticorpos, entre outros. A alta prevalência de anti-F nos estudos com pacientes crônicos indicam uma forte relação da ARPF com a cronicidade da fibrose hepática desencadeada pelo HCV nos demonstra isso (MOHAMADI *et al.*, 2020).

Em relação a glutathione S-transferase A3, possível ligante do epítipo predito na nossa estrutura tridimensional. Segundo Chen e colaboradores, ela é uma protease antioxidante e pode estar relacionada com à inibição da ativação de células hepáticas estreladas (HSCs) e a fibrogênese por meio da supressão das vias de sinalização da MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) e da GSK-3 (quinase do receptor acoplado à proteína G) e por isso pode representar um alvo promissor para uma potencial intervenção terapêutica em doenças fibróticas do fígado. Essas vias estão relacionadas coma ativação das células estreladas,

estresse oxidativo e a indução da fibrose (BORKHAM-KAMPHORST; WEISKIRCHEN, 2016; XIAO *et al.*, 2016).

Além disso, um dado muito interessante sobre essa enzima é que, em camundongos, ela é expressada em altos níveis tornando-os resistentes às lesões no DNA induzidas pela atividade tóxica da Aflatoxina B1, uma substância tóxica considerada um importante fator de risco para o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular em humanos, inibindo o desenvolvimento de tumor no fígado (ILIC *et al.*, 2010).

Os peptídeos vêm sendo considerados bons alvos para estratégias terapêuticas, planejamento racional de medicamentos e inibição de proteínas, pois, possuem baixa toxicidade e pequenas áreas de interface. Estima-se que cerca de 15% a 40% das interações proteicas são mediadas por eles, participando de uma grande variedade de processos biológicos, tais como: sinalização celular, redes regulatórias, respostas imunológicas e inibição enzimática (MARTINS *et al.*, 2021).

Mais estudos precisam ser realizados para a investigar a possível interação entre a proteína F e a enzima glutathione S-transferase A3 e a outras proteínas envolvidas nos mecanismos de infecção e de defesa do HCV. Podendo sugerir uma função mais precisa da ARPF para a comunidade científica.

Diante dos dados relatados nesse trabalho observa-se que a técnica de *Phage Display* é uma ferramenta valiosa para a descoberta de novos marcadores biológicos contra o HCV. Através dela, foi possível selecionar um mimétopo potencialmente envolvido na cronicidade da Hepatite C de pacientes HCV positivos. A sequência selecionada como mais promissora agora será submetida a ensaios experimentais para verificar seu potencial imunogênico contra imunoglobulinas IgG em soros individuais cronicamente infectados, e assim daremos continuidade na construção de uma estratégia para o desenvolvimento de um diagnóstico focado nas fases crônica da Hepatite C.

7.0 Conclusão

Dos 192 clones selecionados, através da técnica de *Phage Display*, 83 deles apresentaram diferenças significativas entre a reatividade contra IgG em *pool* de soros de pacientes com fibrose hepática grave comparados ao *pool* de soros de pacientes saudáveis.

Foi possível identificar mimetopos de um possível epítopo da proteína F do HCV que pode estar interagindo com enzima glutathione S-transferase A3 (GSTA3), conhecida por inibir o processo fibrogênico em células estreladas do fígado.

O clone E4 foi selecionado como o melhor candidato a ser utilizado em novas plataformas nanobiotecnológicas para fins de diagnóstico da Fibrose Hepática Grave induzida pelo HCV.

Foram selecionados clones com similaridade e cobertura a partir de 80% comparadas às proteínas do HCV já depositadas no banco de dados *GenBank* e podem servir de base para o desenvolvimento de outras linhas de estudo.

8.0 Referências

ABBAS, ABUL K.; LICHTMAN, ANDREW H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro. 2019.

AJORLOO, M. *et al.* Detection of Specific Antibodies to HCV-ARF/CORE+1 Protein in Cirrhotic and Non-Cirrhotic Patients with Hepatitis C: A Possible Association with Progressive Fibrosis. **Archives of Iranian Medicine**, V. 18, n. 5, p. 304–307, May 2015.

ALTER, H. J. *et al.* Detection of Antibody to Hepatitis C Virus in Prospectively Followed Transfusion Recipients with Acute and Chronic Non-A, Non-B Hepatitis. **New England Journal of Medicine**, v. 321, n. 22, p. 1494–1500, 1989.

AMARAL, T. *et al.* Perfil clínico e epidemiológico da Hepatite C em Rio Branco, Acre, Brasil. **Saúde.com**, v. 10, n. 1, p. 64–79, 2013.

ARAÚJO, A. R. *et al.* Caracterização do vírus da hepatite C em pacientes com hepatite crônica: Genótipos no eStado do Amazonas, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 638–640, 2011.

ATTALLAH, A. M. *et al.* Combined use of nuclear phosphoprotein c-Myc and cellular phosphoprotein p53 for hepatocellular carcinoma detection in high-risk chronic hepatitis C patients. **British Journal of Biomedical Science**, v. 74, n. 4, p. 170–175, 2017.

AYDIN, M. M.; AKCALI, K. C. Liver fibrosis. **Turkish Journal of Gastroenterology**, v. 29, n. 1, p. 14–21, 2018.

AMBRISH, Roy; KUCUKURAL, Alper; ZHANG, Yang. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature Protocols**, vol 5, 725-738. 2010.

BAGHBANI-ARANI, F. *et al.* Expression and Characterization of Escherichia coli Derived Hepatitis C Virus ARFP/F Protein¹. v. 46, n. 2, p. 226–235, 2012.

BARBAS, CF.; BURTON, DR.; SCOTT, S. **Phage Display a Laboratory Manual**. 2001.

BARBOSA, K. M. V. *et al.* Hepatite C na década de 1980: resgate de casos das antigas hepatites “não A e não B” de um serviço de hepatologia na Amazônia, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 10, n. 0, p. 1–11, 2019.

BARTOSCH, B.; COSSET, F. L. Cell entry of hepatitis C virus. **Virology**, v. 348, n. 1, p. 1–12, 2006.

BARTOSCH, B.; DUBUISSON, J.; COSSET, F. L. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 5, p. 633–642, 2003.

BASU, A. *et al.* Communication Functional properties of a 16 kDa protein translated from an alternative open reading frame of the core-encoding genomic region of hepatitis C virus. p. 2299–2306, 2004.

BATALLER, R.; BRENNER, D. A. Science in medicine Liver fibrosis. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 2, p. 209–218, 2005.

BERARDIS, S. *et al.* Use of mesenchymal stem cells to treat liver fibrosis: Current situation and future prospects. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 3, p. 742–758, 2015.

BOETTLER, T. *et al.* T Cells with a CD4. **Microbiology**, v. 79, n. 12, p. 7860–7867, 2005.

BORKHAM-KAMPHORST, E.; WEISKIRCHEN, R. The PDGF system and its antagonists in liver fibrosis. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 28, p. 53–61, 2016.

BOULANT, S. *et al.* Unusual Multiple Recoding Events Leading to Alternative Forms of Hepatitis C Virus Core Protein from Genotype 1b. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 46, p. 45785–45792, 2003.

BRASIL, C. Inibidores de protease (Boceprevir e Telaprevir) para o tratamento da hepatite crônica C. Relatório de recomendação da comissão nacional de incorporação de tecnologias no SUS-CONITEC-01. **Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos**, 2016.

BRASIL, M. DA S. S. DE V. EM S. D. DE V. E. **Hepatitis virais; Hepatitis Virais: O BRASIL ESTÁ ATENTO**. 2018.

CATANESE, M. T. *et al.* Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 23, p. 9505–9510, 2013.

CHOO, Q. L. *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, n. 4902, p. 359–362, 1989.

COIMBRA, U. D. E. Infecção pelo vírus da hepatite C – diversidade genética e estudo molecular de mediadores da resposta imune Ana Cristina do Espírito Santo Henriques. 2012.

COLLETTA, C. *et al.* Value of two noninvasive methods to detect progression of fibrosis among HCV carriers with normal aminotransferases. **Hepatology**, v. 42, n. 4, p. 838–845, 2005.

CRUVINEL, WM.; JÚNIOR, DM.; ARAÚJO, JAP.; CATELAN, TTT.; SOUZA, AWS.; SILVA, NP.; ANDRADE, L. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos: Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, p. 434–461, 2010.

DING, Q.; VON SCHAEWEN, M.; PLOSS, A. The impact of hepatitis C virus entry on viral tropism. **Cell Host and Microbe**, v. 16, n. 5, p. 562–568, 2014.

FALA, L. Tanzeum (Albiglutide): A Once-Weekly GLP-1 Receptor Agonist Subcutaneous Injection Approved for the Treatment of Patients with Type 2 Diabetes. **American health & drug benefits**, v. 8, n. Spec Feature, p. 126–12630, 2015.

FARKAS, H; VARGA. Ecallantide is a novel treatment for attacks of hereditary angioedema

due to C1 inhibitor deficiency. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, p. 61, 2011.

FIORUCCI, M. *et al.* Expression of the alternative reading frame protein of Hepatitis C virus induces cytokines involved in hepatic injuries Printed in Great Britain. p. 1149–1162, 2007.

FLINT, M.; MCKEATING, J. A. The role of the hepatitis C virus glycoproteins in infection. **Reviews in Medical Virology**, v. 10, n. 2, p. 101–117, 2000.

GARNELO, L.; BRAGA, A.; SOUSA, L. Health regionalization in Amazonas : progress and challenges. p. 1225–1234, 2016.

GAWLIK, GALLAY. HCV core protein and virus assembly: what we know without structures. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 3, p. 139–148, 2017.

GORDON, S. C. *et al.* Prevalence of cirrhosis in hepatitis c patients in the chronic hepatitis cohort study (CHeCS): A retrospective and prospective observational study. **American Journal of Gastroenterology**, v. 110, n. 8, p. 1169–1177, 2015.

SMITH, G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, n. 4705, p. 1315–1317, 1985.

GRETTON, S. N.; TAYLOR, A. I.; MCLAUCHLAN, J. Mobility of the hepatitis C virus NS4B protein on the endoplasmic reticulum membrane and membrane-associated foci. **Journal of General Virology**, v. 86, n. 5, p. 1415–1421, 2005.

GUPTA, E.; BAJPAI, M.; CHOUDHARY, A. Hepatitis C virus: Screening, diagnosis, and interpretation of laboratory assays. **Asian Journal of Transfusion Science**, v. 8, n. 1, p. 19–25, 2014.

HAMZEH-MIVEHROUD, M. *et al.* Phage display as a technology delivering on the promise of peptide drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 23–24, p. 1144–1157, 2013.

HALLIDAY, J *et al.* Europe PMC Funders Group Vaccination for hepatitis C virus: closing in on an evasive target. **Expert review of vaccines** v. 10, n. 5, p. 659–672 , 2011.

HASHEMPOUR, T. *et al.* F protein increases CD4 + CD25 + T cell population in patients with chronic hepatitis C. **FEMS Pathogens and Disease**. V 73. n 4. p. 1–8, 2015.

HERKER, E.; OTT, M. Emerging role of lipid droplets in host/pathogen interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 4, p. 2280–2287, 2012.

HIROISHI, K. *et al.* Immune response of cytotoxic T lymphocytes and possibility of vaccine development for hepatitis C virus infection. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. 2010.

HIROISHI, K.; ITO, T.; IMAWARI, M. Immune responses in hepatitis C virus infection and mechanisms of hepatitis C virus persistence. **Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)**, v. 23, n. 10, p. 1473–1482, 2008.

HOUGHTON, M. *et al.* Molecular biology of the hepatitis C viruses: Implications for diagnosis, development and control of viral disease. **Hepatology**, v. 14, n. 2, p. 381–388, 1991.

HWANG, S. B. *et al.* Hepatitis C virus NS5B protein is a membrane-associated phosphoprotein with a predominantly perinuclear localization. **Virology**, v. 227, n. 2, p. 439–446, 1997.

IBGE. **TERRITÓRIO E AMBIENTE.** Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/am/manaus/panorama>>.

ILIC, Z. *et al.* Glutathione-S-transferase A3 knockout mice are sensitive to acute cytotoxic and genotoxic effects of aflatoxin B1. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 242, n. 3, p. 241–246, 2010.

IREDALE, J. P.; THOMPSON, A.; HENDERSON, N. C. Extracellular matrix degradation in liver fibrosis: Biochemistry and regulation. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1832, n. 7, p. 876–883, 2013.

IRSHAD, M.; GUPTA, P.; IRSHAD, K. Immunopathogenesis of Liver Injury during Hepatitis C Virus Infection. **Viral Immunology**, v. 32, n. 3, p. 112–120, 2019.

JITTAVISUTTHIKUL, S. *et al.* Human transbodies to HCV NS3/4A protease inhibit viral replication and restore host innate immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. AUG, 2016.

KANWAL, F. *et al.* HCV genotype 3 is associated with an increased risk of cirrhosis and hepatocellular cancer in a national sample of U.S. Veterans with HCV. **Hepatology**, v. 60, n. 1, p. 98–105, 2014.

KASSELA, K. *et al.* High prevalence of antibodies to core+1/ARF protein in HCV-infected patients with advanced cirrhosis. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 7, p. 1713–1719, 2017.

KOTTA-LOIZOU, I. *et al.* Communication Hepatitis C virus core + 1 / ARF protein decreases hepcidin transcription through an AP1 binding site. p. 1528–1534, 2013.

LANGE, C. M. *et al.* Emerging therapies for the treatment of hepatitis C. **EMBO Molecular Medicine**, v. 6, n. 1, p. 4–15, 2014.

LAUER; WALKER. HEPATITIS C VIRUS INFECTION. **N Engl J Med**, v. 345, n. 1, p. 41–52, 2001.

LAW, M. *et al.* Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. **Nature Medicine**, v. 14, n. 1, p. 25–27, 2008.

LIMA, M. *et al.* Perfil Clínico-Epidemiológico Das Doenças Gastroenterologia Do Unifeso Clinical and Epidemiological Profile of Chronic Liver Diseases. **Revista Caderno de Medicina**, v. 1, p. 142–156, 2018.

LIN, H. M. Æ. T. *et al.* Hepatitis C virus ARFP / F protein interacts with cellular MM-1 protein and enhances the gene trans-activation activity of c-Myc. p. 417–425, 2008.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. **Nature**, v. 436, n. 7053, p. 933–938, 2005.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 688–700, 2013.

MARTÍNEZ-ESPARZA, M. *et al.* 2015 Advances in Cirrhosis Inflammatory status in human hepatic cirrhosis. v. 21, n. 41, p. 11522–11541, 2015.

MARTINS, P. M. *et al.* Propedia: a database for protein–peptide identification based on a hybrid clustering algorithm. **BMC Bioinformatics**, v. 22, n. 1, p. 1–20, 2021.

MESSINA, J. P. *et al.* Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, v. 61, n. 1, p. 77–87, 2015.

MIMMI, S. *et al.* Phage Display: An Overview in Context to Drug Discovery. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 40, n. 2, p. 87–91, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite C e coinfeções. Brasília. Programa Nacional de DST/Aids. 2018. **Ministério da Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais**, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico – Hepatites Virais. **Secretaria de Vigilância em Saúde – Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis (DCCI)**, v. n°1, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Diagnóstico das hepatites virais. **Ministério da Saúde**, v. 2, 2018.

MOHAMADI, M. *et al.* Hepatitis C virus alternative reading frame protein (ARFP): Production, features, and pathogenesis. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 12, p. 2930–2937, 2020.

MORADPOUR, D.; PENIN, F.; RICE, C. M. Replication of hepatitis C virus. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 453–463, 2007.

MOROZOV, V. A.; LAGAYE, S. Hepatitis C virus: Morphogenesis, infection and therapy. **World Journal of Hepatology**, v. 10, n. 2, p. 186–212, 2018.

MOUSTAFA, S.; KARAKASILLOTIS, I.; MAVROMARA, P. Hepatitis C Virus core+1/ARF Protein Modulates the Cyclin D1/pRb Pathway and Promotes Carcinogenesis. **Journal of Virology**, v. 92, n. 9, 2018.

MUSAVI, Z. *et al.* Antibody Development to HCV Alternate Reading Frame Protein in Liver Transplant Candidate and its Computational Analysis. **Current Proteomics**, v. 17, n. 2, p. 154–170, 2019.

NAKA, K. *et al.* Hepatitis C virus NS5B delays cell cycle progression by inducing interferon- β via Toll-like receptor 3 signaling pathway without replicating viral genomes. **Virology**, v.

346, n. 2, p. 348–362, 2006.

NEW ENGLAND BIOLABS (NEB). Protein Tools: Ph.D. Phage Display Libraries Instruction Manual. Ipswich: New England Biolabs, 2017.

OMIDFAR, K.; DANESHPOUR, M. Advances in phage display technology for drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 10, n. 6, p. 651–669, 2015.

PACIELLO, R. *et al.* Novel human anti-claudin 1 mAbs inhibit hepatitis C virus infection and may synergize with anti-SRB1 mAb. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 1, p. 82–94, 2016.

PELLERIN, M. *et al.* Hepatitis C Virus Quasispecies Variability Modulates Nonstructural Protein 5A Transcriptional Activation, Pointing to Cellular Compartmentalization of Virus-Host Interactions. **Journal of Virology**, v. 78, n. 9, p. 4617–4627, 2004.

PENIN, F. *et al.* Conservation of the Conformation and Positive Charges of Hepatitis C Virus E2 Envelope Glycoprotein Hypervariable Region 1 Points to a Role in Cell Attachment. **Journal of Virology**, v. 75, n. 12, p. 5703–5710, 2001.

PLOSS, M.; KUHN, A. Kinetics of filamentous phage assembly. **Physical Biology**, v. 7, n. 4, 2010.

PUNTORIERO, G. *et al.* Towards a solution for hepatitis C virus hypervariability: Mimotopes of the hypervariable region 1 can induce antibodies cross-reacting with a large number of viral variants. **EMBO Journal**, v. 17, n. 13, p. 3521–3533, 1998.

PUOTI, C. *et al.* HCV carriers with normal alanine aminotransferase levels: Healthy persons or severely ill patients?. Dealing with an everyday clinical problem. **European Journal of Internal Medicine**, v. 21, n. 2, p. 57–61, 2010.

RAKONJAC, J. *et al.* Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications. **Current issues in molecular biology**, v. 13, n. 2, p. 51–76, 2011.

REHERMANN, B. Natural Killer Cells in Viral Hepatitis. **Cmgh**, v. 1, n. 6, p. 578–588, 2015.

RODERFELD, M. Matrix metalloproteinase functions in hepatic injury and fibrosis. **Matrix Biology**, v. 68–69, p. 452–462, 2018.

SAEED, U.; WAHEED, Y.; ASHRAF, M. Hepatitis B and hepatitis C viruses: A review of viral genomes, viral induced host immune responses, genotypic distributions and worldwide epidemiology. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. 2, p. 88–96, 2014.

SALAS-VILLALOBOS, T. B. *et al.* Mechanisms involved in liver damage resolution after hepatitis C virus clearance. *Medicina Universitaria*, v. 19, n. 75, p. 100–107, 2017.

SANTOLINI. Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. **Journal of virology**, v. 68, n. 6, p. 3631–41, 1994.

SEBASTIANI, G.; GKOUVATSOS, K.; PANTOPOULOS, K. Chronic hepatitis C and liver fibrosis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 32, p. 11033–11053, 2014.

SEKI, E.; BRENNER, D. A. Recent advancement of molecular mechanisms of liver fibrosis. 2015.

SHAO, S. W. *et al.* Hepatitis C virus F protein inhibits cell apoptosis by activation of intracellular NF- κ B pathway. **Hepatology Research**, v. 39, n. 3, p. 282–289, 2009.

SHARMA, S. A.; FELD, J. J. Acute hepatitis C: Management in the rapidly evolving world of HCV. **Current Gastroenterology Reports**, v. 16, n. 2, 2014.

SILVA. Hepatites virais: B, C e D: atualização. **Rev Bras Clin Med. São Paulo**, v. 3, n. 10, p. 206–218, 2012.

SMITH, D. B. *et al.* Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and genotype assignment web resource. **Hepatology**, v. 59, n. 1, p. 318–327, 2014.

SMITH, D. B. *et al.* Proposed update to the taxonomy of the genera Hepacivirus and Pegivirus within the Flaviviridae family. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 11, p. 2894–2907, 2016.

SMITH, G. P.; PETRENKO, V. A. Phage display. **Chemical Reviews**, v. 97, n. 2, p. 391–410, 1997.

STAPLEFORD, K. A.; LINDENBACH, B. D. Hepatitis C Virus NS2 Coordinates Virus Particle Assembly through Physical Interactions with the E1-E2 Glycoprotein and NS3-NS4A Enzyme Complexes. **Journal of Virology**, v. 85, n. 4, p. 1706–1717, 2011.

SUZUKI, R. *et al.* Molecular Determinants for Subcellular Localization of Hepatitis C Virus Core Protein. **Journal of Virology**, v. 79, n. 2, p. 1271–1281, 2005.

TARRAGÔ, A. M. *et al.* Sofosbuvir and daclatasvir combination therapy for current hepatitis C virus genotype 4 achieves SVR: A case report of HCV genotype 4 from the Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 6, p. 861–863, 2017.

TOLEDO-MACHADO, C. M. *et al.* Use of Phage Display technology in development of canine visceral leishmaniasis vaccine using synthetic peptide trapped in sphingomyelin/cholesterol liposomes. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2015.

VASSILAKI, N. *et al.* Two Alternative Translation Mechanisms Are Responsible for the Expression of the HCV ARFP / F / Core+1 Coding Open Reading Frame. v. 278, n. 42, p. 40503–40513, 2003.

VIEYRES, G. *et al.* Characterization of the Envelope Glycoproteins Associated with Infectious Hepatitis C Virus. **Journal of Virology**, v. 84, n. 19, p. 10159–10168, 2010.

WALEWSKI, J. L. *et al.* Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an

overlapping reading frame. **Rna**, v. 7, n. 5, p. 710–721, 2001.

WESTBROOK, R. H.; DUSHEIKO, G. Natural history of hepatitis C. **Journal of Hepatology**, v. 61, n. 1, p. S58–S68, 2014.

WHO. Guidelines For The Screening, Care And Treatment Of Persons With Hepatitis Infection. 2014.

WONG, G. L.-H. Update of liver fibrosis and steatosis with transient elastography (Fibroscan). **Gastroenterology Report**, v. 1, n. 1, p. 19–26, 2013.

WU, W. BIN *et al.* Hepatitis C virus F protein up-regulates c-myc and down-regulates p53 in human hepatoma HepG2 cells. **Intervirology**, v. 50, n. 5, p. 341–346, 2007.

XIAO, Y. *et al.* GSTA3 attenuates renal interstitial fibrosis by inhibiting TGF-beta-induced tubular epithelial-mesenchymal transition and fibronectin expression. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. 1–15, 2016.

XU, X. *et al.* Hepatitis C virus alternate reading frame protein decreases interferon - α secretion in peripheral blood mononuclear cells. p. 730–736, 2014.

XU, Z. *et al.* Hepatitis C Virus F Protein Is a Short-Lived Protein Associated with the Endoplasmic Reticulum. v. 77, n. 2, p. 1578–1583, 2003.

ZHANG, Yang. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, 9:40. 2008.

YUE, M. *et al.* Th1 and Th2 cytokine profiles induced by hepatitis C virus F protein in peripheral blood mononuclear cells from chronic hepatitis C patients. v. 152, p. 89–95, 2013.