



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO - PROPESP
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

**IMUNODIAGNÓSTICO COM BEADS SINGLE E MULTIPLEX PARA DETECÇÃO
DE ANTICORPOS CONTRA AS PROTEÍNAS RECOMBINANTES CORE, NS3,
NS4B E NS5A DO VÍRUS DA HEPATITE C**

WALTER LUIZ LIMA NEVES

MANAUS – AMAZONAS

2020

WALTER LUIZ LIMA NEVES

**IMUNODIAGNÓSTICO COM BEADS SINGLE E MULTIPLEX PARA DETECÇÃO
DE ANTICORPOS CONTRA AS PROTEÍNAS RECOMBINANTES CORE, Ns3, Ns4B
E Ns5A DO VÍRUS DA HEPATITE C**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como parte de pré-requisito para defesa da tese e obtenção do título de Doutorado.

Orientadora: Dra. Adriana Malheiro Alle Marie

Coorientador: Dr. Luís André Morais Mariúba

MANAUS – AMAZONAS

2020

Ficha Catalográfica

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

N518i Neves, Walter Luiz Lima
Imunodiagnóstico com beads single e multiplex para detecção de anticorpos contra as proteínas recombinantes Core, Ns3, Ns4b e Ns5a do vírus da hepatite C / Walter Luiz Lima Neves . 2020
110 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Adriana Malheiro Alle Marie
Coorientador: Luis André Morais Mariúba
Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Proteínas Recombinantes. 2. Hepatite C. 3. Citometria de fluxo.
4. Beads. I. Marie, Adriana Malheiro Alle. II. Universidade Federal
do Amazonas III. Título

WALTER LUIZ LIMA NEVES

**IMUNODIAGNÓSTICO COM BEADS SINGLE E MULTIPLEX PARA DETECÇÃO
DE ANTICORPOS CONTRA AS PROTEÍNAS RECOMBINANTES CORE, Ns3, Ns4B
E Ns5A DO VÍRUS DA HEPATITE C**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como parte de pré-requisito para defesa da tese e obtenção do título de Doutorado.

APROVADO EM : ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Adriana Malheiro Alle Marie, Presidente
Universidade Federal do Amazonas

Prof^a. Dr^a. Aya Sadahiro
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Helber Abellini Astolpho
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Marcos César Fernandes Pessoa
Universidade Federal do Amazonas

Prof.^a. Kátia Luz Torres Silva
Fundação de Centro de Controle de oncologia do estado do Amazonas

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por me abençoar todos os dias, por me amar incondicionalmente, por nunca me abandonar nos momentos difíceis. Agradeço a Deus por me ter deixado chegar até esse momento.

À minha mãe – avó **Terezinha de Jesus Auzier e Lima**, que recentemente Deus a levou para que ela ficasse ao seu lado na época da defesa do meu mestrado, agradeço por todo amor que você me deu, por toda criação, por todos os ensinamentos, por proporcionar a melhor educação e formação para minha vida e sei que você estará sempre cuidando de mim e de toda a família como sempre fez. Te amo muito.

À minha mãe guerreira **Ana Maria Auzier e Lima**, por todo amor, por ser meu porto seguro e por me apoiar nessa difícil caminhada. Agradeço a Deus por ter a senhora na minha vida e peço sempre que a abençoe com muita saúde. Te amo muito.

Á meu pai guerreiro, homem de ferro **Luiz Ramos Neves**, agradeço a Deus por você estar aqui nesse momento especial, nos deu um susto, por complicações por causa da Covid-19 e teve que colocar um marca-passo, mas Deus cuidou de você e vamos ficar muitos anos juntos. Te amo.

Aos meus irmãos **Josué Ricardo, Leon Neves, Luciano Neves e Luiz Neves Jr**, por todo apoio, incentivo e torcida.

Aos meus sobrinhos **Daniela Fernanda e Luiz Felipe**, por todo amor e compreensão e pela companhia às vezes nas madrugadas de estudo. Amo vocês.

A toda minha **família**, pela compreensão de que por muitas vezes fiquei ausente e por todo confiança depositada em mim.

A minha orientadora **Adriana Malheiro**, pela confiança em mim depositada, pelas oportunidades e ensinamentos, por contribuir no meu crescimento. Lembro como se fosse hoje, no dia que ela entrou na sala de aula com a coordenadora do curso de biomedicina para falar que iria abrir vaga para ser aluno de iniciação científica, e lá se vão mais de 10 anos. Agradeço

muito a Deus por colocar pessoas maravilhosas como você na minha vida, que sempre fez questão de compartilhar e fazer de tudo para seus alunos cresçam em conhecimento, no trabalho em grupo e na vida. **MUITO OBRIGADO!!!**

Ao meu coorientador **Luiz André Moraes Mariúba**. Lembro quando meu projeto de mestrado precisaria produzir as proteínas recombinantes e tive que ir para FIOCRUZ, e teria que aprender tudo com o Dr. Luis André Moraes Mariúba ou mais conhecido como Dr. André Mariúba, e desde que cheguei lá, eu vejo um cara super amigo de todos, super inteligente, que não mede esforços para resolver os problemas dos projetos de todos. Obrigado meu amigo por tudo e sempre lhe agradeço sempre quando tenho oportunidade. Muito obrigado por me ajudar nessa difícil caminhada, por não deixa desanimar nas várias dificuldades que aconteceram durante o projeto, por todos os ensinamentos, paciência, apoio e amizade.

A toda minha família da minha segunda casa NAEP-Hemoam, **Allyson Guimarães, Andrea Tarragô, João Paulo Pimentel, Nadja Garcia, Pedro, Grenda, Priscila, Kerolaine e todos do grupo** por todo o apoio, ajuda e confiança no meu trabalho, e pela solidariedade nos momentos difíceis e pelos momentos de descontração.

A todos os meus amigos da FIOCRUZ – AM, **Alessandra, Adélia, André Corado, Sebastião, Daniele, Edilene, Elisangela, Fernanda, Késsia, Juliane, Yuri, George, Victor, Paula Taquita, Diogo, Tulio, Marla, Val**, por todo apoio, pela ajuda nos momentos de sufoco e pelos momentos de descontração.

A todos nossos **professores** do PPGIBA, por passarem todos seus conhecimentos contribuindo para nossa formação. Em especial quero agradecer a professora Aya Sadahiro, por além de sempre passar seu conhecimento, tratou-me com muita amizade e carinho. Lembro quando eu sofri um acidente sério de carro, indo entregar minha dissertação de mestrado, e só fiquei calmo e fui levado de ambulância depois que o professor Mauricio (seu esposo) apareceu, pois, a professora desconfiou que poderia ser algo sério. E desde daquele dia me ligou várias vezes preocupada para saber como estava minha recuperação. Então, professora Aya muito obrigado por tudo.

A todos **meus Amigos** que são meus irmãos de mais 20 anos de amizade e irmandade e que Deus nos abençoe com mais 100 anos juntos.

Ao **Programa de Pós-graduação em imunologia Básica e aplicada** e a todos os seus integrantes, pela ajuda, pela oportunidade de capacitação, qualificação profissional e concretização deste trabalho.

Ao **Instituto Leônidas e Maria Deane- ILMD/FIOCRUZ – AM** por proporcionar a realização deste projeto de pesquisa.

À **Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM)** por todo o apoio para realização de experimentos.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Amazonas (FAPEAM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela bolsa de doutorado e auxílio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste sonho.

Senhor Jesus Cristo, dissestes aos vossos apóstolos: eu vos deixo a paz, eu vos dou a minha paz. Não olheis os nossos pecados, mas a fé que anima vossa Igreja; dai-lhe, segundo o vosso desejo, a paz e a unidade. Vós, que sois Deus, com o Pai e o Espírito Santo.

Amém

RESUMO

Introdução: As infecções hepáticas causadas por vírus estão entre as mais graves, com prevalência no mundo todo. O diagnóstico do HCV é feito por teste sorológicos para triagem e testes moleculares confirmatórios. Apesar dos testes diagnósticos utilizados atualmente apresentarem níveis elevados de sensibilidade e especificidade, ainda apresentam resultados falsos-negativos e positivos, além de apresentarem uma jornada de trabalho longa. **Objetivo:** Desenvolver um método single e multiplex para detecção de anticorpos contra as proteínas recombinantes CORE, Ns3, Ns4b e Ns5a do vírus da hepatite C, acopladas a microbeads funcionalizadas. **Material e Métodos:** As proteínas recombinantes do HCV CORE, Ns3, Ns4b e Ns5a foram expressas em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS e purificadas por Ni-NTA. Para realização dos ensaios *single* e *multiplex* as proteínas foram acopladas a beads magnéticas carboxiladas. Foram utilizadas 30 amostras de soros HCV⁺ e 30 amostras de soros controles, para análise do reconhecimento de anticorpos contra as proteínas acopladas às beads, pelo método da citometria de fluxo. **Resultados e conclusão:** As proteínas recombinantes CORE, Ns3, Ns4b, Ns5a N-terminal e Ns5a C-terminal foram expressas com sucesso em hospedeiro *E.coli* e recuperadas na porção solúvel do extrato bacteriano utilizando coluna de níquel. As proteínas recombinantes acopladas em beads magnéticas foram imunorreativas para os soros de pacientes com hepatite C crônica, com alta sensibilidade e especificidade. O ensaio multiplex melhorou a sensibilidade e especificidade dos testes em comparação com os ensaios individuais.

Palavras-chave: Proteínas recombinantes, hepatite C, beads, citometria de fluxo.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 GENÓTIPOS E SUBTIPOS DO VÍRUS DA HEPATITE C.....	23
FIGURA 2 DISTRIBUIÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DOS GENÓTIPOS DO VÍRUS DA HEPATITE C NO MUNDO.....	24
FIGURA 3 DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DO VÍRUS DA HEPATITE C NOS DIFERENTES ESTADOS DO BRASIL. APRESENTA O NÚMERO ABSOLUTO DE CADA GENÓTIPO ENCONTRADO NA REGIÃO.	25
FIGURA 4 ESTRUTURA DO VIRION HCV	26
FIGURA 5 ORGANIZAÇÃO DO GENOMA DO VÍRUS DA HEPATITE C. AS PEPTIDASES DE SINAL DO HOSPEDEIRO CLIVAM AS PROTEÍNAS DO CORE, DO ENVELOPE E P7. AS PROTEÍNAS NÃO ESTRUTURAS SÃO PROCESSADAS POR PROTEASES VIRAIS.	29
FIGURA 6 CICLO DE REPLICAÇÃO.....	31
FIGURA 7 AÇÃO DOS ANTIVIRAIS DE AÇÃO DIRETA FONTE: (AHMED; FELMLEE, 2015) .	36

LISTA DE ABREVIATURAS

µl	Micro litro
aa	Aminoácido
Ag	Antígeno
ALT	Alanina aminotransferase
APS	persulfato de amônia
AST	Aspartato aminotransferase
Bcl2	<i>B – cell lymphoma 2</i>
bDNA	<i>branched DNA</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
C- Terminal	Carboxi-terminal
CD25	<i>Cluster differentiation 25</i>
CD4	<i>Cluster differentiation 4</i>
CD40	<i>Cluster differentiation 40</i>
CD8	<i>Cluster differentiation 8</i>
CD80	<i>Cluster differentiation 80</i>
CD81	<i>Cluster differentiation 81</i>
CD86	<i>Cluster differentiation 86</i>
CLDN	Claudina
CTLs	Células T citotóxicas
CXCL-8	chemokine ligand 8
DAA	antivirais de ação direta
DC	Células Dendriticas
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E1	Proteína do envelope 1
E2	Proteína do envelope 2
EDAC	Cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EIA	Imunoensaio enzimático
ELISA	<i>Enzyme Linked Immune Sorbent Assay</i>
FDA	<i>Food and Drug administration</i>
FHEMOAM	Fundação hospitalar de hematologia e hemoterapia do Amazonas

FITC	isotiocianatonato de fluoresceína
FMT-HVD	Fundação de Medicina Tropical – Heitor Vieira Dourado
Foxp3	<i>Forkhead Box P3</i>
GAGs	Glicosaminoglicanos
H₂O	<i>Água</i>
HBsAg	antígeno de superfície da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Antígeno leucocitário humano
HLA I	Antígeno leucocitário humano I
HLA II	Antígeno leucocitário humano II
HTLV	vírus T-linfotrópico humano
HVR1	Região hipervariável 1
HVR2	Região hipervariável 2
IFN	Interferon
IFN-β	Interferon beta
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
ILMD	Instituto Leônidas e Maria Deane
IMAC	Cromatografia de Afinidade com Metal Imobilizado
IRF	fator regulador de interferon
IRF- 3	Fator regulador de interferon- 3
ISDR	Região determinante de sensibilidade ao interferon
ISG	Genes estimuladores de Interferon
JAK	<i>Janus Kinase</i>
kDa	Kilodalton
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-R	Receptor de lipoproteína de baixa densidade

M	Molar
MFI	<i>median fluorescence intensity</i>
MgBs	<i>Magnetic beads</i>
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
ml	Mililitro
mM	Mili molar
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
NaCl	<i>Cloreto de sódio</i>
NAT	Teste de amplificação de ácido nucleico
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NK	<i>Natural killer</i>
NKT	<i>Natural killer T</i>
NLR	<i>Nod-like receptors</i>
NPV	Negative predictive value
NS	Não estrutural
NS1	Proteína não estrutural 1
NS2	Proteína não estrutural 2
NS3	Proteína não estrutural 3
NS4a	Proteína não estrutural 4 ^a
NS4b	Proteína não estrutural 4b
NS5a	Proteína não estrutural 5 ^a
NS5b	Proteína não estrutural 5b
N-terminal	Amino terminal
OCLN	Ocludina
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PBS-W	<i>Phosphate Buffered Saline wash</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PD-1	<i>Programmed Death 1</i>
PMSF	<i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
PPV	positive predictive value
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão

PVDF	<i>polyvinylidene difluoride</i>
qRT-PCR	<i>Real-time reverse transcription-PCR</i>
RCF	Força Centrífuga Relativa
RE	Retículo endoplasmático
RIBA	Ensaio immunoblot recombinante
RIG – I	Gene indutível pelo ácido retinóico I
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	dodecil sulfato de sódio
SOCS	Supressores da sinalização da citocina
SR-BI	<i>Receptor scavenger B tipo I</i>
STAT	Transdutores de sinais e ativadores da transcrição
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- β	Fator de crescimento transformador – beta
T_H	Células T helper
TLR	Receptor do tipo toll
TMA	transcription-mediated amplification
TNF- α	Fator de necrose tumoral- alfa
Treg	Célula T regulatória
TRIF	domínio contendo adaptadores de indução do interferon- β
TRIS	<i>Hydroxymethyl aminomethane</i>
U.V	Ultravioleta
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
VDRL	<i>Venereal Disease Research Laboratory</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	20
2 EPIDEMIOLOGIA	22
3 VÍRUS DA HEPATITE C (HCV)	25
4 TRANSMISSÃO	29
5 IMUNOPATOGÊNESE	31
5.1 Entrada do HCV nas células hospedeiras	31
5.2 Resposta imune inata e adaptativa.....	32
6 TRATAMENTO	35
7 OBJETIVOS	38
7.1 Objetivo Geral.....	38
7.2 Objetivos Específicos	38
8 MATERIAL E METODOS	40
8.1 Fluxograma de atividades	40
8.2 Tipo de Estudo	41
8.3 Área de estudo.....	41
8.4 População de estudo	41
8.5 Critérios de inclusão, não-inclusão e exclusão.....	41
8.6 Conservação das Amostras	42
8.7 Aspectos éticos.....	42
8.8 Produção das proteínas recombinantes	42
8.9 Autoindução das proteínas recombinantes.....	43
8.10 Purificação das proteínas recombinantes	43
8.11 Análise da Expressão das Proteínas.....	44
8.12 <i>Western blotting</i>	45
8.13 Acoplamento das proteínas recombinantes do HCV às nanopartículas magnéticas (<i>Beads</i>).....	45
8.14 Padronização de testes imunodiagnóstico para detecção de anticorpos anti-HCV por citometria de fluxo.....	46
8.16 Análises estatísticas	47
Capítulo 1	50
ABSTRACT	50
INTRODUCTION	51
DIAGNOSTIC	52
IMMUNOASSAYS	52
FIRST-GENERATION ASSAYS	52

SECOND-GENERATION ASSAYS.....	53
MOLECULAR TESTS AND GENOTYPING.....	55
OTHER IMMUNOASSAYS USED FOR HCV DIAGNOSIS.....	56
CONCLUSION	58
REFERENCES	59
Capítulo 2.....	64
Introduction	65
Subjects and methods	66
Recombinant protein expression and purification.....	66
Magnetic beads preparation.....	67
Ethics approval and consent to participate	67
Sample collection.....	67
Flow cytometry antibody detection using magnetic beads.....	68
Data analysis	68
Results and discussion.....	69
HCV genotype type 1 presented high prevalence	69
Recombinant proteins were successfully obtained from soluble <i>E. coli</i> fraction.....	70
<i>E. coli</i> lysate reduces non-specific reactivity in magnetic bead assay.....	70
Magnetic bead assay specifically detect HCV positive samples	71
Conclusions	74
Ethics approval and consent to participate	74
Funding:	74
Conflicts of interest	74
References	74
Capítulo 3.....	79
Introdução.....	80
Métodos	81
Expressão e purificação das proteínas recombinantes	81
Acoplamento das proteínas recombinantes em <i>beads</i> magnéticas.....	82
Aprovação ética.....	83
Amostras.....	83
Deteção de anticorpos por citometria de fluxo usando <i>Beads</i> magnéticas	83
Análise de dados.....	84
Resultados e discussão	84

Conclusão	90
Referências	90
9 DISCUSSÃO	94
CONCLUSÃO	97
REFERÊNCIAS	99

Introdução

INTRODUÇÃO

As infecções hepáticas causadas pelos vírus das Hepatites estão entre as mais graves, com altas prevalências, no mundo todo (CDC, 2015). Contudo, somente os vírus da Hepatite B, C e D são causadores de hepatites que podem evoluir para doenças graves do fígado ocasionando quadros de cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (SILVA et al., 2012).

A infecção causada pelo vírus da hepatite C (HCV) é um grave problema de saúde pública, causando uma mortalidade que chega a aproximadamente 399.000 mortes por ano. Na maioria das vezes o vírus ocasiona infecção assintomática aumentando o risco de evolução para uma infecção crônica e o desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular. Aproximadamente 60 a 80% dos casos de infecções pelo HCV levam à infecção crônica e 15 a 30% desses pacientes apresentam doenças hepáticas graves (WHO, 2018). O processo de cronicidade da doença é observado após o hospedeiro não desenvolver uma resposta virológica sustentada devido aos mecanismos de escape viral. Estes mecanismos interferem diretamente nas respostas imune tanto inata quanto adaptativa, impedindo as vias de sinalização e produção de citocinas antivirais (ASHFAQ et al., 2011).

Segundo as diretrizes da organização mundial de saúde (2016), o diagnóstico da infecção do HCV é feito por testes sorológicos e molecular. Os testes sorológicos de triagem, que detectam anticorpos anti-HCV contra as proteínas do vírus e os testes de ácidos nucleicos (NAT). Testes moleculares confirmatórios, que detectam o ácido ribonucleico (RNA) viral do vírus da hepatite C. O teste sorológico imunoensaio enzimático (EIA) comumente usados na rotina laboratorial para detecção de anticorpos anti-HCV em soro e plasma de pacientes apresentam alta sensibilidade e especificidade (ALBORINO et al., 2011). Contudo, os testes sorológicos necessitam de testes confirmatórios como o NAT, pois apresentam resultados falsos-positivos e falsos-negativos. Além disso, os testes sorológicos demandam uma longa rotina de trabalho, (CDC, 2013).

Dessa forma, no presente trabalho teve-se como objetivo desenvolver um método Imunodiagnóstico para detecção de anticorpos contra as proteínas recombinantes antigênicas CORE , Ns3, Ns4b, Ns5a N-terminal e Ns5a C-terminal do vírus da hepatite C, acopladas a *beads* funcionalizadas, em imunoensaios *single* e *multiplex* como uma alternativa de teste para o rastreamento da infecção, de sensibilidade e especificidade confiáveis.

Revisão Bibliográfica

2 EPIDEMIOLOGIA

A Hepatite C é um grave problema de saúde pública em todo mundo, acometendo com infecção crônica cerca de 71 milhões de pessoas, ou seja, 1% da população mundial. A mortalidade por ano de pessoas acometidas com a infecção crônica pelo HCV, chega a aproximadamente 399.000, sendo causadas por doenças graves no fígado, como cirrose e carcinoma hepatocelular, (WHO, 2018).

A infecção crônica causada pelo vírus da hepatite C tem sido uma das principais causas do desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. Cerca de 80% dos infectados apresentam um infecção aguda assintomática e vão evoluir para infecção crônica, destes 10 a 20% vão evoluir para complicações graves do fígado, evoluindo para cirrose, 1 a 5% dos infectados crônicos com HCV após 20 a 30 anos de infecção, desenvolvem carcinoma hepatocelular (LAVANCHY, 2011; ZALTRON et al., 2012).

A prevalência da infecção pelo HCV apresenta uma grande variação entre os continentes e países, divididos em grupos de baixa prevalência (< 2,5%), onde estão América do Norte, Europa, Austrália e extremo Oriente. O grupo de países com intermediária prevalência (2,5% a 10%), no qual estão presentes alguns países do mediterrâneo, América do Sul, África e Oriente Médio e grupo de países com elevada prevalência do HCV (> 10%), onde estão presentes Egito, Burundi, Gabão, Camarões, Ruanda, Guiné, Bolívia e Mongólia (ZALTRON et al., 2012).

A distribuição da doença na América Latina e Central apresenta prevalência com taxas que variam de 1,2% a 1,6%. O Brasil apresenta a maior prevalência entre os países da América Latina e Central, apresentando uma prevalência de 1,6%, Argentina e Venezuela apresentam prevalência de 1,5%, seguido por México com 1,4% e Peru com 1,2% (PETRUZZIELLO et al., 2016).

Aproximadamente 13,3 casos são confirmados para o HCV a cada 100 mil habitantes no Brasil. Entre os anos de 1999 a 2016 foram notificados no Brasil 319.751, que foram reagentes para os marcadores anti-HCV ou HCV-RNA. A distribuição por região dos casos reagentes para os marcadores anti-HCV e HCV-RNA mostrou que 64,1% dos casos ocorreram na região Sudeste, 24,5% no Sul, 5,5% no Nordeste, 3,3% no Centro-Oeste e 2,5% no Norte (BRASIL, 2017).

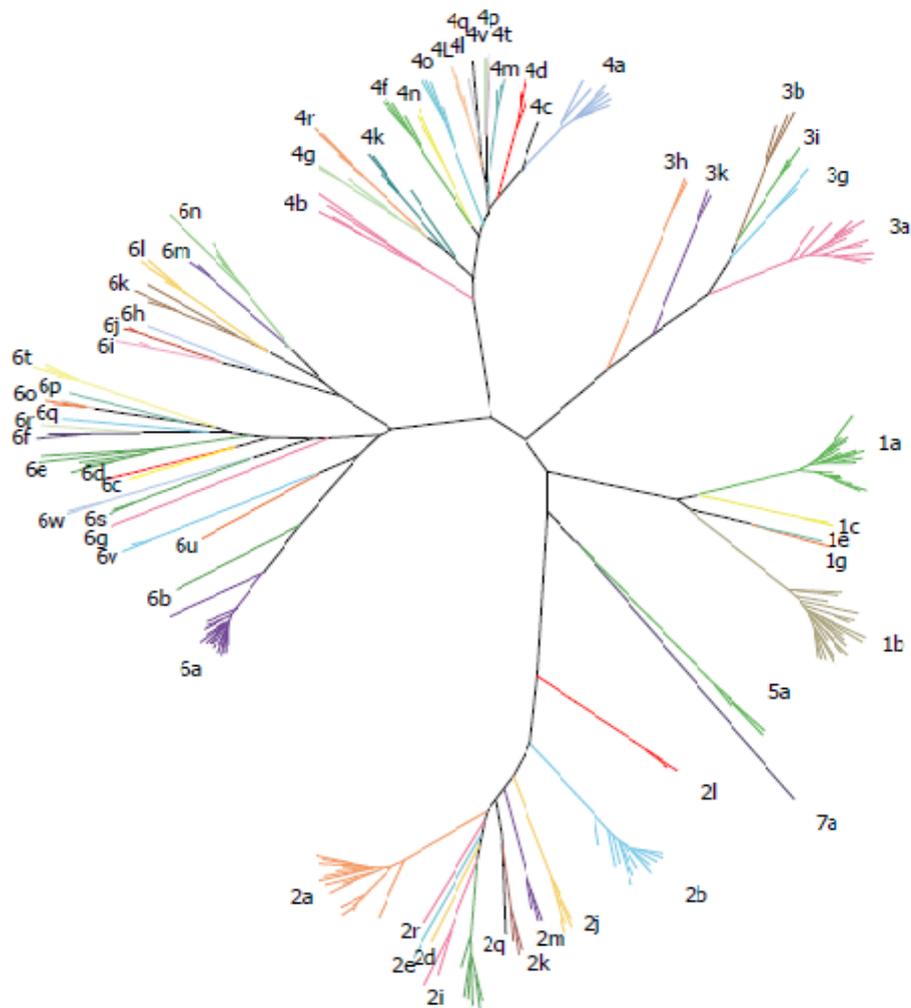
A prevalência do HCV na Região Amazônica do Brasil em doadores de sangue exibem uma variação entre as regiões, as maiores taxas observadas foram nos estados do Acre (5,9%),

Pará (2%) e do Amazonas (0,8(ARAÚJO et al., 2011; FERRAZ DA FONSECA; MELO BRASIL, 2004; OLIVEIRA-FILHO et al., 2010).

O HCV é dividido em 7 genótipos e mais de 100 subtipos. Os genótipos apresentam 30% de diferença nas sequências de nucleotídeos, e entre as espécies similares apresentam 20% de diferença de nucleotídeos (HABIBOLLAHI et al., 2009; SIMMONDS et al., 2005).

A variabilidade do genoma do HCV está relacionada principalmente pela baixa capacidade de correção feita pela RNA-polimerase do vírus durante o processo de replicação viral, ocasionando elevado número de mutações (DUFFY; SHACKELTON; HOLMES, 2008).

Figura 1 Genótipos e subtipos do vírus da Hepatite C



Fonte: (PRECIADO et al., 2014)

A prevalência e distribuição dos genótipos do HCV no mundo modifica de acordo com os continentes e regiões geográficas estudados, sendo que os genótipos com maior prevalência em todo mundo são os genótipos do tipo 1, 2 e 3 (Figura 1) com os subtipos 1a, 1b, 2c, e 3a, encontrados em todas as regiões do mundo. Os genótipos do tipo 4, 5 e 6 são mais limitados e

prevalentes em regiões geográficas específicas e restritas, descritos no Egito e regiões Subsaariana com prevalência nestas regiões do genótipo do tipo 4, sul da África apresentando prevalência do genótipo 5 e genótipo 6 com maior prevalência na regiões do sudeste da Ásia, China e Indochina (GOWER et al., 2014; LOPES et al., 2009; PASQUIER et al., 2005).

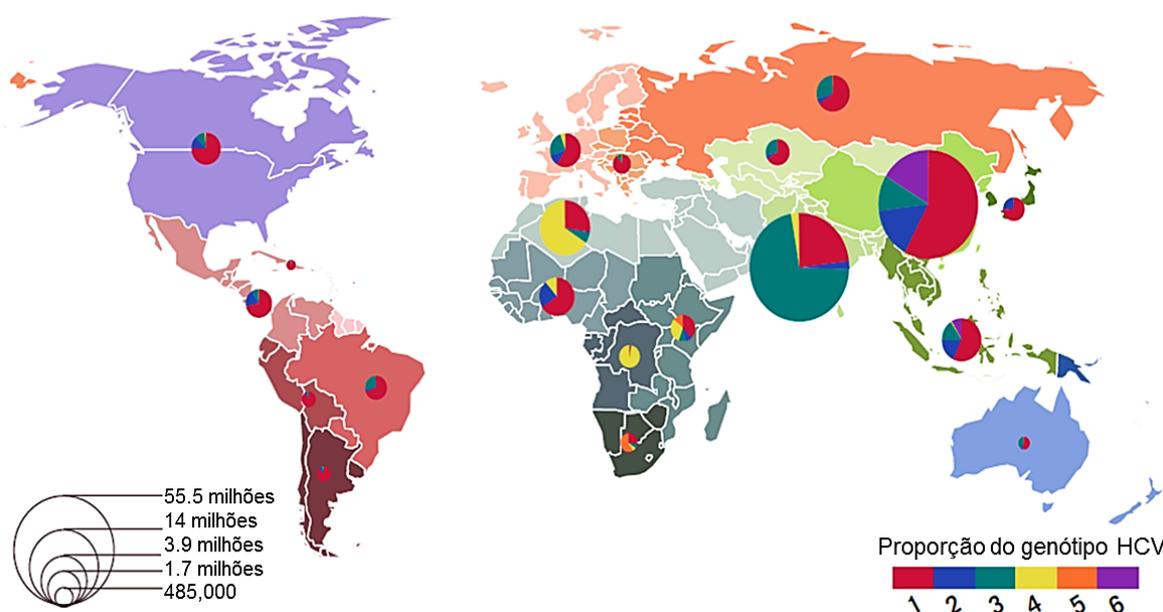


Figura 2 Distribuição epidemiológica dos genótipos do vírus da hepatite C no Mundo

Fonte: WHO 2017.

A prevalência dos genótipos no Brasil acompanha a mundial, embora, dados na população brasileira sejam limitados. Tem sido demonstrado que a distribuição genotípica apresenta um predomínio do genótipo 1 (64,9%), seguido pelos genótipos 3 (30,2%), 2 (4,6%), 4 (0,2%) e 5 (0,1%) (**Figura 2**). Estudo feito em Goiânia e Campo Grande com usuários de drogas demonstrou a prevalência de 7,1% de anti-HCV positivo com maior prevalência do genótipo 1a, seguido dos genótipos 3a e 1b (LOPES et al., 2009).

No estado do Amazonas a maior prevalência genotípica foi do genótipo 1, seguido pelos genótipos 3 e 2 (PEREIRA et al., 2019; TORRES et al., 2009). Estudo feito por Araújo et al. (2011) com 69 pacientes diagnosticados na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas demonstrou maior prevalência do genótipo 1 (54,2%), seguido dos genótipos 3 (25%) e 2 (20,8%) na população do sexo feminino. Para o sexo masculino o genótipo 1 (76,1%) foi o mais prevalente, seguido do genótipo 3 (19,6%) e genótipo 2 (4,3%). O mesmo foi observado no estudo de Pereira et al. (2019), contudo, foi relatado a presença do genótipo 4 e a identificação de uma amostra com a presença dos genótipos 1 e 2.

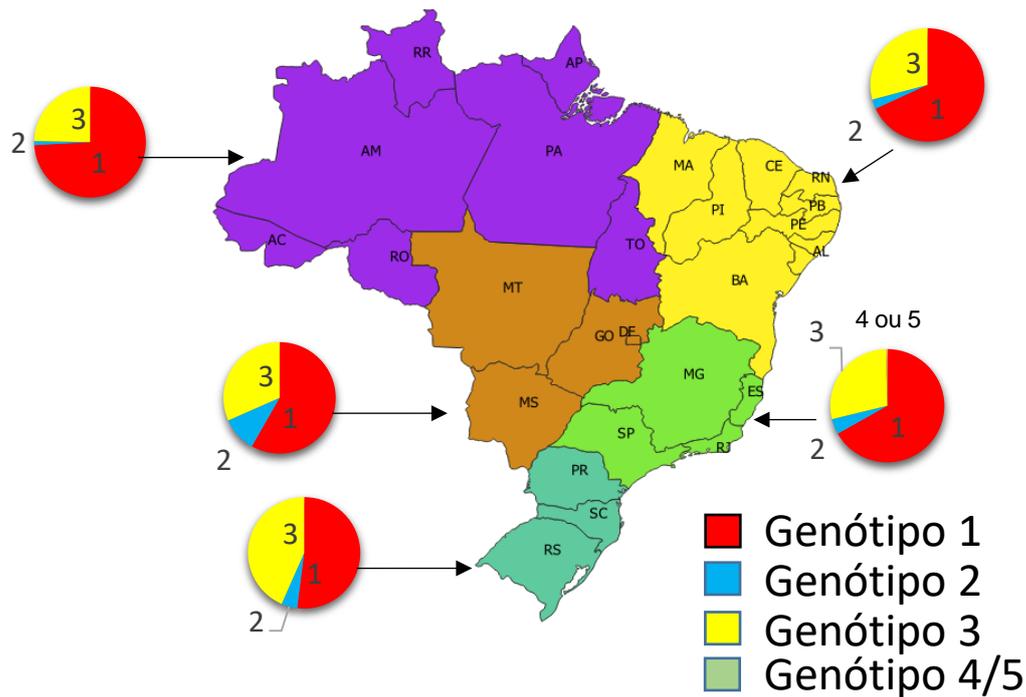


Figura 3 Distribuição dos genótipos do vírus da Hepatite C nos diferentes estados do Brasil. Apresenta o número absoluto de cada genótipo encontrado na região.

Fonte: CAMPIOTTO *et al.*, 2005, modificado.

3 VÍRUS DA HEPATITE C (HCV)

O vírus da hepatite C apresenta uma conformação esférica com cerca de 30 a 60 nm de diâmetro. A partícula viral é envolta por uma membrana celular derivada dos hepatócitos dos hospedeiros com a presença de glicoproteínas virais do envelope 1 (E1) e envelope 2 (E2). O genoma é formado por RNA, que é cercado pelo nucleocapsídeo formado pela proteína C (CORE) (**Figura 3**).

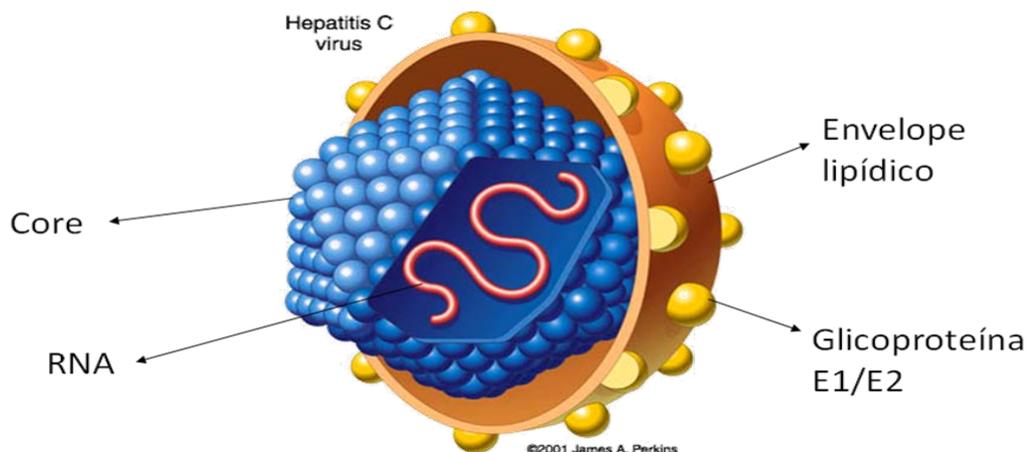


Figura 4 Estrutura do virion HCV

Fonte: Adaptado de James, 2001

O HCV pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Hepacivirus* (MORADPOUR; BLUM, 2004a). O genoma viral do HCV é formado por um ácido ribonucleico de fita simples, apresentando polaridade positiva composta por 9.600 nucleotídeos, havendo uma região codificante com uma longa fase aberta de leitura (*Open Reading Frame* – ORF) que traduz uma poliproteína com 3 mil aminoácidos (CHOO et al., 1989). A fração N-terminal codifica as proteínas estruturais CORE, E1/E2 e proteína P7, enquanto que as proteínas não estruturais Ns2, Ns3, Ns4A, Ns4B, Ns5A e Ns5B são codificadas em outra parte do genoma (CHOO et al., 1989; SHUKLA; HOYNE; WARD, 1995) (**Figura 4**).

A proteína estrutural do CORE do vírus da Hepatite C é a primeira a ser codificada pelo HCV, na sua forma imatura composta por 191 aminoácidos (aa) formando uma proteína de 22 kDa, na sua forma madura é composta por 179 aa com tamanho de 21 kDa. É uma proteína altamente conservada, que forma o nucleocapsídeo viral. A proteína do CORE possui três domínios que estão envolvidos na ligação ao RNA viral, a ligação a gotículas de lipídeos e na translocação para o retículo endoplasmático (RE). Além disso, apresenta funções regulatórias durante a replicação, está envolvida no metabolismo lipídico, podendo levar a esteatose hepática e envolvimento na hepatocarcinogênese (AIT-GOUGHOLTE et al., 2006; LI et al., 2014; ROINGEARD; HOURIOUX, 2008; VERCAUTEREN et al., 2014).

As glicoproteínas do envelope (E1 e E2) viral são proteínas estruturais do HCV. A proteína E1 é composta por 192 aa que formam uma proteína de 35 kDa, a proteína do envelope E2 é composta por 363 aa com tamanho de 73 kDa. Essas proteínas são transmembranares do tipo 1 (DUBUISSON; PENIN; MORADPOUR, 2002). As proteínas E1 e E2 são compostas

por domínios transmembranares com dois trechos hidrofóbicos separados por segmentos curtos e esses domínios estão envolvidos na heterodimerização das proteínas e tem função de ancorar as proteínas do envelope na membrana do RE (GOFFARD et al., 2005). A heterodimerização E1-E2 apresenta um papel importante na interação do vírus com receptores celulares na fusão com as células hospedeiras (VON HAHN; RICE, 2008). A proteína do envelope viral E2 em sua composição possui regiões mais mutáveis do genoma do vírus da Hepatite C. Essas regiões são chamadas de regiões hipervariáveis 1 e 2 (HVR1 – HVR2). A região entre os primeiros aminoácidos da proteína E2 formam as regiões HVR1 e HVR2 e estão presentes entre os aminoácidos 91-97. Por serem regiões com elevadas mutações, acredita-se que essas regiões ajudam na evasão do vírus da Hepatite C ao sistema imune e conseqüentemente ajudam no desenvolvimento para a infecção crônica. A região HVR1 apresenta grande exposição, por esse motivo é alvo principais para os anticorpos neutralizantes, entretanto, como é uma região altamente mutável, apresenta alterações nos epítomos o que levarão escape viral (PANTUA et al., 2013; ROCCASECCA et al., 2003; SANDRES et al., 2000).

Proteína não estrutural 1 (Ns1) também conhecida como proteína P7 é um polipeptídeo de 63 aa localizada entre a proteína estrutural do envelope E2 e a proteína não estrutural Ns2. Formam canais de íons, com importante papel na infecção viral. Durante a replicação viral a proteína P7 participa impedindo a acidificação, é importante na montagem e liberação das partículas virais (CARRERE-KREMER et al., 2004; WOZNIK et al., 2010).

A proteína não estrutural 2 (Ns2) é uma proteína transmembranar hidrofóbica, composta por 217aa com tamanho de 21-23 kDa, é uma das proteínas fundamentais para conclusão da replicação viral. É uma cisteína protease que possui resíduos hidrofóbicos na porção N-terminal que formam 3 a 4 hélices que possuem a capacidade de se inserirem na membrana do retículo endoplasmático. A interação do domínio C-terminal da proteína Ns2 com o domínio N-terminal da proteína Ns3 (Ns2/3) apresentam função importante na atividade de auto protease. A proteína Ns2 está envolvida na esteatose hepática induzida pelo HCV, por participar da regulação positiva dos ácidos graxos (SCHREGEL et al., 2009; WELBOURN; PAUSE, 2005; YI et al., 2009).

A proteína não estrutural 3 (Ns3) é formada por 631 aa e apresenta o tamanho de 70 kDa. Essa proteína é clivada pela auto protease Ns2/3. As porções N-terminal e C-terminal da proteína possuem atividades diferentes. A porção N-terminal da NS3 composta por 189aa possui as atividades de protease e *NTPase*. A porção C-terminal com 442aa apresenta a atividade *NTPase/helicase* e possui papel importante na replicação viral com a função de

catalisar a ligação e desenrolar o genoma viral. A junção da proteína Ns3 com proteína Ns4a formam protease Ns3/4a responsável por clivar as junções das proteínas não estruturais Ns3/Ns4a, Ns4a/Ns4b, Ns5A/Ns5 (MALCOLM et al., 2006).

A proteína não estrutural 4a (Ns4a) é importante para a replicação viral, atuando como cofator da proteína NS3 estabilizando e facilitando a atividade de protease. Essa proteína é pequena com apenas 8 kDa formada por 54aa e podem ser encontradas no RE e nas mitocôndrias. A Ns4a possui atuação importante na fosforilação da proteína Ns5a. além do papel importante na replicação viral no qual em conjunto com proteína Ns3 cliva as proteínas não estruturais, contribui para patogênese viral influenciando em algumas funções celulares, podendo levar a apoptose da célula hospedeira (NOMURA-TAKIGAWA et al., 2006; SELIMOVIC; HASSAN, 2008).

A proteína não estrutural 4b (Ns4b) é uma importante proteína, pois, possui a capacidade de induzir o recrutamento das proteínas não estruturais formando o complexo de replicação. A Ns4b é uma proteína hidrofóbica com 217aa que formam uma proteína de 27 kDa. A função de recrutamento e formação do complexo de replicação é atribuída a quatro domínios presentes na proteína, além disso a Ns4b apresenta papel importante na montagem e liberação das partículas virais (EGGER et al., 2002; JONES et al., 2009).

A proteína não estrutural 5a composta por 485aa é uma fosfoproteína. A Ns5a pode ser encontrada na forma fosforilada com o tamanho de 56 kDa ou na forma hiperfosforilada com 58 kDa. É uma proteína que apresenta regiões conservadas em vários genótipos. A Ns5a possui uma região entre os aminoácidos 237-276 que prevê resistência a sensibilidade ao tratamento com interferon, essa região é denominada de região determinante de sensibilidade ao interferon (ISDR). Além de apresentar papel importante na mediação da resposta ao tratamento ao interferon, essa proteína possui funções como, contribuir na replicação viral, na patogênese, modulação das vias de sinalização celular e apoptose da célula hospedeira. Por esses motivos a proteína Ns5a é um alvo dos novos medicamentos antivirais de ação direta (JR et al., 1997; REYES, 2002; MACDONALD et al., 2004; GU; RICE, 2014).

A proteína não estrutural 5b é componente central do complexo de replicação viral. É a RNA polimerase dependente de RNA, responsável por iniciar a síntese do RNA de fita negativa. É composta por 591aa que formam uma proteína de 65 kDa. A RNA polimerase Ns5b não apresenta a função de revisão, por esse motivo leva a numerosas mutações no genoma do HCV e que resulta em diferentes subtipos de genótipos. Por ser a proteína central na replicação

do vírus, a Ns5b é considerada uns dos principais alvos de medicamentos de ação direta (DE FRANCESCO; MIGLIACCIO, 2005; MEIGANG GU; CHARLES, 2013).

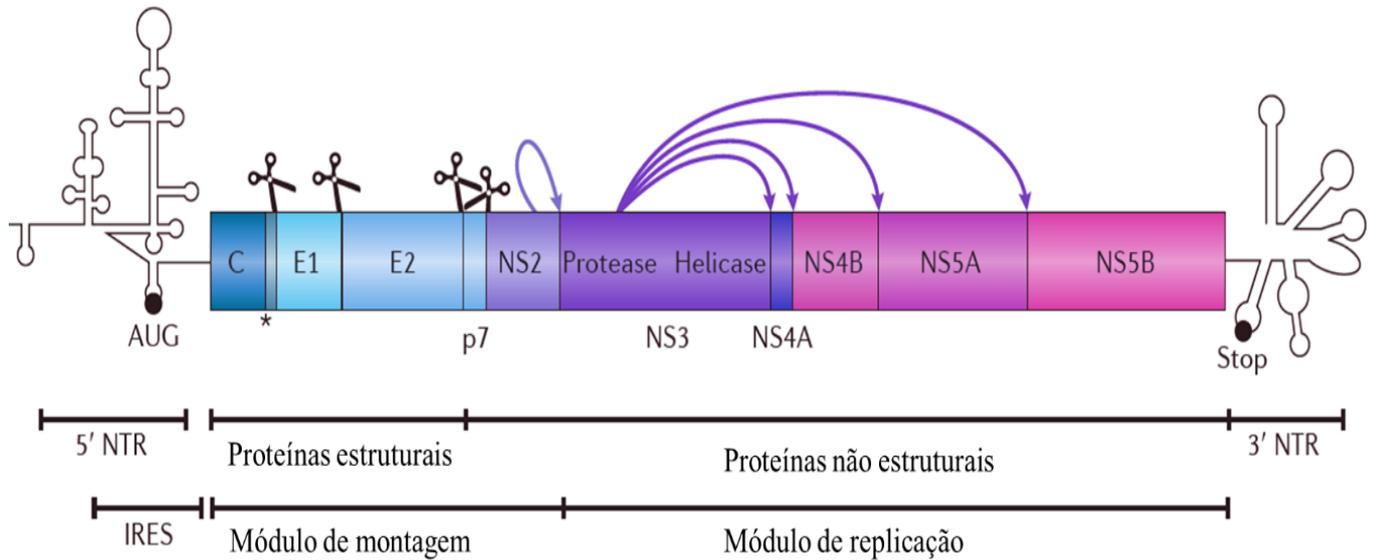


Figura 5 Organização do genoma do vírus da hepatite C. As peptidases de sinal do hospedeiro clivam as proteínas do core, do envelope e p7. As proteínas não estruturais são processadas por proteases virais.

Fonte: modificado de BARTENSCHLAGER et. al (2013).

4 TRANSMISSÃO

O HCV é transmitido por várias formas, sendo que a forma mais eficiente se dá através da exposição ao sangue contaminado, em transfusões sanguíneas, transplantes de órgãos e o uso de drogas injetáveis com compartilhamento de seringas contaminadas. Além disso, foram relatados casos de infecção por acidentes com materiais perfurocortantes, exposição a fluidos corporais e transmissão sexual (ALTER; FABIANI, 2007; HOWE et al., 2005; STOCKMAN et al., 2014).

As hemotransfusões aparecem como uma das maiores causas de transmissão do HCV. O uso de sangue e seus derivados assim como, órgãos transplantados de indivíduos contaminados com esse vírus, representam um alto risco na ausência de um teste diagnóstico para detecção do patógeno. Estudo com pacientes hemofílicos transfundidos antes da

implantação dos testes sorológicos nos bancos de sangue demonstram que cerca de 34,9% de pacientes com hemofilia A e 29,7% com hemofilia B foram positivos para anticorpos anti-HCV (REZENDE et al., 2009).

O compartilhamento de seringas contaminadas para o uso de drogas injetáveis foi responsável pela maioria das infecções pelo HCV nos Estados Unidos e Austrália. No entanto, a incidência entre usuários de drogas injetáveis caiu a partir da década de 90, com a implantação de teste sorológicos para HCV nos hemocentros (SHEPARD; FINELLI; ALTER, 2005). Contudo, calculam-se cerca 16 milhões de usuários de drogas injetáveis no mundo, e o risco de essas pessoas serem infectados com os vírus do HIV e HCV são muito elevados (KERMODE, 2004).

No Brasil, a partir da implementação dos métodos de triagem para Hepatite C em bancos de sangue, nas transfusões de sangue e hemocomponentes, houve uma redução significativa na transmissão do HCV (BUSCH; KLEINMAN; NEMO, 2003).

A transmissão ocupacional através da exposição percutânea durante a realização de tatuagens e perinatal durante a gravidez tem sido relatadas (MARTINS; SCHIAVON; SCHIAVON, 2010). Estimativas apontam que os níveis de transmissão materno-fetal podem atingir 25%, sendo que esse número pode aumentar nos casos de coinfeção com o HIV (PARTHIBAN et al., 2009).

IMUNOPATOGÊNESE

5.1 Entrada do HCV nas células hospedeiras

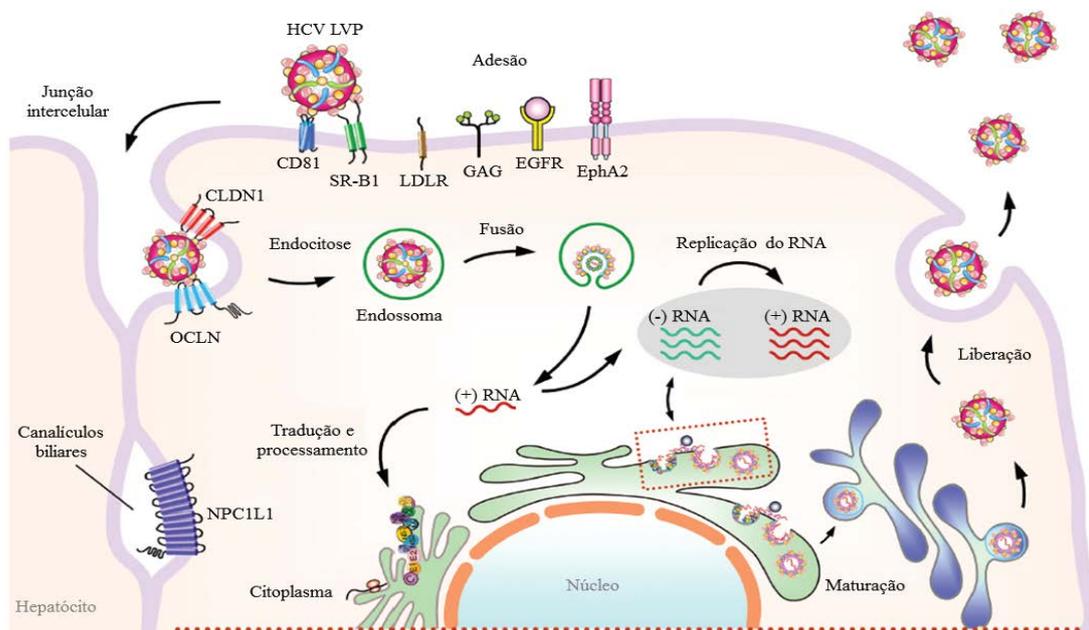


Figura 6 Ciclo de replicação adaptado

Fonte: (WONG; CHEN, 2016).

Os mecanismos de entrada do HCV nas células ainda não estão completamente elucidados, contudo vários correceptores são utilizados pelas proteínas estruturais. O vírus da hepatite C assim como outros vírus apresentam proteínas em sua membrana com a função e capacidade de se ligar a glicosaminoglicanos (*GAGs*) presentes nas células dos hospedeiros. As proteínas que interagem com os hepatócitos para entrada do vírus são as proteínas estruturais do envelope 1 (E1) e envelope 2 (E2). Além das proteínas E1 e E2, a Apolipoproteína E presente no HCV apresenta interação com as *GAGs* e Receptores *low density lipoproteins* (R-LDL) facilitam a fixação e entrada viral (BELOUZARD *et al.*, 2011).

A presença da proteína transmembranar tetrasparina (CD81), receptor *scavenger* B tipo I (SR-BI), ocludina (OCLN) e claudina-1 (CLDN1) facilitam a entrada do HCV (BARTOSCH *et al.*, 2003; EVANS *et al.*, 2007). O receptor *scavenger* classe B tipo I (SR-BI) foi o primeiro fator de entrada estudado na célula alvo, considerado como padrão de ligação à proteína viral E2, através da região hiper variável I (HVR-I) (SCARSELLI *et al.*, 2002). Além dessas moléculas, o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL-R) é usado pelo vírus, que se associa com lipoproteínas formando partículas lipovirais ricas em colesterol para facilitar

sua entrada nos hepatócitos (SCHOLTES *et al.*, 2012). Outro fator de entrada que está envolvido em muitas funções incluindo adesão, morfologia, proliferação e diferenciação celular é a tetrasparina (CD81) humana, constituída de 4 domínios transmembrânicos, que são dois domínios curtos intracelular e dois longos extracelular (MEREDITH *et al.*, 2012). Os fatores SR-BI juntamente com a CD81 estão envolvidos nas fases iniciais de entrada do HCV, gerando uma troca conformacional nas glicoproteínas do envelope E1/E2, facilitando assim, a fusão e endocitose viral (MEREDITH *et al.*, 2012). Outras proteínas ativas atuantes na entrada do HCV nas células alvo são as proteínas *claudin-1* (CLDN1) e ocludina (OCLN), apesar de não apresentarem uma interação diretamente com o vírus. No entanto, a CLDN1 pode interagir com a CD81 como parte do complexo receptor para o HCV (EVANS *et al.*, 2007; PLOSS *et al.*, 2009).

5.2 Resposta imune inata e adaptativa

O vírus da hepatite C tem a capacidade de infectar tanto as células hepáticas, quanto as células do sistema imune (BARNABA, 2010). O reconhecimento do vírus pelas células da imunidade inata é mediado pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), presentes principalmente nas células dendríticas e monócitos. Os principais receptores envolvidos na indução da resposta imune e produção de interferon do tipo I são os receptores do tipo Toll (TLR) e *Nod-like* (BARNABA, 2010; BLACKARD; KEMMER; SHERMAN, 2006). Os receptores *toll* TLR-3 e TLR-7 encontrados no endossoma reconhecem RNA de fita dupla e simples, respectivamente. Esses receptores ativam as vias TRIF (domínio contendo adaptadores de indução do interferon- β) e IRF (fator regulador de interferon) para a produção de interferon, quando reconhecido por TLR-3. O reconhecimento via TLR-7 ativa a via MyD88 e fator de transcrição NF- κ B para produzirem as citocinas pró-inflamatórias (HOSHINO *et al.*, 2006).

As proteínas do CORE e NS3 do HCV são reconhecidas pelo TLR-2 associados com TLR1 e TLR6 que sinalizam para a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e quimiocina CXCL-8. TLR-4 é ativado pela proteína Ns5a induzindo assim a produção de IFN do tipo I e IL-6 (MACHIDA *et al.*, 2006; SATO *et al.*, 2007).

Apesar do papel crucial desses receptores, estudos “*in vitro*” tem demonstrado que as proteínas Ns3a, Ns4a e Ns5a agem bloqueando e inibindo a produção de IFN- β pelos hepatócitos e células imunes. Enquanto que as proteínas do CORE do HCV inibem diretamente o fator regulador 3, e o fator de transcrição NF- κ B que estão diretamente relacionados com a

produção de IFN (LIN et al., 2006). A proteína CORE do HCV parece estar relacionada com apoptose nos hepatócitos, inibindo as vias pró-apoptóticas como Fas/FasL, caspases – 3, ou aumentando a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl 2 (CERELLA et al., 2014; HAHN et al., 2000; MACHIDA et al., 2001). Após o reconhecimento dos peptídeos virais pelas células dendríticas (DCs) presentes no fígado, ocorre a migração destas para os linfonodos e ativação dos linfócitos T auxiliares, através das moléculas co-estimulatórias CD80/CD86 e pelas moléculas do antígeno leucocitário humano de classe II (HLA II). As células dendríticas são antígenos-específicas e não expressam moléculas CD40 e secretam TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias que vão potencializar a resposta imune (HIROISHI et al., 2010).

As DCs irão estimular ainda a ativação dos linfócitos T citotóxicos (CTLs), através da apresentação de antígenos via moléculas de HLA classe I e a diferenciação dos linfócitos T "naïve" em células de perfil T_H1, após a liberação de Interleucina-12 (IL-12). A produção das citocinas IL-2 e IFN- γ pelos linfócitos T_H1 irão induzir a proliferação dos CTLs específicos contra o HCV (HIROISHI et al., 2010).

O interferon (IFN) é uma citocina chave para ação antiviral e é secretada tanto por células da imunidade inata quanto pelas células da imunidade adaptativa. Essa citocina atua como um potente agente antiviral e são codificadas pelos genes de estimulação de interferon (ISGs) (DICKENSHEETS et al., 2012).

Além de apresentar uma ação antiviral o IFN tem um papel na regulação da IL-12p70, que é uma citocina crucial para o perfil T_H1 (GAUTIER et al., 2005). As citocinas secretadas pelos linfócitos TCD4⁺ de perfil T_H1 (IFN- γ e IL-12) parecem estar relacionadas com uma infecção autolimitada durante a fase aguda da doença, contudo citocinas do perfil T_H2 (IL-4) podem contribuir para a cronicidade da infecção pelo vírus do HCV (BYRNES et al., 2007; DAVTYAN et al., 2013).

Durante a terapia antiviral contra o HCV os níveis de citocinas de perfil T_H1, principalmente o interferon, aumentam em consonância com a terapia medicamentosa. Em contrapartida as citocinas de perfil T_H2 tendem a diminuir com a diminuição da carga viral (DAVTYAN et al., 2013; THIMME et al., 2002).

A forte resposta mediada pelos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ pode estar envolvida com a eliminação viral, estabelecendo uma proteção a reinfeção. Porém, o papel da resposta

humoral ainda não está claro em relação à proteção contra o vírus (SEMMO et al., 2006). A resposta imune humoral na infecção contra o vírus da hepatite C, produz anticorpos contra epítomos presentes nas proteínas estruturais e não estruturais. Contudo, a grande maioria dos anticorpos produzidos contra os epítomos das proteínas não apresentam a capacidade de impedir a entrada ou remover o vírus do HCV. Os anticorpos com eficiência em bloquear o HCV são conhecidos como anticorpos neutralizantes (FARCI et al., 1994; VON HAHN et al., 2007).

Os anticorpos neutralizantes apresentam como alvo principalmente os epítomos das regiões hiper variáveis 1 (HVR-1) presentes nas proteínas E1 e E2 do envelope, para inibir a ligação do vírus nos hepatócitos (SABO et al., 2011).

Com o desenvolvimento da infecção do HCV, os anticorpos neutralizantes apresentam títulos elevados nas infecções crônicas (ZEISEL; COSSET; BAUMERT, 2008). Entretanto, a evolução das quasispecies virais, mutações que modificam a conformação das proteínas, são alguns mecanismos de escape do vírus da hepatite C utiliza para que não seja neutralizado pelos anticorpos (VON HAHN et al., 2007).

O fígado apresenta uma grande população de células natural killer (NK) e natural killer T (NKT) da imunidade inata que atuam na modulação da resposta adaptativa e ação antiviral (CROTTA et al., 2002; SWAIN, 2010). Essas células participam do aumento da expressão de receptores de ativação e na citotoxicidade da doença crônica (CROTTA et al., 2002). As células NK apresentam também um papel importante na resposta imune adaptativa antiviral, pois quando estimuladas por interferons do tipo I secretadas por células infectadas pelo HCV, as células NKs começam a secretar IFN- γ (ZHANG et al., 2015).

Semanas após a infecção pelo vírus da hepatite C, pode-se encontrar linfócitos T específicos para o HCV, no sangue periférico e no fígado (REHERMANN, 2009). Os linfócitos T CD8⁺ específicos para o HCV desempenham um papel importante na eliminação do vírus na fase aguda e crônica da doença. Embora, estejam em maior quantidade no tecido hepático, essas células possuem uma menor capacidade de citotoxicidade e produção deficiente de IFN- γ e TNF- α , além do aumento na expressão do receptor programador de morte-1 (PD-1). Tal fenômeno tem sido relacionado com a presença de interleucina 10 (IL-10) no fígado, que diminui a resposta efetora das células T CD8⁺ específicas ao HCV (ACCAPEZZATO; FRANCAVILLA, 2004; BARNABA, 2010; TAN et al., 2012).

Na resposta mediada pelas células TCD4⁺, é observado um aumento na produção de IFN- γ e IL-2, principalmente na infecção aguda e em pacientes com níveis elevados de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). As células TCD4⁺ ajudam a manter a resposta antiviral das células B e das células de memória TCD8⁺ e sua menor atuação na resposta pode estar relacionada à progressão da infecção crônica (MISSALE et al., 1996).

Os linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ que produzem o fator de crescimento transformador β (TGF- β) contribuem também para evolução para fase crônica da doença, suprimindo a resposta antiviral. No entanto, a produção das citocinas regulatórias TGF- β e IL-10 podem proteger o hospedeiro infectado diminuindo o dano hepático. As células T regulatórias CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺ (Treg) parecem ser estimuladas durante a infecção pelo HCV e apresentam uma função moduladora na inflamação, estabelecendo um equilíbrio entre a resposta pró e anti-inflamatória, levando assim a uma infecção persistente (ALATRAKCHI et al., 2007; HASHEMPOUR et al., 2015).

A infecção crônica pelo vírus da hepatite C com doenças graves relacionadas ao fígado, apresentam um aumento das células T *helper* 17(T_H17). As células T_H17 são um subconjunto de células T *helper* que apresentam efeito antagônico em relação as células Treg, elas são células pró-inflamatórias, que quando em demasia estão envolvidas em danos teciduais (CHANG et al., 2012; WEAVER; HATTON, 2009).

6 TRATAMENTO

O tratamento padrão para infecção do HCV no Brasil até o ano de 2015, era administração combinada de IFN- α -2b associado à Ribavirina, visto que, estudos avaliaram que essa utilização apresentava um aumento de 41% na taxa de resposta virológica (JORDAN J. FELD, 2010). Entretanto, os efeitos colaterais, o longo período de tratamento, que duravam em torno de 24 a 48 semanas, foram fatores que dificultavam a adesão do paciente ao tratamento(ADINOLFI; GUERRERA, 2015).

A partir de 2011 com a aprovação da FDA (*Food and Drug administration*) vários agentes antivirais de ação direta (DAAs) apresentaram resultados promissores para o tratamento da infecção do HCV (Figura 7). Os DAAs *Boceprevir* e *Telaprevir* são inibidores de protease de primeira classe, que agem diretamente nas proteínas não estruturais NS5a e na protease NS3/4A e são utilizados nos pacientes HCV crônicos do genótipo 1. O *Sofosbuvir* foi uma nova

estratégia terapêutica aprovada em 2013, que apresentou ser muito eficiente no tratamento do HCV, pois inibe a replicação viral atuando diretamente na NS5b RNA polimerase (FERNANDEZ-YUNQUEIRA et al., 2013; MILAZZO; FOSCHI; ANTINORI, 2012; SOLVALDI, 2015)

Com o surgimento da nova terapia antiviral livre de interferon peguilado, o tratamento do HCV com as DAAs permite um menor tempo de duração (12 a 24 semanas), menos efeitos colaterais e atigem altas taxas de resposta virológica sustentada (RVS) (ASSELAH, 2014; MILAZZO; FOSCHI; ANTINORI, 2012).

Segundo as diretrizes do Ministério da Saúde, o tratamento para infecção do vírus da Hepatite C é indicado para todos os pacientes confirmados com infecção aguda ou crônica, independentemente do estágio de fibrose hepática. O sistema único de saúde apresenta um arsenal de medicamentos de ação simples e conjunta que atuam diretamente inibindo a replicação viral (BRASIL, 2018).

Desta forma, a importância da detecção precoce de infecção na prática clínica de rotina e doadores de sangue, e uma necessidade de novos testes específicos, sensíveis, confiáveis, que possam melhorar o rastreamento da infecção do HCV, auxiliando na detecção e confirmação da infecção de todos os principais genótipos de HCV, é muito importante, pois o HCV é um dos principais causadores óbitos no mundo relacionados a doenças graves do fígado.

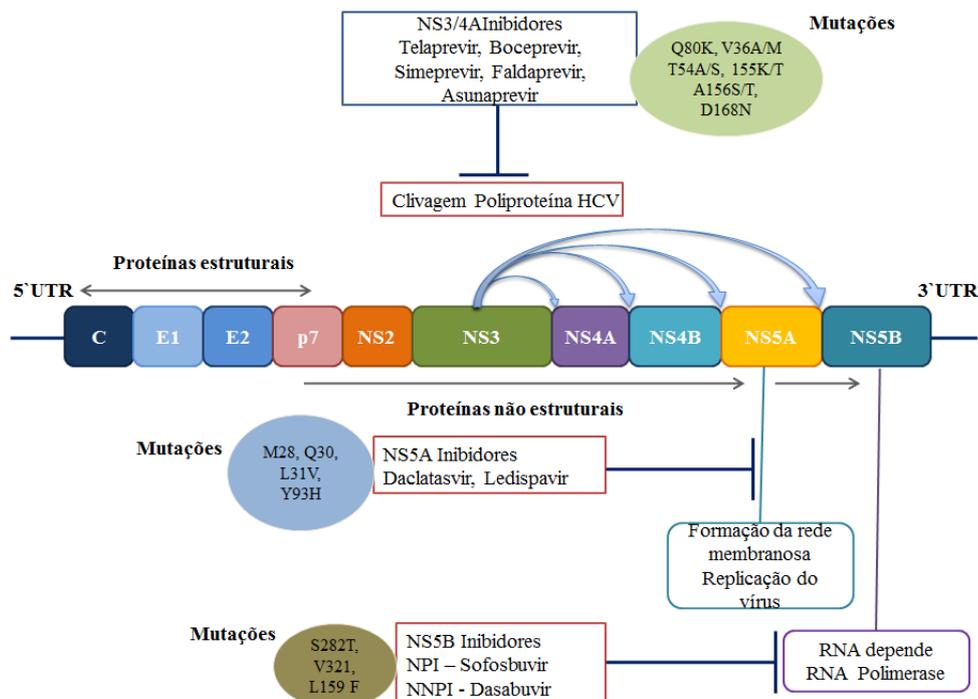


Figura 7 Ação dos antivirais de ação direta Fonte: (AHMED; FELMLEE, 2015)

Objetivos

7 OBJETIVOS

7.1 Objetivo Geral

- Desenvolver um método single e multiplex para detecção de anticorpos contra as proteínas recombinantes CORE, NS3, NS4b e NS5a do vírus da hepatite C, acopladas a microbeads funcionalizadas.

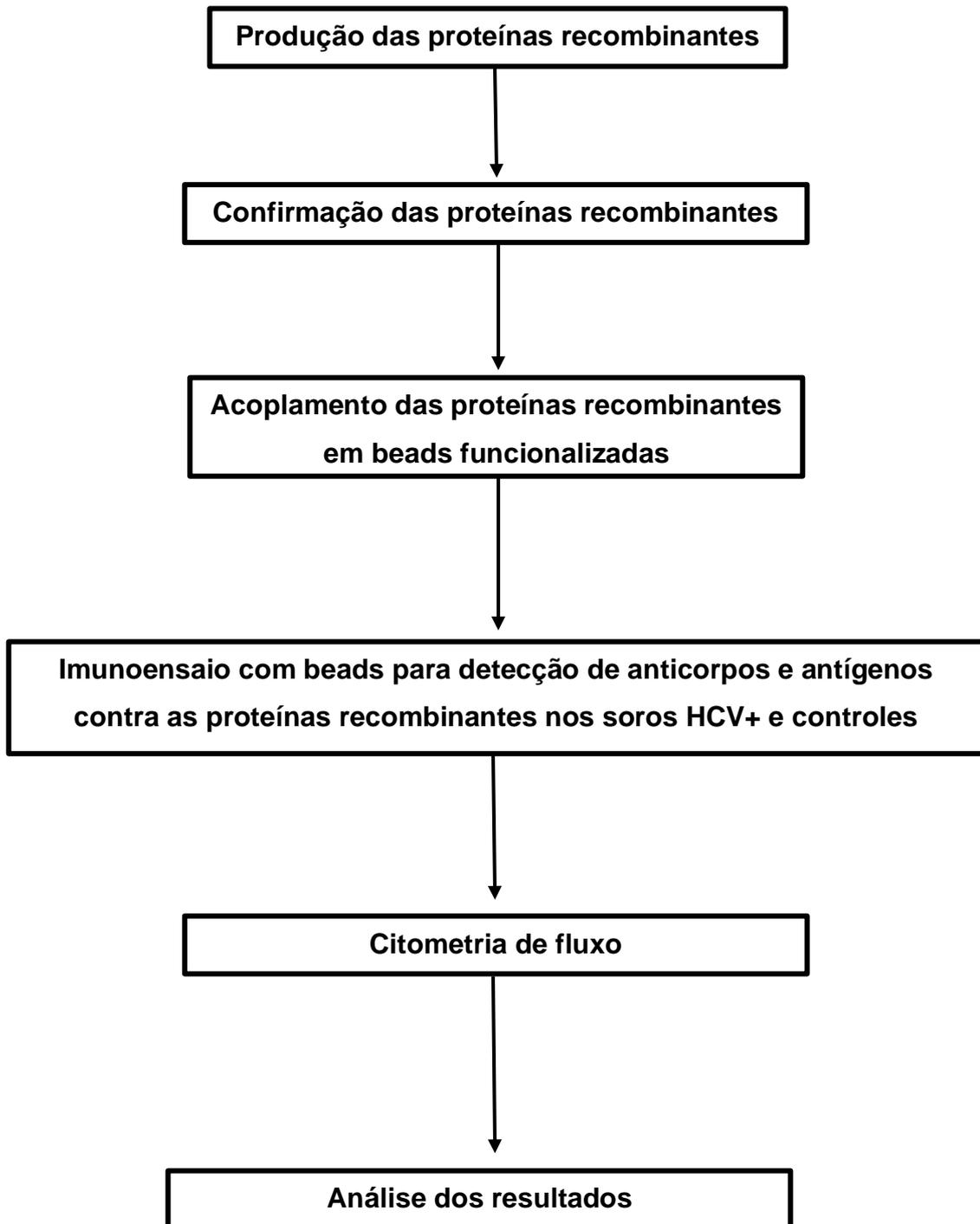
7.2 Objetivos Específicos

- Produzir as proteínas recombinantes (CORE NS3, NS4b e NS5a) do vírus da Hepatite C;
- Realizar a adsorção das proteínas recombinantes do HCV (CORE, NS3, NS4b e NS5a) em *beads*;
- Determinar a sensibilidade e especificidade dos métodos single e multiplex;

Material e Métodos

8 MATERIAL E METODOS

8.1 Fluxograma de atividades



8.2 Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo descritivo, transversal, intitulado como: Imunodiagnóstico com *beads single e multiplex* para detecção de anticorpos contra as proteínas recombinantes CORE, Ns3, Ns4b e Ns5a do vírus da hepatite C, desenvolvidos pelo grupo de Pesquisa “Imunologia Básica e Aplicada” da Universidade Federal do Amazonas, em parceria com a Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado (FMT – HVD), Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD).

8.3 Área de estudo

O estudo está sendo realizado na cidade de Manaus, estado do Amazonas, desenvolvido na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) em colaboração com o Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

8.4 População de estudo

Para a validação do método de diagnóstico foram utilizadas amostras de pacientes HCV+ e controles, que foram obtidas em projetos que visavam avaliar fatores imunológicos, desenvolvidos pelo grupo de pesquisa (PEREIRA et al., 2019; TARRAGÔ et al., 2020). Desta forma, as populações descritas aqui obedeceram aos critérios propostos nos estudos dos projetos desenvolvidos no nosso grupo de pesquisa, como descrito acima.

8.5 Critérios de inclusão, não-inclusão e exclusão

Foram incluídos no estudo pacientes com diagnóstico de hepatite C crônica (HCV) confirmados com testes sorológicos e moleculares de detecção do RNA viral (HCV RNA+) NAT-HCV, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 70 anos, com e sem tratamento prévio, com e sem a presença de fibrose (F1-F2 e F3-F4) que procuraram atendimento na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e aceitaram participar do estudo mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE. Não foram incluídos indígenas nem mulheres grávidas. Foram excluídos pacientes que apresentarem coinfeção com os vírus da hepatite B (HBsAg), vírus da imunodeficiência adquirida-HIV (anti-HIV-I e II), HTLV (anti-HTLV- I e II), doença de Chagas (anti-*T cruzi*) e sífilis (VDRL).

Além disso, os pacientes que apresentaram quadro clínico-laboratorial de cirrose hepática descompensada, pacientes diabéticos descompensados, pacientes com história de uso de drogas ilícitas nos últimos sete anos, pacientes com relato de consumo diário de bebida alcoólica, pacientes com distúrbios psiquiátricos, pacientes renais crônicos e pacientes com síndrome plurimetabólica também não fizeram parte da amostragem.

Para o grupo controle, foram selecionados candidatos a doação de sangue atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), de ambos os sexos, com idade mínima de 18 anos residentes em Manaus, que não apresentaram reatividade para Hepatite B (anti HBc, HBsAg), HCV (anti-HCV), HIV (anti-HIV-I e II), HTLV (anti-HTLV I e II), doença de Chagas (teste ELISA) e sífilis (VDRL).

8.6 Conservação das Amostras

As amostras de soros utilizadas neste estudo foram armazenadas na soroteca da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas e mantidas a -80° C para a manutenção do material biológico.

8.7 Aspectos éticos

As amostras utilizadas neste estudo foram obtidas a partir dos projetos intitulados “*Identificação e Seleção de Peptídeos Miméticos Reativos aos soros de pacientes HCV⁺ e sua influência no desenvolvimento da fibrose hepática in vitro*” e “*Avaliação do perfil Celular, humoral e molecular em doadores de sangue com sorologia reativa ao vírus da hepatite B (HBV) na Cidade de Manaus*”, coordenados pela Dra. Adriana Malheiro Alle Marie e Dra. Laura Patrícia Viana Chaves, respectivamente. Ambos os projetos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas sob os respectivos números de CAAE: 49652815.8.0000.0009 e CAAE 0024.112.000-10.

8.8 Produção das proteínas recombinantes

As sequências dos genes utilizados para o desenho das proteínas recombinantes foram baseadas no depósito no *gene bank* ACJ37216.1 (gi|212675045, *polyprotein [Hepatitis C virus subtype 1a*, NCBI]). A sequência correspondente a cada gene foi inserida no programa de correção de “viés de códon” para *Escherichia coli*, disponibilizado pelo *site* da empresa IDT,

buscando assim otimizar a expressão das proteínas neste hospedeiro. Foram adicionados sítios de restrição para as enzimas *XhoI*, no início dos genes, e *PstI*, no final. O gene *Ns5a* foi dividido ao meio em dois fragmentos (N-terminal e C-terminal), sendo possível uni-los através de um sítio para enzima *BamHI*. *Ns3*, devido a sua grande extensão, foi inicialmente analisado no programa “MHC class II binding prediction”, visando selecionar os epítomos mais relacionados com uma resposta celular. Cinco regiões foram selecionadas, sendo adicionados os mesmos sítios de restrição citados anteriormente em suas extremidades.

Estas informações foram enviadas ao fabricante de genes sintéticos (*IDT - Integrated DNA Technologies*) para síntese. Análise de bioinformática para identificar a massa molecular esperada de cada proteína foi realizada no programa *ProtParam* (<http://web.expasy.org/protparam/>).

Após a confirmação do inserto no plasmídeo de expressão, através da digestão com as respectivas enzimas de restrição e sequenciamento, realizou-se a inserção do plasmídeo em célula competente BL21. Para a inserção do plasmídeo de expressão recombinante, em célula bacteriana *E. coli* BL21 (DE3) *pLysS* quimicamente competente, utilizou-se o mesmo método de transformação por eletroporação e cultivo em LB ágar, porém desta vez foram utilizados os antibióticos ampicilina (100µg/mL) e cloranfenicol (34µg/mL) para o crescimento bacteriano em placas foram. Por conseguinte, as colônias que apresentaram resistência a ampicilina e cloranfenicol foram selecionadas por possuírem o plasmídeo com inserto e transformadas.

8.9 Autoindução das proteínas recombinantes

Para a autoindução das proteínas recombinantes do HCV (CORE, *Ns3*, *Ns4b* e *Ns5A*) foram utilizados os reagentes: 50x 5052 (Glicose 0,5% e Lactose 10%) e 20x NPS ($\text{NH}_4 \text{SO}_4$ - 0,5M, $\text{KH}_2 \text{PO}_4$ - 1M, $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ - 1M pH - 6,75). Após o crescimento das colônias com os plasmídeos das proteínas recombinantes, foram adicionadas ao meio líquido *Luria Bertani* (500 ml), com os reagentes 50x 5052 e 20x NPS em quantidades proporcionais dos reagentes utilizados e foram adicionados os antibióticos ampicilina e cloranfenicol e levado ao shaker por 16 horas a 37°C.

8.10 Purificação das proteínas recombinantes

As proteínas foram purificadas pela técnica denominada Cromatografia de Afinidade com Metal Imobilizado (IMAC). Neste estudo, utilizou-se a coluna de purificação contendo

íons Ni²⁺ (*Qiagen*®) em afinidade a cauda de Histidina inserida na proteína. As retenções das proteínas do HCV foram testadas em várias concentrações de imidazol, em duplicata. Para a realização da purificação das proteínas recombinantes, a cultura do induzido, foi centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em tampão de lise contendo, 20mM Tris pH8. 0, 500Mm NaCl, 1Mm de PMSF e glicerol a 10%. Em seguida, foram submetidas ao processo de *lise* celular por sonicação. O produto da sonicação foi centrifugado por 15 min a 14000 rpm e o sobrenadante recuperado. A coluna de purificação contendo íons Ni²⁺ foi previamente lavada com H₂O e tampão de lise. Posteriormente, foi adicionado o sobrenadante lisado, contendo a proteína (de 1 em 1 ml). Em seguida foram realizadas lavagem para verificar a retenção das proteínas HCV na coluna, seguindo as seguintes concentrações de Imidazol 20Mm; 40Mm; 60Mm; 80Mm. O tampão de eluição com imidazol foi adicionada sempre de duas vezes de 500 µl, nas seguintes concentrações: 100Mm, 200Mm, 300Mm, 400Mm e 500Mm de Imidazol sendo separadas em alíquota E1 e E2. Todas as alíquotas foram armazenadas a -20°C. O monitoramento deste processo foi realizado através de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS-PAGE 15%. As proteínas foram quantificadas utilizando o método de Bradford (*Bio-Rad*®) e densidade óptica por espectrofotômetro. E seguida, todas as eleições das proteínas que foram visualizadas no gel SDS-PAGE e quantificadas, foram submetidas à diálise em membranas de 0,2mm, para retirada do excesso do imidazol e dos outros reagentes.

8.11 Análise da Expressão das Proteínas

Para a análise da expressão das proteínas recombinantes (CORE; Ns3; Ns4b; Ns5a), utilizou-se a técnica de eletroforese em gel poliacrilamida-SDS-PAGE 15% SDS-*(running gel)* e 5% *(stacking gel)*, na presença da solução acrilamida/bisacrilamida 30%, Tris 1M pH 8.8, persulfato de amônia a 10% (APS); dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e 6µl de Temed e água miliQ para um volume final de aproximadamente 15ml. As proteínas foram aplicadas no gel com tampão de corrida (Tris 0,01M, pH 6,8; SDS 10%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,06% e DTT a 4%) e em seguida desnaturadas por aquecimento á 95°C por 10 minutos. A eletroforese foi realizada sob corrente constante de 100 V até a coloração do azul de bromofenol alcance a extremidade inferior do gel. Após corrida em gel de poliacrilamida, fixou-se a proteína em solução corante contendo azul de *Coomassie* (*coomassie blue* 0,2%), ácido acético glacial 7%, etanol 40%, diluídos em H₂O destilada, que além de fixá-las, mantém as proteínas desnaturadas.

Uma vez coradas, foram submetidas à descoloração, utilizando os mesmos reagentes citados acima, exceto o Coomassie, para visualização e análise de proteínas.

8.12 Western blotting

A detecção da presença da cauda de poli histidina nos antígenos recombinantes foi realizada pela técnica de “immunoblot” (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979). Para isso, as proteínas foram separadas por eletroforese SDS-PAGE 15% e transferidas por eletroforese para membrana de PVDF, ambos embebidos em tampão 0,025 M Tris, 0,192 M glicina, pH 8.5, e metanol 20%.

O sistema foi colocado em uma cuba específica para eletro transferência (*Semidry system, Bio-rad, Hercules, USA*) sendo submetido à uma voltagem constante de 12 Volts durante 65 minutos. Após ser retirada do sistema, a membrana foi mantida no mesmo tampão de transferência descrito, até o momento da revelação. Posteriormente, realizou-se a revelação utilizando kit comercial Western breeze (*InvitrogenTM*), seguindo as recomendações do fabricante.

8.13 Acoplamento das proteínas recombinantes do HCV às nanopartículas magnéticas (*Beads*).

As nanopartículas magnéticas foram inicialmente ativadas para o acoplamento as proteínas recombinantes produzidas. Pesado 20 mg de *beads* e após, adicionado 1 mL de água ultrapura. Em seguida a mistura será agitada por vórtex e submetido à base magnética para a decantação das *beads*. O sobrenadante foi retirado e então foi adicionado o tampão de acoplamento (10 mM potássio fosfato + 0,15 M NaCl pH 5,5). Após a adição do tampão, a solução foi agitada no vórtex. Em seguida, a solução foi incubada por 3 minutos em temperatura ambiente sem agitação, e o sobrenadante foi retirado após o processo de decantação. Este processo foi repetido por duas vezes.

O acoplamento das proteínas recombinantes às *beads* magnéticas é realizado após a retirada do sobrenadante. Sendo adicionado 10µg/µL das proteínas recombinantes do HCV purificados na solução de *beads* previamente ativadas. Após a adição das proteínas recombinantes a solução foi homogeneizada por agitação em vórtex durante 3 minutos.

Adicionando à solução um volume de 10 µL de EDAC [Cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)]. Em seguida a solução foi incubada durante 24 horas sobre agitação lenta.

Após o tempo de incubação, a solução foi colocada na base magnética e o sobrenadante foi retirado e armazenado a 4 °C. As *beads* com as proteínas recombinantes acoplados foram lavadas 2 vezes com 1 mL do tampão de lavagem (10 Mm tris base + 0,15 M NaCl + 0,1% BSA + 1 mM EDTA+ 0,1% Azida - pH 7.5). Após as lavagens foi realizado o bloqueio da solução contendo as proteínas do HCV acopladas nas *beads* magnéticas. A solução foi incubada por uma 1 hora em 500 µL de tampão de bloqueio (1 M de glicina pH 8.0). Após o período de bloqueio, a solução foi lavada por 2 vezes com tampão de lavagem e após foi ressuspensa com o tampão de acoplamento foram armazenadas a 4 °C

8.14 Padronização de testes imunodiagnóstico para detecção de anticorpos anti-HCV por citometria de fluxo

Para a detecção dos anticorpos produzidos contra as proteínas do vírus do HCV, foram utilizados como anticorpo primário 30 amostras de soros de pacientes HCV+ e 30 soros controles (HCV-), confirmadas nos testes moleculares (NAT). Os soros controles e HCV+ foram diluídos na concentração de 1:200 e tratados com 10% de lisado bacteriano de *E. coli* BL21 para o bloqueio de anticorpos anti- *E. coli* presentes no soro humano. Como secundário foi utilizado anti-IgG humano marcado com isotiocianatonato de fluoresceína (*FITC*). Na primeira etapa foi feita a identificação dos tubos controles (CN1 – tubo contendo somente as *beads* magnéticas com as proteínas acopladas) e os tubos com os números específicos de cada amostra. Em seguida foi pipetado nos tubos poliestireno, 1µl da suspensão das *beads* magnéticas com as proteínas do HCV acopladas e foi acrescentado 50µl dos anticorpos primários na diluição de 1:200.

As amostras foram homogeneizadas com auxílio de agitador e incubados por 30 minutos, ao abrigo da luz, à temperatura ambiente. Logo após a incubação, foi procedida a etapa de lavagem, onde foram adicionados 2mL de PBS-W (*Phosphate Buffered Saline* 1x + Albumina sérica bovina (BSA) a 0,5%) e foi feita uma centrifugação dos tubos na rotação de 0.3 rcf por 5 minutos. Logo após, os sobrenadantes foram descartados e foi adicionado 1µl o anticorpo secundário (anti-IgG humano *Alexa Flour* 488, *Invitrogen*), e homogeneizadas com auxílio de agitador e incubadas por 30 minutos, ao abrigo da luz, à temperatura ambiente. Logo após a etapa de incubação do anticorpo secundário, foram feitas as etapas de lavagem para retirada a

ligação inespecífica de anticorpos, onde foram adicionados 2 mL de PBS-W e logo após, realizada uma centrifugação dos tubos na rotação de 0.3 rcf por 5 minutos. Após a etapa lavagem foi adicionado 200µl de PBS-W e levado para leitura no citômetro de fluxo *BD FACSCanto™ II Cell Analyser*.

8.16 Análises estatísticas

Para as análises dos resultados da análise da Citometria de Fluxo foram utilizados os programas *FlowJo®*, no qual obtivemos as medianas de intensidade de fluorescência (MFI), adicionado um ponto de corte para retirar a fluorescência normal das beads.

Os testes estatísticos e gráficos foram feitos no programa *GrahPadPrism®* (versão 7.0), onde obtivemos os pontos de corte entre as amostras HCV positivas e amostras controles, a curva ROC para avaliar a sensibilidade e especificidade do teste. Para comparar as MFIs entre os grupos controle e HCV+ foi feito o *teste Mann-Whitney* com *P value* <0.05 em ambos os testes com beads nos ensaios *single* e *multiplex*.

Resultados

CAPÍTULO 1

**Artigo de Revisão, submetido na
Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**

Capítulo 1

Diagnostic methods for Hepatitis C virus: a review

Walter Luiz Lima Neves**^{a,b}, Luis André Morais Mariuba*^{a,b,g,h}, Andrea Monteiro Tarragô^{a,c,d}, Allyson Guimarães Costa^{a,c,d,e,f}, Adriana Malheiro^{a,b,d,e}

A. Post-graduate Program in Basic and Applied Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil;

B. Post-graduate Program in Biotechnology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil;

C. Department of Education and Research, Amazonas Hospital Foundation of Hematology and Hemotherapy (HEMOAM), Manaus, AM, Brazil;

D. Post-graduate Program in Tropical Medicine, State University of Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil;

E. Post-graduate Program in Hematology Sciences, State University of Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil;

F. Carlos Borborema Clinical Research Institute, Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, AM, Brazil;

G. Leonidas & Maria Deane Research Institute, FIOCRUZ-Amazônia, Manaus, AM, Brazil.

H. Postgraduate Program Stricto sensu in Cellular and Molecular Biology of the Oswaldo Cruz Institute (PGBCM/IOC/Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil.

*Both authors contributed equally to this work.

**CONTACT: walterluizbiomedicina@hotmail.com

ABSTRACT

The hepatitis C virus (HCV) is a notable cause of liver cancer, and currently about 71 million people are chronically infected by the virus. Since its discovery in the late 1980s, and with the improvement of diagnostic tests, there has been a significant decrease in contamination by the virus, mainly in blood banks. However, the search for more sensitive, faster and more accessible diagnostic tests, mainly for use in regions where there are no laboratories with sophisticated equipment and/or infrastructure, has been the aim for decades. In this review article, we discuss the evolution of screening tests for antibody and nucleic acid detection that has occurred over the decades. It is notable that despite the existence of many tests for screening and confirming the virus, they still present false-positive and false-negative results. In addition, the main tests for confirming HCV infection are still expensive and inaccessible to a large part of the world's population, thus making it difficult to reduce and perhaps eradicate this infection.

Keywords: Hepatitis, Diagnostic tests, HCV.

INTRODUCTION

The hepatitis C virus exhibits a spherical shape of about 30 to 60 nm in diameter. The viral particle is surrounded by a cell membrane derived from the hosts' hepatocytes and includes the presence of viral glycoproteins E1 and E2. The genome is formed by RNA, which is surrounded by the nucleocapsid, formed by protein C (CORE). HCV belongs to the family Flaviviridae and the genus *Hepacivirus*¹. The HCV viral genome is formed by a single-stranded ribonucleic acid, and presents a positive polarity composed of 9,600 nucleotides, with a coding region with a long open reading frame (ORF) that encodes a polyprotein with three thousand amino acids². The N-terminal fraction encodes the structural proteins CORE, E1 / E2, and protein P7, while the non-structural proteins Ns2, Ns3, Ns4a, Ns4b, Ns5a and Ns5b are encoded elsewhere in the genome^{2,3}. The hepatitis C virus is divided into 7 genotypes and more than 100 subtypes. Genotypes show a 30% difference in nucleotide sequences and, among similar species, they present a 20% difference in nucleotides (HABIBOLLAHI *et al.*, 2009; SIMMONDS *et al.*, 2005). The variability of the HCV genome is mainly related to the low correction capacity made by the RNA polymerase of the virus during its replication process, causing a high number of mutations⁶. The prevalence and distribution of hepatitis C virus genotypes in the world change according to the continents and geographic regions involved, with the most prevalent genotypes worldwide being type 1, 2 and 3, with subtypes 1a, 1b, 2c and 3a found in all regions of the world. Type 4, 5 and 6 genotypes are more limited and only prevalent in specific and restricted geographic regions. Egypt and sub-Saharan Africa have a prevalence of type 4 genotype, southern Africa a prevalence of genotype 5, and in the regions of Southeast Asia, China and Indochina a greater prevalence of genotype 6⁷⁻⁹.

The infection caused by the hepatitis C virus (HCV) is a serious public health problem, and causes approximately 399,000 deaths per year. In most cases, the virus causes an asymptomatic infection, which increases the risk of progressing to a chronic condition, development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma¹⁰. In about 80% of cases, HCV infections will be asymptomatic and will evolve to a chronic condition. Of these patients, 10 to 20% will develop serious complications and evolve to cirrhosis, and 1 to 5% of these infected patients will develop hepatocellular carcinoma after 20 to 30 years of infection^{11,12}.

According to the guidelines of the World Health Organization (2016), the diagnosis of HCV infection should be made by serological screening tests that search for anti-HCV antibodies against virus proteins, and nucleic acid (NAT) tests that detect HCV viral RNA, and are considered confirmatory tests. Since the discovery of HCV in the late 1980s, the search for diagnostic tests that are sensitive, faster and more easily available, especially for use in regions

that do not have laboratories with sophisticated equipment and/or infrastructure, has been the aim of researchers for decades. In this review article, we will discuss the evolution of screening tests for antibody and RNA detection.

DIAGNOSTIC

The Hepatitis C virus causes liver damage, and often elevates serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), which are non-specific biomarkers for HCV infection. Therefore, according to the guidelines of the Brazilian Ministry of Health, HCV diagnosis is performed by at least two tests: indirect serological tests, used in the screening for specific antibodies to HCV antigens; and direct confirmatory tests, which detect the RNA and can characterize and quantify viral particles. Another direct test used to confirm the active infection of the virus is the detection of the HCV CORE antigen by the use of immunoassays (HCV CORE Ag)¹³. In the next session, we will describe the evolution of serological assays and molecular screening immunoassays.

IMMUNOASSAYS

FIRST-GENERATION ASSAYS

In the 1970s, radioimmunoassays were developed for the detection of antibodies to hepatitis A and hepatitis B viruses in serological screening^{14,15}. Only in the late 1980s, after the discovery of the hepatitis C virus (HCV) in 1989, serological tests were developed based on the detection of antibodies against HCV antigens².

Since then, many immunoassays have been developed to detect anti-HCV antibodies in serum or plasma. The first generation of immunoassays (EIA-1) used to screen HCV employed epitopes of non-structural recombinant protein 4 (Ns4), called c100-3 (**Figure 1**). This epitope region was expressed in yeast and comprised amino acid residues from position 1569 to 1931 in HCV polyprotein. The application of an enzymatic immunoassay in the serological screening revealed that 80% of patients who developed hepatitis after transfusion presented antibodies against epitope c100-3. This method contributed greatly to the reduction of HCV infection caused by transfusions. EIA-1 had low sensitivity in the period when there was a high prevalence of the disease, and presented high levels of false-positive results - around 70% - in blood bank samples, in which they had a low prevalence. These tests provided a long immunological window varying from 6 weeks to 6 months for the detection of antibodies

against c100-3 epitope that was detected in blood samples after acute infection of hepatitis C, and it persists as a reactive in the chronic phase. Due to the problem of transmission of HCV to patients who underwent a blood transfusion still occurring, it was clear that advances in serological screening tests were needed (AACH *et al.*, 1990; ALTER, H. J., 1992; ZEIN; RAKELA; PERSING, 1995).

SECOND-GENERATION ASSAYS

The second-generation enzyme immunoassay method (EIA-2) had an increase in sensitivity and specificity compared to EIA-1. These new enzymatic immunoassays, just like their predecessor, used c100-3 recombinant protein but in addition sensitivity to antigens from regions of CORE proteins (c22-p) and Ns3 (c33c) (**Figure 1**), and its use was approved by the Food and Drug Administration (FDA) in 1992.

Despite showing an improvement in sensitivity and specificity compared to first-generation tests, differences in reactivity between types of genotypes were reported HCV^{17,18}. The addition of epitopes from the structural protein CORE (c22-p) and non-structural protein 3 (Ns3) (c33c) increased the sensitivity to 95%, improving the detection of antibodies in acute and chronic phase of the disease by up to 20% and 10% respectively, when compared to the first-generation method. However, it decreased the immunological window to around 30 to 90 days, and seroconversion to approximately ten weeks^{17,19}.

Notwithstanding these advances, EIA-2 still presented a significant number of false-negative and false-positive results, which made it necessary to implement a supplementary method in order to confirm HCV infection²⁰. The supplemental tests for anti-HCV detection were developed to be a counterproof of positive results, and minimize the number of false-positive results.

A second generation of recombinant immunoblot assays (RIBA-2) was used as a supplementary prototype test in the United States, and had the same HCV recombinant antigens used in EIA-2, but in an immunoblot format. The results of the RIBA-2 method were interpreted as positive when two or more antigens were recognized by antibodies present in the patient's serum; undetermined when only one antigen was positive; and negative when no HCV antigen was detected by anti-HCV antibodies. The use of the RIBA-2 method in the serological screening at blood banks reveals that approximately 50% of positive samples in EIA-2 presented negative results in RIBA-2, indicating false-positive results. However, in regions

with a high prevalence of HCV, 93% of samples with positive results in EIA-2 were also positive in RIBA-2^{21,22}.

THIRD-GENERATION ASSAYS

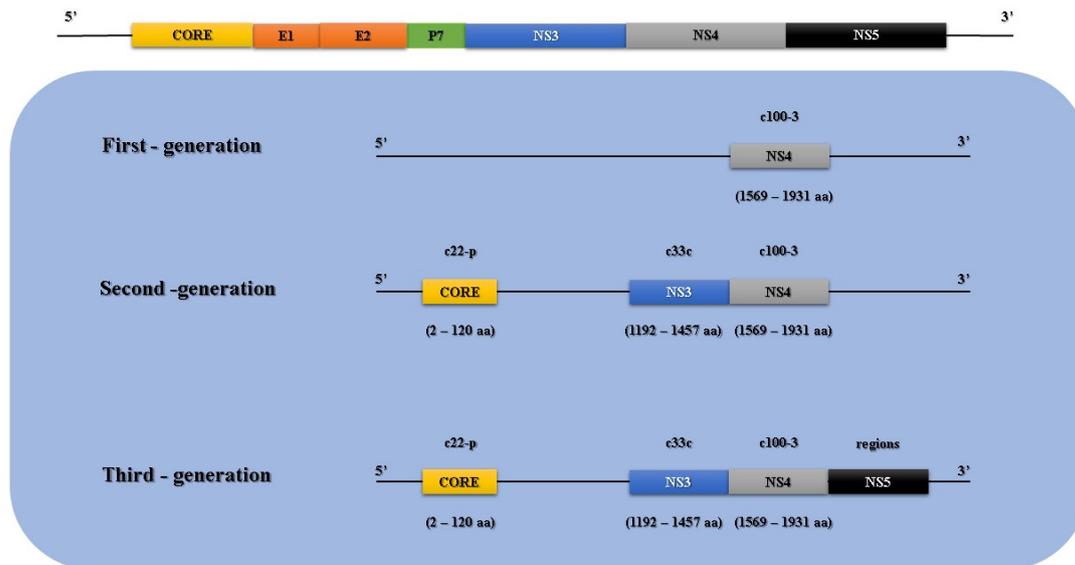
Advances were needed in order to improve the reactivity among the HCV genotypes. Therefore, in association with the CORE, Ns3, and Ns4 proteins already employed, regions of the non-structural recombinant protein 5 (Ns5) (**Figure 1**) were added in commercial tests. This third-generation of enzymatic immunoassay tests (EIA-3) presented high sensitivity and specificity in comparison to EIA-2, thus reducing, even further, the immunological window, and making it possible to detect anti-HCV antibodies during 5 to 6 weeks²³. Patients with spontaneously clearance of HCV may be positive for anti-HCV throughout their lives, however, some people experienced a decrease or even disappearance of antibodies against HCV antigens in further tests throughout their lives (BARRERA et al., 1995; COLIN et al., 2001; KAO et al., 1996; MAKRIS et al., 1995). Despite presenting high specificity and sensibility, false-positive results in patients with autoimmune diseases, mononucleosis infection, syphilis, and pregnancy were still reported. False-negative results were detected in severely immunosuppressed individuals when immunosuppression was caused by HIV infection, hypogammaglobulinemia, and chronic renal patients undergoing hemodialysis²⁴.

The third-generation RIBA (RIBA-3) was used as a supplementary confirmatory test for serological screening tests. This immunoblot assay is positive in 70.4% to 86.6% of people with chronic infection. This method is based on the immobilization of recombinant antigen CORE protein, the structural protein of envelope 2 (E2), Ns3 protein, Ns4 protein and HCV Ns5 membrane protein. For a sample to be confirmed as positive by RIBA, it must be recognized by anti-HCV antibodies in two to four immobilized recombinant antigens. However, it is necessary to remember that screening tests that detect anti-HCV antibodies do not confirm whether an infection has been established or whether the patient has had previous contact with the virus. Therefore, supplementary confirmatory diagnosis using RIBA fell into disuse with the emergence of the nucleic acid amplification test (NAT)^{25,26}.

Figure 1 generations of diagnostic HCV screening tests

MOLECULAR TESTS AND GENOTYPING

Molecular tests are of great importance in the diagnosis and clinical monitoring of HCV.



Currently, the detection of HCV viral nucleic acid (HCV-RNA) is the diagnostic method that is considered as the “gold standard” for confirmation of an active infection, a past infection, or no infection. NAT can detect viral RNA around 4 and 6 weeks before seroconversion²⁷⁻²⁹.

Molecular diagnoses present qualitative and quantitative methods. Qualitative NAT tests use polymerase chain reaction, like conventional reverse transcriptase (RT-PCR) or through transcription-mediated amplification (TMA), which is recommended for the detection of viremia during blood bank screening of candidates for blood donation. This assay was widely used in the past, and was replaced by quantitative NATs using real-time PCR and branched DNA (bDNA) tests, which have greater sensitivity (99%) and specificity (98-99%), and detect less than 20 IU / mL^{30,31}.

After confirmation of HCV infection, determining its genotypes and subtypes is very important in order to decide which treatment therapy will be most effective³². According to the Brazilian Ministry of Health, the molecular tests used to identify the genotypes and subtypes of HCV require the sample to contain at least 500 UI / ml of viral load³³. Currently, the identification of genotypes is done using molecular tests, and based mainly on real-time PCR, sequencing, and reverse hybridization^{34,35}. The difference between genotypes and subtype can be detected by analyzing the 5'UTR and CORE and Ns5B regions^{34,36}.

Another commercially available option for molecular detection is the Xpert HCV Viral Load (Cepheid, Sunnyvale, CA). This option presents an automated system that does not require the expensive equipment for RNA extraction that is used in traditional molecular methods. It can quantify the viral RNA in just 1 ml of serum or plasma samples or even in a drop of blood from a finger puncture, depending on the commercial version. Although this test has 100% specificity, and detects and quantifies the infection in less than an hour, it has a high cost and is unviable for laboratories with low financial resources³⁷⁻³⁹.

OTHER IMMUNOASSAYS USED FOR HCV DIAGNOSIS

ELISA or chemiluminescence can be used for HCV detection when resources are limited, when molecular services are unavailable, or when it is impossible to use them due to the costs. These methods require less technical knowledge and are less expensive when compared to NAT. Studies have reported that screening assays targeting CORE antigens can detect positive samples around 40 days earlier than immunoassays which search for HCV antibodies. Also, for HCV infection, this test presents itself as an alternative confirmatory test to the molecular test, and allows clinical monitoring regardless of the genotype present⁴⁰⁻⁴². Currently, the commercial serological tests considered the gold standard for the detection of antibodies against HCV proteins are the ELISA immunoenzymatic assays OTHO HCV version 3.0 (Ortho Diagnostic Systems, USA) and the Murex anti-HCV 4.0 multiplex assay (Murex Diagnostics, United Kingdom), and have high sensitivity (100%) and specificity (99.4%)^{43,44}. There are also serological tests of competitive enzymatic immunoassays that can identify genotypes 1 to 6 in 90% of chronic patients, and recognize the specific epitopes that are present. Nevertheless, these tests are unable to identify subtypes⁴⁵.

In addition to ELISA, other assays can be used for anti-HCV detection, such as chemiluminescent immunoassays (CLIA), which use chemical reagents to reveal the formation of the antigen-antibody complex, generating light via an enzymatic reaction. Chemiluminescent immunoassays have a specificity of 99.8% and sensitivity of 99.9%. Another variant that presents specificity and sensitivity equivalent to ELISA is the chemiluminescent tests of microparticles (CMIA) (ARCHITECT - Abbott diagnostics, USA), which use microparticles conjugated with antibodies or antigens, and use secondary antibodies conjugated with chemicals that generate light. Chemiluminescent methods use the same principles as ELISA, however, the excitation of chemicals is much more sensitive than colorimetric assays⁴⁶.

Although they are tests with high sensitivity and specificity, they still present some false-positive and false-negative results^{47,48}.

In order to achieve greater sensitivity in screening tests, in addition to enzymes and chemical reagents used to detect antibodies or antigens in screening tests for the hepatitis C virus, diagnostic tests such as VIDAS - BioMerieux (Marcy l'Etoile, France) use conjugates with fluorescence for detecting antibodies against HCV proteins and have better sensitivity and specificity in samples with low antibody titers when compared to the Ortho HCV enzyme immunoassays^{43,49}. Tests that use fluorescence linked to enzymes present satisfactory sensitivity and specificity and are as reliable as chemiluminescent tests. However, in a study with patients who underwent cardiovascular procedures with implantation of a pacemaker or other device, HEINRICHS et al. (2016)³⁸ reported that both chemiluminescent tests and assays using an enzymatic fluorescent presented false-positive results when the results were confirmed using molecular assays.

An alternative for regions that do not have access to specialized laboratory diagnostics is the point-of-care rapid diagnostic tests (RDTs) for HCV screening, however, they still do not have sensitivity and specificity that is equivalent to traditional screening tests⁵⁰. OraQuick-HCV RDT, for example, is used for the detection of antibodies against the hepatitis C virus proteins present in whole blood, plasma, serum, and oral fluid, and can be used in the identification of genotypes; the result is obtained in about 20 minutes. Currently, several companies, such as SD Bioline - Standard Diagnostics, South Korea; Assure HCV Multisure - MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA; INNO-LIA HCV Score INNOGENETICS, Ghent, Belgium, produce rapid tests using recombinant HCV proteins and, according to the manufactures, these present 99% and 100% sensitivity and specificity, respectively^{51,52}. Despite presenting excellent results, rapid tests and traditional tests used in serological screening for the hepatitis C virus present false-positive and false-negative results when compared to the traditional ELISA test, and are costly if used in large-scale testing⁵³. Other commercially available diagnostic test can be find in the table “1”.

Table 1 – Commercially available diagnostic test for HCV

Name	Method	Sample	Target
Xpert HCV Viral Load	Real-Time qPCR (Real-Time Quantitative PCR)	1mL plasma (EDTA) or serum	HCV RNA genotypes 1-6
Xpert HCV VL Fingerstick	Real-Time qRT-PCR (Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR)	100µL of capillary or venous EDTA whole blood	HCV RNA genotypes 1-6

ORTHO HCV Version 3.0 ELISA Test System	enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	human serum, plasma, and cadaveric specimens	antibody against hepatitis C virus (anti-HCV – c22- 3, c200, Ns5)
Murex anti-HCV (version 4.0)	enzyme immunoassay	human serum or plasma	antibody against hepatitis C virus (anti-HCV – Core, Ns3, Ns4 and Ns5)
VIDAS - BioMerieux	ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) technology	human serum or plasma	antibody against hepatitis C virus (anti-HCV – Core, Ns3 and Ns4)
SD Bioline HCV	immunochromatographic rapid test	human serum, plasma or whole blood	antibody against hepatitis C virus (anti-HCV – Core, Ns3, Ns4 and Ns5)
MULTISURE ® HCV Antibody Assay	Rapid Test	Plasma, Serum, Whole Blood	antibody against hepatitis C virus (anti-HCV – Core, Ns3, Ns4 and Ns5)
INNO-LIA HCV Score INNOGENETICS	Line immunoassay	human serum or plasma	antibody against hepatitis C virus (anti-HCV – Core, E2, Ns3, Ns4 and Ns5)
ARCHITECT Anti- HCV assay	Chemiluminescent Microparticle Immunoassay (CMIA)	human serum or plasma	antibody against hepatitis C virus (anti-HCV – HCr43 and c100- 3)
ARCHITECT HCV Ag assay	Chemiluminescent Microparticle Immunoassay (CMIA)	human serum or plasma	Core antigen

CONCLUSION

Since the discovery of the hepatitis C virus, there has been a vast evolution in diagnostic screening tests that use recombinant proteins or peptides to detect anti-HCV antibodies. The technological advances observed in the first, second, and third-generation have reduced the window for detecting antibodies to the virus, thus reducing contamination through transfusions by blood banks. However, despite the high sensitivity and specificity currently presented by molecular tests, these remain costly, requiring better equipment, more infrastructure and specialized staff.

Increasing test performance via lateral flow tests, for example, could indicate a way to reduce costs, thus facilitating technological dissemination in isolated regions, since they are often precarious, low-income regions, without specialized laboratories to perform the tests on the population. Likewise, the development of portable equipment with high analysis capacity and capable being used in the field for the execution of molecular tests may be a way to achieve

this same objective. Therefore, the development of highly sensitive, specific, and low-cost technologies to detect and confirm HCV infection is still extremely important in order to achieve worldwide HCV eradication in the future.

REFERENCES

1. Moradpour, D. & Blum, H. E. A primer on the molecular virology of hepatitis C. *Liver Int.* **24**, 519–525 (2004).
2. Choo, Q. *et al.* Isolation of a cDNA Clone Derived from a Blood- Borne Non-A , Non-B Viral Hepatitis Genome. *Sci. Rep.* **13545**, (1988).
3. Shukla, D., Hoyne, P. & Ward, C. Evaluation of complete genome sequences and sequences of individual gene products for the classification of hepatitis C viruses. *Arch. Virol.* **140**, 1747–1761 (1995).
4. Habibollahi, P., Safari, S., Daryani, N. & Alavian, S. Occult hepatitis B infection and its possible impact on chronic hepatitis C virus infection. *Saudi J. Gastroenterol.* **15**, 220 (2009).
5. Simmonds, P. *et al.* Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* **42**, 962–973 (2005).
6. Duffy, S., Shackelton, L. A. & Holmes, E. C. Rates of evolutionary change in viruses: Patterns and determinants. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 267–276 (2008).
7. Gower, E., Estes, C., Blach, S., Razavi-Shearer, K. & Razavi, H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.* **61**, S45–S57 (2014).
8. Lopes, C. L. R. *et al.* Prevalência, fatores de risco e genótipos da hepatite C entre usuários de drogas. *Rev. Saude Publica* **43**, 43–50 (2009).
9. Pasquier, C. *et al.* Distribution and Heterogeneity of Hepatitis C Genotypes in Hepatitis Patients in Cameroon. *J. Med. Virol.* **398**, 390–398 (2005).
10. World Health Organization. WHO Prequalification of In Vitro Diagnostics PUBLIC REPORT Product : OraQuick HIV Self-Test WHO reference number : PQDx 0159-055-01. **2**, 1–16 (2017).
11. Lavanchy, D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 107–115 (2011).
12. Zaltron, S., Spinetti, A., Biasi, L., Baiguera, C. & Castelli, F. Chronic HCV infection: epidemiological and clinical relevance. *BMC Infect. Dis.* **12**, S2 (2012).
13. Ministério da Saude do Brasil. Protocolo Clínico E Diretrizes Terapêuticas De

- Osteoporose. (2016).
14. Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z., Purcell, R. H., Alter, H. J. & Holland, P. V. Transfusion-Associated Hepatitis Not Due to Viral Hepatitis Type A or B. *N. Engl. J. Med.* **292**, 767–770 (1975).
 15. Knodell, R. G., Conrad, M. E., Dienstag, J. L. & Bell, C. J. Etiological spectrum of post transfusion hepatitis. *Gastroenterology* **69**, 1278–1285 (1975).
 16. Aach, R. D. *et al.* Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. *New English J. Med.* **323**, 1120–1123 (1990).
 17. Alter, H. J. New kit on the block: Evaluation of second-generation assays for detection of antibody to the hepatitis C virus. *Hepatology* **15**, 350–353 (1992).
 18. Zein, N. N., Rakela, J. & Persing, D. H. Genotype-Dependent Serologic Reactivities in Patients Infected With Hepatitis C Virus in the United States. *Mayo Clin. Proc.* **70**, 449–452 (1995).
 19. GRETCH, D. R. Diagnostic Tests for Hepatitis C. *Hepatology* 1–5 (1997).
 20. Schroter, M. *et al.* Strategies for Reliable Diagnosis of Hepatitis C Infection: The Need for a Serological Confirmatory Assay. *J. Med. Virol.* **324**, 320–324 (2001).
 21. Alter, H J; Tegtmeier, GE; Jett, BW; Quan , S; Shih, JW; Bayer; WL; Polito, A. The use of a recombinant immunoblot assay in the interpretation of anti- hepatitis C virus reactivity among prospectively followed patients, implicated donors, and random donors. *Transfusion* **31**, 771–776 (1991).
 22. Evans, C. S. *et al.* Comparative evaluation of supplemental hepatitis C virus antibody test systems. *Transfusion* **32**, 408–414 (1992).
 23. Netski, D. M. *et al.* Humoral Immune Response in Acute Hepatitis C Virus Infection. *Clin. Infect. Dis.* **41**, 667–675 (2005).
 24. Kalantar-Zadeh, K., Miller, L. G. & Daar, E. S. Diagnostic discordance for hepatitis C virus infection in hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* **46**, 290–300 (2005).
 25. Alter, M. J., Kuhnert, W. L. & Finelli, L. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR. Recomm. Rep.* **52**, 1–134 (2003).
 26. Armstrong, G. L. *et al.* Annals of Internal Medicine Article The Prevalence of Hepatitis C Virus Infection in the United States , 1999 through 2002. *Ann. Intern. Med.* **144**, 706–20 (2006).
 27. Glynn, S. A. *et al.* Dynamics of viremia in early hepatitis C virus infection. *Transfusion* **45**, 994–1002 (2005).

28. Kamal, S. M. Acute Hepatitis C: A Systematic Review. *Am. J. Gastroenterol.* **103**, 1283 (2008).
29. Maheshwari, A., Ray, S. & Thuluvath, P. J. Acute hepatitis C. *Lancet* **372**, 321–332 (2008).
30. Ghany, M. G., Strader, D. B., Thomas, D. L. & Seeff, L. B. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: An update. *Hepatology* **49**, 1335–1374 (2009).
31. JD, S. & DR, G. Molecular diagnostics of hepatitis c virus infection: A systematic review. *JAMA* **297**, 724–732 (2007).
32. Bowden, D. S. & Berzsenyi, M. D. Chronic hepatitis C virus infection: genotyping and its clinical role. *Future Microbiol.* **1**, 103–12 (2006).
33. Ministério da Saúde Brasil. *Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções: Relatório de Recomendação*. Ministério da Saúde (2018).
34. Chevaliez, S. & Pawlotsky, J. Virological techniques for the diagnosis and monitoring of hepatitis B and C. *Ann Hepatol* **8**, 7–12 (2009).
35. Stelzl, E. *et al.* Determination of the hepatitis C virus subtype: comparison of sequencing and reverse hybridization assays. *Clin. Chem. Lab. Med.* **45**, 167–170 (2007).
36. Shinol, R. C., Gale, H. B. & Kan, V. L. Performance of the abbot realtime HCV genotype II RUO assay. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 3099–3101 (2012).
37. Grebely, J., Applegate, T. L., Cunningham, P. & Feld, J. J. Hepatitis C point-of-care diagnostics: in search of a single visit diagnosis. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **17**, 1109–1115 (2017).
38. Heinrichs, A., Antoine, M., Steensels, D., Montesinos, I. & Delforge, M. L. HCV false positive immunoassays in patients with LVAD: A potential trap! *J. Clin. Virol.* **78**, 44–46 (2016).
39. Lamoury, F. M. J. *et al.* Evaluation of the Xpert HCV Viral Load Finger-Stick Point-of-Care Assay. *J. Infect. Dis.* **217**, 1889–1896 (2018).
40. Gaudy, C. *et al.* Usefulness of the hepatitis C virus core antigen assay for screening of a population undergoing routine medical checkup. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 1722–1726 (2005).
41. Kesli, R., Polat, H., Terzi, Y., Kurtoglu, M. G. & Uyar, Y. Comparison of a newly developed automated and quantitative hepatitis C virus (HCV) core antigen test with the HCV RNA assay for clinical usefulness in confirming anti-HCV results. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 4089–4093 (2011).
42. Seme, K., Poljak, M., Babič, D. Z., Močilnik, T. & Vince, A. The role of core antigen

- detection in management of hepatitis C: A critical review. *J. Clin. Virol.* **32**, 92–101 (2005).
43. ORTHO. Hepatitis C Virus Encoded Antigen. *Control* 1–15 (2009).
 44. World Health Organization. GLOBAL HEPATITIS REPORT, 2017. in *Polyhedron* **50**, 215–218 (2107).
 45. Montenegro, L., De Michina, A., Misciagna, G., Guerra, V. & Di Leo, A. Virus C hepatitis and type 2 diabetes: A cohort study in Southern Italy. *Am. J. Gastroenterol.* **108**, 1108–1111 (2013).
 46. Ilyas, M. & Ahmad, I. Chemiluminescent microparticle immunoassay based detection and prevalence of HCV infection in district Peshawar Pakistan. *Virol. J.* **11**, 1–5 (2014).
 47. Myrmel, H., Navaratnam, V. & Åsjø, B. Detection of antibodies to hepatitis C virus: False-negative results in an automated chemiluminescent microparticle immunoassay (ARCHITECT® Anti-HCV) compared to a microparticle enzyme immunoassay (AxSYM HCV Version 3.0). *J. Clin. Virol.* **34**, 211–215 (2005).
 48. Wadood, M. & Usman, M. Comparative Analysis of Electrochemiluminescence Assay and Chemiluminescent Microparticle Immunoassay for the Screening of Hepatitis C. *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* **35**, 131–136 (2019).
 49. Seignerres, B. *et al.* Performance evaluation of VIDAS Anti-HCV, a new automated immunoassay test for the qualitative detection of antibodies anti-HCV in human serum and plasma samples. *Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**, 679 (2012).
 50. WHO. *Guidelines for the care and treatment of persons diagnosed with chronic hepatitis C virus infection.* Who (2018).
 51. DeWeerd, S. testing journey. *Nature* **474**, 20–21 (2011).
 52. OraSure Technologies. Ofreciendo un diagnóstico a lo que aún no ha sido diagnosticado Presentación del OraQuick VHC. in (2009).
 53. Sharafi, H. *et al.* Performance of a rapid diagnostic test for screening of hepatitis C in a real-life prison setting. *J. Clin. Virol.* **113**, 20–23 (2019).

CAPÍTULO 2

**1º artigo original, publicado na revista científica
“Biotechnology & Biotechnological Equipment”**

Capítulo 2

Development of an immunoassay for the detection of human IgG against Hepatitis C Virus proteins using magnetic beads and flow cytometry

Walter Luiz Lima Neves^{*a,b}, Luis André Morais Mariuba^{*a,b,g,h}, Késsia Caroline Souza Alves^b, Kerolaine Fonseca Coelho^{c,d}, Andrea Monteiro Tarragô^{a,c,d}, Allyson Guimarães Costa^{a,c,d,ef}, Yury Oliveira Chaves^g, Flamir da Silva Victoria^{e,f}, Marilu Barbieri Victoria^{e,f}, Adriana Malheiro^{a,b,d,e}

A. Post-graduate Program in Basic and Applied Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil;

B. Post-graduate Program in Biotechnology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil;

C. Department of Education and Research, Amazonas Hospital Foundation of Hematology and Hemotherapy (HEMOAM), Manaus, AM, Brazil;

D. Post-graduate Program in Tropical Medicine, State University of Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil;

E. Post-graduate Program in Hematology Sciences, State University of Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil;

F. Carlos Borborema Clinical Research Institute, Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, AM, Brazil;

G. Leonidas & Maria Deane Research Institute, FIOCRUZ-Amazônia, Manaus, AM, Brazil.

H. Postgraduate Program *Stricto sensu* in Cellular and Molecular Biology of the Oswaldo Cruz Institute (PGBCM/IOC/Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil

*Both authors contributed equally to this work.

**CONTACT: walterluizbiomedicina@hotmail.com

Abstract: Hepatitis C is a public health problem worldwide, affecting chronically about 71 million people, or 1% of the world population. The early detection of infection in clinical practice routine and blood donors is still important, being necessary for the development of new specific, sensitive, reliable tests that can improve the screening of HCV infection. Flow cytometry beads assay opens the possibility to detect multiple antigens, decrease cross-reactivity, increase in the sensitivity, with low sample volumes. Here, we describe proof-of-concept of a method for anti-Core and anti-NS5a detection using magnetic beads and flow cytometry. The immunoassay presented 93.33% sensitivity and 100% specificity for rCore magnetic beads (MgBs), and 93.33% sensitivity and 96.67% specificity for rctNs5a MgBs. The accuracy values for the tests using rCore and rctNs5a MgBs were 96.67% and 95%, respectively. The results of the ROC curve were 0.97 and 0.99 for rCore and rctNs5a MgBs, respectively. Therefore, we concluded that the method presented here for the detection of anti-HCV antibodies using magnetic beads analyzed by flow cytometry showed promising results, achieving satisfactory sensitivity and specificity values, with future potential to be an alternative method for screening anti-HCV antibodies in blood banks and blood centers.

Keywords: recombinant protein, Hepatitis C, cytometry, antibody, magnetic beads, Immunoassay

Introduction

Hepatitis C is a public health problem worldwide, affecting chronically about 71 million people, or 1% of the world population. The mortality per year of people afflicted with chronic infection of hepatitis C virus (HCV), reaches approximately 399,000, being caused by severe liver diseases such as cirrhosis and hepatocellular carcinoma (1). Approximately 11.9 new cases per 100.000 are confirmed for the HCV in Brazil (2).

The viral genome of HCV consists of ribonucleic acid of a single strand, with positive polarity composed of 9,600 nucleotides and a coding region with a long open reading frame that expresses a polyprotein with 3000 amino acids (3). Between the structural proteins expressed, the one called “Core” is highly conserved in all genotypes and forms the viral nucleocapsid (4,5). Among the non-structural proteins is the “Ns5a”, which is a protein that has conserved regions in different genotypes and contributes to viral replication, pathogenesis, modulation of cell signaling pathways and apoptosis of the host cell (6–8).

According to the guidelines of the World Health Organization (1), the diagnosis of HCV infection can be made by serologic and molecular assays. The serological screening tests detect antibodies against proteins of the virus, the enzymatic immunoassay (EIA) being commonly used in routine laboratory practice for the detection of anti-HCV antibodies in serum and plasma of patients (9).

Although the diagnostic tests used for HCV detection present a significant evolution and its incidence has decreased enough in developed countries, a large portion of the world population have an undiagnosed asymptomatic infection and live with severe problems related to the liver. In addition, the screening tests give false-negative results in the window period in patients with low titers of antibody, or false-positive in some autoimmune diseases or infections by other pathogens (10). Thus, the early detection of infection in routine clinical practice and blood donors is still important, which calls for the development of new specific, sensitive, reliable tests that can improve the screening of HCV infection.

Single and multiplex immunoassays using flow cytometry and beads coupled with proteins or antibodies are a potent diagnostic methodology for the identification and confirmation of microbial antigens in biological samples in infectious diseases. The results of these studies have demonstrated significant gains in time, cost, sensitivity and specificity of the diagnostics, mainly in assays using different antigens at the same time (11,12).

Thus, we present here a proof-of-concept of an immunodiagnostic method to detect antibodies against Core and Ns5a proteins of the hepatitis C virus using its recombinant forms coupled to functionalized magnetic microbeads associated to flow cytometry. This test may become an alternative for the detection of HCV infections, with reliable sensitivity and specificity.

Subjects and methods

Recombinant protein expression and purification

Synthetic genes were designed for recombinant protein production. They were based on the GenBank accession ACJ37216.1 (gi|212675045, polyprotein [Hepatitis C virus *subtype 1a*, NCBI]). The genes were optimized for *Escherichia coli* using the software offered by the manufacturer IDT - Integrated DNA Technologies. The 594-bp core gene was synthesized, flanked with the restriction enzyme sites of *XhoI* / *PstI*, 5' and 3', respectively. The Ns5a gene C- terminus (ctNs5a), comprising 692 bp and was constructed with restriction sites for *BamHI/PstI* enzymes. The amino-acid sequences were analyzed in the Protparam program, which predicted the molecular mass, GRAVY, among other parameters. The synthetic genes were excised, purified by gel extraction kit QIAquick (QIAGEN), according to the manufacturer's instructions. Subsequently, the fragments were ligated to the pRSET expression vector (*Invitrogen*), and competent cells of *Escherichia coli*, strain TOP 10, were transformed with this plasmid. Cloning of the insert was confirmed through enzymatic restriction and sequencing in an Abi a 3100 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*). *E. coli*, strain BL21 (DE3) pLysS, competent cells were transformed with the plasmid through electroporation. Expression of proteins was performed in 500 mL of LB medium, with 1 mmol/L IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside), at 37 °C, under constant agitation, for three hours.

Recombinant proteins were purified using an NTA-Ni column (Qiagen[®]), following the manufacturer's instructions. The proteins were separated by 15% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (**Figure 1B**) (13). The proteins were quantified using the Bradford method (*Bio-Rad*[®]). The presence of the polyhistidine tag in the recombinant antigen was confirmed by immunoblotting (14). For this, proteins were separated by 15% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane using electrotransfer (*Semidry system, Bio-rad, Hercules, USA*) (13). Subsequently, the visualization

was performed using a commercial WesternBreeze kit (*Invitrogen*), following the manufacturer's recommendations.

Magnetic beads preparation

Purified proteins were coupled in BcMag carboxy-terminated magnetic beads (Bioclone Inc.). For this, 20 mg of magnetic microbeads were activated according to the manufacturer's instructions. After the first wash with ultrapure water, coupling buffer (10 mmol/L potassium phosphate + 0.15 mol/L NaCl pH 5.5) was added and beads were incubated for 3 minutes at room temperature without stirring. Then, the supernatant was removed, and this process was repeated twice. Subsequently, 10 µg of purified proteins were put in contact with the activated beads, homogenized by agitation using a vortex for 3 minutes; 3 mmol/L of EDAC (N-Ethyl-N'-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride) were added and this mixture was incubated

at 4 °C for 24 hours. Beads coupled with recombinant proteins were washed 2 times with 1 mL of the washing buffer (10 mmol/L Tris base + 0.15 mol/L NaCl + 0.1% BSA

+ 1 mmol/L EDTA+ 0.1% Sodium azide - pH 7.5). After washing, the solution containing HCV proteins coupled to magnetic beads was blocked with 500 µL of 1 mol/L glycine, pH 8.0, for 1-2 hours. After the blocking period, the solution was washed twice with a washing buffer and stored at 4 °C until its use.

Ethics approval and consent to participate

This study was approved with written consent by the Ethics Committee Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas with the approval number of CAAE: 49652815.8.0000.0009. Written informed consent was obtained from all the participants.

Sample collection

To evaluate the proposed test, the samples included in this study consist of patients with a confirmed diagnosis of chronic hepatitis C. Sample collection was made at Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) with patients who agreed to participate in the study by signing the Term of Informed consent of the approved project. Both sexes were included, aged between 18 and 70 years old, with and without prior treatment or presence of fibrosis (F1-F2 and F3-F4). Indigenous patients were not included, or pregnant women or any patients who presented co- infection. The control group included candidates who attended at the blood donation at Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia

do Amazonas (FHEMOAM), of both sexes, with a minimum age of 18 years, resident in Manaus. The control group samples did not present reactivity to any infection evaluated in serological and molecular screening tests. Standardization of immunodiagnostic tests occurred with 30 analyzed HCV positive (HCV+) samples without any previous treatment: 21 samples from male patients with ages ranging from 29 to 59 years, and nine samples from HCV+ female patients with ages ranging from 49 to 78 years.

Flow cytometry antibody detection using magnetic beads

For the detection of anti-Core and anti-ctNs5a, 1 μ L of suspension of magnetic beads with coupled HCV proteins was added in 50 μ L of samples in dilution of 1:200 with PBS (samples were treated previously with 10% *E. coli* BL21 (DE3) pLysS bacterial lysate for the blockade of any possible anti-*E. coli* antibodies present in human serum). This mixture was incubated with gentle agitation for 30 minutes, at room temperature, protected from the light. Then, the beads were washed with PBS-W (Phosphate Buffered Saline 1x + 0.5% Bovine Serum Albumin) and harvested at 0.3 g for 5 minutes. The supernatant was discarded and 1 μ L of the secondary antibody (anti-IgG human Alexa Flour 488, Invitrogen) was added and homogenized and incubated for 30 minutes. Subsequently, magnetic beads were washed three times with PBS-W and read in the BD FACS Canto II flow cytometer. All procedures were done in a magnetic bead's separation rack. Only magnetic beads and beads coupled with proteins but without primary antibody were used as a negative control. Median fluorescence intensity (MFI) was obtained excluding the values acquired by magnetic beads without modifications in histogram graphic analysis using FlowJo software v.10.

Data analysis

FlowJo® software v.10 program was used for flow cytometry result analysis, calculating the median fluorescence intensity (MFI) and cutoff point, removing the normal bead fluorescence. The statistical and graphic analyses were done in GrahPadPrism® software v.7 program, the cutoff point being obtained by adding the average of the negative samples plus two times their standard deviation. For HCV positive samples, Mann–Whitney test was performed with $P < 0.0001$ in both beads/HCV-Core and beads/HCV-NS5A C-terminal tests. ROC curve test was used to determine the test sensitivity and specificity.

Results and discussion

HCV genotype type 1 presented high prevalence

Among the analyzed samples, the most frequent HCV genotype was type 1 (70%), followed by type 3 (20%), type 2 (6.66%) and a sample with type 1 and type 2 (3.33%), superinfection with the presence of two genotypes.

The HCV genotype distribution observed in our study corroborates to the prevalence found in Brazil with the highest frequency of genotype 1 followed by genotype 3 and genotype 2 (15) Araújo et al. (16) in their study characterizing hepatitis C virus genotypes of patients in the state of Amazonas, also obtained results with higher prevalence of genotype 1 followed by genotypes 3 and 2.

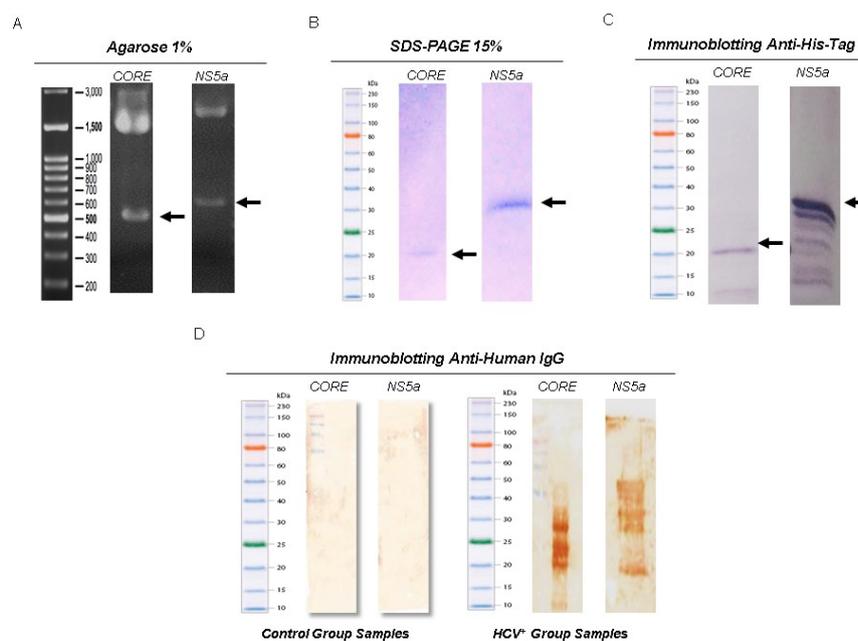


Figure 1 - Confirmation and expression of recombinant proteins and analysis of reactivity against anti-HCV antibodies. **(A)** Confirmation by restriction enzyme of the correct insertion of recombinant genes. Lane 1, molecular weight marker (*Jena Bioscience*); Lane 2, recombinant protein CORE gene with ~594 bp; Lane 3, recombinant protein gene ctNS5a (~692 bp) to the expression vector pRSET A (~2897 bp). **(B)** SDS PAGE (15%) of the purified CORE (rCORE) and ctNS5a (rctNS5a) recombinant proteins. **(C)** Western blot with anti-histidine tag against rCORE and rctNS5a. **(D)** Immunoblot using a pool of 10 HCV+ sera against the rCORE (well 1) and against the rctNS5a (well 2). Immunoblot using a pool of HCV negative serum did not present any reactivity against the proteins.

Recombinant proteins were successfully obtained from soluble *E. coli* fraction

Recombinant his-tagged HCV Core and NS5a were successfully expressed and purified using *E. coli* host and nickel column purification system. In our experiments, it was possible to obtain around 5 mg of rCore and 8 mg of NS5a per liter of culture using the described method. Proteins of molecular weight lower than the expected were detected, and probably correspond to c-terminal cleavages of recombinant proteins during the expression process.

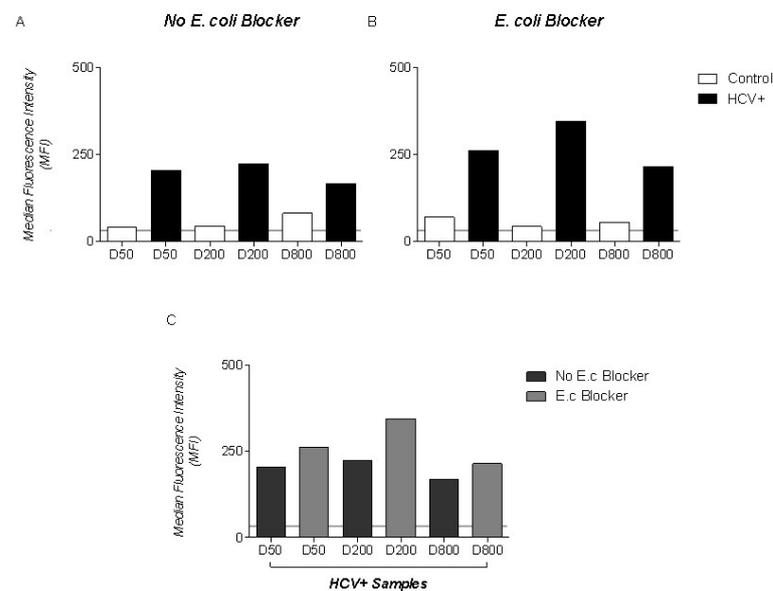


Figure 2 - Comparisons between the concentrations of primary antibodies with or without the presence of bacterial lysate. (A) Pools of ten HCV negative samples and pools of 10 HCV+ samples diluted at concentrations of 1:50, 1:200 and 1:800, without the addition of bacterial lysate proteins. (B) Analysis of negative and positive samples at 1:50 1:200 and 1:800 dilutions adsorbed with 10% of bacterial lysate. (C) Comparison of HCV+ pools with and without the addition of bacterial protein lysate.

E. coli lysate reduces non-specific reactivity in magnetic bead assay

MFI observed in HCV+ samples was higher when bacterial lysate adsorption was used. Our test was standardized using serum samples at 1:200 dilutions plus 10% of *E. coli* lysate. We noted that although the gene sequence of the recombinant ctNS5a (rctNS5a) and Core (rCore) were obtained from genotype 1a, antibodies of genotypes 2 and 3 infection samples could recognize the produced proteins coupled to magnetic beads (**Figure 2**). Analysis of negative and positive HCV samples for both recombinant proteins with magnetic beads (MgBs) showed statistically significant results ($P < 0.0001$) (**Figure 3**), MFI from rCore-MgBs being higher than rctNS5a-MgBs.

There was also a decrease in non-specific reactivity after the use of 10% of *E. coli* BL21 DE3 pLysS bacterial lysate in the serum samples. Other authors reported the use of bacterial protein lysate for the improvement of MFI in positive samples and 1:200 dilution offers a greater recognition of HCV antibodies (17,18). Crestani et al. (17) added bacterial lysate in samples at 3% final concentration and observed an improvement in their bead assay specificity using recombinant proteins. It is important to point out that many recombinant proteins are produced in *E. coli* and even after many purification steps, it is possible to present impurities. The positive effect of the addition of bacterial lysate to the sample could be explained by the blocking of human serum anti-*E. coli* antibodies from bead interaction.

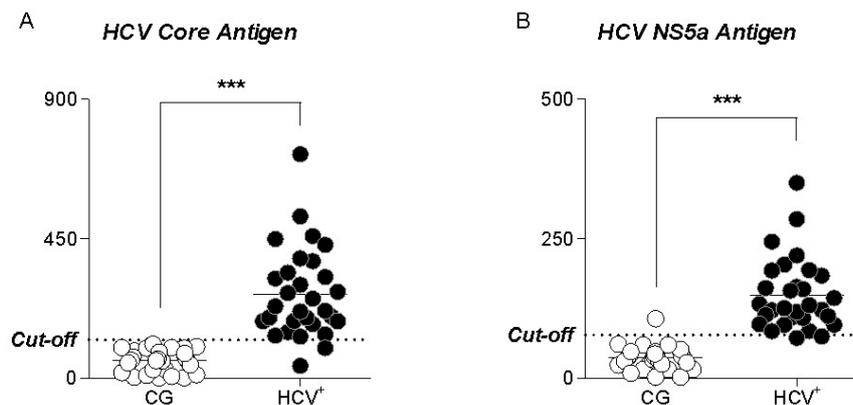


Figure 3 - Comparison of MFI between 30 HCV+ samples and 30 negative HCV samples using beads coupled with rCORE (A) and rctNs5a (B).

Note: Panel (A) shows the highest recognition of anti-Core HCV antibodies present in HCV+ samples. No recognition of the control samples getting all below the cutoff. Panel (B) We observed increased recognition of Anti-ctNs5a antibodies in HCV + samples compared to control.

Magnetic bead assay specifically detect HCV positive samples

MFIs of HCV+ samples were higher when compared to those of negative samples (<125MFI), indicating specific reactivity against rCore-MgBs and rctNs5a- MgBs (**Figure 3 A and B**). However, two positive samples presented inconclusive results, since they showed MFIs below the cutoff (MFI = 78), indicating the absence of HCV Core antibodies in these samples. It is essential to point out that these same samples exhibited reactive antibodies to rctNs5a MgBs, showing that not all HCV infections presented a humoral

response to all viral proteins. We also observed that a negative sample presented reactive antibodies against rctNs5a-MgBs with its MFI above the cutoff, representing a possible cross-reactivity against this protein.

The test showed excellent accuracy (96.7% and 95.0%) for rCore and rctNs5a mgBs (**Table 1**). Furthermore, the immunoassay presented 93.3% sensitivity for both proteins, with 100% and 96.7% specificity for rCore-MgBs and rctNs5a-MgBs, respectively. Negative predictive value (NPV) of 93.8% and 93.6%, and positive predictive value (PPV) of 100% and 96.7%, indicating a high probability of the disease presence when the test is positive. Finally, the results of the ROC curve were 0.97 and 0.99 for rCore (**Figure 4A**) and rctNs5a MgBs (**Figure 4B**), respectively.

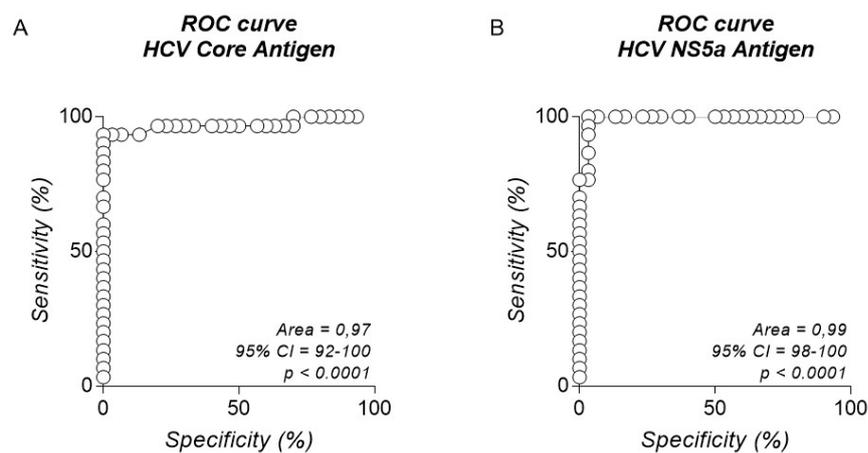


Figure 4 - ROC curve. Analysis of positive and negative HCV samples by flow cytometry using beads coupled with Core (A) and ctNs5a (B) recombinant protein, presenting areas of 0.97 and 0.99, respectively.

Table 1 - Sensitivity and specificity parameters of tests

Antigen	Accuracy % (95% CI)	Sensitivity % (95% CI)	Specificity % (95% CI)	PPV % (95% CI)	NPV % (95% CI)
Core	95.0 (86.3-98.3)	93.3 (78.7-98.2)	96.7 (83.3-99.4)	96.6 (82.8-99.4)	93.6 (79.3-98.2)
NS5a	96.7 (88.6-99.1)	93.3 (78.7-98.2)	100.0 (88.7-100.0)	100.0 (87.9-100.0)	94 (79.9-98.3)

The high sensitivity and specificity obtained in the assay presented here demonstrated that the test developed here is useful for detection of anti-HCV antibodies, allowing detection in dilutions as low as 1:200 and corroborating with literature. Core protein

has a high recognition of reactive antibodies using different immunoassays. Fonseca et al. (18) observed a sensitivity of 55.9% and specificity of 100%, PPV 100%, and NPV 69.4% in their standardized assay using commercial Luminex beads with Ns5 protein. When they analyzed individually, there was an improvement when tested in a multiplex format. McHugh et al. (19) also reported a high performance in their test using microsphere-coupled Core and Ns3 and cytometry reading, reaching sensitivity five times higher than the ELISA test. These results demonstrate the enormous potential of using microbeads and flow cytometry in screening for anti-HCV antibodies.

The use of magnetic beads brought advantages in the execution of the test since the entire process of concentration of the beads was carried out in a magnetic beads separation rack, excluding the need for centrifugation, thus preventing the compaction of impurities with the sample. Another point that should be highlighted is the practicality in immobilizing proteins to these beads and the possibility of standardizing the method to use minimal concentrations of the antigen. Meng et al. (20) also described high sensitivity and specificity in the identification of *Staphylococcus aureus* using the same approach used here, using minimal concentrations of capture protein in the beads. It is worth noting that the antigens and antibodies used in immunoassays are one of the most expensive elements in commercial kits. Therefore, reducing its use to very low quantities leads to a reduction in the analysis' cost. Ondigo et al. (21) also applied the flow cytometry beads assay in their work to detect multiple antigens of *Plasmodium falciparum*, and observed a decrease in cross-reactivity, reduction of the antigen concentration used, an increase in the sensitivity of the test, allowing the use of sample dilutions 5 times lower than those used in other tests. They also described a decrease in the time of diagnosis and an increase in the range of detection of antigens.

Unlike other immunoassays such as ELISA and immunoblot, immunoassays using flow cytometers apply lasers that recognize only the soluble particles marked and of pre-established size. Recent studies have demonstrated its potential use in new applications (22,23). This methodology presents a minimum interference of unmarked particles, thus allowing reduction of the washing steps, handling and testing time (24,25). Commercial enzymatic immunoassays take about 2 hours to be executed. In our study, the use of flow cytometry, in association with magnetic beads, this time was reduced to 1 hour and 30 minutes, mainly due to the quick separation of the beads during all procedures and the fast reading process of the equipment. The technique described here could allow the reduction in test cost, sample volume, time for result and can open the possibility for multiple tests

(18,26). It can also be applied to analyze the treatment response of patients according to anti-NS5a titers (27) and anti-core titers to distinguish acute and chronic HCV infection (28).

Conclusions

This study demonstrated that the method presented here for the detection of anti-HCV antibodies using magnetic beads analyzed by flow cytometry showed promising results, achieving satisfactory sensitivity and specificity values, promising to be in the future an alternative method for screening anti-HCV antibodies in blood banks and blood centers. However, more studies must be made, applying the same methodology to other proteins of HCV and evaluating it in a multiplex format with principal structural and non-structural proteins of the Hepatitis C virus. Future work will also expand the number of samples and analyze the cross-reactivity with other epidemic diseases in the region.

Ethics approval and consent to participate

This study was approved with written consent by the Ethics Committee Amazonas Hospital Foundation of Hematology and Hemotherapy (HEMOAM), with the approval number of CAAE: 49652815.8.0000.0009, and written informed consent was obtained from all the participants

Funding:

This work was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) (Pró-Estado Program - #002/2008 and PAPAC Program - #005/2019), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Universal Program - Process #407818/2016) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). WLLN and KCF have a fellowship from CAPES and FAPEAM (Ph.D. and Master student). AM is a level 2 research fellow from CNPq. The funders had no role in study design, data collection, and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Conflicts of interest

All authors declare that they have no competing interests regarding this manuscript.

References

1. World Health Organization. Global Hepatitis Report, 2017. World Health Organisation. 2017.

2. BRASIL. Ministério da Saúde. Hepatites virais - Boletim Epidemiológico. Ministério da Saúde. 2018;49(31):1–69.
3. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-a, non-b viral hepatitis genome. *Science* (80-). 1989;244(4902):359–62.
4. Gawlik K, Science M, Jolla L, Gallay PA, Science M, Jolla L. HCV core protein and virus assembly: what we know without structures. *Immunol Res.* 5406;60(1):1–10.
5. Bukh J, Purcell RH, Miller RH. Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(August 1994):8239–43.
6. Gale MJ, Korth MJ, Tang NM, Tan SL, Hopkins DA, Dever TE, et al. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology.* 1997;230(2):217–27.
7. Macdonald A, Crowder K, Street A, McCormick C, Harris M, Harris M. The hepatitis C virus NS5A protein binds to members of the Src family of tyrosine kinases and regulates kinase activity. *J Gen Virol.* 2004;85(11):721–9.
8. Meigang Gu, Charles RM. Structures of hepatitis C virus nonstructural proteins required. *Curr Opin Virol.* 2013;3(2).
9. Alborino F, Burighel A, Tiller FW, Van Helden J, Gabriel C, Raineri A, et al. Multicenter evaluation of a fully automated third-generation anti-HCV antibody screening test with excellent sensitivity and specificity. *Med Microbiol Immunol.* 2011;200(2):77–83.
10. Moorman AC, Drobenuic J, Kamili S. Prevalence of false-positive hepatitis C antibody results, National Health and Nutrition Examination Study (NHANES) 2007–2012. *J Clin Virol* [Internet]. 2017;89:1–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2017.01.007>
11. Binder SR. Autoantibody detection using multiplex technologies. *Lupus.* 2006;15(7):412–21.
12. Ernst D, Bolton G, Recktenwald D, Cameron MJ, Danesh A, Persad D, et al. Bead-Based Flow Cytometric Assays: A Multiplex Assay Platform with Applications in Diagnostic Microbiology. In: *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2006. p. 427–43. Available from: http://link.springer.com/10.1007/0-387-32892-0_25
13. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual* [Internet]. Cold Spring Harbor Laboratory; 1982. 545 p. (A Manual for genetic engineering). Available from: <http://books.google.com.br/books?id=HZRqAAAAMAAJ>

14. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* [Internet]. 1979 Jan;24(9):145–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1422008>
15. Campiotto S, Pinho JRR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJD, Spinelli V, et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Brazilian J Med Biol Res*. 2005;38(1):41–9.
16. Araújo AR, de Almeida CM, Fraporti L, Garcia N, de Lima TA, Maia LPV, et al. Caracterização do vírus da hepatite C em pacientes com hepatite crônica: Genótipos no eStado do Amazonas, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(5):638–40.
17. Crestani S, Leitolis A, Lima LFO, Krieger MA, Foti L. Enhanced target-specific signal detection using an *Escherichia coli* lysate in multiplex microbead immunoassays with *E. coli*-derived recombinant antigens. *J Immunol Methods*. 2016;435(May):17–26.
18. Fonseca BPF, Marques CFS, Nascimento LD, Mello MB, Silva LBR, Rubim NM, et al. Development of a Multiplex Bead-Based Assay for Detection of Hepatitis C Virus. *Clin Vaccine Immunol*. 2011;18(5):802–6.
19. McHugh TM, Viele MK, Chase ES, Recktenwald DJ. The sensitive detection and quantitation of antibody to HCV by using a microsphere-based immunoassay and flow cytometry. *Cytometry*. 1997;29(2):106–12.
20. Meng X, Yang G, Li F, Liang T, Lai W, Xu H. Sensitive Detection of *Staphylococcus aureus* with Vancomycin-Conjugated Magnetic Beads as Enrichment Carriers Combined with Flow Cytometry. *ACS Appl Mater Interfaces* [Internet]. 2017 Jun 28;9(25):21464–72. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsami.7b05479>
21. Ondigo BN, Park GS, Gose SO, Ho BM, Ochola LA, Ayodo GO, et al. Standardization and validation of a cytometric bead assay to assess antibodies to multiple *Plasmodium falciparum* recombinant antigens. *Malar J* [Internet]. 2012 Dec 21;11(1):427. Available from: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-11-427>
22. Irumva V, Waihenya R, Mwangi AW, Kipkemboi P, Kaneko S, Teya T, et al. Evaluation of the TbgI 2 and TbgI 17 Tandem Repeat Antigens as Potential Antigens for the Diagnosis of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Open J Clin Diagnosis*. 2019;9(11):152–63.
23. Wang H, Cong F, Guan J, Xiao L, Zhu Y, Lian Y, et al. Establishment of xMAP for the simultaneous detection of antibodies to Newcastle disease virus and avian influenza virus. *Poult Sci* [Internet]. 2017;98(3):1494–9. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pey510>
24. Duensing TD, Watson SR. Antibody screening using high-throughput flow cytometry. Vol. 2018, Cold Spring Harbor Protocols. 2018. p. 7–12.
 25. Edwards BS, Oprea T, Prossnitz ER, Sklar LA. Flow cytometry for high-throughput, high-content screening. *Curr Opin Chem Biol* [Internet]. 2004 Aug;8(4):392–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1367593104000833>
 26. Kellar KL, Iannone MA. Multiplexed microsphere-based flow cytometric assays. *Exp Hematol*. 2002;30(11):1227–37.
 27. Desombere I, Vlierberghe H Van, Weiland O, Hultgren C, Saˆ llberg M, Quiroga J, et al. Serum levels of anti-NS4a and anti-NS5a predict treatment response of patients with chronic hepatitis C. *J Medical Virol*. 2007;79(February):701–13.
 28. Nikolaeva LI, Blokhina NP, Tsurikova NN, Voronkova N V., Miminoshvili MI, Braginsky DM, et al. Virus-specific antibody titres in different phases of hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat*. 2002;9(6):429–37.

CAPÍTULO 3

**2º artigo original, a ser submetido na revista científica
“Diagnostic Microbiology and Infectious Disease”**

Capítulo 3

DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO MÉTODO SINGLEPLEX E MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HCV UTILIZANDO CITOMETRIA DE FLUXO

Walter Luiz Lima Neves^{**a,b}, Luis André Morais Mariuba^{*a,b,g,h}, Késsia Caroline Souza Alves^b, Kerolaine Fonseca Coelho^{c,d}, Andrea Monteiro Tarragô^{a,c,d}, Allyson Guimarães Costa^{a,c,d,e,f}, Flamir da Silva Victoria^{e,f}, Marilu Barbieri Victoria^{e,f}, Adriana Malheiro^{a,b,d,e}

A. Programa de Pós-graduação de imunologia básica e aplicada, Instituto de ciências biológicas, Universidade federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil;

B. Programa de Pós-graduação de Biotecnologia, Instituto de ciências biológicas, Universidade federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil;

C. Departamento de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM, Brasil;

D. Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brasil;

E. Programa de Pós-graduação em ciências aplicadas a Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brasil;

F. Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, AM, Brasil;

G. Instituto de Pesquisa Leônidas & Maria Deane, FIOCRUZ-Amazônia, Manaus, AM, Brasil.

H. Programa de Pós-graduação Stricto sensu em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz (PGBCM/IOC/Fiocruz), Rio de Janeiro, Brasil.

* todos os autores contribuíram igualmente neste trabalho

*Both authors contributed equally to this work.

**Contato: walterluizbiomedicina@hotmail.com

RESUMO

A Hepatite C é um grave problema de saúde pública em todo mundo, sendo uma das principais causas do desenvolvimento de carcinoma hepatocelular e cirrose. Apesar de atualmente haver tratamento, nos quais 95% dos casos os pacientes tratados com os medicamentos atuais evoluem para cura, acredita-se que o número de infectados por esse vírus no mundo é muito maior. Por esse motivo a busca de novas metodologias de diagnóstico mais sensíveis, com menor número de etapas no procedimento para evitar erros, com elevada acurácia e confiáveis para os diagnósticos dessa infecção, é uma peça-chave para alcançar a erradicação dessa infecção que

até o momento não apresenta vacina. Neste intuito, este trabalho teve como objetivo desenvolver um novo imunoenensaio de citometria de fluxo utilizando “beads” magnéticas acopladas com proteínas do HCV Core, Ns3, Ns4b, Ns5a N-terminal e Ns5a C-terminal, avaliando o uso individual e em conjunto destes antígenos na busca de anticorpos anti-HCV. O imunoenensaio individuais (single), apresentaram elevada sensibilidade, principalmente a proteínas Ns5a N-terminal que apresentou 100% de sensibilidade e especificidade. Entretanto, nem todas as amostras apresentam anticorpos para todas as proteínas, por conseguinte, a utilização de um imunoenensaio *multiplex* apresenta uma elevada sensibilidade e especificidade, aumentando detecção de anticorpos.

Palavras-chave: Hepatite C, Proteínas recombinantes, beads, teste sorológico, anti-HCV

Introdução

A Hepatite C é um grave problema de saúde pública em todo mundo, acometendo com infecção crônica cerca de 71 milhões de pessoas, ou seja, 1% da população mundial. Além disso a infecção crônica causada pelo vírus da hepatite C tem sido uma das principais causas do desenvolvimento de carcinoma hepatocelular e cirrose, resultando no ano 2016 em uma taxa de mortalidade em pessoas acometidas com a infecção crônica do vírus da hepatite C (HCV) de aproximadamente 399.000 mortes¹.

O período de incubação do HCV é de 15 a 155 dias, no qual 20% dos infectados pelo vírus do HCV vão apresentar a forma aguda ou forma icterica e na maioria das vezes cerca de 80% dos infectados apresentam uma infecção aguda assintomática não icterica e irão evoluir para infecção crônica. Destes, 10 a 20% evoluem para complicação graves como cirrose, 1 a 5% dos infectados crônicos com HCV após 20 a 30 anos de infecção desenvolvem carcinoma hepatocelular²⁻⁴. Desta forma, o diagnóstico do HCV é feito por testes de triagem para detecção de anticorpos IgG em soro ou plasma e um teste molecular de confirmação que detectam o RNA viral. Vale a pena ressaltar que a janela diagnostica de detecção apresenta uma variação de acordo com o teste feito, sendo que os testes sorológicos detectam anticorpos anti-HCV entre 33 a 129 dias, os de detecção de antígeno apresentam janela diagnostica de 22 a 30 dias e os moleculares detectam o RNA viral em 22 dias⁵.

Desde a primeira geração de testes para diagnóstico do HVC, os testes diagnósticos vêm utilizando as proteínas recombinantes do vírus na triagem sorológica em busca de anticorpos reativos. Visto isso, a evolução dos métodos diagnósticos de segunda e terceira geração de triagem como os imunoenensaio, testes rápidos e imunoenensaio confirmatórios, foram adicionando regiões das proteínas estruturais e não estruturais do HCV, em busca de um teste

com maior sensibilidade e especificidade para detecção e confirmação da infecção pelo vírus⁶⁻⁸.

Apesar de nos dias atuais haver tratamento, onde, 95% dos casos os pacientes tratados com os medicamentos atuais evoluem para cura⁵. Acredita-se que o número de infectados por esse vírus no mundo é muito maior, por esse motivo a busca de novas metodologias de diagnóstico mais sensíveis, com menor número de etapas no procedimento para evitar erros, com elevada acurácia e confiáveis para os diagnósticos dessa infecção, é uma peça-chave para alcançar a erradicação dessa infecção que até o momento não apresenta vacina⁹. Neste intuito, este artigo teve como objetivo desenvolver um novo imunoenensaio de citometria de fluxo utilizando “beads” magnéticas acopladas com proteínas do HCV, avaliando o uso individual e em conjunto destes antígenos na busca de anticorpos anti-HCV.

Métodos

Expressão e purificação das proteínas recombinantes

A construção das proteínas recombinantes rCore e rctNs5a C-terminal foram desenvolvidas no trabalho anterior¹⁰. Os desenhos dos genes das proteínas recombinantes foram baseadas no depósito no *gene bank* ACJ37216.1 (gi|212675045, *polyprotein [Hepatitis C virus subtype 1a, NCBI]*). As sequências de cada gene foram inseridas no programa para a correção de “viés de códon” em *Escherichia coli*, disponibilizado pelo site da empresa IDT, para otimizar a expressão das proteínas neste hospedeiro. Foram adicionados sítios de restrição para as enzimas *XhoI*, no flanco inicial dos genes, e *PstI*, no flanco final. O gene rNs4b foi sintetizado 804 pb flanqueados pelos sítios das enzimas de restrição *XhoI* / *PstI* nas posições 5' e 3' respectivamente. O gene rNs5a foi dividido ao meio em dois fragmentos (rntNs5a N-terminal (678pb) e rctNs5a C-terminal (692pb)), sendo possível uni-los através de um sítio para enzima *BamHI*. O gene rNs3 (897pb), foi analisado no programa “*MHC class II binding prediction*”, visando selecionar os epítomos mais relacionados com uma resposta celular. Cinco regiões foram selecionadas, sendo flanqueada pelo os sítios de restrição citados anteriormente em suas extremidades. Todas as informações foram enviadas para *IDT - Integrated DNA Technologies* para a síntese dos genes. As sequências de aminoácidos foram analisadas no programa *ProtParam* e *GRAVY*, que previu a massa molecular, entre outros parâmetros. Os genes sintéticos foram obtidos, purificados pelo kit de extração de gel *QIAquick (QIAGEN)*, de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, os fragmentos foram ligados ao vetor de expressão pRSET (*Invitrogen*), e foram transformados os plasmídeos para as células competentes de *Escherichia coli*, cepa TOP 10. A clonagem do inserto foi confirmada por

restrição enzimática e sequenciamento em um Abi a 3100 *Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*). Os plasmídeos foram transformados através de eletroporação nas células competentes de expressão *E. coli* da linhagem BL21 (DE3) *pLysS*. A expressão das proteínas foi realizada em 500 mL de meio LB, com 1 mmol / L de IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo), a 37 ° C, sob agitação constante, por três horas.

As proteínas recombinantes foram purificadas usando uma coluna de cromatografia de afinidade ao níquel (NTA-Ni (*Qiagen*®)), seguindo as instruções do fabricante. As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio 15% (*SDS-PAGE*) (Figura 1B) (13). As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (*Bio-Rad*®). A presença do marcador poli-histidina no antígeno recombinante foi confirmada por *western blotting* (14). Para isso, as proteínas foram separadas por *SDS-PAGE* 15% e transferidas para uma membrana de PVDF por eletro transferência (Sistema Semidry, *Bio-rad*, *Hercules*, EUA) (13). A seguir, a visualização foi realizada por meio de kit comercial *Western Breeze* (*Invitrogen*), seguindo as recomendações do fabricante.

Acoplamento das proteínas recombinantes em *beads* magnéticas

As proteínas purificadas foram acopladas em *beads* magnéticas (BcMag) com terminações carboxilas (*Bioclone Inc.*). Para isso, 20 mg de microesferas magnéticas foram ativadas de acordo com as instruções do fabricante. Após a primeira lavagem com água ultrapura, tampão de acoplamento (10 mmol / L de fosfato de potássio + 0,15 mol / L de NaCl pH 5,5) foi adicionado e as *beads* foram incubadas por 3 minutos em temperatura ambiente sem agitação. Em seguida, o sobrenadante foi removido e este processo foi repetido duas vezes. Posteriormente, 10 µg de proteínas recombinantes purificadas foram colocadas em contato com as *beads* ativadas, foram homogeneizadas por agitação em vórtex por 3 minutos; 3 mmol / L de EDAC *N-Ethyl-N'-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride* foram adicionados e esta mistura foi incubada a 4°C durante 24 horas. *Beads* acopladas com proteínas recombinantes foram lavadas 2 vezes com 1 mL do tampão de lavagem (Tris base 10 mmol / L + NaCl 0,15 mol / L + BSA 0,1% + EDTA 1 mmol / L + azida de sódio 0,1% - pH 7,5). Após a lavagem, a solução contendo proteínas do HCV acopladas a BcMag foram bloqueadas com 500 µL de 1 mol / L de glicina, pH 8,0, por 1-2 horas. Após o período de bloqueio, a solução foi lavada duas vezes com tampão de lavagem e armazenada a 4°C até o seu uso.

Aprovação ética

Este estudo foi aprovado com consentimento por escrito do Comitê de Ética da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas com o número de aprovação CAAE: 49652815.8.0000.0009, e o consentimento informado por escrito foi obtido de todos os participantes.

Amostras

Para avaliação do teste proposto, as amostras incluídas neste estudo são constituídas por pacientes com diagnóstico confirmado de hepatite C crônica. A coleta das amostras foi realizada na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) com pacientes que aceitaram participar do estudo mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do projeto aprovado. Foram incluídos ambos os sexos, com idade entre 18 e 70 anos, com e sem tratamento prévio ou presença de fibrose (F1-F2 e F3-F4). Não foram incluídos indígenas nem gestantes ou quaisquer pacientes que apresentassem coinfeção. O grupo controle incluiu candidatos que compareceram à doação de sangue da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), de ambos os sexos, com idade mínima de 18 anos, residentes em Manaus. As amostras do grupo controle não apresentaram reatividade a nenhuma infecção avaliada em testes sorológicos e de triagem molecular. A padronização dos testes de imunodiagnóstico ocorreu com 30 amostras de HCV positivas (HCV+) analisadas sem nenhum tratamento prévio: 21 amostras de pacientes do sexo masculino com idades variando de 29 a 59 anos e nove amostras de pacientes do sexo feminino com HCV + variando de 49 a 78 anos.

Deteção de anticorpos por citometria de fluxo usando *Beads* magnéticas

Para a detecção de anticorpos contra as proteínas recombinantes em ensaios *single* de cada proteína (Core, Ns3, Ns4, Ns5a N-terminal e Ns5a C-terminal). Os dados dos ensaios *single* utilizando as proteínas Core e Ns5a C-terminal foram publicados em um estudo anterior¹⁰. Os ensaios *multiplex* utilizamos todas as proteínas (Core, Ns3, Ns4b, Ns5a N-terminal e Ns5a C-terminal) em conjunto. Foram adicionados 1 µL de suspensão de *beads* magnéticos com proteínas do HCV acopladas foi adicionado em 50 µL de amostras na diluição de 1: 200 com PBS (as amostras foram tratadas previamente com 10% de lisado bacteriano *E. coli* BL21 (DE3) *pLysS* para o bloqueio de quaisquer possíveis anticorpos anti-*E. coli* presentes no soro humano). Esta mistura foi incubada com agitação suave durante 30 minutos, à temperatura ambiente, protegida da luz. Em seguida, as *beads* foram lavadas com PBS-W

(solução salina tamponada com fosfato 1x + 0,5% de albumina de soro bovino) e centrifugadas a 0,3 rcf por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e 1 μ L do anticorpo secundário (anti-IgG human Alexa Flour 488, Invitrogen) foi adicionado e homogeneizado e incubado por 30 minutos. Posteriormente, as *beads* magnéticas foram lavadas três vezes com PBS-W e lidas no citômetro de fluxo (BD FACS Canto II). Todos os procedimentos foram feitos em rack de separação de esferas magnéticas. Apenas *beads* magnéticas e *beads* acopladas com proteínas, mas sem anticorpo primário, foram usadas como controle negativo. A intensidade mediana de fluorescência (MFI) foi obtida excluindo os valores adquiridos por esferas magnéticas sem modificações na análise gráfica do histograma usando o software *FlowJo v.10*.

Análise de dados

Foi utilizado o programa *FlowJo*® v.10 para análise dos resultados da citometria de fluxo, sendo calculada a intensidade mediana de fluorescência (MFI) e o ponto de corte, retirando a fluorescência normal das *beads*. Portanto, as análises estatísticas e gráficas foram feitas no programa *GrahPadPrism*® v.7, sendo obtido o ponto de corte somando a média das amostras negativas mais duas vezes o seu desvio padrão. Para amostras positivas para HCV, o teste de *Mann-Whitney* foi realizado obtendo-se o valor $P < 0,05$ para os testes com *beads* acopladas com as proteínas recombinantes. O teste da curva ROC foi usado para determinar a sensibilidade e especificidade do teste.

Resultados e discussão

Na **figura 1** apresenta-se o resultado do SDS-PAGE 15% contendo as proteínas purificadas e *Western blotting* utilizando anti-histidina para confirmar as proteínas recombinantes do HCV recuperadas da porção solúvel do extrato bacteriano da célula de expressão *E. coli* BL21 (DE3) *pLysS*, purificadas por cromatografia de afinidade em coluna com resina de níquel e podemos observar as proteínas Ns3, Ns4B, Ns5A N-terminal. As proteínas recombinantes apresentam os respectivos pesos moleculares (~35 kDA, ~31 kDA, ~30 kDA), respectivamente. Também foi possível observar que estas proteínas recombinantes apresentaram clivagens, principalmente a proteína Ns5a. Estudo feito por Kalamvoki et al (2002), relatou que a expressão em *E. coli* da proteína recombinante NS5a da porção C-terminal, apresentou múltiplas bandas da proteína expressa, corroborando com que foi observado em nossos resultados.

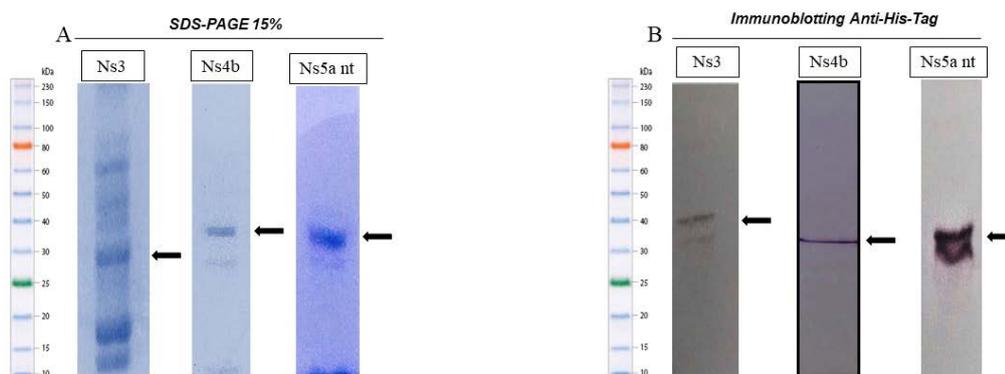


Figura 1 - Confirmação e expressão de proteínas recombinantes. (A) SDS PAGE (15%) das proteínas recombinantes Ns3 (rNs3), Ns4b (rNs4b) e ntNS5a (rntNS5a) purificadas (B) imunoblotting Anti-his-tag confirmatório das proteínas recombinantes Ns3 (rNs3), Ns4b (rNs4b) e ntNS5a (rntNS5a)

Foram realizadas análises entre as médias de intensidade de fluorescência (MFI) das beads acopladas com as proteínas recombinantes do HCV Ns3, Ns4b, Ns5a N-terminal nos ensaios *single* e ensaio *multiplex* testadas com soros do grupo controle (GC) e soros HCV+ (**Figura 2**). Após obter o ponto de corte para determinar quais amostras eram positivas e negativas, podemos observar que tanto nos testes *single*, quanto no teste *multiplex* as MFIs das amostras HCV+ foram maiores comparadas com as MFIs das amostras do grupo controle. Pode-se observar que as 15 amostras controles ficaram abaixo do ponto de corte (*cutoff* = 1895), mostrando não serem reativas contra a proteína do Ns3 acopladas as *beads*. Contudo, duas amostras dadas como positivas, ficaram abaixo do valor do ponto de corte do anticorpo anti-HCV Ns3 nas amostras analisadas. Além disso, a sensibilidade e especificidade foram de 86,67% e 100% respectivamente e os valores preditivos positivos (VPP) 100% e valor preditivo negativos (VPN) 83,33% e curva ROC com Área = 0.97 (**FIGURA 2a**). A análise dos resultados com a *beads* acopladas com a proteína Ns4b (**Figura 2b**), as amostras 14 amostras negativas ficaram a abaixo do ponto de conte (*Cutoff* = 2376) e 1 uma amostra ficou um pouco acima do ponto de corte, apresentando como positiva para HCV. Dentre as amostras HCV+, uma amostra apresentou MFI abaixo do *Cutoff* apresentando ser um falso negativo. Após essa análise observamos que a sensibilidade e especificidade foram de 93,33% e 90% respectivamente, e o VPP foi de 93.33%, VPN foi de 90% e curva ROC 0.98 (**Tabela 1**). Brenner et al.¹² utilizando as proteínas recombinantes do Core, Ns3, Ns4a, Ns5a e Ns5b para validação do imunoensaio com *beads* e comparando com os ensaios imune enzimáticos

comerciais, observou que somente as proteínas do Core e Ns3 apresentaram capacidade para diferenciar entre as amostras positivas e negativas com sensibilidade de 84% para Core e 98% para Ns3 e especificidade de 100% e 98.1% respectivamente. Contudo, em seu trabalho podemos observar que ambas os ensaios apresentaram resultados falsos-positivos.

Fonseca et al¹³ apresentou nos seus resultados sensibilidade em torno de ~50% com os ensaios *singleplex* com as proteínas não estruturais Ns3, Ns4 e Ns5. Entretanto, quando analisado os resultados do ensaio *multiplex* obteve o resultado de 100% para sensibilidade e especificidade.

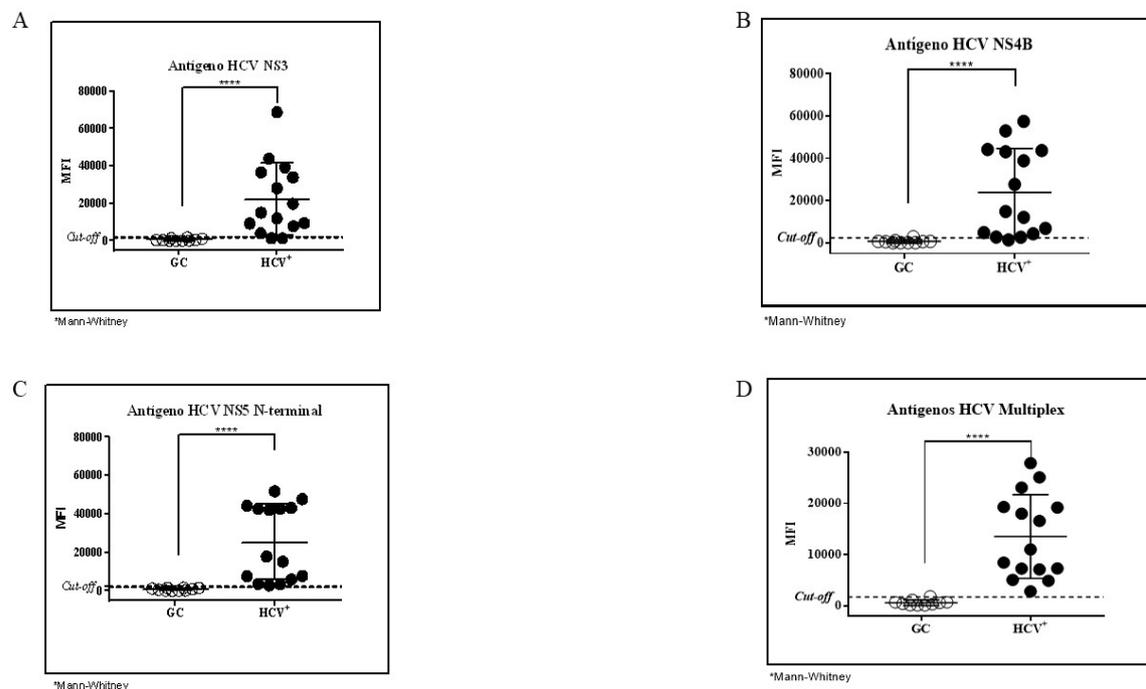


Figura 2 - Comparação de MFI entre 15 amostras de HCV + e 15 amostras de HCV negativas usando esferas acopladas com rNs3 (A), Ns4ba (B), ntNs5a (C) e ensaio multiplex (D).

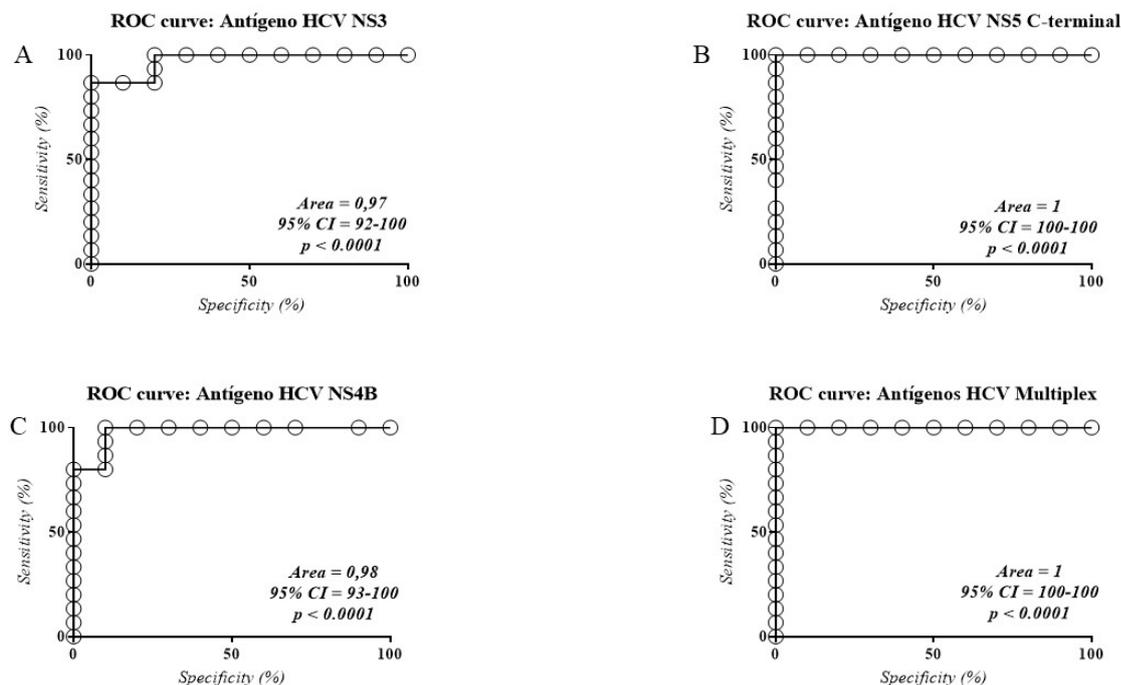


Figure 3 - Análise de amostras positivas e negativas de HCV por citometria de fluxo utilizando beads acoplados à proteína recombinante Ns3 (A), Ns4b (B), ntNs5a (C) e multiplex (D). Os melhores resultados com os ensaios com a proteína ntNs5ae e multiplex.

Dentre os nossos resultados, os testes *single* com a proteína Ns5a N-terminal (**figura 2 C**) foi a melhor em comparação com as outras proteínas analisadas, no qual as amostras do GC ficaram abaixo do ponto de corte ($Cutoff = 2068$) e o resultados observado foi de 100% de sensibilidade e especificidade, assim como nos valores preditivos positivos e negativos e curva ROC com Área = 1 (**FIGURA 3**).

Segundo as diretrizes e protocolos do teste suplementar confirmatório do *recombinant immunoblot assay* (RIBA). O teste pode ser negativo quando nenhuma proteína for detectada, indeterminada quando somente uma proteína for reconhecida por anticorpos anti-HCV e positiva quando 2 ou proteínas recombinantes forem positivas¹⁴¹⁵. Desta forma, analisando e interpretando os resultados da mesma forma utilizada no teste RIBA, individualmente nas amostras tanto do grupo controle, quanto das amostras HCV+ (**TABELA 1**), observamos que o imunoensaio *single* das 15 amostras analisadas todas seriam positivas, pois apresentaram positividade no mínimo para três proteínas recombinantes e no máximo de cinco proteínas. A análise do grupo controle observamos que somente uma amostra apresentou resultado indeterminado, pois apresentou reatividade para uma proteína.

Tabela 1 - análise do resultado individual das amostras do grupo controle e HCV+

Amostras HCV+					Amostras GC						
	Core	Ns3	Ns4b	ntNs5a	ctNs5a		CORE	NS3	NS4B	NTNS5A	CTNS5A
1	●	●	●	●	●	1	X	X	X	X	X
2	●	●	●	●	●	2	X	X	X	X	X
3	●	●	●	●	●	3	X	X	X	X	X
4	●	●	●	●	●	4	X	X	X	X	X
5	●	●	●	●	●	5	X	X	X	X	X
6	●	●	●	●	●	6	X	X	X	X	●
7	●	●	●	●	●	7	X	X	X	X	X
8	●	●	●	●	●	8	X	X	X	X	X
9	●	●	●	●	●	9	X	X	X	X	X
10	●	●	●	●	●	10	X	X	X	X	X
11	●	●	●	●	●	11	X	X	X	X	X
12	●	●	●	●	●	12	X	X	X	X	X
13	●	●	●	●	●	13	X	X	X	X	X
14	●	X	●	●	●	14	X	X	X	X	X
15	●	X	X	●	●	15	X	X	X	X	X

A análise do ensaio *multiplex* utilizando todas as proteínas recombinantes (Core, Ns3, Ns4b, Ns5a N-terminal e C-terminal) acopladas à *beads*, demonstrou sensibilidade, especificidade e valores preditivos de 100% e Curva ROC com Área = 1 (**FIGURA 3c**), no qual todas as amostras do GC ficaram abaixo do ponto de corte (*Cutoff* = 2013), assim como todas as amostras HCV+ apresentaram MFIs superiores ao *Cutoff*, mostrando que a utilização dos antígenos recombinantes em conjunto melhora a sensibilidade de detecção do teste. Watson et al.¹⁶ desenvolveu um ensaio *multiplex* com microesferas para detecção de anticorpos contra as proteínas da Influenza aviária. Apesar de utilizar poucas amostras o imunoensaio *multiplex* apresentou 100% de sensibilidade e especificidade, em comparação com o teste comercial feito por ELISA que apresentou 60% de sensibilidade e 90% de especificidade.

De Voer et al.¹⁷ desenvolveu um testes imunoensaio *multiplex* por citometria de fluxo para detecção de anticorpos IgG e subclasses contra *Neisseria meningitidis* sorogrupo A (MenA), C (MenC) e polissacarídeos (PS). No seu estudo, fez a comparação dos ensaios *monoplex*, *duplex* utilizando três ensaios com duas proteínas combinadas e avaliou o ensaio *hexaplex*, analisando as três combinações no mesmo ensaio. Apesar de não ter sido observado variações entre os ensaios, o hexaplex mostrou ser um teste específico para *Neisseria meningitidis*, requerendo pequenas quantidades de amostras de soro para detectar os anticorpos.

Estudo feito com a população egípcia infectada com vírus da hepatite C com genótipo 4, que é o mais prevalente naquela população, foi desenvolvido um ensaio *multiplex* com doze regiões antigênicas das diferentes proteínas estruturais e não estruturais para avaliar a resposta imune humoral específica do HCV. O ensaio apresentou alta sensibilidade em comparação com os métodos comerciais disponíveis melhorando a precisão no diagnósticos tornando-se útil no manejo clínico de pacientes HCV+ ¹⁸.

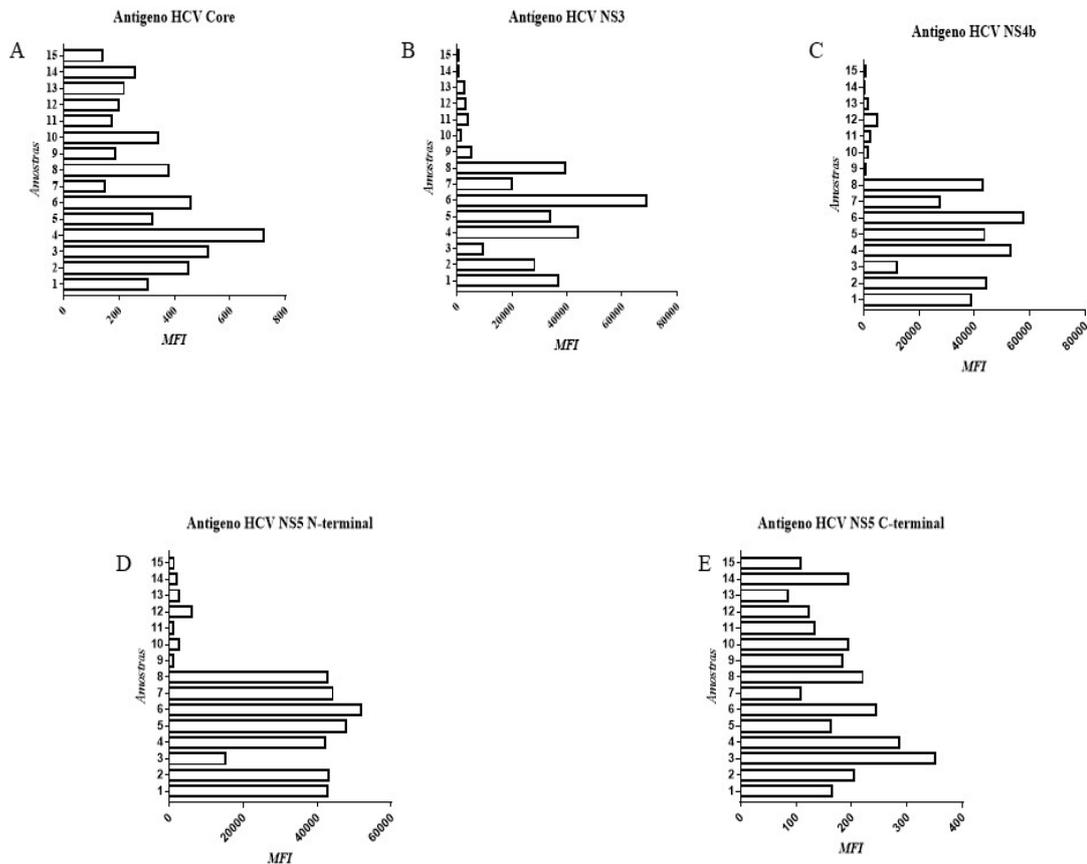


Figura 4 – Análise individual das MFIs de cada amostra nos imunoenaios single das proteínas do Core (A), Ns3 (B), Ns4b (C), Ns5a N-terminal (D) e Ns5a C-terminal (E).

Analisando os resultados MFIs de detecção de anticorpos anti-HCV em todas as amostras individualmente (**FIGURA 4**) nos ensaios com *singleplex* com as proteínas recombinantes, observamos que nem todas as amostras vão detectar anticorpos para todas as proteínas, o que reforça ainda mais que a utilização de um ensaio *multiplex* com a utilização de vários antígenos torna os testes com uma melhor sensibilidade e acurácia. Sillanpää et al.¹⁹ demonstraram em seu trabalho, que de 9 proteínas do HCV produzidas utilizando o Baculovírus, somente algumas apresentaram reatividade contra os anticorpos de 68 pacientes

positivos para HCV por *western blotting*. Sendo que as proteínas CORE (97%), Ns3 (86%), Ns4b (68%) e Ns5a (53%) apresentaram maior reatividade para os anticorpos presentes nos soros HCV⁺. Chen et al.²⁰ e colaboradores, avaliaram a resposta humoral de anticorpos contra as proteínas do HCV de 60 pacientes com hepatite C crônica. O resultado observado no trabalho demonstrou diferença entre a presença de anticorpos nos soros analisados. Visto que, das 60 amostras analisadas, 98% das amostras apresentaram anticorpos com a proteína estrutural E2, 97% para proteína do CORE, 88% para proteína Ns3, 68% para proteína Ns5 e 48% para proteína Ns4.

Conclusão

Em resumo, concluímos que o imunoensaio desenvolvido com as proteínas recombinantes acopladas a *beads* magnéticas nos ensaios individuais (*single*), apresentaram elevada sensibilidade, principalmente a proteínas Ns5a N-terminal que apresentou 100% de sensibilidade e especificidade. Entretanto, nem todas as amostras apresentam anticorpos para todas as proteínas, por conseguinte, a utilização de um imunoensaio *multiplex* apresenta uma elevada sensibilidade e especificidade, aumentando detecção de anticorpos. Estudos posteriores buscarão avaliar o uso deste imunoensaio em um grupo maior de pacientes.

A utilização da citometria de fluxo permitiu a investigação individuais e múltiplas de anticorpos em uma única amostra, em poucos volumes, com uma metodologia de fácil reprodução e rápida avaliação dos resultados, mostrando ser ideais para triagem, podendo ser utilizada em ensaios *multiplex* para detecção em laboratórios de triagem sorológica. Portanto, nossos resultados abrem a perspectiva do desenvolvimento de um ensaio *multiplex* com *beads* acopladas com proteínas recombinantes dos principais patógenos alvos na triagem em banco sangue.

Referências

- 1 World Health Organization. GLOBAL HEPATITIS REPORT, 2017. In: *Polyhedron*. 2107, pp 215–218.
- 2 Zaltron S, Spinetti A, Biasi L, Baiguera C, Castelli F. Chronic HCV infection: epidemiological and clinical relevance. *BMC Infect Dis* 2012; **12**: S2.

- 3 Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect* 2011; **17**: 107–115.
- 4 Ministério da Saúde do Brasil. Diagnóstico das hepatites virais. *Ministério da Saúde* 2018; **2**. doi:10.1098/rstb.2006.2023.
- 5 Ministério da Saúde Brasil. *Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções: Relatório de Recomendação*. 2018 http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_clinico_diretrizes_hepatite_co_coinfecoes.pdf.
- 6 Aach RD, Stevens CE, Holiinger FB, Mosley JW, Peterson DA, Nemo GJ. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. *New English J Med* 1990; **323**: 1120–1123.
- 7 ALTER H, BUSCH M, HOLLAND P, TEGTMEIER G, NELLES M, LEE S *et al*. Increased detection of hepatitis C virus (HCV)-infected blood donors by a multiple-antigen HCV enzyme immunoassay. *Transfusion* 1992; **32**: 805–813.
- 8 Netski DM, Mosbrugger T, Depla E, Maertens G, Ray SC, Hamilton RG *et al*. Humoral immune response in acute hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* 2005; **41**: 667–675.
- 9 Arca-Lafuente S, Martínez-Román P, Mate-Cano I, Madrid R, Briz V. Nanotechnology: A reality for diagnosis of HCV infectious disease. *J Infect* 2020; **80**: 8–15.
- 10 Neves WL., Mariuba L., Alves KCS, Coelho KF. Development of an immunoassay for the detection of human IgG against Hepatitis C Virus proteins using magnetic beads and flow cytometry. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2020; : 2–17.
- 11 Kalamvoki M, Miriagou V, Hadziyannis a, Georgopoulou U, Varaklioti a, Hadziyannis S *et al*. Expression of immunoreactive forms of the hepatitis C NS5A protein in *E. coli* and their use for diagnostic assays. *Arch Virol* 2002; **147**: 1733–45.
- 12 Brenner N, Mentzer AJ, Butt J, Braband KL, Michel A, Jeffery K *et al*. Validation of Multiplex Serology for human hepatitis viruses B and C, human T-lymphotropic virus 1 and *Toxoplasma gondii*. *PLoS One* 2019; **14**: 1–21.
- 13 Fonseca BPF, Marques CFS, Nascimento LD, Mello MB, Silva LBR, Rubim NM *et al*. Development of a Multiplex Bead-Based Assay for Detection of Hepatitis C Virus. *Clin Vaccine Immunol* 2011; **18**: 802–806.
- 14 Paltanin LF, Reiche EM V. Soroprevalência de anticorpos antivírus da hepatite C em doadores de sangue, Brasil. *Rev Saude Publica* 2002; **36**: 393–399.
- 15 Alter H, Tegtmeier G, Jett B, Quan S, Shih J, Bayer W *et al*. The use of a recombinant immunoblot assay in the interpretation of anti-hepatitis C virus reactivity among prospectively followed patients, implicated donors, and random donors. *Transfusion*

- 1991; **31**: 771–776.
- 16 Watson DS, Reddy SM, Brahmakshatriya V, Lupiani B. A multiplexed immunoassay for detection of antibodies against avian influenza virus. *J Immunol Methods* 2009; **340**: 123–131.
- 17 De Voer RM, Van Der Klis FRM, Engels CWAM, Rijkers GT, Sanders EA, Berbers GAM. Development of a fluorescent-bead-based multiplex immunoassay to determine immunoglobulin G subclass responses to *Neisseria meningitidis* serogroup A and C polysaccharides. *Clin Vaccine Immunol* 2008; **15**: 1188–1193.
- 18 Filomena A, Göpfert JC, Duffy D, Pol S, Abdel-Hamid M, Esmat G *et al.* Study of the humoral immune response towards HCV genotype 4 using a bead-based multiplex serological assay. *High-Throughput* 2017; **6**: 1–16.
- 19 Sillanpää M, Melén K, Porkka P, Fagerlund R, Nevalainen K, Lappalainen M *et al.* Hepatitis C virus core, NS3, NS4B and NS5A are the major immunogenic proteins in humoral immunity in chronic HCV infection. *Virol J* 2009; **6**: 84.
- 20 Chen M, Sällberg M, Sönnnerborg A, Weiland O, Mattsson L, Jin L *et al.* Limited humoral immunity in hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 1999; **116**: 135–43.
- 21 Morgan E, Varro R, Sepulveda H, Ember JA, Apgar J, Wilson J *et al.* Cytometric bead array: A multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. *Clin Immunol* 2004; **110**: 252–266.
- 22 Kellar KL, Iannone MA. Multiplexed microsphere-based flow cytometric assays. *Exp Hematol* 2002; **30**: 1227–1237.
- 23 Duensing TD, Watson SR. Antibody screening using high-throughput flow cytometry. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2018; **2018**: 7–12.
- 24 Wong J, Sibani S, Lokko NN, LaBaer J, Anderson KS. Rapid detection of antibodies in sera using multiplexed self-assembling bead arrays. *J Immunol Methods* 2009; **350**: 171–182.

9 DISCUSSÃO

Desde a descoberta do vírus da hepatite C é um grave problema de saúde pública e por isso o desenvolvimento de métodos diagnósticos são um dos pontos-chaves para tentativa de erradicação dessa infecção. Durante décadas os métodos diagnósticos foram evoluindo, diminuindo a janela diagnóstica, apresentando maior sensibilidade e especificidade, com intuito de produzir um teste com uma acurácia elevada e confiável.

Contudo, como descrito no capítulo “1”, os testes diagnósticos, principalmente os de triagem sorológica que buscam a detecção de anticorpos contra as proteínas recombinantes do vírus, ainda apresentam interferentes, que os levam a resultados falsos-positivos e falsos negativos quando confirmados com os testes moleculares, que atualmente são o padrão ouro. Sabendo disso, buscamos produzir neste estudo testes de imunodiagnóstico fluorescente, utilizando proteínas recombinantes estrutural (Core) e não estruturais (Ns3, Ns4b, Ns5a N-terminal e C-terminal) do HCV, acopladas em beads magnéticas carboxiladas e analisadas em citômetro de fluxo.

Para o desenvolvimento destes testes, primeiramente tivemos que desenhar, clonar, expressar e purificar as proteínas recombinantes. Desta forma, todas as proteínas foram desenhadas no presente estudo para serem expressas em *Escherichia coli* e foram adicionados sítios de restrição enzimática para obtenção dos genes, para ligação em plasmídeos para expressão das proteínas. Apesar de nosso grupo de pesquisa apresentar experiência na produção e expressão de proteínas, em nosso trabalho tivemos dificuldades nas etapas de clonagem e ligação, quando alguns genes das proteínas recombinantes apresentaram muitas colônias vazias. Após resolvermos os problemas com a ligação dos genes com os plasmídeos, partimos para expressão e purificação das proteínas recombinantes. Dessa forma, após a expressão das proteínas recombinantes em *E. coli* (DE3) pLysS, a purificação foi feita pelo método manual de coluna de cromatografia de afinidade ao níquel, pois, todas as proteínas expressas foram desenhadas para apresentar um região poli-histidina que apresenta afinidade ao níquel e possibilita a obtenção da proteína. Após a purificação, confirmamos em gel *SDS-PAGE* e *Western Blotting* a expressão e purificação das proteínas. Contudo, apesar de conseguirmos recuperar e purificar as proteínas solúveis, estas apresentavam baixa concentração, impurezas vindas do hospedeiro de expressão, clivagem e degradação das proteínas, o que nos levou a aprimorar os métodos de purificação para obtenção destas proteínas.

Após melhoria deste processo, decidimos utilizar no primeiro momento as proteínas do Core e Ns5a C-terminal no imunoensaio com proteínas acopladas a beads, por apresentarem

regiões constantes em todos os genótipos e por apresentarem maior reatividade no ensaio de *immunoblot*, realizado com pool de amostras de soros HCV+ oriundas de estudos anteriores. Assim, utilizamos o protocolo padronizado de acoplamento utilizando EDAC e NHS para permitir a ligação do grupamento amina das proteínas ao braço carboxila que está na superfície das beads. Após o acoplamento, confirmamos o acoplamento, pois, houve reconhecimento de anticorpos anti-HCV. Contudo, antes analisar os ensaios single com as proteínas do Core e Ns5a C-terminal, padronizamos a melhor diluição do anticorpo primário no qual o melhor foi 1:200 e observamos também que a utilização 10 % de lisado bacteriano melhora a detecção dos anticorpos (capítulo 2).

Com esta, padronização fizemos o imunoensaio com as proteínas do Core e Ns5a C-terminal, utilizando 30 amostras HCV+ confirmadas por testes moleculares coletadas de pacientes antes do tratamento e 30 amostras do grupo controle. Foi possível observar nos dados já apresentados aqui no trabalho que os ensaios apresentaram boa sensibilidade e especificidade, mostrando ser um método que poderia ser utilizado para detecção de anticorpos na triagem sorológica. Além disso, observamos que algumas amostras positivas por NAT não apresentavam anticorpos para duas proteínas, e por esse motivo continuamos o trabalho utilizando um ensaio com as cinco proteínas recombinantes produzidas em nosso trabalho avaliadas em ensaios individuais (single) e um ensaio multiplex.

Ao realizamos os testes, como foi possível observar no capítulo 3, os resultados foram promissores tanto os singleplex, que apresentaram alta sensibilidade e especificidade, podendo ser utilizado no futuro como um teste suplementar. Já o ensaio multiplex que aumentou para 100% a sensibilidade e especificidade, demonstrou ser um método de grande potencial para uso em triagem sorológica. Entendemos que no estágio atual, o teste aqui desenvolvido está no “Technology readiness level 4” (TRL4), visto que foi validado em ambiente laboratorial. Trabalhos posteriores buscarão avaliar a tecnologia desenvolvida em um maior número de amostras em ambiente relevante para assim avançar ao TRL5. Os resultados aqui obtidos abrem também a perspectiva de expansão da técnica para o diagnóstico de múltiplas doenças em um único ensaio multiplex.

Conclusão

CONCLUSÃO

- As proteínas CORE, Ns3, Ns4 e Ns5 foram expressas com sucesso em hospedeiro *E. coli*, apresentando, contudo, baixo rendimento.
- A imobilização das proteínas recombinantes em “beads” magnéticas foi alcançada com sucesso utilizando a metodologia abordada, sendo possível através dessas capturar os anticorpos anti-HCV presentes em amostras de paciente;
- Os imunoenaios desenvolvidos apresentaram valores de especificidade e sensibilidade específicas para cada antígeno utilizado, sendo que o antígeno Ns5a N-terminal apresentou melhores resultados;
- Apesar da metodologia multiplex apresentar melhores valores de sensibilidade e especificidade quando comparado ao singleplex, sugere-se o uso deste último de modo somatório, onde a reatividade para mais de 2 ou mais antígenos poderia ser utilizada como resultado confirmatório para HCV.

Referências

REFERÊNCIAS

- ACCAPEZZATO, Daniele; FRANCAVILLA, Vittorio. Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8⁺ T cell population in chronic hepatitis C virus infection. **Journal of Clinical ...**, [s. l.], v. 113, n. 7, p. 2–11, 2004.
- ADINOLFI, LE; GUERRERA, B. All-oral interferon-free treatments : The end of hepatitis C virus story , the dream and the reality. **World Journal of Hepatology**, [s. l.], v. 7, n. 22, p. 2363–2368, 2015.
- AHMED, Asma; FELMLEE, Daniel J. Mechanisms of hepatitis C viral resistance to direct acting antivirals. **Viruses**, [s. l.], v. 7, n. 12, p. 6716–6729, 2015.
- AIT-GOUGHOLTE, Malika et al. Core protein cleavage by signal peptide peptidase is required for hepatitis C virus-like particle assembly. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 87, n. 4, p. 855–860, 2006.
- ALATRAKCHI, Nadia et al. Hepatitis C Virus (HCV) -Specific CD8 + Cells Produce Transforming Growth Factor β That Can Suppress HCV-Specific T-Cell Responses Hepatitis C Virus (HCV) -Specific CD8 α Cells Produce Transforming Growth Factor β That Can Suppress HCV-Specific T-Cell. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 81, p. 5882–5892, 2007.
- ALBORINO, F. et al. Multicenter evaluation of a fully automated third-generation anti-HCV antibody screening test with excellent sensitivity and specificity. **Medical Microbiology and Immunology**, [s. l.], v. 200, n. 2, p. 77–83, 2011.
- ALTER, Miriam J.; FABIANI, Françoise Lunel. Epidemiology of hepatitis C virus infection PREVALENCE AND INCIDENCE. **World J Gastroenterol**, [s. l.], v. 13, n. 17, p. 2436–2441, 2007. Disponível em: <www.wjgnet.com/http://www.wjgnet.com/1007-9327/13/2436.asp>
- ARAÚJO, Ana Ruth 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**, [s. l.], v. 44, n. 5, p. 638–640, 2011.
- ASHFAQ, Usman A. et al. An overview of HCV molecular biology , replication and immune responses. **Virology Journal**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 161, 2011. Disponível em: <<http://www.virologyj.com/content/8/1/161>>
- ASSELAH, Tarik. Daclatasvir plus sofosbuvir for HCV infection: An oral combination therapy with high antiviral efficacy. **Journal of Hepatology**, [s. l.], v. 61, n. 2, p. 435–438, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2014.04.042>>
- BARNABA, Vincenzo. Hepatitis C virus infection: a “liaison a trois” amongst the virus, the

host, and chronic low-level inflammation for human survival. **Journal of hepatology**, [s. l.], v. 53, n. 4, p. 752–61, 2010.

BARTENSCHLAGER, Ralf; LOHMANN, Volker; PENIN, Francois. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 482–496, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3046>>

BARTOSCH, Birke et al. Cell Entry of Hepatitis C Virus Requires a Set of Co-receptors That Include the CD81 Tetraspanin and the SR-B1 Scavenger Receptor *. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 278, n. 43, p. 41624–41630, 2003.

BELOUZARD, Sandrine; COCQUEREL, Laurence; DUBUISSON, Jean. Hepatitis C virus entry into the hepatocyte. **Central European Journal of Biology**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 933–945, 2011.

BLACKARD, Jason T.; KEMMER, Nyingi; SHERMAN, Kenneth E. Extrahepatic Replication of HCV : Insights Into Clinical. **Hepatology**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 15–22, 2006.

BRASIL. Hepatites virais. **Ministério da Saúde**, [s. l.], v. 48, p. 1–65, 2017. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2016/59121/boletim_hepatites_05_08_2016_pdf_96185.pdf>

BUSCH, Michael P.; KLEINMAN, Steven H.; NEMO, George J. Current and Emerging Infectious Risks of Blood Transfusions. **Journal of the American Medical Association**, [s. l.], v. 289, n. 8, p. 959–962, 2003.

BYRNES, Adriana a et al. Modulation of the IL-12/IFN-gamma axis by IFN-alpha therapy for hepatitis C. **Journal of leukocyte biology**, [s. l.], v. 81, n. 3, p. 825–34, 2007.

CARRERE-KREMER, Séverine et al. Regulation of Hepatitis C Virus Polyprotein Processing by Signal Peptidase Involves Structural Determinants at the p7 Sequence Junctions *. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 279, n. 40, p. 41384–41392, 2004.

CDC. Testing for HCV Infection: An Update of Guidance for Clinicians and Laboratories. **Morbidity and mortality weekly report**, [s. l.], v. 62, n. 18, p. 362–365, 2013.

CERELLA, Claudia et al. From nature to bedside: pro-survival and cell death mechanisms as therapeutic targets in cancer treatment. **Biotechnology advances**, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 1111–22, 2014.

CHANG, Qing et al. Th17 cells are increased with severity of liver inflammation in patients with chronic hepatitis C. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 273–278, 2012.

CHOO, Qui Lim et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B

viral hepatitis genome. **Science**, [s. l.], v. 244, n. 4902, p. 359–362, 1989.

CROTTA, Stefania et al. Inhibition of Natural Killer Cells through Engagement of CD81 by the Major Hepatitis C Virus Envelope Protein. **J Exp Med**, [s. l.], v. 195, n. 1, p. 35–41, 2002.

DAVTYAN, Tigran K. et al. The anti-idiotypic antibody 1F7 stimulates monocyte interleukin-10 production and induces endotoxin tolerance. **Journal of inflammation (London, England)**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 14, 2013.

DE FRANCESCO, Raffaele; MIGLIACCIO, Giovanni. Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. **Nature**, [s. l.], v. 436, n. 7053, p. 953–960, 2005.

DICKENSHEETS, Harold et al. Interferon-lambda (IFN- λ) induces signal transduction and gene expression in human hepatocytes but not in lymphocytes or monocytes. **Journal of leukocyte biology**, [s. l.], v. 93, n. March, p. 377–385, 2012.

DIVISION OF VIRAL HEPATITIS, NATIONAL CENTER FOR HIV/AIDS, VIRAL HEPATITIS, STD & TB Prevention. Viral Hepatitis Surveillance, United States, 2011. [s. l.], 2011. Disponível em:

<<http://www.cdc.gov/hepatitis/statistics/2011surveillance/pdfs/2011hepsurveillancercpt.pdf>>

DUBUISSON, Jean; PENIN, François; MORADPOUR, Darius. Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. **Trends in Cell Biology**, [s. l.], v. 12, n. 11, p. 517–523, 2002.

DUFFY, Siobain; SHACKELTON, Laura A.; HOLMES, Edward C. Rates of evolutionary change in viruses: Patterns and determinants. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 267–276, 2008.

EGGER, Denise et al. Expression of Hepatitis C Virus Proteins Induces Distinct Membrane Alterations Including a Candidate Viral Replication Complex. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 76, n. 12, p. 5974–5984, 2002.

EVANS, Matthew J. et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. **Nature**, [s. l.], v. 446, n. April, p. 801–805, 2007.

FARCI, P. et al. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 91, n. 16, p. 7792–6, 1994. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=44488&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>

FERNANDEZ-YUNQUEIRA, A. et al. Update on the use of direct-acting antiviral agents for the treatment of chronic hepatitis C virus infection. **Rev Esp Quimioterapia**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 189–192, 2013.

- FERRAZ DA FONSECA, José Carlos; MELO BRASIL, Leila. Infecção pelo vírus da hepatite C na região Amazônica Brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 37, n. SUPPL. 2, p. 1–8, 2004.
- GALE, Michael J. et al. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. **Virology**, [s. l.], v. 230, n. 2, p. 217–227, 1997.
- GAUTIER, Grégory et al. A type I interferon autocrine – paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. **JEM**, [s. l.], v. 201, n. 9, p. 1435–1446, 2005.
- GOFFARD, Anne et al. Role of N-Linked Glycans in the Functions of Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins. **Society**, [s. l.], v. 79, n. 13, p. 8400–8409, 2005.
- GOWER, Erin et al. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. **Journal of Hepatology**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. S45–S57, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2014.07.027>>
- HABIBOLLAHI, Peiman et al. Occult hepatitis B infection and its possible impact on chronic hepatitis C virus infection. **Saudi Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 220, 2009. Disponível em: <<http://www.saudijgastro.com/text.asp?2009/15/4/220/56089>>
- HAHN, C. S. et al. The HCV core protein acts as a positive regulator of fas-mediated apoptosis in a human lymphoblastoid T cell line. **Virology**, [s. l.], v. 276, n. 1, p. 127–37, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11022001>>
- HASHEMPOUR, Tayebbeh et al. F protein increases CD4+CD25+ T cell population in patients with chronic hepatitis C. **Pathogens and Disease**, [s. l.], v. 73, n. 4, 2015. Disponível em: <<http://femspd.oxfordjournals.org/content/73/4/ftv022.abstract>>
- HIROISHI, Kazumasa et al. Immune Response of Cytotoxic T Lymphocytes and Possibility of Vaccine Development for Hepatitis C Virus Infection. **Journal of biomedicine & biotechnology**, [s. l.], v. 2010, p. 10, 2010.
- HOSHINO, Katsuaki et al. LETTERS I k B kinase- a is critical for interferon- a production induced by Toll-like receptors 7 and 9. **Nature**, [s. l.], v. 440, n. April, p. 949–953, 2006.
- HOWE, Chanelle J. et al. Association of sex , hygiene and drug equipment sharing with hepatitis C virus infection among non-injecting drug users in New York City. **Drug and alcohol dependence**, [s. l.], v. 79, n. 0376, p. 389–395, 2005.
- JONES, Daniel M. et al. The Hepatitis C Virus NS4B Protein Can trans -Complement Viral RNA Replication and Modulates Production of Infectious Virus □. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 83, n. 5, p. 2163–2177, 2009.

- JORDAN J. FELD, Glen A. Lutchman. Ribavirin improves early responses to peginterferon through enhanced interferon signaling. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 139, n. 1, p. 154–162, 2010.
- KERMODE, Michelle. Unsafe injections in low-income country health settings: Need for injection safety promotion to prevent the spread of blood-borne viruses. **Health Promotion International**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 95–103, 2004.
- KHAN, Nasar et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in pakistan. **Hepatitis Monthly**, [s. l.], v. 14, n. 10, p. 41–49, 2014.
- LAVANCHY, D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 107–115, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03432.x>>
- LI, Hui Chun et al. Production and pathogenicity of hepatitis C virus core gene products. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 20, n. 23, p. 7104–7122, 2014. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i23/7104.htm>>
- LIN, Wenyu et al. Hepatitis C Virus Core Protein Blocks Interferon Signaling by Interaction with the STAT1 SH2 Domain Hepatitis C Virus Core Protein Blocks Interferon Signaling by Interaction with the STAT1 SH2 Domain. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 80, n. 18, p. 9226, 2006.
- LOPES, Carmen L. R. et al. Prevalência, fatores de risco e genótipos da hepatite C entre usuários de drogas. **Revista de Saúde Pública**, [s. l.], v. 43, n. suppl 1, p. 43–50, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19669064>>
- MACDONALD, Andrew et al. The hepatitis C virus NS5A protein binds to members of the Src family of tyrosine kinases and regulates kinase activity. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 85, n. 11, p. 721–729, 2004.
- MACHIDA, K. et al. Inhibition of cytochrome c release in Fas-mediated signaling pathway in transgenic mice induced to express hepatitis C viral proteins. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 276, n. 15, p. 12140–6, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11278624>>
- MACHIDA, Keigo et al. Hepatitis C Virus Induces Toll-Like Receptor 4 Expression , Leading to Enhanced Production of Beta Interferon Hepatitis C Virus Induces Toll-Like Receptor 4 Expression , Leading to Enhanced Production of Beta Interferon and Interleukin-6. **Journal of viral hepatitis**, [s. l.], v. 80, n. 2, p. 866, 2006.
- MALCOLM, B. A. et al. SCH 503034 , a Mechanism-Based Inhibitor of Hepatitis C Virus NS3 Protease , Suppresses Polyprotein Maturation and Enhances the Antiviral Activity of Alpha Interferon in Replicon Cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 50, n. 3, p.

1013–1020, 2006.

MARTINS, T.; SCHIAVON, J.; SCHIAVON, L. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C. **Revista Associação médica Brasileira**, [s. l.], p. 107–112, 2010.

MEIGANG GU; CHARLES, Rice M. Structures of hepatitis C virus nonstructural proteins required. **Curr Opin Virol**, [s. l.], v. 3, n. 2, 2013.

MEREDITH, Luke W. et al. Hepatitis C virus entry : beyond receptors. **Rev. Med. Virol**, [s. l.], v. 22, n. March, p. 182–193, 2012.

MILAZZO, Laura; FOSCHI, Antonella; ANTINORI, Spinello. Rapid virological response: Is it four or eight weeks? **Hepatology**, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 979, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções: Relatório de Recomendação**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_clinico_diretrizes_hepatite_co_coinfeccoes.pdf>

MISSALE, Gabriele et al. Different Clinical Behaviors of Acute Hepatitis C Virus Infection Are Associated with Different Vigor of the Anti-viral Cell-mediated Immune Response. **Journal Clin. Invest**, [s. l.], v. 98, n. 5, p. 706–714, 1996.

MORADPOUR, D.; BLUM, H. A primer on the molecular virology of hepatitis C. **Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver**, [s. l.], v. 24, p. 519–525, 2004.

NOMURA-TAKIGAWA, Yuki et al. Non-structural protein 4A of Hepatitis C virus accumulates on mitochondria and renders the cells prone to undergoing mitochondria-mediated apoptosis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, [s. l.], v. 87, n. 2, p. 1935–1945, 2006.

OLIVEIRA-FILHO, Aldemir B. et al. Prevalence and genotyping of hepatitis C virus in blood donors in the state of Pará, Northern Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 105, n. 1, p. 103–106, 2010.

PANTUA, Homer et al. Glycan shifting on hepatitis C virus (HCV) E2 glycoprotein is a mechanism for escape from broadly neutralizing antibodies. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 425, n. 11, p. 1899–1914, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2013.02.025>>

PARTHIBAN, Rudrapathy et al. Transmission of hepatitis C virus infection from asymptomatic mother to child in southern India. **International Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 13, p. 394–400, 2009.

PASQUIER, Christophe et al. Distribution and Heterogeneity of Hepatitis C Genotypes in

- Hepatitis Patients in Cameroon. **Journal of Medical Virology**, [s. l.], v. 398, n. July, p. 390–398, 2005.
- PEREIRA, Grenda Leite et al. Immunological Dynamics Associated with Direct-Acting Antiviral Therapies in Naive and Experimented HCV Chronic-Infected Patients. **Mediators of Inflammation**, [s. l.], v. 2019, 2019.
- PETRUZZIELLO, Arnolfo et al. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An update of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 22, n. 34, p. 7824–7840, 2016.
- PLOSS, Alexander et al. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. **Nature**, [s. l.], v. 457, n. 7231, p. 882–886, 2009.
- PRECIADO, Maria Victoria et al. Hepatitis C virus molecular evolution: Transmission, disease progression and antiviral therapy. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 20, n. 43, p. 15992–16013, 2014.
- REHERMANN, Barbara. Science in medicine Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses : a tale of coevolution and coexistence. **Science in medicine**, [s. l.], v. 119, n. 7, p. 1745–1754, 2009.
- REYES, Gregory R. The Nonstructural NS5A Protein of Hepatitis C Virus: An Expanding, Multifunctional Role in Enhancing Hepatitis C Virus Pathogenesis. **journal Biomedical Science**, [s. l.], v. 9, n. 11, p. 187–197, 2002.
- REZENDE, S. M. et al. Registry of inherited coagulopathies in Brazil: First report. **Haemophilia**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 142–149, 2009.
- ROCCASECCA, R. et al. Binding of the Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein to CD81 Is Strain Specific and Is Modulated by a Complex Interplay between Hypervariable Regions 1 and 2. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 77, n. 3, p. 1856–1867, 2003. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.77.3.1856-1867.2003>>
- ROINGEARD, P.; HOURIOUX, C. Hepatitis C virus core protein, lipid droplets and steatosis. **Journal of Viral Hepatitis**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 157–164, 2008.
- SABO, M. C. et al. Neutralizing Monoclonal Antibodies against Hepatitis C Virus E2 Protein Bind Discontinuous Epitopes and Inhibit Infection at a Postattachment Step. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 85, n. 14, p. 7005–7019, 2011. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.00586-11>>
- SANDRES, K. et al. Genetic heterogeneity of hypervariable region 1 of the hepatitis C virus (HCV) genome and sensitivity of HCV to alpha interferon therapy. **Journal of virology**, [s. l.], v. 74, n. 2, p. 661–8, 2000. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=111585&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>

SATO, Ken et al. Expression of Toll-like receptors in chronic hepatitis C virus infection. **Hepatology**, [s. l.], v. 22, p. 1627–1632, 2007.

SCARSELLI, Elisa et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. **The EMBO journal**, [s. l.], v. 21, n. 19, p. 5017–5025, 2002.

SCHOLTES, Caroline et al. High plasma level of nucleocapsid-free envelope glycoprotein-positive lipoproteins in hepatitis C patients. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 39–48, 2012.

SCHREGEL, V. et al. Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. **PNAS**, [s. l.], v. 106, n. 3, p. 5342–5347, 2009.

SELIMOVIC, Denis; HASSAN, Mohamed. Inhibition of Hepatitis C virus (HCV) Core protein- induced cell Growth by Non-structural Protein 4A (NS4A) is mediated by mitochondrial dysregulation. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 4–11, 2008.

SEMMO, Nasser et al. patients a decade after early therapy To the editor : **Blood**, [s. l.], v. 107, n. 6, p. 4570–4571, 2006.

SHEPARD, Colin W.; FINELLI, Lyn; ALTER, Miriam J. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. **Lancet infect Dis**, [s. l.], v. 5, p. 558–67, 2005.

SHUKLA, D.; HOYNE, P.; WARD, C. Evaluation of complete genome sequences and sequences of individual gene products for the classification of hepatitis C viruses. **Archives of virology**, [s. l.], v. 140, p. 1747–1761, 1995.

SILVA, A. et al. Hepatites virais : B , C e D : atualização *. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 206–18, 2012.

SIMMONDS, Peter et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, [s. l.], v. 42, n. 44, p. 962–973, 2005.

SOLVALDI. Sovaldi - TM (Sofosbuvir) Gilead Sciences Farmacêutica do Brasil. **Gilead Sciences Farmacêutica do Brasil Ltda.**, [s. l.], p. 1–12, 2015.

STOCKMAN, Lauren J. et al. Rapid hepatitis C testing among persons at increased risk for infection — Wisconsin, 2012–2013. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, [s. l.], v. 63, n. 14, p. 309–30911, 2014.

SWAIN, Mark G. Natural Killer T Cells within the Liver : Conductors of the Hepatic Immune Orchestra. **Immunology and Liver Disease**, [s. l.], v. 28, p. 7–13, 2010.

TAN, Amabel C. L. et al. Polyfunctional CD8(+) T cells are associated with the vaccination-

induced control of a novel recombinant influenza virus expressing an HCV epitope. **Antiviral research**, [s. l.], v. 94, n. 2, p. 168–78, 2012.

TARRAGÔ, Andréa Monteiro et al. Combination of genetic polymorphisms in TLR influence cytokine profile in HCV patients treated with DAAs in the State of Amazonas. **Cytokine**, [s. l.], v. 130, n. February, p. 155052, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155052>>

THIMME, Robert et al. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance , persistence , and disease. **Microbiology**, [s. l.], v. 99, n. 11, p. 15661–15668, 2002.

TORRES, K. et al. Hepatitis C Virus in Blood Donors , Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 2007–2009, 2009.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. **Biotechnology (Reading, Mass.)**, [s. l.], v. 24, n. 9, p. 145–9, 1979. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1422008>>

VERCAUTEREN, Koen et al. Impact of lipids and lipoproteins on hepatitis C virus infection and virus neutralization. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 20, n. 43, p. 15975–15991, 2014.

VON HAHN, Thomas et al. Hepatitis C Virus Continuously Escapes From Neutralizing Antibody and T-Cell Responses During Chronic Infection In Vivo. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 132, n. 2, p. 667–678, 2007.

VON HAHN, Thomas; RICE, Charles M. Hepatitis C virus entry. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 283, n. 7, p. 3689–3693, 2008.

WEAVER, Casey T.; HATTON, Robin D. Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective. **Nat Rev Immunol**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 883–889, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri2660>>

WELBOURN, Sarah; PAUSE, Arnim. The Hepatitis C Virus NS2 / 3 Protease. **Curr. Issues Mol.**, [s. l.], v. 9, p. 63–70, 2005.

WHO. Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection. **Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis b infection**, [s. l.], n. March, p. 166, 2015.

WHO. **Guidelines for the care and treatment of persons diagnosed with chronic hepatitis C virus infection**. [s.l: s.n.].

WONG, Mun-Teng; CHEN, Steve S. L. Emerging roles of interferon-stimulated genes in the innate immune response to hepatitis C virus infection. **Cellular and Molecular Immunology**,

[s. l.], v. 13, n. 1, p. 11–35, 2016. Disponível em:
<<http://www.nature.com/doi/10.1038/cmi.2014.127>>

WOZNIAK, Ann L. et al. Intracellular Proton Conductance of the Hepatitis C Virus p7 Protein and Its Contribution to Infectious Virus Production. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 6, n. 9, 2010.

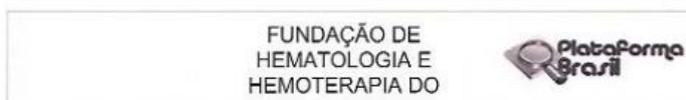
YI, Minkyung et al. trans-Complementation of an NS2 Defect in a Late Step in Hepatitis C Virus (HCV) Particle Assembly and Maturation. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 5, n. 5, 2009.

ZALTRON, S. et al. Chronic HCV infection: epidemiological and clinical relevance. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 12, n. Suppl 2, p. S2, 2012. Disponível em:
<<http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-12-S2-S2>>

ZEISEL, Mirjam B.; COSSET, François Loïc; BAUMERT, Thomas F. Host neutralizing responses and pathogenesis of hepatitis C virus infection. **Hepatology**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 299–307, 2008.

ZHANG, Shuye et al. IFN- γ production by human natural killer cells in response to HCV-infected hepatoma cells is dependent on accessory cells. **The effects of brief mindfulness intervention on acute pain experience: An examination of individual difference**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 442–449, 2015.

Anexo 01: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP-HEMOAM
(CAAE:49652815.8.0000.0009).



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE PEPÍTIdeos MIMÉTICOS REATIVOS AOS SOROS DE PACIENTES HCV+ E SUA INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO DA FIBROSE HEPÁTICA IN VITRO

Pesquisador: ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÓ

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 49652815.8.0000.0009

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.406.965

Apresentação do Projeto:

Projeto de Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE PEPÍTIdeos MIMÉTICOS REATIVOS AOS SOROS DE PACIENTES HCV+ E SUA INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO DA FIBROSE HEPÁTICA IN VITRO

Trata-se de um estudo descritivo, transversal constituindo subprojeto de um estudo maior da linha de pesquisa sobre Biotecnologia & Saúde

intitulado: "Desenvolvimento de tecnologias aplicadas ao diagnóstico e terapia de doenças infecciosas tropicais", que será desenvolvido pelos

grupos de Pesquisa "Virologia" da Universidade Federal do Pará – UFPA, em parceria com os grupos "Imunologia Básica e Aplicada" da

Universidade Federal do Amazonas e "Nanotecnologia" da Universidade Federal de Uberlândia- UFU. Ainda teremos apoio das Universidade da

Califórnia (UCDAVIS) e da Universidade de Miami(UM). Aprovado pelo Edital Pró-Amazônia n. 047/2012.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Determinar a reatividade em soro de indivíduos HCV+ para peptídeos miméticos ao HCV identificados pela técnica phage display e caracterizar o

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 Br. D Dir. Ens. Pós-grad.
Bairro: Chapéada **CEP:** 69.060-402
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (82)3655-0114 **Fax:** (82)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 1.408.965

perfil de citocinas envolvidas no desenvolvimento de fibrose hepática em cultura de células

Objetivo Secundário:

- Selecionar e identificar peptídeos miméticos reativos a soros de pacientes HCV+ com fibrose hepática;
- Sequenciar os clones isolados e realizar análises de bioinformática;
- Descrever o perfil de citocinas envolvidos no desenvolvimento da fibrose em cultura de células mesenquimais e hepatócitos;
- Pré-validar os clones selecionados através de ensaios de Phage-ELISA utilizando proteínas totais de pacientes com fibrose hepática;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Risco de contaminação dos colaboradores da pesquisa com sangue contaminado com o vírus da Hepatite C

Benefícios: Conseguir desenvolver peptídeos que possam ser utilizados posteriormente em biossensores capazes de detectar proteínas presente em soro de

pacientes que possam prever e servir de biomarcadores para diagnóstico de fibrose.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa Relevante que busca detectar marcadores que auxiliem na detecção de peptídeos miméticos ao vírus da hepatite C capazes de prever fibrose utilizando tecnologias combinadas em engenharia genética, como Phage Display com o intuito de gerar estratégias direcionadas para a investigação do processo do desenvolvimento da fibrose.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_P	09/09/2015	-	Aceito

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 Bl.D Dir Ens Pesq
Bairro: Chapada CEP: 69.050-002
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 Fax: (92)3655-0112 E-mail: cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 1.406.865

Básicas do Projeto	ETO_579290.pdf	15:35:04		Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	09/09/2015 15:32:42	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	09/09/2015 15:30:02	ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÓ	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	09/09/2015 15:28:05	ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÓ	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencias.pdf	09/09/2015 15:21:14	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencias.docx	09/09/2015 14:46:19	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 12 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
Elisa Brosina de Leon
(Coordenador)

Endereço: Av. Constantino Nery 4307 BLD Dir Ens Pesq
Bairro: Chapada CEP: 69.050-002
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 Fax: (92)3655-0112 E-mail: cep@hemoam.am.gov.br