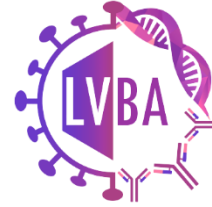




mICROBIOLOGIA
SINCE 1969 UFMG



Laboratório de
Virologia Básica
e Aplicada
ICB - UFMG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**

LAURA CARDOSO CORRÊA DIAS

**AVALIAÇÃO DE PADRÕES PEPTÍDICOS IMUNODOMINANTES DO VÍRUS
DA HEPATITE C RESTRITOS AO HLA DO TIPO I**

Belo Horizonte

2024

Laura Cardoso Corrêa Dias

**AVALIAÇÃO DE PADRÕES PEPTÍDICOS IMUNODOMINANTES DO VÍRUS
DA HEPATITE C RESTRITOS AO HLA DO TIPO I**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof. Dra. Jordana G. A.
Coelho dos Reis

Belo Horizonte

2024

043

Dias, Laura Cardoso Corrêa.

Avaliação de padrões peptídicos imunodominantes do vírus da Hepatite C restritos ao HLA do tipo I [manuscrito] / Laura Cardoso Corrêa Dias. – 2024. 94 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof. Dra. Jordana G. A. Coelho dos Reis.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Hepatite C. 3. Carcinoma Hepatocelular. 4. Resposta imune. 5. Linfócitos T CD8-Positivos. 6. Peptídeos. I. Reis, Jordana Graziela Alves Coelho dos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **LAURA CARDOSO CORRÊA DIAS**

Nº REGISTRO: **2022661383**

Às 14:00 horas do dia **08 de fevereiro de 2024**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Elisson Nogueira Lopes (Van Andel Institute – Michigan/EUA) e a Profa. Dra. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis (Orientadora), para julgar o trabalho final "**Avaliação de padrões peptídicos imunodominantes do vírus da Hepatite C restritos ao HLA do TIPO I**", da aluna **Laura Cardoso Corrêa Dias**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidenta da Comissão, Profa. Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 08 de fevereiro de 2024

Membros da banca:

Profa. Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli

Dr. Elisson Nogueira Lopes

De acordo:

Profa. Dra. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis
(Orientadora)

Profa. Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli
(Presidenta)

Prof. Dr. Daniel de Assis Santos
(Coordenador do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Edel Figueiredo Barbosa Stancioli, Professora do Magistério Superior**, em 09/02/2024, às 13:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel de Assis Santos, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 10/02/2024, às 10:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elisson Nogueira Lopes, Usuário Externo**, em 15/02/2024, às 12:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis, Membro de comitê**, em 13/03/2024, às 14:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3012486** e o código CRC **4D02D7C0**.

**Ao meu pai que sempre esteve a uma chamada
de vídeo de distância me dando forças, me
incentivando e não me deixando desanimar...**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, Milene, que sonhou comigo esse sonho de ser pesquisadora desde o início. Lamento por ela não poder ver a finalização de mais uma etapa da minha vida acadêmica, mas tenho certeza de que ela está acompanhando de longe.

Ao meu pai, Alessandro, que vai para o céu sem pagar pedágio depois desses últimos anos em que teve que me consolar, acalmar e não me deixar desanimar. Saber que eu sempre podia correr de volta para ele se precisasse fez toda a diferença.

Ao meu irmão, Lucas, que mesmo distante sabia que estava a uma ligação de distância se eu precisasse de qualquer coisa.

Ao meu cachorro, Duque, que salvou a minha vida e me fez insistir na minha carreira, mostrando que não valia a pena existir apenas dentro de casa e não aproveitar e contribuir fora dela. Agradeço também por todas as vezes que ele lambeu minhas lágrimas enquanto eu chorava, que ficou quietinho me escutando desabafar e que só de olhar para ele meu humor já melhorava.

Aos demais familiares que me apoiaram, incentivaram, torceram por mim e desejaram sucesso durante toda essa caminhada.

Aos meus colegas do Laboratório de Virologia Básica e Aplicada que me receberam tão bem desde o começo e que se tornaram minha família em pouquíssimo tempo. Meus dias no laboratório sempre foram muito felizes por ter todos vocês comigo seja nos momentos de trabalho, experimentos e desafios, como também nos momentos de conversas, café, congressos e rolês. Em especial, a Ágata que sempre esteve ali para mim desde o começo, me ensinando, me orientando, me acalmando e foi minha luz durante essa trajetória.

A Professora Jordana pela oportunidade, confiança e aprendizado dentro e fora do laboratório. Aos professores Ediel e Flávio também pelo aprendizado e ensinamentos.

A todos os meus amigos que me apoiaram, me motivaram e nunca me deixaram sentir sozinha durante essa caminhada, sempre dispostos a me ouvir, aconselhar e garantir que tudo ficaria bem. Fico feliz por ter tantos ao meu lado e não ter espaço para nomear todos nesses agradecimentos.

A Universidade Federal de Minas Gerais que me recebeu tão bem.

E a todas as minhas versões do passado que mesmo nos piores cenários, tomaram as melhores decisões no momento para que pudéssemos continuar e estar aqui hoje, obrigada por nunca desistir da gente.

RESUMO

Hepatite C é o nome dado à doença causada pelo *Hepacivirus hominis* (HCV), representando um grande problema de saúde global devido às altas taxas de morbidade e mortalidade, uma vez que a infecção pelo HCV é responsável por causar graves alterações no fígado, incluindo fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular. A transmissão do HCV se dá pelo sangue e é estimado que mais 71 milhões de pessoas estejam cronicamente infectadas pelo vírus. Atualmente, não existem vacinas aprovadas contra a hepatite C. Embora o tratamento com antivirais de ação direta (DAAs) seja considerado eficiente, existem limitações, tais como o não impedimento de reinfecção e o custo elevado desses medicamentos. Durante uma infecção viral, sabe-se que o processo de apresentação de peptídeos pelo MHC de classe I aos linfócitos T CD8⁺ é essencial para desencadear uma resposta antiviral eficaz, relevante para o melhor desenvolvimento de protótipos vacinais contra o HCV. Assim, o desenvolvimento dessa dissertação teve como objetivo apresentar uma visão geral dos epítomos imunodominantes derivados do HCV restritos ao HLA-A*02:01 utilizando ferramentas *in silico* e *in vitro*. Para os estudos *in silico*, 59 sequências de poliproteínas de 7 genótipos do vírus foram obtidas do *NCBI nucleotide* e utilizadas para a predição de peptídeos no software NetCTL 2.0. Cerca de 2700 peptídeos com *score* combinado $\geq 0,75$ foram considerados com potencial para ativar células T CD8⁺, identificados e mantidos para análise funcionais *in silico*. Além disso, também foram analisadas propriedades físico-químicas e a capacidade de indução de citocinas dos eixos Th1 e/ou Th2 da resposta imune celular por esses peptídeos. Tais análises indicaram uma clara tendência a indução da citocina reguladora IL-4 quando comparada a IFN- γ . Para a avaliação *in vitro* da afinidade peptídeo-MHC-I, um sistema de microarranjo de peptídeos foi realizado utilizando os peptídeos derivados dos 7 genótipos do HCV e uma molécula HLA-A*02:01 recombinante. Esta estratégia, permitiu a triagem das sequências de aminoácidos imunodominantes reativas, tendo sido observado 615 peptídeos reativos ao HLA-A*02:01 *in vitro*, que correspondem a cerca de 21,3% do total de peptídeos testados. Por fim, os resultados obtidos *in silico* e *in vitro* permitiram a identificação de peptídeos com alta reatividade ao HLA-A*02:01, observando predominância de sequências reativas nas regiões das proteínas p7, NS2 e NS5B. Além disso, os padrões de aminoácidos observados nos peptídeos reativos destacaram a prevalência de resíduos de leucina e triptofano, destacando a importância destes resíduos para a ligação do epítipo ao TCR e, conseqüentemente, para a ativação dos linfócitos T CD8⁺. De um modo geral, os padrões de peptídeos derivados do

HCV e restritos ao HLA-A2*02:01 observados neste trabalho fornecem informações importantes para o desenvolvimento de uma vacina multiepítopo, eficaz contra vários genótipos do HCV.

PALAVRAS-CHAVE: Hepatite C; HCV; resposta imune celular; resposta TCD8⁺; HLA-A*02:01; microarranjo de peptídeos.

ABSTRACT

Hepatitis C is the name given to the *Hepacivirus hominis* (HCV) disease, representing a major global health problem due to high morbidity and mortality rates, as HCV infection is responsible for causing severe liver changes, including fibrosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. HCV transmission is associated with direct contact with contaminated blood, and there is an estimative that more than 71 million people are chronically infected with the virus. Currently, there are no approved vaccines against hepatitis and even though direct antiviral agents (DAAs) therapies are highly effective, limitations such as the possibility of reinfection and **and** very high price treatment remain to be of concern. During a viral infection, the process of peptide presentation by MHC class I to CD8⁺ T lymphocytes is known to be essential for triggering an effective antiviral response, relevant to the improved development of HCV vaccine prototypes. This project aimed to **present** an overview of HCV-derived immunodominant epitopes restricted to HLA-A*02:01 using *in silico* and *in vitro* tools. For *in silico* studies, 59 polyprotein sequences from 7 genotypes of the virus were obtained from NCBI nucleotide and used for peptide prediction in NetCTL 2.0 software. About 2700 peptides with a combined score ≥ 0.75 were considered with potential to activate CD8⁺ T cells, identified and maintained for *in silico* functional analysis. In addition, physicochemical properties, and the capacity of induction of cytokines of the Th1 and/or Th2 axes of the cellular immune response by these peptides were also analyzed. Such analyses indicated a clear tendency to induce the regulatory cytokine IL-4 when compared to IFN- γ . For *in vitro* evaluation of peptide-MHC-I affinity, a peptide microarray system was performed using the peptides derived from the 7 HCV genotypes and a recombinant HLA-A*02:01 molecule. This strategy allowed the screening of immunodominant reactive amino acid sequences, and 615 peptides reactive to HLA-A*02:01 were observed *in vitro*. Finally, the results obtained *in silico* and *in vitro* allowed the identification of peptides with high reactivity to HLA-A*02:01, observing a predominance of reactive sequences in the regions of the p7, NS2 and NS5B proteins. In addition, the amino acid patterns observed in the reactive peptides has demonstrated the prevalence of leucine and tryptophan residues, highlighting the importance of these residues for the binding of the epitope to the TCR and, consequently, for the activation of CD8⁺ T lymphocytes. Overall, the HCV-derived and HLA-A2*02:01-restricted peptide patterns observed in this work provide important information for the development of a multi-epitope vaccine effective against multiple HCV genotypes.

KEYWORDS: Hepatitis C; HCV; cellular immune response; TCD8⁺ response; HLA-A*02:01; peptide microarray.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Estrutura da partícula viral e organização do genoma do HCV.....	18
Figura 2 – Representação esquemática do ciclo de multiplicação do HCV.....	20
Figura 3 – Prevalência da infecção por hepatite C no mundo dividida em seis regiões.....	21
Figura 4 – Classificação do HCV em 7 genótipos principais e diversos subtipos.....	23
Figura 5 – Taxa de incidência/deteção e óbitos de hepatites virais (A, B, C e D) no Brasil ao longo dos anos.....	25
Figura 6 – Resposta imune à infecção aguda pelo HCV.....	31
Figura 7 – Estrutura do MHC de classe II e do MHC de classe I.....	33
Figura 8 – Processamento antigênico para apresentação via MHC-I.....	34
Figura 9 – Alvo dos DAAs e seus respectivos inibidores.....	36
Figura 10 – Fluxograma contendo as etapas da metodologia para avaliação dos peptídeos preditos <i>in silico</i> e <i>in vitro</i> dos sete genótipos de HCV e seus subtipos.....	43
Figura 11 – Esquema metodológico do microarranjo PEPperCHIP®.....	51
Figura 12 – Parâmetros avaliados para os peptídeos preditos <i>in silico</i>	54
Figura 13 – Hidrofobicidade ao longo das poliproteínas dos 7 genótipos do HCV.....	56
Figura 14 – Hidrofobicidade das poliproteínas dos 7 genótipos do HCV sobrepostas.....	57
Figura 15 – Capacidade dos peptídeos preditos <i>in silico</i> de induzir citocinas IFN- γ e IL-4...58	
Figura 16 – Indução de IL-4 e IFN- γ pelos peptídeos preditos <i>in silico</i> derivados de cada um dos genótipos do HCV.....	59
Figura 17 – Quantidade de peptídeos preditos <i>in silico</i> com capacidade de indução de IL-4 e IFN- γ por genótipo.....	60
Figura 18 – Avaliação da reatividade dos peptídeos preditos pela afinidade com o HLA-A*02:01 em três diferentes concentrações 0 μ g/mL, 1 μ g/mL e 10 μ g/mL.....	61
Figura 19 – Análise quantitativa da distribuição dos peptídeos reativos <i>in vitro</i> ao HLA-A*02:01 por proteína do HCV dos sete genótipos juntos.....	63
Figura 20 – Análise quantitativa da distribuição dos peptídeos reativos <i>in vitro</i> ao HLA-A*02:01 por proteína do HCV para cada um dos sete genótipos.....	64
Figura 21 – Análise de logotipo de sequência dos peptídeos preditos <i>in silico</i> em relação aos parâmetros de (A) afinidade ao HLA-A*02, (B) clivagem e (C) TAP, mostrando os resíduos de aminoácidos predominantes em cada posição.....	66
Figura 22 – Análise de logotipo de sequência dos peptídeos reativos <i>in vitro</i> ao HLA-A*02, mostrando os resíduos de aminoácidos predominantes em cada posição.....	67

Figura 23 – Heatmaps demonstrando a correlação dos valores obtidos para a reatividade dos peptídeos ao HLA-A*02:01 nas concentrações de 1 µg e 10 µg da molécula, capacidade <i>in silico</i> de indução de citocinas no eixo Th1 (IFN-γ) e Th2 (IL-4) e parâmetros físico-químicos para cada um dos genótipos avaliados neste estudo.....	68
Figura 24 – Redes de correlação com os parâmetros físico-químicos dos peptídeos em azul, reatividade <i>in vitro</i> em verde, análises <i>in silico</i> em amarelo e indução de citocinas em vermelho.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APC** – Célula apresentadora de antígenos
- C** – Proteína do nucleocapsídeo
- CD81** – *Cluster of differentiation 81*
- CDC** – Centro de Controle e Prevenção de Doenças
- CLDN1** – Claudina 1
- CTLs** – Linfócitos T citotóxicos
- DAAs** – *Direct antiviral agents* – Antivirais de ação direta
- DC** – Célula dendrítica
- DENV** – *Dengue virus*
- DNA** – *Deoxyribonucleic acid* – Ácido desoxirribonucleico
- E1** – Glicoproteína do envelope E1
- E2** – Glicoproteína do envelope E2
- EGFR** – Receptor do fator de crescimento epidérmico
- ELISA** – Ensaio de imunoabsorção enzimática
- HCC** – *Hepatocellular carcinoma* – Carcinoma hepatocelular
- HCV** – *Hepacivirus hominis* – *Hepatitis C virus*
- HCV1-7** – *Hepatitis C virus* genótipos 1 a 7
- HIV** – *Human Immunodeficiency virus* – Vírus da imunodeficiência humana
- HLA** – *Human leukocyte antigen* – Antígeno leucocitário humano
- HSCs** – Células estreladas hepáticas
- HSPGs** – Proteoglicanos de sulfato de heparano
- IFN** – Inteferon
- IFN- γ** – Interferon gamma
- IgG** – Imunoglobulina G
- IL-10** – Interleucina 10
- IL-2** – Interleucina 2
- IL-4** – Interleucina 4
- IREs** – *Internal ribosome entry site* – Sítio interno de entrada do ribossomo
- JFH-1** – Variante do genótipo 2a
- L** – Leucina
- LDL-R** – Receptor de baixa densidade de lipoproteína
- LVPs** – Partículas lipovirais

MHC-I – *Major histocompatibility complex class I* – Complexo principal de histocompatibilidade de classe I

MHC-II – *Major histocompatibility complex class II* – Complexo principal de histocompatibilidade de classe II

mRNA – *Messenger ribonucleic acid* – Ácido ribonucleico mensageiro

NS5B – *Non-structural protein 5B* – Proteína não estrutural 5B

NK – *Célula natural killer*

NS2 – *Non-structural protein 2* – Proteína não estrutural 2

NS3 – *Non-structural protein 3* – Proteína não estrutural 3

NS4A – *Non-structural protein 4A* – Proteína não estrutural 4A

NS4B – *Non-structural protein 4B* – Proteína não estrutural 4B

NS5A – *Non-structural protein 5A* – Proteína não estrutural 5A

OCLN – Ocludina

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORF – *Open reading frame* – Fase de leitura aberta

P – Prolina

p7 – *Non-structural protein p7* – Proteína não estrutural p7

PBMC – Células mononucleares do sangue periférico

PBS – Tampão fosfato alcalino

PEG – Polietilenoglicol

pI – Ponto isoelétrico

pMHC-I – Peptídeo associado ao MHC-I

RAVs – *Resistance-associated amino-acid variants* – Variantes de aminoácidos associadas à resistência

RE – Retículo endoplasmático

RIG-I – *retinoic-acid inducible gene*

RNA – *Ribonucleic acid* – Ácido ribonucleico

RT-PCR – *Reverse transcription polymerase chain reaction* – Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

RVS – Resposta virológica sustentada

SRB1 – Receptor scavenger de classe B tipo 1

ssRNA – *Single strain Ribonucleic acid* – Ácido ribonucleico de fita simples

SVM – *Support vector machine* – Máquinas de vetor de suporte

TAP – *Transport associated proteins* – Proteínas transportadoras associadas ao processamento de antígenos

TCR – *T-cell receptor* – receptor de células T

Th1 – *T helper 1* – T auxiliar 1

Th2 – *T helper 2* – T auxiliar 2

TNF – Fator de necrose tumoral

UTRs – *Untranslated regions* – Regiões não traduzidas

UV – Ultravioleta

V – Valina

VLPs – *Virus-like particles* – Partículas semelhantes a vírus

W – Triptofano

YFV – *Yellow fever virus*

ZIKV – *Zika virus*

β-2M – Beta-2 microglobulina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 ESTRUTURA DA PARTÍCULA VIRAL E MULTIPLICAÇÃO DO HCV	17
1.2 EPIDEMIOLOGIA	21
1.3 DIAGNÓSTICO E ASPECTOS CLÍNICOS	26
1.4 IMUNOPATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO HCV	28
1.4.1 Apresentação dos peptídeos virais via MHC.....	32
1.5 ABORDAGENS TERAPÊUTICAS	35
1.6 ABORDAGENS PROFILÁTICAS E VACINAS	37
2 JUSTIFICATIVA	40
3 OBJETIVOS	42
3.1 OBJETIVO GERAL	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 Fluxograma da estratégia metodológica.....	43
4.2 Ferramentas de bioinformática.....	43
4.3 Análises in silico para predição de epítomos restritos ao HLA-A*02.....	47
4.4 Predição in silico da afinidade entre peptídeo e o HLA-A*02:01, processamento antigênico e imunogenicidade	48
4.5 Avaliação de resíduos conservados e frequências de aminoácidos em peptídeos HCV restritos ao HLA-A*02:01	49
4.6 Predição da indução de produção de citocinas e análise de propriedades físico- químicas dos peptídeos restritos ao HLA-A*02:01 dos genótipos de HCV	49
4.7 Avaliação do repertório de epítomos virais com alta afinidade ao HLA-A*02:01 empregando o sistema de microarranjos PEPperCHIP©	50
4.8 Identificação da posição dos peptídeos restritos ao HLA-A*02:01 ao longo das poliproteínas virais	52
4.9 Análises estatísticas	53
5 RESULTADOS	53
6 DISCUSSÃO	71
7 CONCLUSÃO	80
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

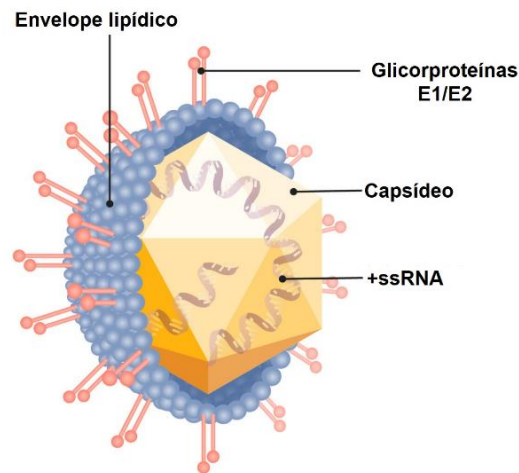
1.1 Estrutura da partícula viral e multiplicação do HCV

A hepatite C é um grave problema de saúde global, uma vez que é a principal causa de doença hepática crônica, cirrose e carcinoma hepatocelular (HCC) no mundo (Khullar; J Firpi, 2015; Roudot-Thoraval, 2021). Atualmente, estima-se que cerca de 71 milhões de pessoas estejam infectadas com o *Hepacivirus hominis* (HCV) (ICTV, 2024) mundialmente, sendo uma maioria de indivíduos assintomáticos ou com sintomatologia inespecífica (Castaneda *et al.*, 2021; Spearman *et al.*, 2019).

O HCV compreende diversos vírus envelopados de genoma ssRNA+ entre 9.0-13 kb, compostos por uma proteína de capsídeo e duas ou três glicoproteínas do envelope. Trata-se de vírus pertencentes ao gênero *Hepacivirus*, família *Flaviviridae*. Além do gênero *Hepacivirus*, a família *Flaviviridae* é composta por outros três gêneros: *Pestivirus*, *Pegivirus* e *Flavivirus*; sendo o último conhecido por englobar diversos outros vírus de importância média no Brasil, tais como o vírus da febre amarela (YFV), vírus da Zika (ZIKV) e o vírus da dengue (DENV) (Gerold *et al.*, 2017; ICTV, 2024; Simmond *et al.*, 2017).

O genoma do HCV codifica apenas uma ORF (*open reading frame*) flanqueada por regiões 5' e 3' não traduzidas (UTRs) contendo estruturas secundárias de RNA essenciais para a replicação viral. A 5' UTR possui um sítio interno de entrada do ribossomo (IRES) do tipo 3, importante na caracterização da família *Flaviviridae*, e essencial para o início do processo de tradução da ORF. Essa ORF é então traduzida em uma única poliproteína, que é processada durante e após a tradução por proteases celulares e virais, originando as proteínas estruturais e não estruturais do vírus. Enquanto as proteínas não estruturais p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B, participam diretamente da replicação, montagem e liberação de novos vírions (Li *et al.*, 2021; Tabata *et al.*, 2020) (Figura 1B). Já as proteínas estruturais E1 e E2 são responsáveis pela formação do envelope viral, formando um heterodímero durante a maturação viral e permitindo a penetração viral, adicionalmente os virions liberados ainda possuem em sua membrana lipídica moléculas de colesterol e esfingomiélin, com funções importantes na penetração do HCV nas células alvo (Li *et al.*, 2021; Tabata *et al.*, 2020) (Figura 1A). Por fim, a proteína estrutural do capsídeo associa-se à molécula de RNA, formando a estrutura do nucleocapsídeo (L *et al.*, 2021; Tabata *et al.*, 2020)

A) Estrutura do HCV



B) Proteínas codificadas pelo genoma do HCV

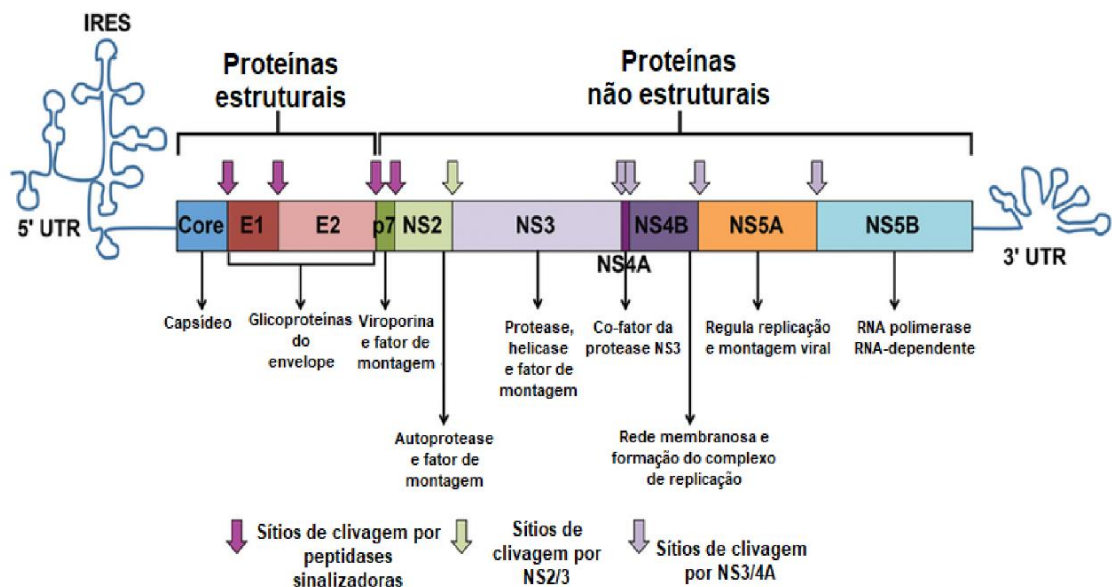


Figura 1 – Estrutura da partícula viral e organização do genoma do HCV. Em (A) estrutura da partícula viral. Em (B) genoma do HCV e proteínas codificadas pelo vírus onde 5' UTR e 3' UTR significa região 5' e 3' não traduzidas e IRES significa sítio interno de entrada do ribossomo. Fonte: Adaptado de Abdel-Hakeem; Shoukry, 2014.

O HCV é transmitido via contato direto com sangue infectado e circula pela corrente sanguínea na forma de partículas lipovirais (LVPs), nas quais o vírus encontra-se associado com lipoproteínas de baixa densidade. Os LVPs atingem o fígado e infectam os hepatócitos, dando início ao seu ciclo de multiplicação viral (Figura 2). A penetração do vírus na célula hospedeira tem início com a ligação das partículas lipovirais com proteoglicanos de heparan sulfato (HSPGs), o receptor de baixa densidade de lipoproteína (LDL-R) e o receptor scavenger de classe B tipo 1 (SRB1) presentes na superfície basolateral celular (Colpitts *et al.*, 2020; Gerold *et al.*, 2020; Lindenbach; Rice, 2013).

O SRB1 é capaz de remover os lipídeos das lipoproteínas associadas ao HCV e induzir alterações conformacionais na glicoproteína E2, facilitando a exposição do sítio de ligação ao CD81, principal receptor do HCV, e permitindo a interação com a partícula viral. Após essa ligação, a interação E2-CD81 ativa então uma transdução de sinal através do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), e outros fatores que irão ser responsáveis por promover a internalização do vírion. Estes eventos de sinalização então promovem a difusão lateral de complexos HCV-CD81 para sítios de contato celular para possibilitar a interação de CD81 com a proteína claudina 1 (CLDN1) expressa na membrana basolateral e nas junções de oclusão dos hepatócitos (Colpitts *et al.*, 2020; Gerold *et al.*, 2020; Lindenbach; Rice, 2013).

A formação do complexo de correceptores CD81-CLDN1 desempenha um papel essencial na internalização do HCV na célula hospedeira. Além disso, outra proteína de junção que participa da internalização viral nos hepatócitos é a ocludina (OCLN), sendo essa uma etapa crítica do processo de entrada do HCV. Por fim, a internalização ocorre por meio da endocitose mediada por clatrina e dependente de dinamina II. Após a endocitose o vírus então se encontra dentro de um endossomo e o baixo pH do compartimento endossomossômico induz a fusão do envelope viral com a membrana endossomal, liberando o RNA viral no citosol, onde será diretamente traduzido em proteínas virais para a produção de novos vírions (Colpitts *et al.*, 2020; Gerold *et al.*, 2020; Lindenbach; Rice, 2013).

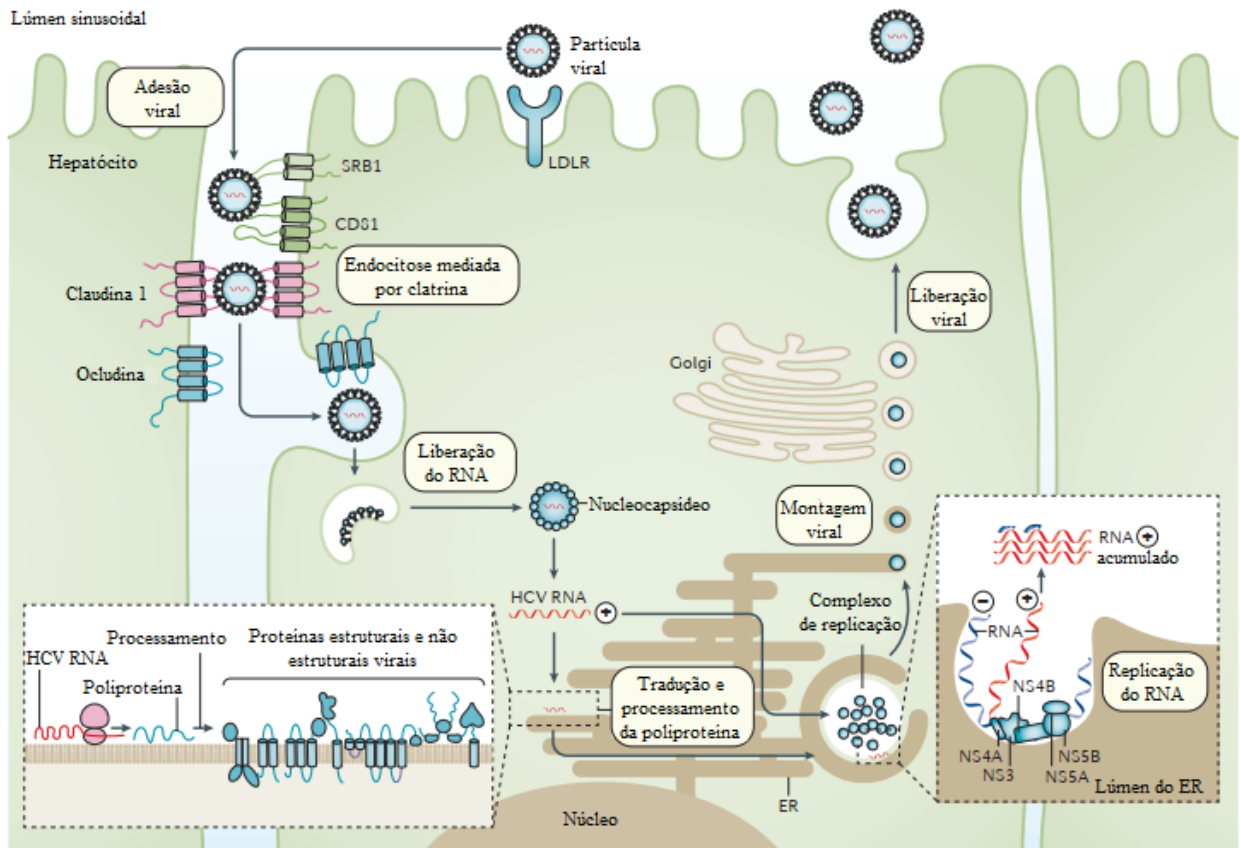


Figura 2 – Representação esquemática do ciclo da multiplicação do HCV. Na imagem estão ilustradas as etapas de adesão, entrada por meio do processo de endocitose mediada por clatrina, expressão do genoma viral envolvendo tradução e processamento da poliproteína e a replicação do RNA viral, e por fim, a montagem e liberação de novas partículas. Adaptado de Manns *et al.*, 2017.

As primeiras proteínas transcritas pela maquinaria celular são as proteínas não estruturais do HCV para dar início ao processo de replicação viral. Esse complexo de replicação é formado pelas proteínas NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B, cujas principais proteínas são a NS3, com função de helicase, e a NS5B que é a RNA polimerase dependente de RNA viral. O HCV é capaz de induzir alterações na membrana do retículo endoplasmático para a replicação do RNA, formando a fábrica viral, responsável por realizar as cópias do material genético do vírus (Li *et al.*, 2021; Lindenbach; Rice, 2013; Tabata *et al.*, 2020).

Após a amplificação do material genético viral, as proteínas estruturais são produzidas, dando início ao processo de montagem que depende principalmente das proteínas p7 e NS2, responsáveis por interagir com NS3-NS4A para recrutar a proteína do nucleocapsídeo e o complexo E1-E2 para montagem das partículas virais. Por fim, o HCV utiliza a via biosintética de lipoproteína de baixa densidade para sua montagem e liberação da célula pelo processo de brotamento do RE (Li *et al.*, 2021; Lindenbach; Rice, 2013; Tabata *et al.*, 2020).

1.2 Epidemiologia

O HCV foi identificado pela primeira vez após diversos casos de hepatite não-A e não-B observados após transfusões sanguíneas em 1975, mas a descrição do vírus ocorreu apenas em 1989 (Laugi, 2020; Westbrook; Dusheiko, 2014). Atualmente, o HCV é endêmico em vários países e um grande motivo de preocupação para a sociedade devido a sua alta morbidade e mortalidade. As regiões mais acometidas pela doença, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), são: Mediterrâneo Oriental, Pacífico Ocidental, Europeia, Sudeste da Ásia, Africana e a região das Américas (Figura 3) (Castaneda *et al.*, 2021; Dennis *et al.*, 2021; Roudot-Thoraval, 2021; World Health Organization, 2021).

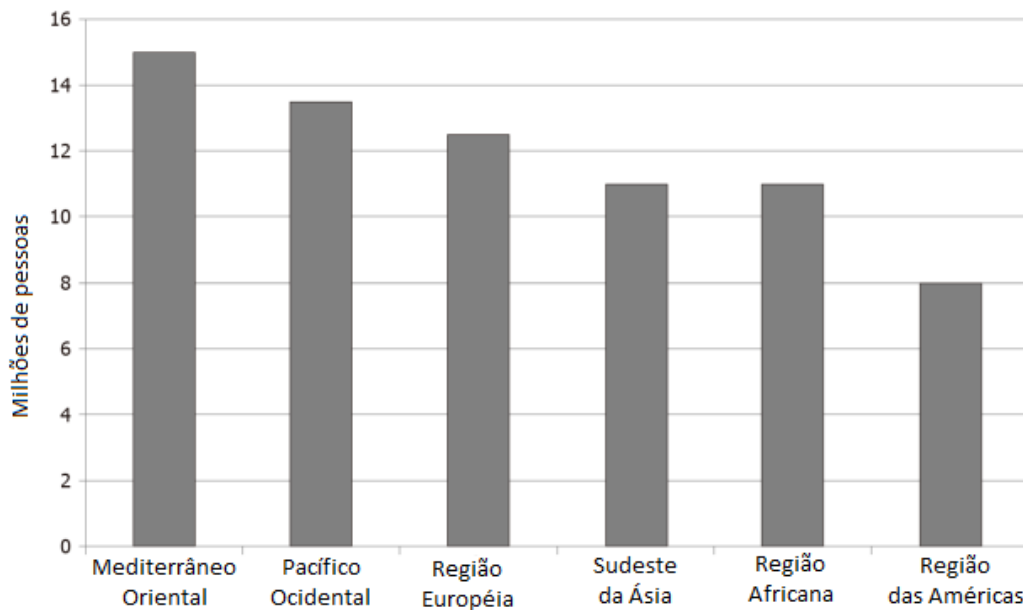


Figura 3 – Prevalência da infecção por hepatite C no mundo dividida em seis regiões. Essas regiões são Mediterrâneo Oriental, Pacífico Ocidental, Região Europeia, Sudeste da Ásia, Região Africana e Região das Américas. Adaptado de Castaneda *et al.*, 2021.

De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), a cada 100 pessoas infectadas com o HCV, cerca de 60-70 irão desenvolver doença hepática crônica, 5-20 irão desenvolver cirrose em um período de 20 a 30 anos e 1-5 irão à óbito em decorrência da infecção. De maneira geral, é estimado pela OMS que cerca de 350 mil pessoas morrem anualmente infectadas pelo HCV (Stasi *et al.*, 2020; World Health Organization, 2021).

As regiões de maior endemicidade para a doença estão concentradas na Ásia e na África com uma grande porcentagem de casos principalmente no Egito, com cerca de 18-22% dos casos, e no Paquistão com cerca de 4,9% dos casos. Entretanto, mundialmente é difícil

estimar a soroprevalência do HCV por ser altamente variável entre as diversas regiões e subestimada, já que depende da testagem ampla e eficiente da população de cada país. Como grande parte dos indivíduos infectados é assintomática, estes indivíduos muitas vezes não são testados, dificultando ainda mais a determinação de uma soroprevalência mundial confiável. De acordo com a OMS, no ano de 2017 apenas cerca de 20% dos infectados estavam cientes do seu diagnóstico, contribuindo para a propagação e disseminação do vírus. Outros fatores que colaboram para uma testagem insuficiente e dificuldade no diagnóstico do HCV é a escassez de informação, baixa infraestrutura e pouco investimento em diversos países (Dennis *et al.*, 2021; Mangia *et al.*, 2021; Roudot-Thoraval, 2021; Westbrook; Dusheiko, 2014).

O HCV possui uma variabilidade genética muito alta, podendo ser classificado em sete diferentes genótipos (1-7) (Figura 4) que diferem entre si em aproximadamente 30-35% da sequência de nucleotídeos. Além da divisão em genótipos, o HCV ainda possui classificação em 67 subtipos, com variação de cerca de 15% da sequência de nucleotídeos entre si. Os genótipos do HCV e seus subtipos possuem uma distinta distribuição regional no mundo, sendo possível observar a predominância de certos genótipos em determinadas regiões. Tal observação pode ser explicada por diversos fatores, dentre eles a migração humana, alterações ambientais e evoluções virais (Bukh, 2016; Dennis *et al.*, 2021; Messina *et al.*, 2014; Roudot-Thoraval, 2021).

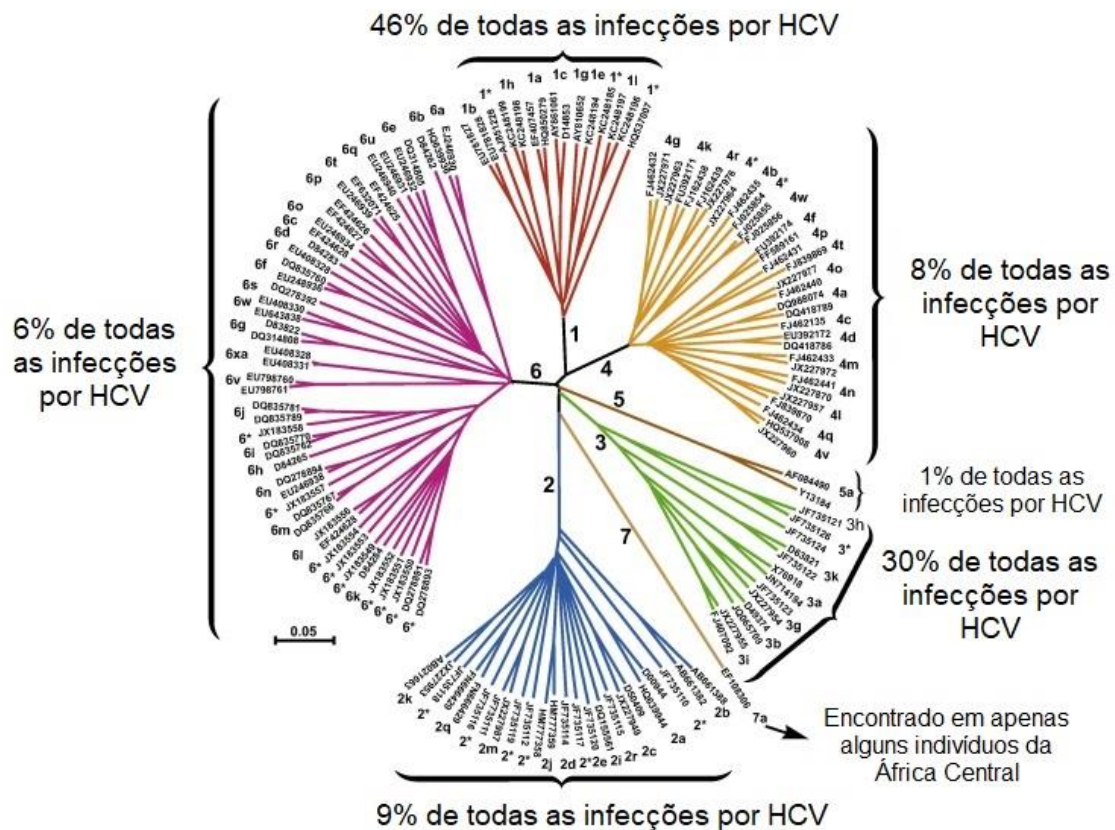


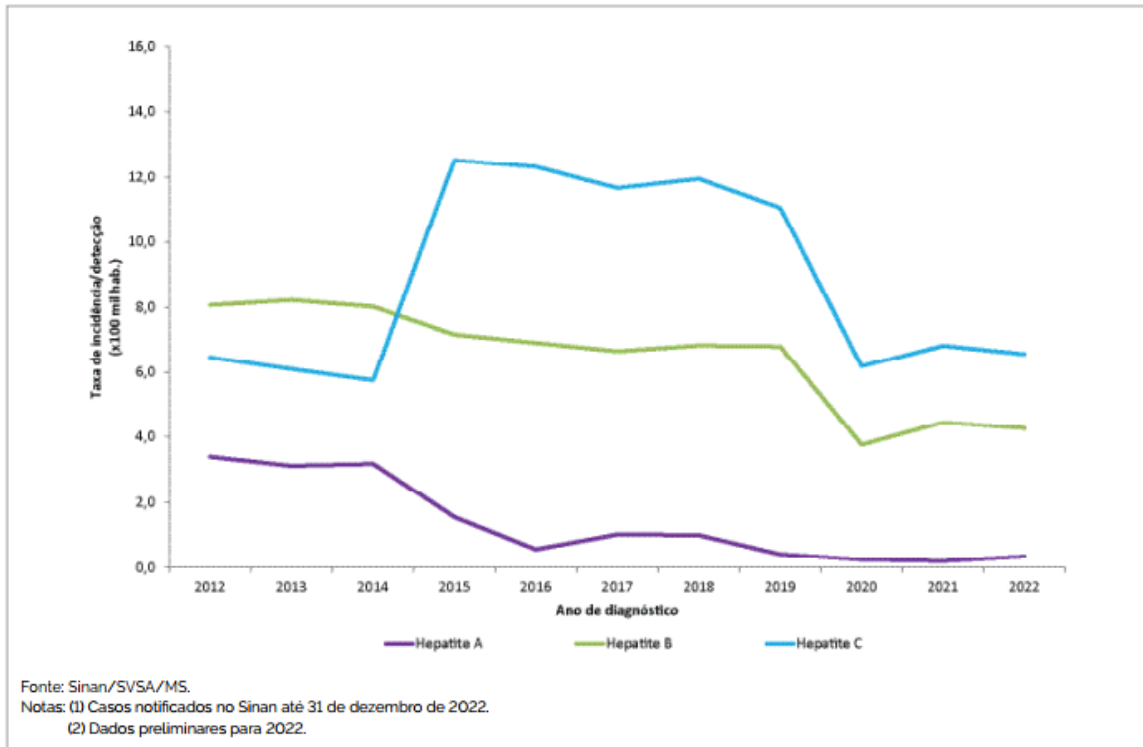
Figura 4 - Classificação do vírus da hepatite C (HCV) em 7 genótipos principais e muitos subtipos. A árvore de análise filogenética foi baseada na análise das sequências nucleotídicas das ORFs. A prevalência e a distribuição geral são indicadas para cada genótipo. Adaptado de Bukh, 2016.

O conhecimento sobre a distribuição dos genótipos do HCV é de extrema importância, pois possui significantes implicações clínicas na eficácia do tratamento da hepatite C. De maneira geral, estima-se que o genótipo 1 seja mais frequente, seguido pelo genótipo 3 e posteriormente pelos genótipos 2, 4 e 6, respectivamente. Regionalmente, o genótipo 1 é mais prevalente nas Américas, na África Central e na Europa, já o genótipo 2 na África Ocidental, o genótipo 3 no Sudeste e Sul da África, Norte da Europa e Sul da Ásia, o genótipo 4 na África Central e no Oriente Médio, o genótipo 5 no Sul da África e na Ásia, o genótipo 6 no Sudeste da Ásia e o genótipo 7 na África Central (Bukh, 2016; Dennis *et al.*, 2021; Gower *et al.*, 2014; Roudot-Thoraval, 2021).

No Brasil, dentre os 750.651 casos confirmados de hepatites virais no período de 2000 a 2022 (Figura 5A), o maior número é atribuído à hepatite C, bem como a maior causa de mortes (Figura 5B). Nesse mesmo período, foram reportados 298.738 casos de hepatite C, com maior incidência identificada nas regiões Sudeste (58,3%), Sul (27,1%), Nordeste (7,1%), Centro-Oeste (3,9%) e Norte (3,6%), respectivamente, com os estados de São Paulo e

Rio Grande do Sul apresentando as maiores porcentagem dentre os estados brasileiros (Da Silva *et al.*, 2020, Hanus *et al.*, 2015; Kretzer *et al.*, 2014; Ministério da Saúde, 2023).

A) Taxa de incidência/deteção de hepatites virais (por 100.000 habitantes) segundo agente etiológico e ano de diagnóstico. Brasil, 2012 a 2022^(1,2)



B) Distribuição percentual dos óbitos por causa básica e associada às hepatites virais segundo agente etiológico. Brasil, 2000 a 2021

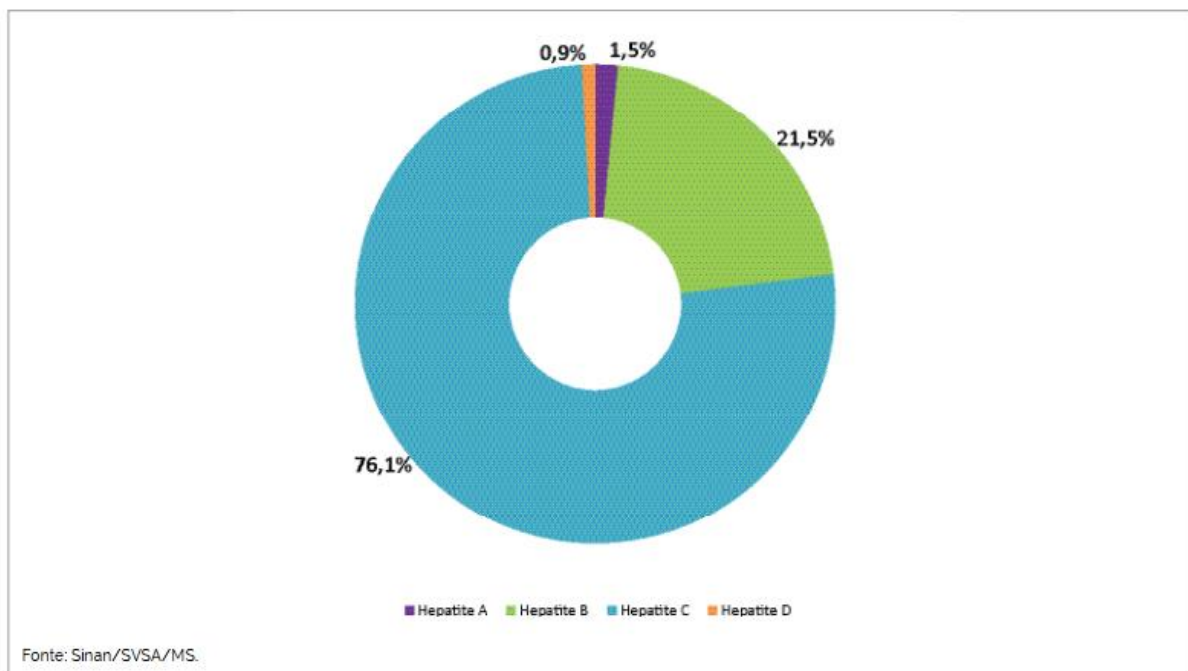


Figura 5 – Taxa de incidência/deteção e óbitos de hepatites virais (A, B, C e D) no Brasil ao longo dos anos. Em (A) taxa de incidência/deteção de hepatites virais por 100.000 habitantes considerando hepatite A, B e C entre os anos de 2012-2022. Em (B) distribuição percentual dos óbitos por causa básica e associada às hepatites virais A, B, C e D entre os anos de 2000-2021. Adaptado de Ministério da Saúde, 2023.

1.3 Diagnóstico e aspectos clínicos

As principais formas de contaminação estão ligadas à reutilização ou esterilização inadequada de equipamento médico, à transfusão de sangue e hemoderivados e ao compartilhamento de seringas e agulhas para utilização de drogas injetáveis, enquanto a contaminação por práticas sexuais de risco e transplacentárias são menos comuns (Dennis *et al.*, 2021; Roudot-Thoraval, 2021; World Health Organization, 2021).

Entretanto, as rotas de transmissão variam com as mudanças nos âmbitos econômico, social e da saúde. Por exemplo, a transmissão por transfusão de sangue e procedimentos cirúrgicos tem sido a principal rota de transmissão em diversos países do mundo, exceto em países mais desenvolvidos, nos quais a esterilização eficaz de materiais cirúrgicos e testes para a identificação de HCV de doadores foram implementadas, permitindo a eliminação destas rotas de transmissão. A segunda principal rota de transmissão ocorre entre a população que faz uso de drogas intravenosas e essa rota afeta tanto os países mais desenvolvidos, sendo a principal rota de infecção, quanto os menos desenvolvidos, embora alguns países industrializados estejam atualmente investindo em políticas de redução de danos para diminuição do compartilhamento de agulhas e seringas (Dennis *et al.*, 2021; Roudot-Thoraval, 2021; Stasi *et al.*, 2020).

Após a contaminação, o período de incubação da hepatite C pode variar de 2 semanas a 6 meses e apenas 20% dos pacientes apresentam sintomas de fase aguda da doença, o restante são assintomáticos ou apresentam sintomas não específicos da doença. Os sintomas principais incluem perda de apetite, fadiga, mal-estar e icterícia, enquanto alguns pacientes conseguem eliminar a infecção dentro de seis meses, a maioria desenvolve uma infecção crônica com elevado risco de morbidade e mortalidade (Dennis *et al.*, 2021; Stasi *et al.*, 2020; World Health Organization, 2021).

Os pacientes com hepatite C crônica apresentam uma persistente inflamação no fígado e podem desenvolver hepatite aguda, cirrose e carcinoma hepatocelular. Além dessas manifestações hepáticas, também podem ser observadas manifestações extra-hepáticas, como crioglobulinemia, glomerulonefrites, distúrbios na tireoide, diabetes mellitus e resistência à insulina (Antonelli *et al.*, 2008; Khatun; Ray, 2019; Kuna *et al.*, 2019; Roudot-Thoraval, 2021).

O diagnóstico do HCV ocorre em duas etapas, a primeira através da realização de um teste sorológico, o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), para identificação de anticorpos anti-HCV, em caso de teste positivo, é necessária a realização do teste de reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-PCR), para identificar a presença do RNA viral (Dennis *et al.*, 2021; Keikha *et al.*, 2019; World Health Organization, 2021). Se confirmada a infecção crônica pelo HCV, é necessária a realização de uma avaliação para determinar o grau de lesão hepática e identificar qual o genótipo do HCV responsável pela infecção para guiar as decisões de tratamento da doença (Gower *et al.*, 2014; World Health Organization, 2021).

1.4 Imunopatogênese da infecção pelo HCV

O HCV é um vírus que não apresenta efeito citopático de maneira direta, mas a resposta imunológica do hospedeiro contra o vírus causa danos ao fígado e induz uma inflamação de longa duração. Dessa forma, ao se multiplicar no hepatócito, o HCV é responsável por causar necrose celular através de uma citólise imunomediada, ligada tanto à imunidade inata quanto à imunidade adaptativa, e inflamação mediada pelo metabolismo celular, causando esteatose hepática, estresse oxidativo e resistência à insulina (Antonelli *et al.*, 2007; Castaneda *et al.*, 2021).

A autolimitação da infecção aguda pelo HCV é decorrente de uma forte resposta multiespecífica dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ contra os epítomos das proteínas virais, entretanto, quando o hospedeiro não é capaz de eliminar o vírus naturalmente, a infecção torna-se crônica, caracterizando-se pela persistência viral. A persistência viral pode ser atribuída à capacidade do vírus para escapar à vigilância imunológica por meio de mutações e inibição de componentes do sistema imune inato como células dendríticas (DC) e células *natural killer* (NK), pela disfunção dos linfócitos T e pelas proteínas virais do HCV (Antonelli *et al.*, 2007; Chigbu *et al.*, 2019).

Durante a infecção aguda pelo HCV, o RNA viral é detectado em até duas semanas, dando início à resposta imune inata e adaptativa. Padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) são reconhecidos por receptores do tipo RIG-I e receptores do tipo Toll, ativando uma cascata que culmina com a liberação de proteínas antivirais, incluindo interferons. A citólise dos hepatócitos infectados é mediada por perforinas e granzimas secretadas pelos linfócitos T citotóxicos (CTLs) e células NK e a secreção de interferon gamma (IFN- γ), realizada também por essas células, juntamente com o fator de necrose tumoral (TNF) secretado por macrófagos, desempenham um papel crucial na eliminação do HCV das células infectadas.

Por outro lado, algumas proteínas virais desempenham um papel importante na persistência viral e evasão do sistema imune do hospedeiro, sendo essenciais para a patogênese do HCV. É o caso da proteína NS5A, cuja função está relacionada à inibição da via apoptótica celular, permitindo a replicação viral. De maneira similar, a proteína do capsídeo (Core) e E1 inibem a maturação das células dendríticas, enquanto a proteína E2

contribui para a evasão do HCV do sistema imune. Esses fatores contribuem para que a infecção progrida para a sua forma crônica (Castaneda *et al.*, 2021; Chigbu *et al.*, 2019).

Em uma infecção crônica pelo HCV, os hepatócitos são destruídos constantemente pelos CTLs e células NK na tentativa de eliminação do vírus, ocasionando um grande dano hepático que leva ao processo de fibrose e ao subsequente desenvolvimento de cirrose. A cirrose, é resultado de um constante estímulo para regeneração do tecido danificado pela citólise dos hepatócitos, sendo caracterizada por uma inflamação crônica, substituição do tecido hepático por tecido fibroso e pelo acúmulo excessivo de proteínas da matriz extracelular, tais como fibras de colágeno e células estreladas hepáticas (HSCs). As complicações relacionadas a esse quadro incluem hipertensão portal, disfunção hepática, carcinoma hepatocelular e distúrbios de coagulação (Chigbu *et al.*, 2019; Khatun *et al.*, 2019; Nusrat *et al.*, 2014; Pinzani *et al.*, 2011).

Para o HCV, de maneira semelhante a outras infecções virais conhecidas, uma resposta funcional multiespecífica das células T CD4⁺ e T CD8⁺ é essencial para a eliminação do vírus e a prevenção da fase crônica da infecção. Diversos estudos sugerem que as células T CD8⁺ são as principais células efetoras antivirais, enquanto as células T CD4⁺ desempenham um importante papel no processo de eliminação viral. Entretanto, é importante destacar que as células T CD8⁺ específicas contra o HCV infiltram-se no fígado apenas 6-8 semanas após a infecção e não produzem IFN- γ na fase inicial da infecção. Durante as semanas iniciais da infecção, a viremia é controlada relativamente pela resposta imune inata, como células NK e interferons do tipo I e III (Chigbu *et al.* 2019; Shoukry *et al.*, 2003; Kemming, Thimme e Neumann-Haefelin 2020).

No contexto da resposta imune adaptativa, células T CD4⁺ auxiliam na estimulação da resposta das células T CD8⁺, que ativa células apresentadoras de antígenos (APCs) e produz citocinas importantes para o controle da multiplicação viral durante a fase aguda da doença, como IFN- γ . As células T CD4⁺ auxiliares ativadas podem ser divididas em dois subgrupos funcionais com base nas citocinas que elas produzem. O subgrupo Th1 promove uma resposta de imunidade mediada por células e pró-inflamatória pela produção de interleucina 2 (IL-2) e IFN- γ , enquanto o subgrupo Th2 promove uma imunidade mediada por anticorpos e uma resposta mais regulatória, suprimindo a resposta TH1, pela produção de interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10). Dessa forma, diversos trabalhos sugerem que uma resposta das células T CD4⁺ sustentada promove a eliminação do HCV, enquanto uma perda de resposta

dessas células promove a persistência viral, uma vez que impacta negativamente a funcionalidade das células T CD8⁺ (Brown *et al.* 2001; Chigbu *et al.* 2019; Diepolder *et al.* 1996; Sofian *et al.*, 2012).

Assim, sumariamente, após a entrada do HCV no organismo do hospedeiro, o vírus é levado pela corrente sanguínea pela artéria hepática e a veia porta até o fígado devido ao seu tropismo pelos hepatócitos, células permissíveis à multiplicação viral. Já no fígado, o HCV dará início ao seu ciclo de multiplicação para produção de partículas virais infecciosas. Durante a infecção aguda, as células NK atuam na tentativa de conter a multiplicação viral por meio da eliminação das células infectadas, bem como pela produção de IFN- γ que exerce papéis importantes na atividade antiviral. Além disso, as partículas virais infecciosas produzidas pelos hepatócitos infectados serão liberadas e fagocitadas por células APCs, responsáveis pelo processamento de antígenos virais e apresentação desses antígenos via MHC-II para as células T CD4⁺, além de, assim como as células NK, produzir IFN- γ para controle da infecção (Figura 6) (Heim, 2013; Rana, Chawla e Arora 2013).

Em seguida, essas células T CD4⁺ ativadas podem se diferenciar entre os subgrupos Th2, cujas citocinas produzidas, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, estimulam a produção de anticorpos pela ativação de células B e Th1, cujas citocinas IFN- γ e TNF- α , estimulam uma resposta antiviral inflamatória. Enquanto isso, as células T CD8⁺, estimuladas pelo IFN- γ presentes no microambiente do fígado, reconhecem peptídeos apresentados via MHC-I por hepatócitos infectados e atuam eliminando essas células (Figura 6) (Heim, 2013; Rana, Chawla e Arora 2013).

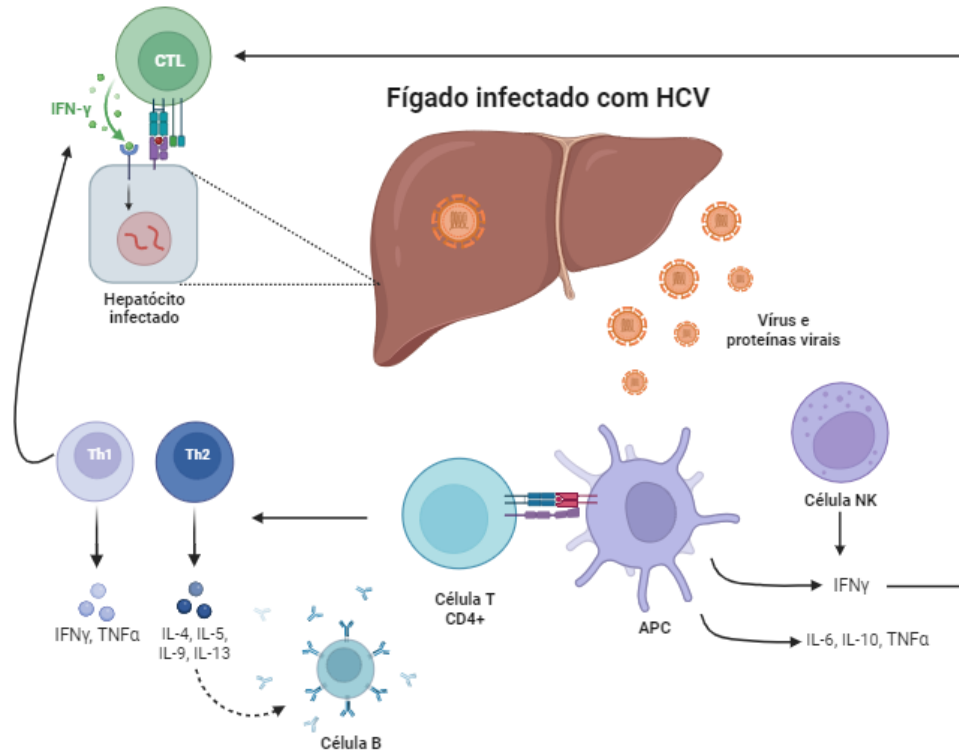


Figura 6 – Resposta imune à infecção aguda pelo HCV. Após a infecção das células do fígado, os hepatócitos, pelo HCV, partículas virais são processadas e seus peptídeos apresentados pelos hepatócitos via MHC-I para células T CD8⁺ que irão destruir as células infectadas e por APCs via MHC-II para as células T CD4⁺. As células T CD4⁺ efectoras então se diferenciam em dois subgrupos: Th2, que produz IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, e estimulam a produção de anticorpos pela ativação de células B e Th1, que produz de IFN- γ e TNF- α , e exercem atividade antiviral, contribuindo também para a ativação dos CTLs responsáveis pela destruição dos hepatócitos infectados. APCs e células NK também produzem citocinas, principalmente IFN- γ , contribuindo ainda mais para atividade antiviral. Elaborado pela autora, 2023.

Na infecção pelo HCV, as citocinas IFN- γ e IL-4 são importantes não só para a diferenciação entre Th1 e Th2, respectivamente, como também para determinar a ocorrência ou não de uma infecção crônica (Chigbu *et al.* 2019). Sabe-se que o IFN- γ é essencial para o controle de infecções virais, uma vez que tem uma atividade antiviral direta e estabelece uma conexão entre resposta imune inata e adaptativa, contribuindo para a diferenciação das células T CD4⁺ e T CD8⁺. Além de contribuir para a diferenciação de células T, responsáveis pelo *clearance viral*, o IFN- γ atua controlando a multiplicação do HCV de maneira não citolítica, impedindo a penetração do vírus nos hepatócitos e replicação do RNA. Assim, uma expressão maior de IFN- γ já foi diversas vezes relacionada com a autolimitação da infecção (Edlich *et al.* 2011; Frese *et al.* 2002; Whitmire, Tan e Whitton, 2005).

Já a IL-4 é uma citocina multifuncional que controla o crescimento celular, incluindo células do sistema imune, e é responsável por manter respostas reguladoras e anti-inflamatórias por meio da inibição da ativação de células Th1. Essa citocina já foi descrita

como tendo propriedade de induzir a diferenciação de células T para o subgrupo Th2 e de aumentar a síntese de colágeno por células do fígado em estudos *in vitro*, exercendo assim um papel crucial na fibrogênese hepática. Além disso, IL-4 geralmente é encontrada aumentada em pacientes com infecção crônica pelo HCV (Batsaikhan *et al.* 2019; Lee *et al.* 2015).

1.4.1 Apresentação dos peptídeos virais via MHC

Para que a resposta de linfócitos T tenha início, é necessário que essas células sejam ativadas via interação entre o receptor de células T (TCR) e sequências peptídicas virais apresentadas por moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), que são divididas em duas classes: MHC de classe I (MHC-I) e MHC de classe II (MHC-II) (Wieczorek *et al.*, 2017). Os haplótipos de MHC estão localizados no braço curto do cromossomo 6, em uma região conhecida como a região mais variável do genoma humano e recebe o nome de sistema de antígenos leucocitários humano (HLA) (Fabreti-Oliveira *et al.*, 2014).

O MHC de classe I e o MHC de classe II possuem estruturas e funções muito semelhantes, porém apresentam particularidades importantes. As moléculas de MHC-II são responsáveis pela apresentação de peptídeos obtidos de patógenos extracelulares obtidos pela via fagocítica às células T CD4⁺ e estão presentes em células apresentadoras de antígenos (APCs), tais como células dendríticas, macrófagos e células B. Sua estrutura é composta por duas cadeias polipeptídicas não covalentemente associadas denominadas de cadeia α e cadeia β e formadas por dois domínios cada ($\alpha 1$ e $\alpha 2$, $\beta 1$ e $\beta 2$). Os domínios $\alpha 1$ e $\beta 1$ interagem de maneira a formar uma fenda de ligação do peptídeo, comportando sequências com tamanho entre 13 a 25 aminoácidos (Figura 7A) (Abbas *et al.*, 2019; Wieczorek *et al.*, 2017).

Já as moléculas de MHC-I estão presentes em todas as células nucleadas (com exceção de neurônios) e são responsáveis pela apresentação de peptídeos derivados de patógenos intracelulares. Após o processamento de antígenos da via endocítica, células expressando MHC-I já acoplado a peptídeos virais realizarão a apresentação dos epítomos às células T CD8⁺, induzindo sua ativação. A estrutura do MHC-I é composta por duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não covalente, sendo uma cadeia α formada por três domínios ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$) e uma subunidade não codificada no MHC e chamada de $\beta 2$ microglobulina

(β_2m). No caso do MHC-I, os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ formam a fenda de ligação do peptídeo, comportando seqüências entre 9 a 11 aminoácidos (Figura 7B) (Wieczorek *et al.*, 2017).

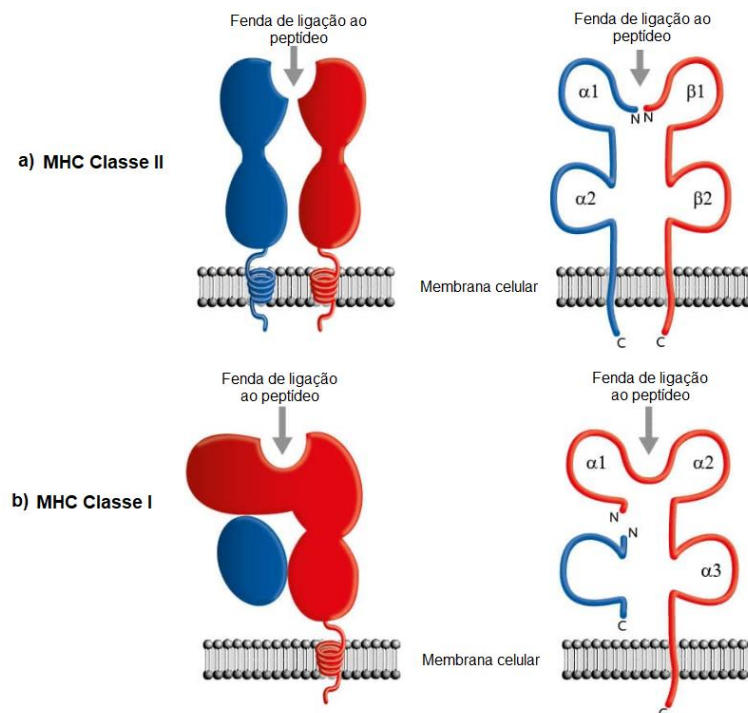


Figura 7 – Estrutura do MHC de classe II e do MHC de classe I. Em (A) a estrutura do MHC de classe II composta por duas cadeias polipeptídicas, a cadeia α com dois domínios ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) e a cadeia β também com dois domínios ($\beta 1$ e $\beta 2$), com a fenda de ligação nos domínios $\alpha 1$ e $\beta 1$. Em (B) a estrutura do MHC de classe I composta por duas cadeias polipeptídicas, a cadeia com três domínios ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$) e a cadeia de β_2 -microglobulina (β_2m), com a fenda de ligação entre os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$. Adaptado de Promocell, 2019.

A apresentação de peptídeos aos linfócitos T $CD8^+$ via MHC-I desempenha um papel essencial na imunidade antiviral, uma vez que proporciona a ativação dessas células e diferenciação em CTLs, auxiliando na eliminação das células infectadas pelo vírus (Hansen; Bouvier, 2009; Xia *et al.*, 2019). O processamento das proteínas virais começa com a proteólise de seqüências maiores em peptídeos lineares de 9 a 11 aminoácidos pelo proteossoma no citoplasma. Em seguida, esses peptídeos são translocados por meio do transportador associado à apresentação de antígenos (TAP), composto pelas subunidades TAP1 e TAP2, para o lúmen do retículo endoplasmático (ER), onde serão acoplados às moléculas de MHC-I, formando o complexo peptídeo-MHC-I (pMHC-I) com o auxílio da proteína tapasina. O pMHC-I são transportados via complexo de Golgi para a superfície celular, onde ficaram disponíveis para a interação com o TCR das células T $CD8^+$. Na ausência de peptídeos, as moléculas de MHC-I são estabilizadas por chaperonas do ER, como calreticulina e ERp57, e na presença de peptídeos as chaperonas são liberadas para a formação dos complexos pMHC-I (Figura 8) (Neefjes *et al.*, 2011; Hansen; Bouvier, 2009).

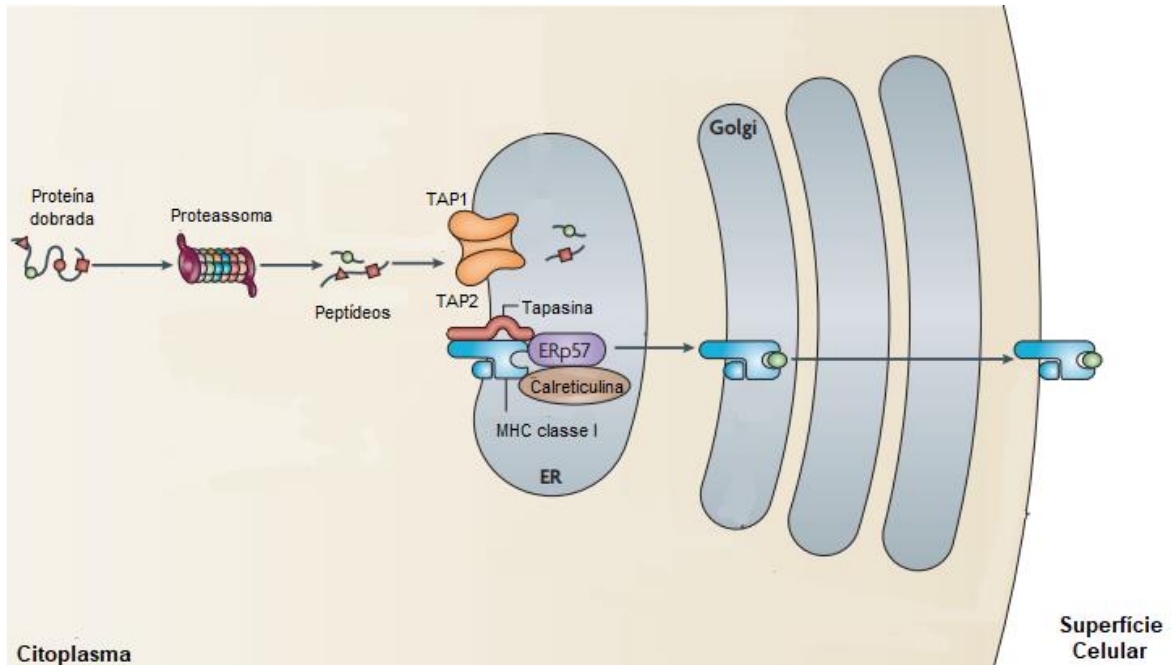


Figura 8 – Processamento antigênico para apresentação via MHC-I. Primeiro, a proteína dobrada é clivada no proteassoma em peptídeos e em seguida esses peptídeos são translocados pela proteína TAP, composta pelas subunidades TAP1 e TAP2, para o lúmen do ER. Na ausência de peptídeos, as moléculas de MHC-I são estabilizadas pelas chaperonas ERp57 e calreticulina e na presença de peptídeos essas chaperonas liberam as moléculas de MHC-I para a formação do complexo pMHC-I com o auxílio da proteína tapasina. Adaptado de Hansen; Bouvier, 2009.

Estudos prévios já demonstraram que alguns haplótipos de MHC-I induzem uma resposta protetora relacionada a resolução espontânea da infecção pelo HCV e à diminuição do escape viral da resposta de células T, como o HLA-B27 e HLA-B57 (Neumann-Haefelin *et al.*, 2013; Rao *et al.*, 2015; Schmidt *et al.*, 2012). De maneira análoga, haplótipos como HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3 e HLA-B7 podem estar envolvidos na progressão da doença e no desenvolvimento de HCC em pacientes com HCV (Yue *et al.*, 2013). O entendimento destes processos e o repertório de peptídeos capazes de induzir resposta protetora tem sido alvo de investigação dentro do contexto das infecções virais, no entanto, muitas lacunas ainda existem dentro desta perspectiva.

1.5 Abordagens terapêuticas

A infecção pelo HCV nem sempre requer tratamento, uma vez que a resposta imunológica de uma parcela dos infectados será capaz de eliminar a infecção naturalmente. Porém, se a infecção pelo HCV se torna crônica, é necessário iniciar o tratamento (World Health Organization, 2021).

A terapia com interferon (IFN) foi utilizada por mais de 20 anos devido às propriedades antivirais e imunoestimulatórias dessa citocina. O interferon era utilizado em associação com uma molécula de polietilenoglicol (PEG) e injetado via subcutânea semanalmente. O PEG-IFN era utilizado em conjunto ao antiviral ribavirina, um análogo de guanósina, para melhorar a eficácia do tratamento, entretanto, essa combinação apresentava muitos efeitos colaterais como neutropenia, trombocitopenia e anemia hemolítica (Castaneda *et al.*, 2021; Parlati *et al.*, 2020). Atualmente, a OMS recomenda a terapia com antivirais de ação direta (DAAs) para pessoas com mais de 12 anos de idade. Os DAAs podem apresentar eficácia de até 98% com tratamento de curta duração (entre 12 a 24 semanas) dependendo do grau de lesão hepática, no entanto, esses medicamentos apresentam taxa de falha de cerca de 5 a 10% (World Health Organization, 2021).

Os DAAs foram aprovados inicialmente em 2011 e além da elevada eficácia, apresentam alta tolerância do paciente, boa taxa de depuração e uma curta duração do tratamento. Para a escolha do melhor tratamento é necessário avaliar as condições do paciente, o estado de cirrose, se há coinfeção com outras doenças, em particular com o HIV, e realizar testes de genótipo do vírus e de sensibilidade aos fármacos (Dennise *et al.*, 2021; Keikha *et al.*, 2019). Os DAAs inibem a replicação do HCV agindo diretamente na protease NS3/NS4, cujos inibidores possuem sufixo “-previr”, na proteína NS5A, cujos inibidores possuem sufixo “-asvir” e na polimerase NS5B, cujos inibidores terminam com “-buvir” (Figura 9). Dessa forma, a terapia com DAAs para o HCV é considerada um dos melhores exemplos no tratamento de infecções virais, contribuindo para a erradicação global do HCV (Castaneda *et al.*, 2021; Martinez; Franco, 2020; Parlati *et al.*, 2020).

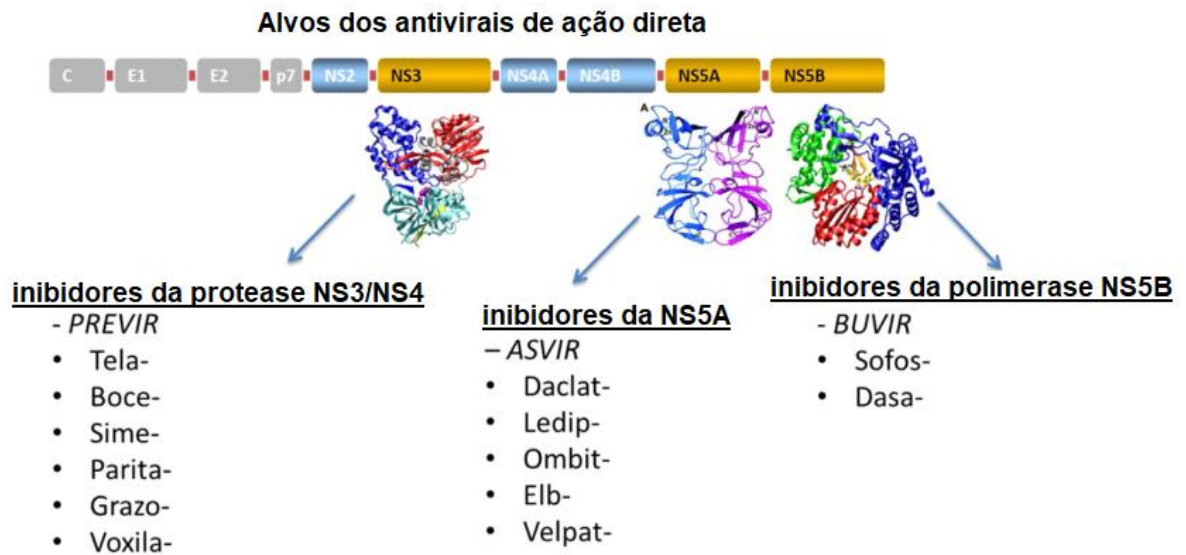


Figura 9 – Alvo dos DAAs e seus respectivos inibidores. Os inibidores da protease NS3/NS4 com o sufixo “-previr”, inibidores da NS5A com o sufixo “-asvir” e inibidores da polimerase NS5B com o sufixo “-buvir”. Adaptado de Parlati *et al.*, 2020.

O objetivo do tratamento do HCV é curar os doentes por meio da erradicação do vírus HCV tendo como alvo seu genoma. Assim, o sucesso terapêutico é medido via detecção de RNA viral, e sua ausência após o término do tratamento classifica a resposta virológica sustentada (RVS). Aproximadamente 99% dos infectados que atingem a RVS após tratamento com DAAs permanecem sem infecção pelos próximos 5 anos. O tratamento está associado a taxas reduzidas de carcinoma hepatocelular (HCC), morbidade e mortalidade hepática. Porém, a disponibilidade e o acesso aos DAAs no mundo diferem em função do rendimento econômico dos países devido ao custo muito elevado dos fármacos. Por exemplo, países de baixo rendimento econômico possuem pouco acesso ou não são registrados para o acesso aos DAAs, enquanto países de alto rendimento possuem acesso aos medicamentos, apesar do alto custo para a população. No entanto, alguns países possuem estratégias para tentar maximizar o acesso a esses medicamentos. O Egito e o Paquistão, por exemplo, produzem DAAs genéricos, a um custo menor, enquanto no Japão, Estados Unidos e Europa, a competição entre as empresas produtoras dos fármacos faz com que os preços sejam mais acessíveis (Dennis *et al.*, 2021; Martinez; Franco, 2020). Os DAAs não são produzidos no Brasil, sendo assim necessária a importação destes medicamentos a preços muito elevados, cerca de 1.000 a 24.890 dólares por tratamento (Andrieux-Meyer *et al.*, 2015).

Além do alto custo dos DAAs, outra questão acerca da utilização desses medicamentos para o tratamento da hepatite C é a taxa de falha, que pode variar de 5-10% devido à resistência do HCV aos antivirais e consequente escape viral (Serre *et al.*, 2016). Isso ocorre devido à pressão seletiva no contexto terapêutico da utilização dos antivirais e mutações do vírus, favorecendo o aparecimento de variantes resistentes. Nesse contexto, a seleção de variantes de aminoácidos associadas à resistência (RAVs) é motivo de grande preocupação no tratamento da hepatite C, uma vez que a RNA polimerase RNA dependente viral possui uma alta capacidade replicativa, porém não tem atividade revisora, permitindo a geração de um alto número de variantes. Ademais, é importante destacar que o número de alterações nucleotídicas varia entre os genótipos e subtipos do HCV, sendo alguns mais susceptíveis ao surgimento de novas variantes e de resistência ao tratamento com os DAAs (Vermehren *et al.*, 2012; Welsch *et al.*, 2012). Atualmente, tem-se observado para todos os genótipos do HCV substituições de aminoácidos principalmente na protease NS3, sendo um *hotspot* para o surgimento de novas variantes virais (Pham *et al.*, 2019; Serre *et al.*, 2016).

Embora os fatores relacionados ao genoma viral desempenhem um fator chave na resistência ao tratamento, fatores relacionados ao hospedeiro também contribuem de maneira significativa para a falha do tratamento. Por exemplo, o estado de fibrose do paciente no início do tratamento pode influenciar na resposta imune contra o HCV e na entrega das drogas nas células alvo do fígado (Pawlotsky, 2011; Vermehren *et al.*, 2012). Dessa forma, é possível afirmar que a resistência está geralmente associada a um escape viral marcado por uma rápida recuperação dos níveis de replicação viral anteriores ao tratamento, quando as substituições de aminoácidos conferem um elevado nível de resistência sem afetar o *fitness* viral na presença do medicamento (Pawlotsky, 2011). Assim, estudos sugerem que a melhor forma de evitar o aparecimento de mutações associadas à resistência é a supressão viral rápida, que pode ser realizada através da combinação de vários DAAs com diferentes mecanismos de ação e resistência cruzada (Vermehren *et al.*, 2012; Welsch *et al.*, 2012).

1.6 Abordagens profiláticas e vacinas

Considerando o grande número de pessoas infectadas pelo vírus da hepatite C, a disseminação de abordagens profiláticas se faz extremamente importante. Entre elas, o principal meio de prevenção é evitar o contato com o sangue e hemoderivados infectados, e evitar comportamentos de risco como compartilhamento de seringas e agulhas, bem como a

prática de sexo sem preservativo. Além disso, o desenvolvimento de programas de rastreio dos infectados, a acessibilidade aos medicamentos e estratégia de tratamento eficazes também desempenham papel crucial para reduzir a transmissão do HCV enquanto ainda não se tem uma vacina contra a hepatite C (Manns *et al.*, 2017).

Atualmente, ainda não existe uma vacina contra o HCV, principalmente devido à falta de incentivo econômico, a significativa variabilidade e diversidade genética viral, a capacidade do vírus de escapar do sistema imune, a escassez de modelos de ensaio *in vitro* e *in vivo*, ausência de dados acerca de determinantes imunológicos ligados à depuração e persistência viral e imunidade protetora, e ao fato de que uma infecção primária pelo HCV não induz proteção contra reinfeção (Castaneda *et al.*, 2021; Dennis *et al.*, 2021; Echeverría *et al.*, 2021; Martinez; Franco, 2020).

Nesse contexto, a grande variabilidade genética do HCV é o principal fator limitante para o desenvolvimento de uma resposta imune das células T eficaz e para a produção de anticorpos neutralizantes por plasmócitos, dificultando ainda mais o desenvolvimento de imunizantes eficazes contra o vírus. Sabe-se que as células T CD8⁺ específicas contra o vírus são as principais células efetoras na infecção pelo HCV e a diminuição de suas funções tem impacto direto na progressão da doença. Tal redução pode ser atribuída não apenas aos mecanismos de escape imunológico do vírus, como também à exaustão das células T. A exaustão das células T é uma consequência da estimulação crônica por antígenos virais e é caracterizada por um estado de profunda perda de funções efetoras dessas células, contribuindo para a persistência viral. Já o escape viral ocorre devido ao genoma do HCV ser altamente mutável, como abordado no tópico de resistência aos DAAs, contribuindo para o surgimento de novas variantes virais com mutações que permitem um reconhecimento deficiente dos epítopos pelo TCR e consequente uma resposta de células T deficiente (Thimme, 2021).

Contudo, diversos estudos clínicos estão sendo desenvolvidos utilizando abordagens tradicionais para o desenvolvimento de imunizantes contra o HCV, como por exemplo, vacinas de vírus inativado e vacinas de vírus atenuado. Adicionalmente, plataformas como vacinas de DNA, vacinas de subunidades e vacinas de vírus recombinante também vem sendo exploradas (Echeverría *et al.*, 2021). Atualmente, as vacinas em desenvolvimento para o HCV encontram-se em diferentes estágios de pesquisa. Na fase de avaliação *in vitro* encontram-se uma vacina com tecnologia de vírus atenuado utilizando a linhagem JFH-1 e outra com

tecnologia de RNA mensageiro (mRNA), que codifica a proteína C do HCV. Na fase pré-clínica encontra-se um imunizante com tecnologia de vírus inativado, utilizando a linhagem JFH-1 inativada por radiação UV e uma vacina utilizando *virus-like particles* (VLPs). Já na fase clínica encontra-se uma vacina utilizando a tecnologia de vetor viral expressando as proteínas NS3 e NS5B, uma de DNA expressando as proteínas NS3, NS4A, NS4B e NS5A, um imunizante de peptídeos sintéticos das proteínas C, E1, E2, NS3 e NS4, e um de subunidades recombinantes utilizando o heterodímero E1-E2. Porém, todos esses estudos enfrentam desafios para o desenvolvimento de uma vacina eficaz e segura contra a hepatite C (Echeverría *et al.*, 2021).

2 JUSTIFICATIVA

Há décadas a hepatite C é considerada uma pandemia silenciosa, uma vez que mesmo com seu grande impacto em diversos países e apesar de ser responsável por 71 milhões de pessoas cronicamente infectadas, 350 mil mortes anualmente e 1,75 milhões de novas infecções por ano, ainda é negligenciada globalmente principalmente em relação ao diagnóstico, transmissão e tratamento. No ano de 2016, a OMS definiu estratégias para a eliminação do HCV até 2030 compostas por etapas como promover conscientização, prevenir a transmissão e melhorar serviços de rastreio, cuidados e tratamento, no entanto ainda há um longo caminho a ser percorrido para que isso seja alcançado.

O tratamento da hepatite C com DAAs é muito eficiente, contudo, ele também apresenta limitações dentre elas a resistência aos medicamentos, a não erradicação do risco de desenvolvimento de câncer de fígado, a incapacidade de impedir reinfecção e principalmente o custo muito elevado dos medicamentos. Em diferentes países o custo dos DAAs pode variar de 1.000 a 24.890 dólares por tratamento, enquanto os gastos do Brasil com medicamentos para a hepatite C podem chegar a cerca de 950 milhões de reais por ano. Além disso, é importante destacar que ainda não existe uma vacina contra o HCV devido à inúmeras barreiras para o seu desenvolvimento, dentre elas principalmente a escassez de modelos *in vitro* e *in vivo* adequados, a grande variabilidade e diversidade genética viral e os processos de escape viral e exaustão de células T característica da infecção.

A apresentação de epítomos pelo MHC de classe I é essencial para uma resposta imune T CD8⁺ antiviral específica, durante a exposição ao HCV, entretanto, alguns epítomos denominados epítomos imunodominantes, quando apresentados são capazes de se ligarem mais avidamente ao MHC-I e estimular uma resposta imune mais robusta quando comparados a outros epítomos. Dessa forma, a identificação desses epítomos imunodominantes é de extrema importância na avaliação da resposta imune e para desenvolvimento de vacinas e novas abordagens terapêuticas. Nesse contexto, a predição de epítomos utilizando ferramentas de bioinformática desempenha um papel valioso na identificação desses epítomos imunodominantes.

Assim, a realização de uma avaliação *in silico* dos epítomos preditos restritos ao HLA-A*02:01, um dos haplótipos mais encontrados na população brasileira, para o HCV juntamente com a análise *in vitro* de peptídeos imunodominantes do HCV utilizando a

metodologia PEPperCHIP© poderá fornecer informações importantes acerca do desenvolvimento da resposta imune celular, além de auxiliar no desenvolvimento de vacinas e possibilitar o desenvolvimento ou aprimoramento de estratégias terapêuticas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar, utilizando estratégias *in silico* e *in vitro*, padrões peptídicos imunodominantes do vírus da hepatite C restritos ao HLA do tipo I.

3.2 Objetivos Específicos

1. Realizar a predição *in silico* de peptídeos restritos ao HLA-A*02, derivados da poliproteína do HCV e seus diferentes genótipos;
2. Avaliar o potencial de indução de produção de citocinas e análise de propriedades físico-químicas dos peptídeos restritos ao HLA-A*02:01 de HCV e seus diferentes genótipos;
3. Desenvolver um sistema baseado em microarranjo de peptídeos como ferramenta para a triagem *in vitro* de sequências de aminoácidos imunodominantes reativas ao HLA-A*02:01;
4. Mapear os epítomos imunodominantes ao longo da poliproteína viral;
5. Correlacionar os resultados de afinidade dos peptídeos selecionados nas análises *in silico* e *in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Fluxograma da estratégia metodológica

O fluxograma a seguir (Figura 10) sumariza as etapas metodológicas de avaliação *in silico* e *in vitro* dos peptídeos preditos derivados dos sete genótipos do HCV.

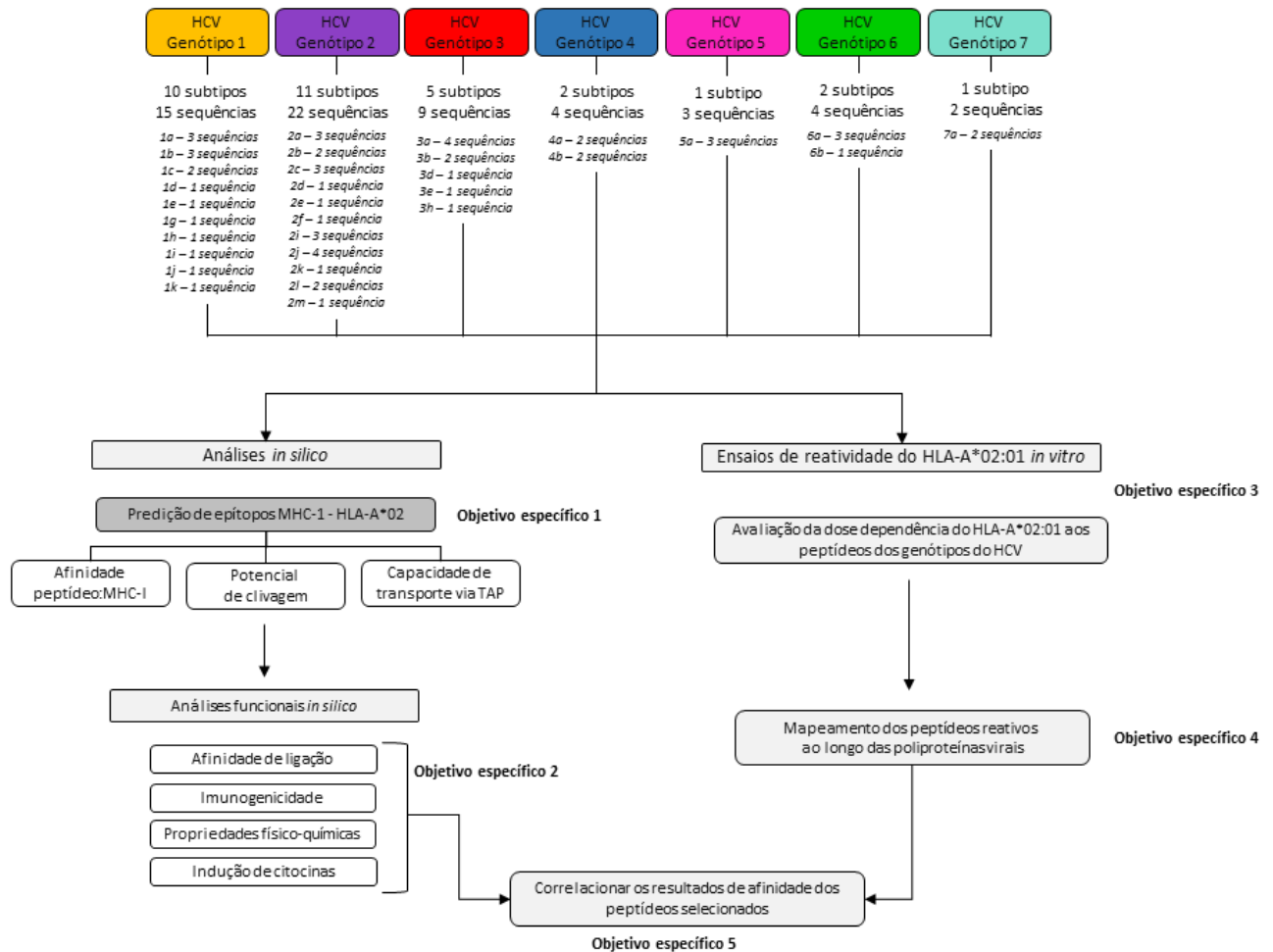


Figura 10 – Fluxograma contendo as etapas da metodologia para avaliação dos peptídeos preditos *in silico* e *in vitro* dos sete genótipos de HCV e seus subtipos.

4.2 Ferramentas de bioinformática

4.2.1 NetCTL-1.2

Predições confiáveis de epítomos CTLs são essenciais para o desenvolvimento de vacinas e podem minimizar o esforço experimental necessário para identificação desses epítomos. Dessa forma, para a predição *in silico* de peptídeos do HCV foi utilizado o servidor NetCTL-1.2, uma ferramenta baseada desenvolvida para prever epítomos de CTL humanos em

qualquer proteína. Esse servidor integra três parâmetros de predição: a afinidade do peptídeo ao MHC-I (pMHC-I), o potencial de clivagem do peptídeo e a capacidade de transporte do peptídeo para o retículo endoplasmático via transportador associado ao processamento de antígeno (TAP). A afinidade pMHC-I é predita utilizando redes neurais como descrito para outro servidor, o NetMHC, o potencial de clivagem é predito utilizando a versão de redes neurais do servidor NetChop treinadas em porções C terminais de epítomos CTL conhecidos, conforme descrito para o servidor NetChop-3.0 e a capacidade de transporte via TAP é predita utilizando o método baseado na matriz de pesos descrito por Peters *et al.*, 2003 (Larsen *et al.*, 2007).

Assim, os *scores* dos três métodos de previsão individuais são integrados em uma soma ponderada com um peso relativo na afinidade peptídeo/MHC de 1. Diferentes limiares para o *score* integrado podem ser traduzidos em valores de sensibilidade/especificidade, por exemplo, *scores* iguais ou maiores que 0,75 possui sensibilidade de 0,80 e especificidade de 0,970. Quando comparado a outros softwares de predição de epítomos de CTLs como EpiJen, MAPPP, MHC-pathway e WAPP, o NetCTL-1.2 possui um desempenho de predição superior a todos eles (Larsen *et al.*, 2007).

4.2.2 Immunogenicity

As células T devem reconhecer peptídeos apresentados nas moléculas MHC para serem ativadas e desencadear suas funções efetoras. Vários estudos já demonstraram que alguns peptídeos são mais imunogênicos do que outros e, assim, mais susceptíveis a serem epítomos de células T. Nesse contexto, sabe-se que identificação de epítomos é fundamental para o estudo e compreensão das respostas imune celulares e é de grande importância para o desenvolvimento de vacinas (Calis *et al.*, 2013).

Para o desenvolvimento do servidor Immunogenicity, um grande conjunto de dados que descrevem a imunogenicidade dos peptídeos apresentados via moléculas de MHC-I foi analisado. Essa análise mostrou que as posições P4-6 de ancoragem de um peptídeo apresentado ao MHC são mais importantes para a imunogenicidade e que alguns aminoácidos, especialmente aqueles com cadeias laterais grandes e aromáticas, estão associados à imunogenicidade. Assim, essas informações foram combinadas num modelo simples utilizado para prever a imunogenicidade de peptídeos reconhecidos pelo MHC-I. Para isso, esse modelo foi validado com dados de dois estudos independentes de descoberta de epítomos (Calis *et al.*, 2013).

4.2.3 Unipro UGENE

O Unipro UGENE é um software de código aberto que integra ferramentas de bioinformática amplamente utilizadas numa única interface e fornece módulos de visualização para objetos biológicos, tais como sequências genômicas, dados de sequenciamento de nova geração (NGS), alinhamentos de sequências múltiplas, árvores filogenéticas e estruturas 3D. A maioria dos algoritmos integrados são ajustados para um desempenho máximo através da utilização de leituras múltiplas e instruções especiais do processador. Esse software é ideal para aqueles pesquisadores sem grande experiência em bioinformática analisarem seus dados (Okonechnikov *et al.*, 2012).

4.2.4 WebLogo3

Para avaliar a frequência de aminoácidos nas sequências de peptídeos preditas e reativos foi utilizado o servidor WebLogo3 para obtenção de um logotipo dessas sequências. Um logotipo de sequência é uma representação gráfica de um alinhamento de sequências múltiplas de aminoácidos ou ácidos nucleicos. Esse logotipo concentra as seguintes informações em um único gráfico: o consenso das sequências, a ordem de predominância dos resíduos em cada posição, as frequências relativas de cada resíduo em cada posição e a quantidade de informação presente em cada posição da sequência, medida em bits. Esse servidor já foi utilizado em diversas publicações científicas, sendo assim uma ferramenta amplamente utilizada (Crooks *et al.*, 2004; Schneider; Stephens, 1990).

4.2.5 IFNepitope

Células T e células NK são as principais produtoras de IFN- γ , importante citocina para a diferenciação de células T e controle de infecções virais. Na infecção pelo HCV, o IFN- γ atua controlando a multiplicação do HCV e está relacionada com a autolimitação da infecção. Sabe-se que para o desenvolvimento de uma vacina a identificação de ligantes de MHC capazes de induzir a produção dessa citocina é essencial, assim, para avaliar a indução de IFN- γ pelos peptídeos preditos foi utilizado o servidor IFNepitope. Esse servidor foi a primeira ferramenta desenvolvida para predição de epítomos indutores de IFN- γ e possui uma alta precisão em sua predição (Dhanda *et al.*, 2013a).

O algoritmo desse servidor se baseia em três métodos: métodos baseados em máquinas de vetores de suporte (*support vector machine* - SVM), métodos baseados em motivos (Motif) e método híbrido que combina os métodos SVM e Motif. Nesse trabalho, utilizamos o método

SVM e, para o desenvolvimento desse método, o servidor utilizou o software SVM_Light. As características principais utilizadas para treinar e testar esse método foi a composição de resíduos dos peptídeos, incluindo a composição de aminoácidos e de dipeptídeos. Esse método já demonstrou anteriormente um grande potencial para predição de sítios de clivagem constitutivos e do imunoproteossoma em sequências antigênicas, sendo capaz de reconhecer mais de 84% dos sítios de clivagem (Bhasin *et al.* 2005; Dhanda *et al.*, 2013a).

4.2.6 IL4pred

Em células T com o fenótipo Th2, IL-4 é a principal citocina secretada e possui funções reguladoras e anti-inflamatórias por meio da inibição da ativação de células Th1. Na infecção pelo HCV, a presença de grandes quantidade de IL-4 está associada a pacientes com hepatite C crônica. Para avaliar a indução de IL-4 pelos peptídeos preditos e obter as características físico-químicas desses epítomos foi utilizado o servidor IL4pred, uma ferramenta capaz de predizer peptídeos indutores de IL-4 com boa eficácia. Esse servidor utiliza o método SVM e considera diversos fatores para a realização da predição: composição de aminoácidos, composição de dipeptídeos, propensão de aminoácidos e propriedades físico-químicas (Dhanda *et al.*, 2013b).

4.2.7 ProtScale

O ProtScale é um software que permite o cálculo e a representação gráfica do perfil produzido por qualquer escala de aminoácidos numa proteína selecionada. Esse software pode ser utilizado com 50 escalas predefinidas introduzidas a partir da literatura. Os valores da escala para os 20 aminoácidos, bem como uma referência da literatura, são fornecidos no ExPASy para cada uma destas escalas. Para gerar dados para um gráfico, a sequência de proteínas é analisada com uma janela de um determinado tamanho. Em cada posição, o valor médio da escala dos aminoácidos dentro dessa janela é calculado, e esse valor é representado no ponto médio da janela. No nosso trabalho, utilizamos a escala de Kyte & Doolittle, a escala mais amplamente utilizada para a detecção de regiões hidrofóbicas em proteínas (Kyte & Doolittle, 1982; Wilkins *et al.*, 1999).

4.2.8 Cytoscape

O Cytoscape é um software de fonte aberta para integração em grande escala de dados de redes de interação biomolecular com dados de expressão de elevado rendimento e outros estados moleculares num quadro conceitual unificado. Os estados dinâmicos das moléculas e

das interações moleculares são tratados como atributos dos nós e das bordas, enquanto os dados hierárquicos estáticos são tratados por anotações. Esse software apresenta as características básicas, como a disposição da rede e o mapeamento dos atributos dos dados para a visualização das diferentes propriedades (Shannon *et al.*, 2003).

4.3 Análises *in silico* para predição de epítomos restritos ao HLA-A*02

A coleta do conjunto de dados foi realizada na plataforma do NCBI Nucleotide (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>), com aquisição de sequências poliproteicas dos 7 genótipos do HCV e alguns de seus subtipos (Tabela 1).

Tabela 1 – Tabela contendo os 7 genótipos e 32 subtipos do HCV utilizados para as análises com os respectivos ID das sequências do NCBI Nucleotide.

Genótipo/Subtipo do HCV	ID das sequências
Genótipo 1 subtipo 1a	EU781819.1, EU781814.1 e EU781816.1
Genótipo 1 subtipo 1b	EU781825.1, EU781827.1 e EU781826.1
Genótipo 1 subtipo 1c	KC844047.1 e KJ439767.1
Genótipo 1 subtipo 1d	KJ439768.1
Genótipo 1 subtipo 1e	KJ439769.1
Genótipo 1 subtipo 1g	KJ439770.1
Genótipo 1 subtipo 1h	KJ439771.1
Genótipo 1 subtipo 1i	KJ439772.1
Genótipo 1 subtipo 1j	KJ439773.1
Genótipo 1 subtipo 1k	KJ439774.1
Genótipo 2 subtipo 2a	NC_009823.1, AF169005.1 e AF169002.1
Genótipo 2 subtipo 2b	KC967477.1, KM349851.1
Genótipo 2 subtipo 2c	KC967479.1
Genótipo 2 subtipo 2d	JF735114.1
Genótipo 2 subtipo 2e	JF735120.1
Genótipo 2 subtipo 2f	KC844050.1
Genótipo 2 subtipo 2i	KC197229.1, KC197230.1 e KC197231.1
Genótipo 2 subtipo 2j	HM777359.1, JF735113.1, KC197233.1 e KC197232.1
Genótipo 2 subtipo 2k	KC197234.1
Genótipo 2 subtipo 2l	KC197235.1 e KC197240.1
Genótipo 2 subtipo 2m	JF735111.1
Genótipo 3 subtipo 3a	NC_009824.1, GQ275355.1, JQ717260.1 e JQ717259.1

Genótipo 3 subtipo 3b	KJ470616.1 e D49374.1
Genótipo 3 subtipo 3d	KJ470619.1
Genótipo 3 subtipo 3e	KJ470618.1
Genótipo 3 subtipo 3h	JF735126.1
Genótipo 4 subtipo 4a	NC_009825.1 e JF735137.1
Genótipo 4 subtipo 4b	FJ025856.1 e FJ025854.1
Genótipo 5 subtipo 5a	NC_009826.1, KC844046.1 e Y13184.1
Genótipo 6 subtipo 6a	DQ480524.1, DQ480512.1 e Y12083.1
Genótipo 6 subtipo 6b	NC_009827.1
Genótipo 7 subtipo 7a	NC_030791.1 e EF108306.2

Todas as sequências coletadas foram utilizadas para a predição de epítomos no servidor NetCTL 1.2 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetCTL-1.2>). Foram preditos epítomos de 9 aminoácidos com restrição a um dos MHC-I de maior prevalência na população brasileira, o HLA-A*02 (Fabretti *et al.*, 2014), considerando a afinidade pMHC-I, o potencial de clivagem do peptídeo e a capacidade de transporte do peptídeo para o retículo endoplasmático via TAP (Larsen *et al.*, 2007). A combinação dos valores referentes a esses três parâmetros (*score* combinado) foi utilizada para a seleção de peptídeos imunodominantes. Apenas sequências com valores de *score* combinado superiores a 0,75 foram considerados epítomos putativos para células T CD8⁺ e mantidos para análises adicionais. Para ampliar a predição de peptídeos, este passo incluiu vários subtipos de HLA-A*02 (Lund *et al.* 2004), no entanto, as avaliações subsequentes focaram principalmente no HLA-A*02:01.

4.4 Predição *in silico* da afinidade entre peptídeo e o HLA-A*02:01, processamento antigênico e imunogenicidade

A avaliação do score combinado de predição para os peptídeos de sequências de HCV foi realizada seguida pela análise geral dos parâmetros independentes utilizados para a predição dos epítomos (afinidade peptídeo-HLA-A*02:01, clivagem do peptídeo e transporte do peptídeo por meio da proteína TAP).

A imunogenicidade dos peptídeos foi avaliada empregando a ferramenta MHC-I Immunogenicity (<http://tools.iedb.org/immunogenicity/>), considerando os resíduos 2 e 9 dos

peptídeos em questão como os principais pontos de ancoragem para a ligação com o HLA-A*02:01 (Calis *et al.*, 2013).

4.5 Avaliação de resíduos conservados e frequências de aminoácidos em peptídeos HCV restritos ao HLA-A*02:01

Para a avaliação das regiões conservadas em associação com a imunodominância dos peptídeos, os tercis de afinidade de ligação peptídeo-HLA-A*02:01, clivagem e transporte via TAP foram calculados utilizando os valores obtidos para todos os peptídeos do HCV. Os tercis permitiram a identificação de sequências com scores altos, médios e baixos para todos os três parâmetros avaliados. Foram selecionadas 20 sequências de peptídeos dos sete genótipos do HCV nos três intervalos de scores e alinhadas utilizando o algoritmo de alinhamento UGENE no software Unipro UGENE v.44 (Okonechnikov *et al.*, 2012).

A frequência de aminoácidos nas sequências alinhadas foi calculada utilizando o software Unipro UGENE v.44 (Okonechnikov *et al.*, 2012). O logotipo das sequências foi gerado no WebLogo3 (<http://weblogo.threeplusone.com/>).

4.6 Predição da indução de produção de citocinas e análise de propriedades físico-químicas dos peptídeos restritos ao HLA-A*02:01 dos genótipos de HCV

A capacidade dos peptídeos de levarem a produção de citocinas do eixo Th1 e/ou Th2 da resposta imune via MHC-I foi avaliada utilizando os servidores IFNepitope (<https://webs.iiitd.edu.in/raghava/ifnepitope/predict.php>) e IL4Pred (<https://webs.iiitd.edu.in/raghava/il4pred/predict.php>) para a indução de IFN- γ e IL-4, respectivamente (Dhanda *et al.*, 2013a; Dhanda *et al.*, 2013b). Em ambos os casos foram aplicados métodos baseados em máquinas de vetores de suporte (*support vector machine* – SVM). Essa análise acerca da indução de citocinas pela interação das sequências peptídicas preditas com moléculas de MHC-II é realizada já que o MHC-II pode apresentar peptídeos adquiridos por vias não-clássicas ou ainda os peptídeos de 9 aminoácidos preditos nesse estudo com afinidade ao HLA-A*02:01 podem estar contidos dentro de peptídeos maiores apresentados às células T CD4⁺ via MHC-II.

Do mesmo modo, dados sobre as características físico-químicas dos peptídeos em questão também foram adquiridos com o software IL4Pred, incluindo valores de hidrofobicidade, hidrofiliabilidade, estereoquímica, pontes de hidrogênio, massa lateral, carga, hidropaticidade, ponto isoelétrico (pI), anfipaticidade e peso molecular.

Adicionalmente, os dados de hidrofobicidade da sequência completa das poliproteínas de todas as sequências de HCV avaliadas foi adquirida com a ferramenta ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>), empregando a escala de Kyte & Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982).

4.7 Avaliação do repertório de epítomos virais com alta afinidade ao HLA-A*02:01 empregando o sistema de microarranjos PEPperCHIP©

A avaliação do repertório de peptídeos imunodominantes restritos ao HLA-A*02:01 foi realizada pela empresa PEPperPRINT© (Heidelberg, Alemanha), utilizando o ensaio personalizado de microarranjo PEPperCHIP© (PEPperPRINT©, 2020) (Figura 10) (Ribeiro *et al.*, 2021). Neste ensaio foram utilizados todos os peptídeos preditos para os sete genótipos do vírus HCV, com valores de score combinado acima de 0,75. Peptídeos compartilhados entre dois ou mais genótipos serão considerados apenas uma vez e peptídeos preditos com “X” em qualquer uma das nove posições tiveram esse “X” substituído pelos aminoácidos valina (V), leucina (L) e prolina (P), uma vez que de acordo com a literatura, L e V são importantes para a ligação ao HLA-A*02:01 e P funciona como um sítio de clivagem.

A figura 11 apresenta as etapas do ensaio de detecção da ligação peptídeo-HLA-A2 empregando o microarranjo PEPperCHIP© (PEPperPRINT, 2020).

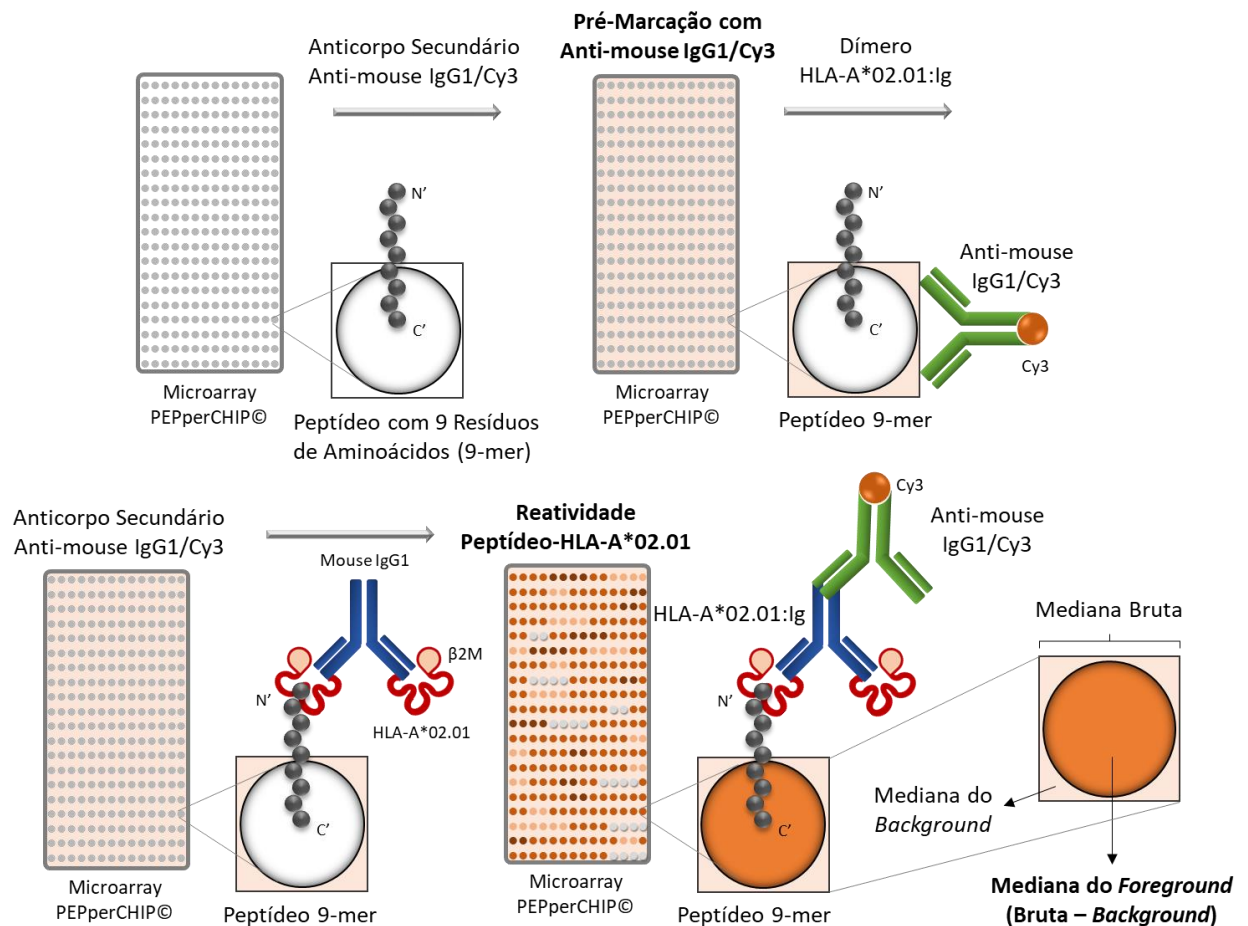


Figura 11 – Esquema metodológico do microarranjo PEPperCHIP©. O microarranjo PEPperCHIP© (PEPperPRINT©, Heidelberg, Alemanha) foi utilizado para a detecção da ligação de peptídeo-HLA-A*02:01. Para este ensaio, peptídeos de 9 aminoácidos restritos ao HLA-A*02:01 foram adsorvidos em lâmina de vidro incubados com diferentes concentrações de dímero de HLA-A*02:01 recombinante (DimerX – BD biosciences, San Jose, CA). O anticorpo secundário anti-IgG1 murino/Cy3 foi utilizado para a detecção da ligação peptídeo-HLA-A*02:01. A pré-marcação da lâmina foi realizada com anticorpo secundário anti-IgG1 murino/Cy3 antes do início do experimento para a avaliação de reatividade inespecífica. Adaptado de Lopes-Ribeiro *et al.*, 2022.

4.7.1 Etapas do ensaio

Resumidamente, 2.888 peptídeos foram adsorvidos em duplicada no interior de *spots* localizados na lâmina de vidro do microarranjo (75,4 mm x 25,0 mm x 1 mm) antes do início do experimento.

A primeira etapa do ensaio foi constituída pela pré-marcação da lâmina do microarranjo com anticorpo secundário anti-IgG1 murino/Cy3 (BD Biosciences, California, EUA), para exclusão posterior dos valores de reatividade inespecíficas. Para isso, a lâmina foi incubada com ‘tampão padrão’ [tampão fosfato-salino (PBS) + 0,05% Tween20; pH 7,4] por 15 minutos em temperatura ambiente. Após a remoção completa do tampão, uma nova incubação foi realizada com ‘tampão de bloqueio’ [PBS + 0,05% Tween20 + 1% albumina

sérica bovina (BSA); pH 7,4] por 30 minutos em temperatura ambiente. Após a remoção completa do tampão, a lâmina foi incubada com anticorpo secundário anti-IgG1 murino conjugado ao fluorocromo Cy3 (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) diluído na proporção de 1:5.000 em ‘tampão de coloração’ [‘tampão padrão’ + 10% ‘tampão de bloqueio’] por 45 minutos, em temperatura ambiente no escuro. Após a remoção completa do anticorpo secundário, a lâmina foi lavada três vezes em ‘tampão padrão’, secada em fluxo de ar e, em seguida, digitalizada.

Para a segunda etapa do ensaio, a lâmina foi reequilibrada por uma nova incubação com ‘tampão padrão’ por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a remoção completa do tampão, concentrações de 1µg/mL ou 10µg/mL de dímero HLA-A*02:01:Ig DimerX (BD Biosciences, Califórnia, EUA) diluído em ‘tampão de coloração’ foram adicionadas à lâmina de vidro do microarranjo e incubadas por 16 horas em temperatura de 2-8°C. Após a remoção do dímero de HLA-A*02:01, a lâmina foram lavadas três vezes utilizando ‘tampão padrão’ e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG1 murino/Cy3 (BD Biosciences, Califórnia, EUA) diluído na proporção de 1:5.000 em ‘tampão de coloração’ (‘tampão padrão’ + 10% ‘tampão de bloqueio’) por 45 minutos à temperatura ambiente no escuro. Após a remoção completa do anticorpo secundário, a lâmina foi lavada três vezes em ‘tampão padrão’, secada em fluxo de ar e, em seguida digitalizada.

Ao longo do ensaio, todas as incubações foram realizadas sob agitação constante em sistema de agitação orbital (140 rpm).

A lâmina do microarranjo PEPperCHIP© foi digitalizada no aparelho Affymetrix 428 Array Scanner (Thermo Fisher, Califórnia, EUA) e a reatividade peptídeo-HLA-A2:Ig foi obtida no software PepSlide© Analyzer (PEPperPRINT ©, Heidelberg, Alemanha), para posterior quantificação usando imagens-16 bits em escala cinza (RIBEIRO *et al.*, 2021).

4.8 Identificação da posição dos peptídeos restritos ao HLA-A*02:01 ao longo das poliproteínas virais

Para a identificação do posicionamento dos peptídeos utilizados no microarranjo PEPperCHIP© ao longo das poliproteínas virais do HCV, todos os peptídeos de cada uma das sequências de HCV citadas foram alinhados com a sequência completa do vírus de origem

utilizando o algoritmo de alinhamento UGENE no software Unipro UGENE v.44 (Okonechnikov *et al.*, 2012).

A fim de garantir uma avaliação completa de todos as sequências de HCV, os peptídeos compartilhados entre dois ou mais genótipos foram mantidos em replicata.

4.9 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism v.8.0 (GraphPad Software, Califórnia, EUA). A distribuição não-paramétrica dos dados foi confirmada pelo teste de Wilcoxon para comparações estatísticas envolvendo apenas dois grupos. As comparações múltiplas foram realizadas utilizando o método de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn, no caso de dados não pareados, e o método de Friedman com o pós-teste de Dunn para comparar dados pareados. Os testes de correlação de Spearman e de Pearson foram aplicados para a correlação da reatividade *in vitro* e da previsão *in silico* da indução de citocinas e das propriedades físico-químicas dos peptídeos, posteriormente os valores obtidos foram então empregados na construção de redes de correlação no software Cytoscape v3.9.0. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Para entender os padrões peptídicos imunodominantes do HCV restritos ao HLA do tipo I foram realizadas análises *in silico* utilizando sequências dos 7 genótipos conhecidos do HCV como detalhado no fluxograma metodológico (Figura 10). A predição dos peptídeos foi realizada considerando o HLA-A*02:01 como um dos HLA-A mais prevalente na população brasileira, e o fato de nosso grupo de pesquisa ter produzido um dímero recombinante de HLA-A*02:01 que possibilitou que avaliássemos a afinidade ao MHC-I *in vitro* desses peptídeos para relacionar com os dados obtidos *in silico*.

Após a predição, foram realizadas análises funcionais *in silico* para avaliação dos parâmetros funcionais entre os peptídeos estudados, sendo eles a afinidade ao HLA-A*02:01, o potencial de clivagem do peptídeo pelo proteassoma e a capacidade do peptídeo ser transportado para o retículo endoplasmático via TAP. Os resultados dessa etapa demonstram

que não há diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos do HCV nos parâmetros avaliados. Da mesma forma, em relação à análise *in silico* da imunogenicidade dos peptídeos, também não houve diferenças nos valores obtidos entre os genótipos de HCV avaliados (Figura 12).

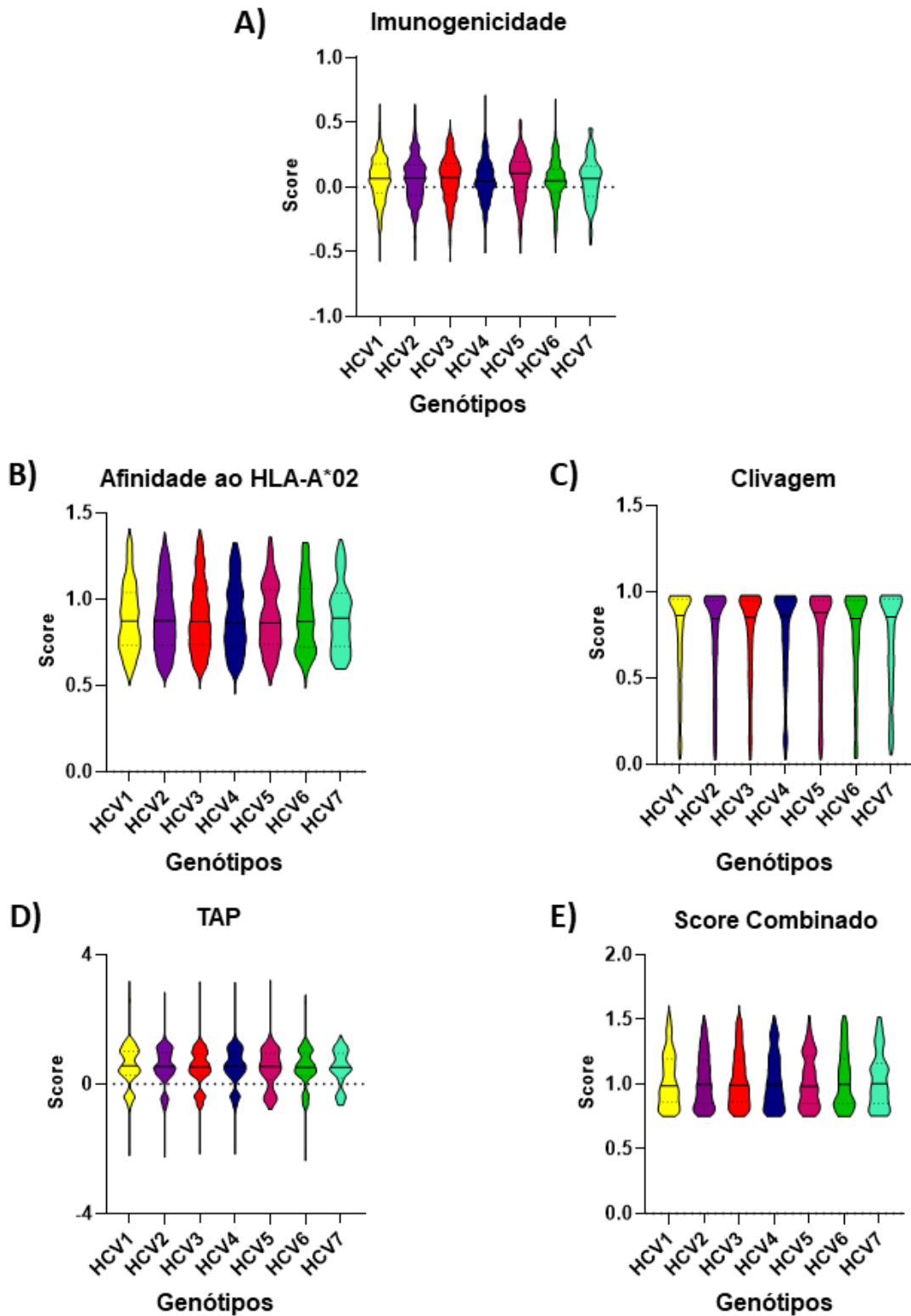


Figura 12 – Gráficos de violino com os valores de score obtidos *in silico* para os parâmetros de imunogenicidade (A), afinidade ao HLA-A*02 (B), clivagem dos peptídeos no proteassoma (C), transporte via TAP (D) e score combinado (E) dos peptídeos incluídos no estudo derivados de cada um dos genótipos analisados. Linhas cheias no gráfico indicam os valores de quartis.

A avaliação dos dados de hidrofobicidade ao longo das poliproteínas dos 7 genótipos do HCV mostrou um perfil muito semelhante entre os genótipos (Figura 12A-G) e isso pode ser evidenciado ao realizar a sobreposição dessas 7 poliproteínas (Figura 13). A partir dessa sobreposição, foi possível a identificação de porções medianamente hidrofóbicas principalmente nas porções finais das proteínas estruturais C, E1 e E2. Em relação às proteínas não estruturais, observou-se uma maior quantidade de porções medianamente hidrofóbicas em NS2, NS4A, porção final da proteína NS5B e predominância de alta hidrofobicidade na proteína p7 (Figura 14).

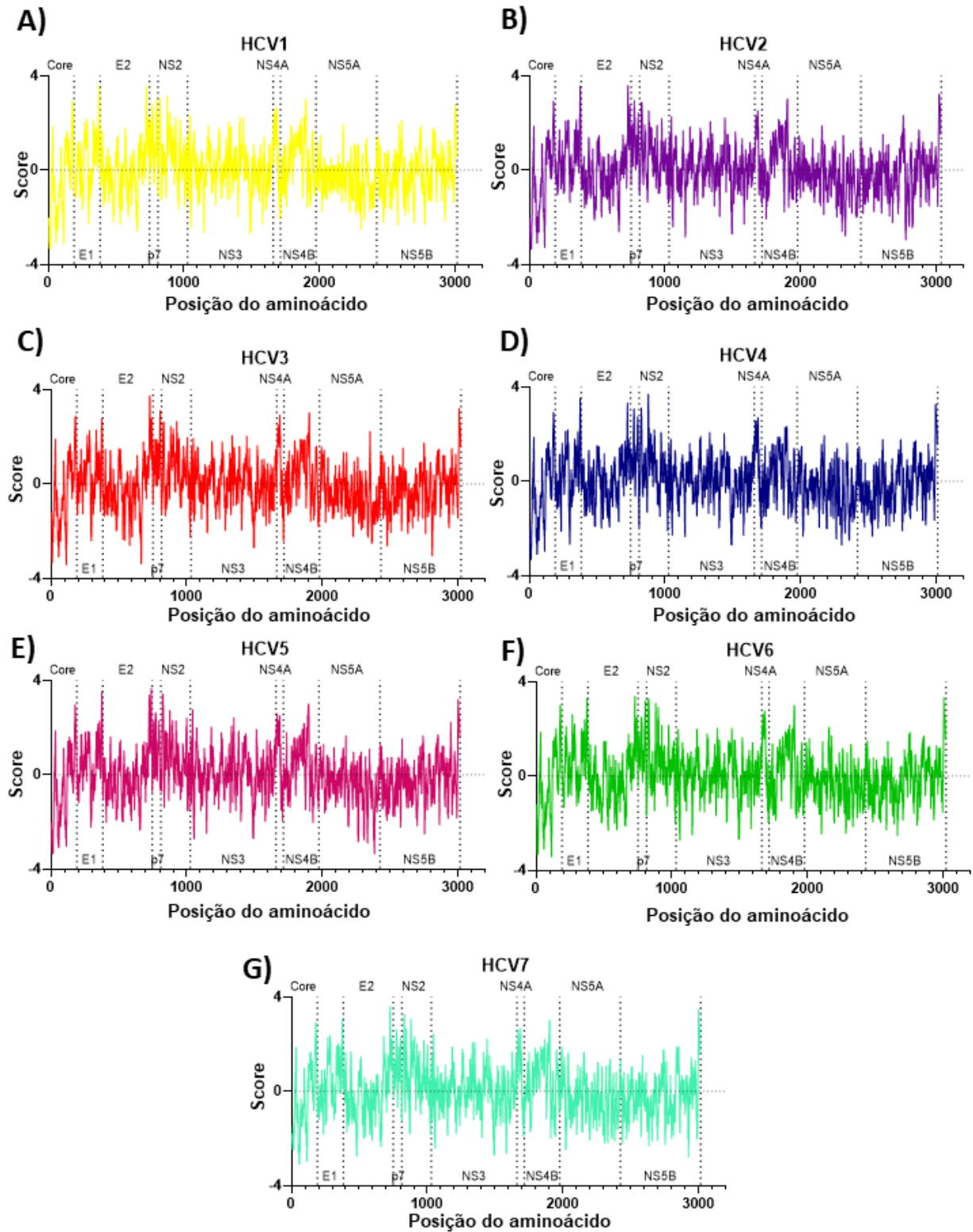


Figura 13 – Gráficos de linha com o score de hidrofobicidade para as proteínas do HCV em cada um dos genótipos do vírus incluídos nos estudos. Eixo Y indica o score de hidrofobicidade de Kyte&Doolittle, enquanto o eixo X indica a posição dos aminoácidos ao longo da poliproteína. Diferentes proteínas estão separadas por linhas pontilhadas e identificadas.

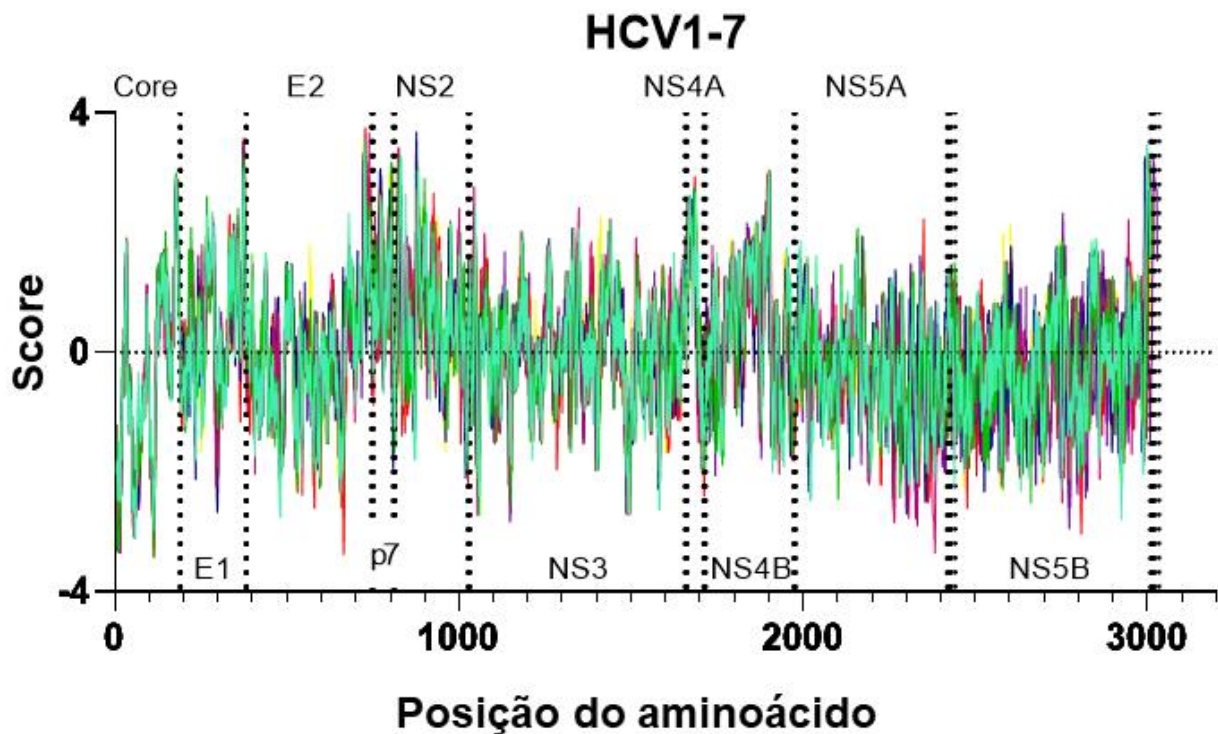


Figura 14 – Gráficos de linha com o score de hidrofobicidade para as proteínas do HCV para os sete poliproteínas dos genótipos do vírus sobrepostas. Eixo Y indica o score de hidrofobicidade de Kyte&Doolittle, enquanto o eixo X indica a posição dos aminoácidos ao longo da poliproteína. Diferentes proteínas estão separadas por linhas pontilhadas e identificadas.

A capacidade dos peptídeos de induzirem a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , e regulatórias, como IL-4, do eixo Th1 e/ou Th2, respectivamente, que participam da resposta imune antiviral foram preditas para os genótipos de HCV. Os resultados mostram que dentre os sete genótipos não há diferenças estatísticas em relação aos valores de produção dessas duas citocinas pelos peptídeos preditos (Figura 15), exceto na produção de IFN- γ entre os genótipos HCV1 e HCV2 que demonstra valores um pouco aumentados dessa citocina no HCV2 (Figura 15A). Ademais, ao analisar cada genótipo separadamente, comparando apenas a produção das duas citocinas, foi possível demonstrar que em todos os genótipos de HCV há uma prevalência de valores positivos referentes à produção de IL-4 pelos peptídeos preditos, indicando uma tendência à estimulação do eixo Th2 da resposta imune reguladora para os sete genótipos (Figura 16). Além disso, também foi possível observar para todos os genótipos a presença de um maior número de peptídeos indutores de IL-4 quando comparado ao número de peptídeos indutores de IFN- γ (Figura 17).

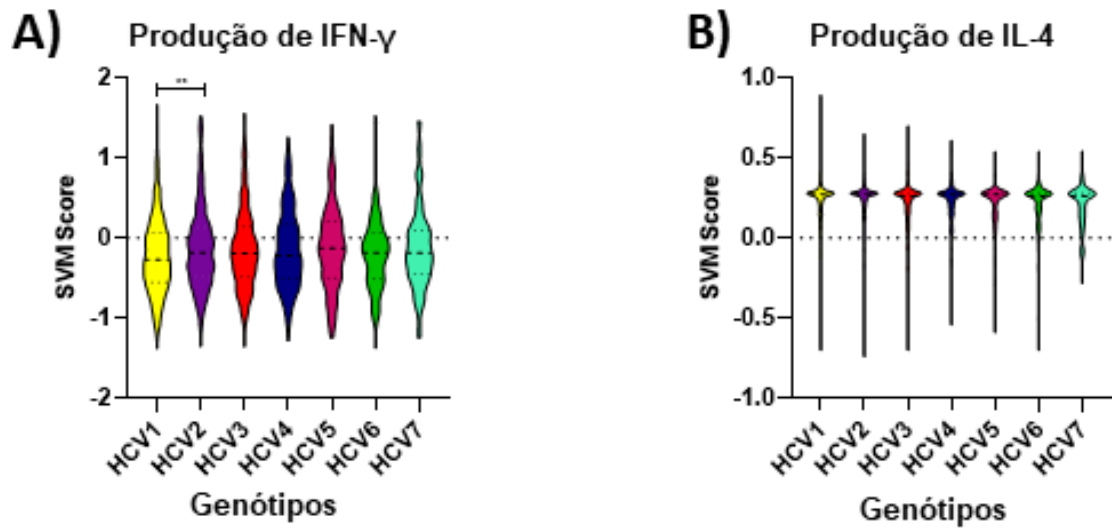


Figura 15 – Capacidade dos peptídeos preditos *in silico* de induzir citocinas IFN- γ e IL-4. Em (A) indução da citocina pró-inflamatória de IFN- γ pelos peptídeos dos 7 genótipos do HCV. Em (B) a indução da citocina reguladora IL-4 pelos peptídeos dos 7 genótipos do HCV. Os resultados estão representados em gráficos de violino com a identificação da mediana global de cada genótipo. Linhas pretas indicam média com desvio padrão. Análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste Kruskal-Wallis. Significância estatística foi considerada para $p < 0,05$.

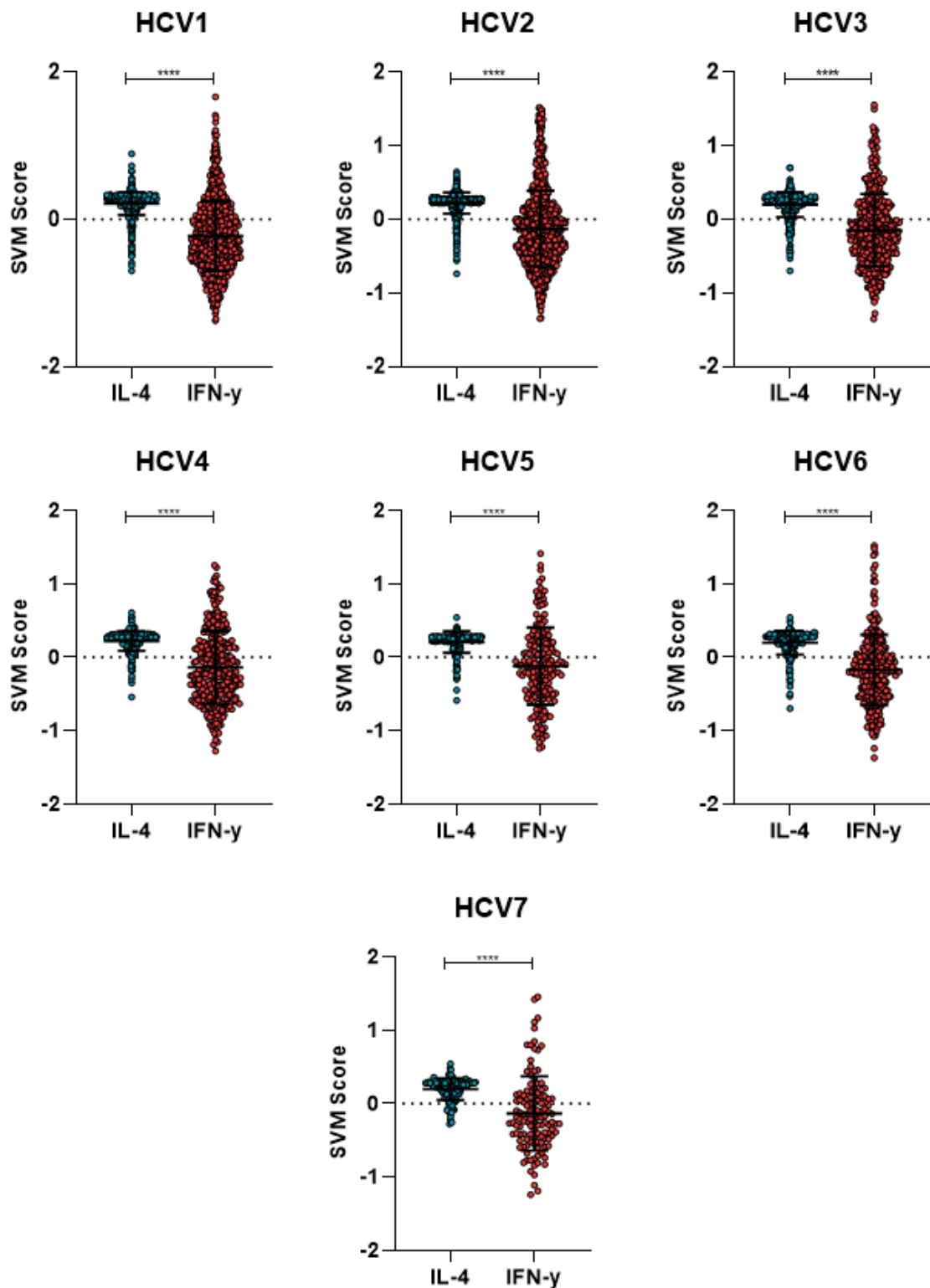


Figura 16 - Indução de IL-4 e IFN- γ pelos peptídeos preditos *in silico* derivados de cada um dos genótipos do HCV. Os resultados estão representados em gráficos *scatter plot* com a identificação da mediana global de cada genótipo do HCV, onde cada ponto significa o SVM score de cada peptídeo predito. Linhas pretas indicam média com desvio padrão. Análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste Wilcoxon. Significância estatística foi considerada para $p < 0,05$ e identificada por linhas conectoras e asteriscos (**** = $p < 0,00001$).

Peptídeos indutores de IFN- γ e IL-4 por genótipo

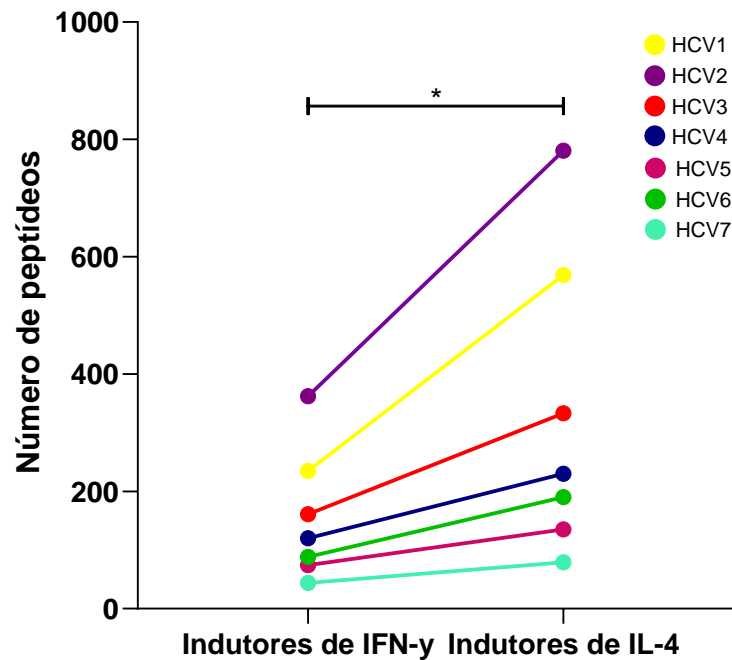


Figura 17 – Quantidade de peptídeos preditos *in silico* com capacidade de indução de IL-4 e IFN- γ por genótipo. Gráfico de símbolos pareados e conectados por linhas com o número de peptídeos indutores das duas citocinas estudadas de acordo com o genótipo de HCV, identificados por cores conforme legenda a direita do gráfico. Análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste Wilcoxon. Significância estatística foi considerada para $p < 0,05$ e identificada por linhas conectoras e asteriscos (* = $p < 0,05$).

A avaliação da reatividade dos peptídeos imunodominantes restritos ao HLA-A*02:01 pelo ensaio microarranjo PEPperCHIP foi realizada utilizando 2888 peptídeos únicos entre os 7 genótipos do HCV. Desses 2888 peptídeos, 2708 foram preditos pelas nossas análises *in silico* e os 180 peptídeos restantes foram os peptídeos que possuíam “X” em qualquer uma das nove posições e tiveram esse “X” substituído pelos aminoácidos valina (V), leucina (L) e prolina (P). Os resultados então revelaram que o HCV possui diversos peptídeos reativos *in vitro*, com um número maior de peptídeos reativos nos genótipos HCV1 e HCV2 e com o HCV1 apresentando os peptídeos com os maiores valores de reatividade. Entretanto, os dados obtidos demonstram uma ausência de dose dependência para todos os genótipos, ou seja, a reatividade dos peptídeos não aumenta com o aumento da concentração de HLA-A*02:01 (Figura 18).

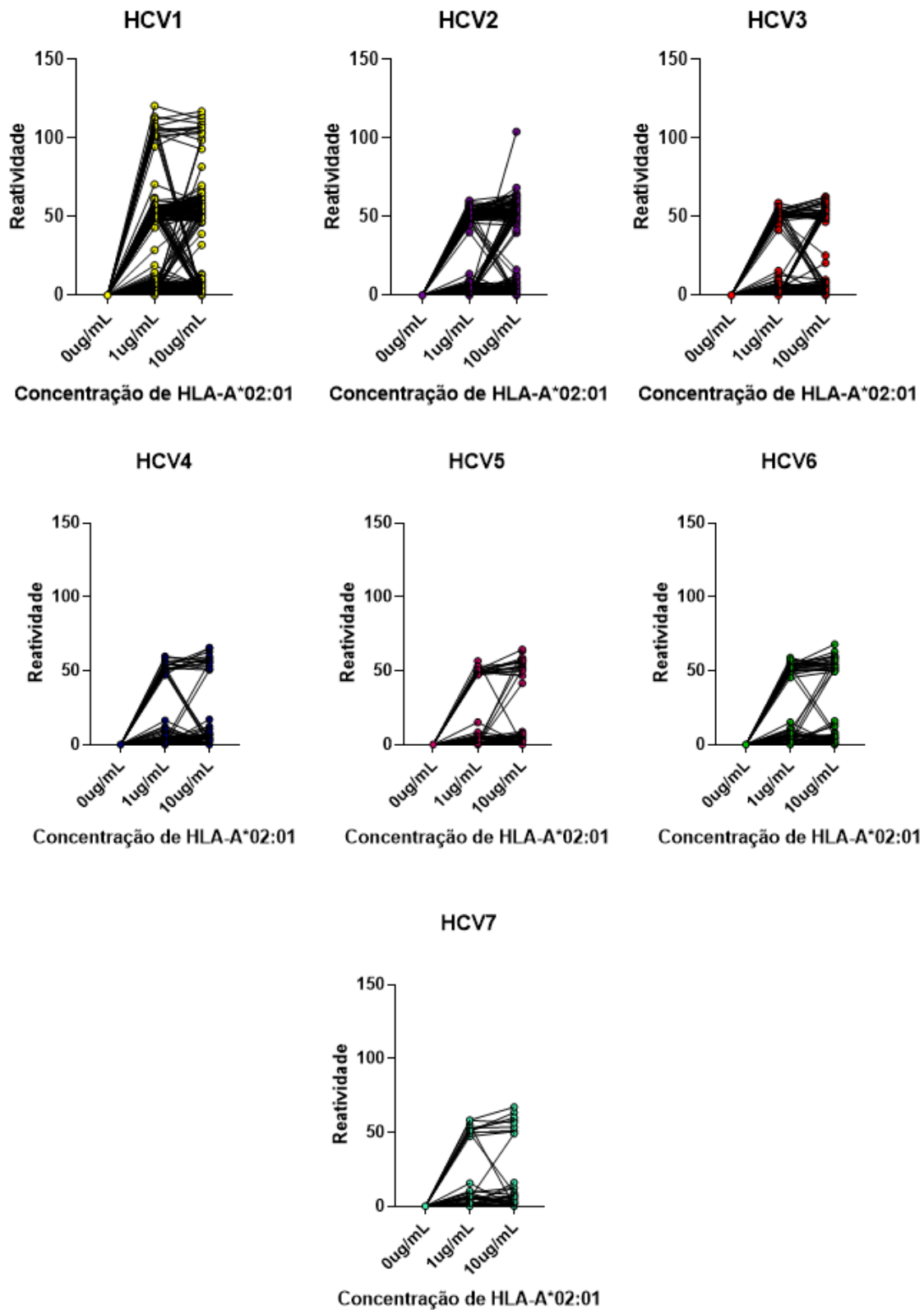


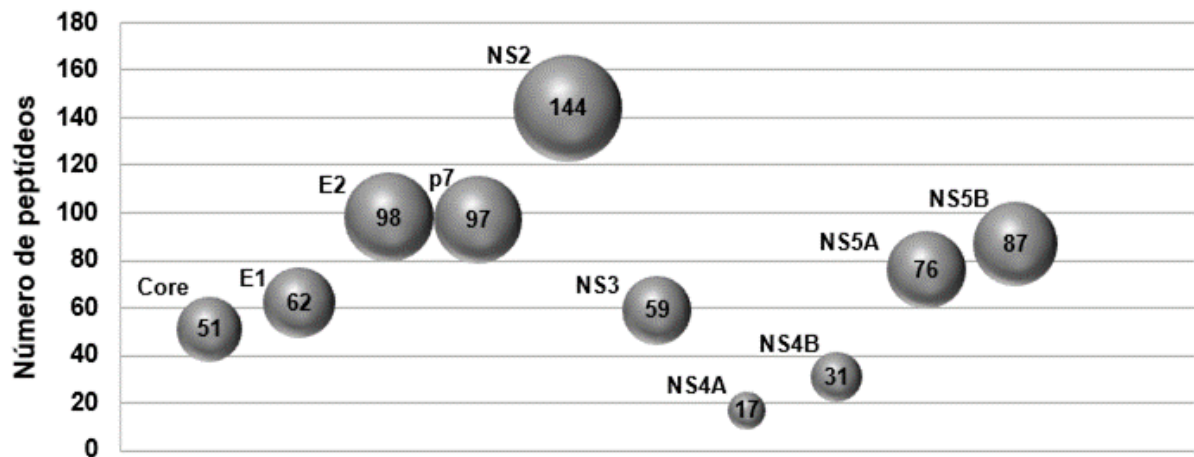
Figura 18 - Avaliação da reatividade dos peptídeos preditos pela afinidade com o HLA-A*02:01 em três diferentes concentrações 0 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$. Gráfico de símbolos pareados e conectados por linhas com o valor da reatividade dos peptídeos nas três concentrações testadas para cada genótipo de HCV.

A partir desses resultados previamente descritos, foi possível realizar o mapeamento dos peptídeos reativos ao longo das poliproteínas virais dos genótipos de HCV e dessa forma, foi observado que o maior número de peptídeos reativos *in vitro* estão presentes principalmente nas regiões das proteínas NS2 (144 peptídeos), E2 (98 peptídeos), p7 (97 peptídeos), NS5B (87 peptídeos), NS5A (76 peptídeos), E1 (62 peptídeos) e Core (51 peptídeos), respectivamente, quando analisados todos os genótipos em conjunto (Figura 19A). Já quando analisada a frequência de peptídeos reativos para os sete genótipos, as maiores frequências estão presentes nas proteínas p7 (39% dos peptídeos), NS4A (28% dos peptídeos), NS2 (26% dos peptídeos), NS5A (25% dos peptídeos), Core (24,5% dos peptídeos) e E2 (23% dos peptídeos), respectivamente (Figura 19B).

Em relação à análise realizada separadamente de cada um dos sete genótipos do HCV (Figura 20), as proteínas com maiores quantidades de peptídeos reativos do HCV1 foram NS2 (57 peptídeos), p7 (37 peptídeos), NS5B (34 peptídeos) e E2 (33 peptídeos). No HCV2 foram NS2 (37 peptídeos), E2 (27 peptídeos), p7 (23 peptídeos) e E1 (19 peptídeos). No HCV3 foram NS5A (18 peptídeos), NS2 (17 peptídeos), E2 (16 peptídeos) e p7 (14 peptídeos). No HCV4 foram NS2 (12 peptídeos), E2 (10 peptídeos), NS5A (9 peptídeos) e NS5B (8 peptídeos). No HCV5 foram Core (10 peptídeos), NS2 (8 peptídeos), E1 (7 peptídeos) e NS5A (6 peptídeos). No HCV6 foram p7 (13 peptídeos), E1 (8 peptídeos), NS5B (8 peptídeos) e NS5A (7 peptídeos). Por fim, no HCV7 foram NS2 (8 peptídeos), NS5B (8 peptídeos), NS4B (4 peptídeos) e E1/E2 (3 peptídeos). De maneira análoga, quando analisada a frequência de peptídeos reativos para cada genótipo foi possível observar que em todos os 7 a proteína p7 está presente como uma das maiores frequências. Outras proteínas compartilhadas entre os genótipos que possuem maiores frequências são as proteínas Core, NS2, NS5A, NS4A e E2 (Figura 20).

A)

Peptídeos reativos por proteína dos 7 genótipos de HCV



B)

Frequência de peptídeos reativos por proteína viral dos genótipos de HCV

	HCV1-7
Core	24,5%
E1	16,5%
E2	23%
p7	39%
NS2	26%
NS3	17%
NS4A	28%
NS4B	15%
NS5A	25%
NS5B	16%

Figura 19 - Análise quantitativa da distribuição dos peptídeos reativos *in vitro* ao HLA-A*02:01 por proteína do HCV dos sete genótipos juntos. Em (A) gráfico de bolhas onde o tamanho das bolhas está diretamente relacionado ao número de peptídeos reativos para os sete genótipos de HCV avaliados. Em (B) está representada a frequência de peptídeos reativos ao longo das proteínas virais para os sete genótipos de HCV avaliados.

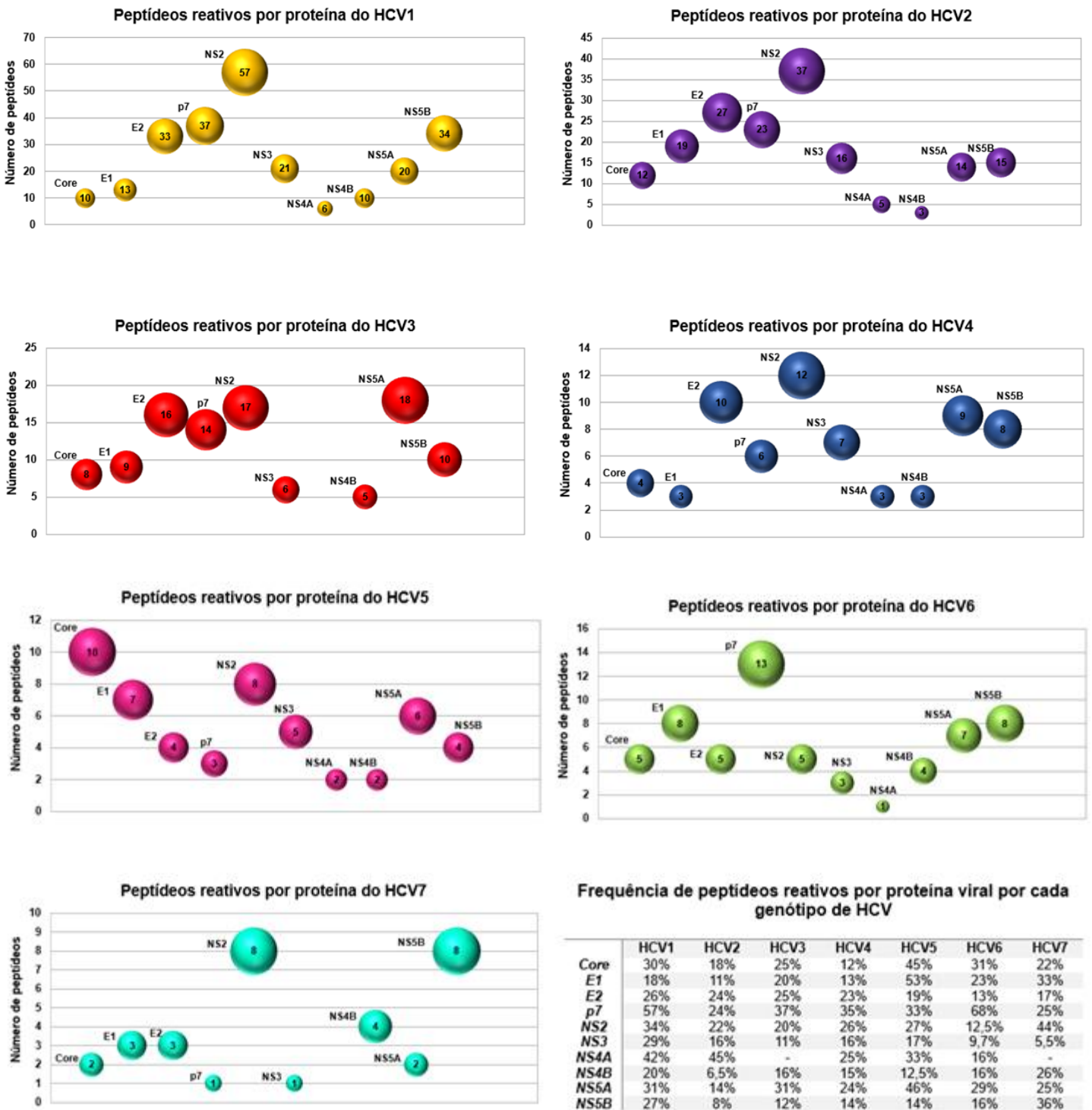


Figura 20 – Análise quantitativa da distribuição dos peptídeos reativos *in vitro* ao HLA-A*02:01 por proteína do HCV para cada um dos sete genótipos. Estão representados gráficos de bolhas onde o tamanho das bolhas está diretamente relacionado ao número de peptídeos reativos presentes em cada um dos genótipos de HCV avaliados. Além disso, também está representada a frequência de peptídeos reativos ao longo das proteínas virais para cada um dos sete genótipos de HCV.

Para a identificação de peptídeos preditos com scores altos, médios e baixos foi necessário gerar valores de tercil para todos os peptídeos únicos preditos dos sete genótipos agrupados. Foram selecionados 20 peptídeos representativos nessas três faixas de valores para a realização de um alinhamento que possibilitou à obtenção de uma sequência consenso de aminoácidos, permitindo a identificação de resíduos conservados dentre os genótipos de HCV. Cada logótipo consiste em pilhas de símbolos, uma pilha para cada posição na sequência. A altura total da pilha indica a conservação da sequência nessa posição, enquanto a altura dos símbolos dentro da pilha indica a frequência relativa de cada aminoácido ou ácido nucleico nessa posição (Figura 21).

Dessa forma, os peptídeos com alta afinidade ao HLA-A*02:01 apresentaram alta predominância de resíduos de leucina na posição dois e valina na posição nove. Já os peptídeos com baixa afinidade ao HLA-A*02:01 apresentaram predominância de leucina na posição 9. Enquanto isso, os peptídeos com média afinidade ao HLA-A*02:01 não demonstraram um padrão claro de resíduos de aminoácidos, mas é possível observar uma ligeira diminuição de leucina na posição 2 e de valina na posição 9 (Figura 21A).

Para os peptídeos com alto potencial de clivagem foi observado uma alta predominância de leucina na posição nove e uma ligeira predominância também de leucina na posição dois. Em relação aos peptídeos com baixo potencial de clivagem não foi possível observar um perfil bem definido de aminoácidos, porém apresentaram predominância de leucina na posição dois e presença principalmente de valina e alanina na posição nove. Já os peptídeos de médio potencial de clivagem também não apresentaram um padrão claro de resíduos de aminoácidos, mas é possível observar ligeira predominância de leucina na posição dois e leucina e valina na posição nove (Figura 21B).

Por fim, os peptídeos com alto potencial de transporte via TAP apresentaram altíssima predominância de leucina na posição nove e os peptídeos com baixo potencial de transporte via TAP apresentam leucina predominante na posição dois e alternância entre valina e alanina na posição nove. Enquanto isso, os peptídeos de médio potencial de transporte via TAP demonstram uma alta prevalência de valina na posição nove (Figura 21C).

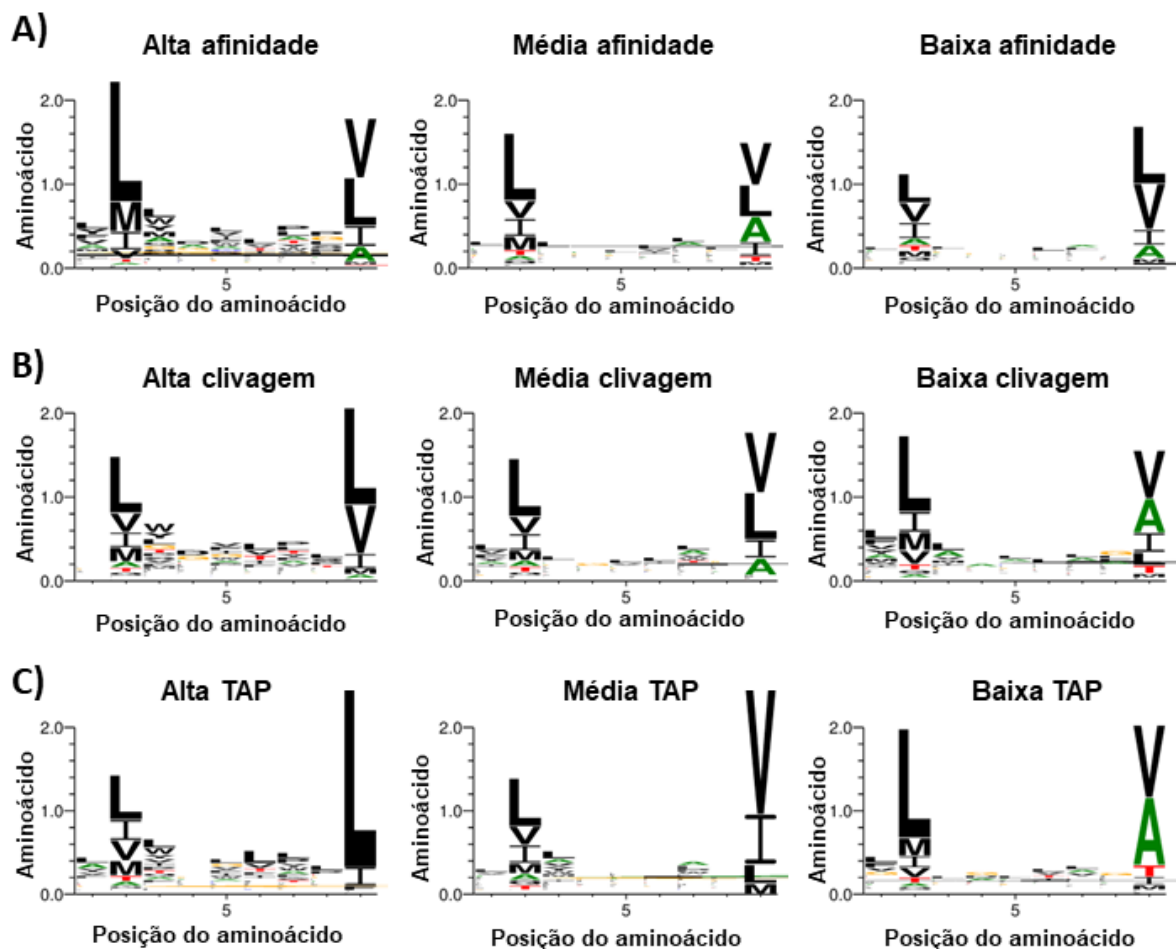


Figura 21 - Análise de logotipo de sequência dos peptídeos preditos *in silico* em relação aos parâmetros de (A) afinidade ao HLA-A*02, (B) clivagem e (C) TAP, mostrando os resíduos de aminoácidos predominantes em cada posição. O tamanho das letras está diretamente relacionado com a frequência observada do aminoácido na posição indicada no eixo X.

O alinhamento de todos os peptídeos reativos ao HLA-A*02:01 *in vitro* também foi realizado para a obtenção de uma sequência consenso de aminoácidos, permitindo a identificação de resíduos conservados do HCV. Assim, foi possível observar a alta predominância de leucina na posição dois e grandes quantidades de leucina e valina na posição nove. Foi também observado quantidades significativas de triptofano nas posições três e sete (Figura 22).

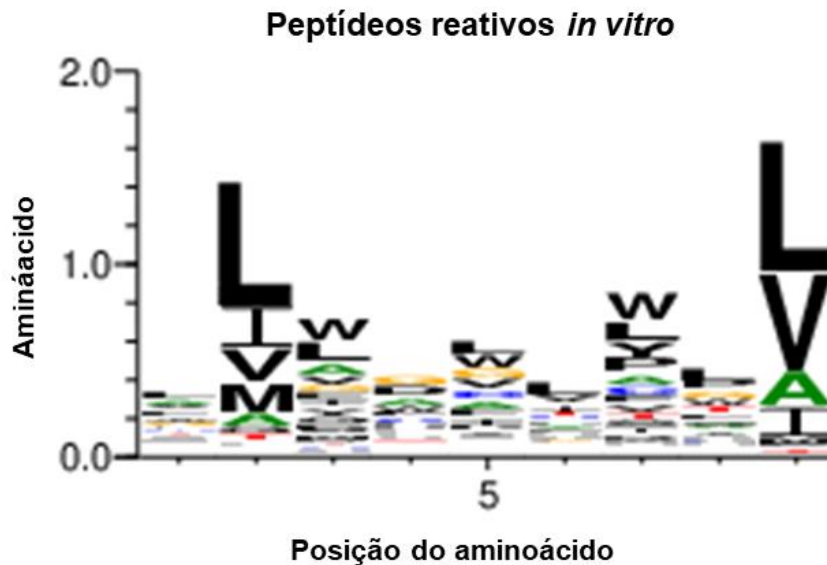


Figura 22 - Análise de logotipo de sequência dos peptídeos reativos *in vitro* ao HLA-A*02, mostrando os resíduos de aminoácidos predominantes em cada posição. O tamanho das letras está diretamente relacionado com a frequência observada do aminoácido na posição indicada no eixo X.

Em relação à análise das propriedades físico-químicas dos peptídeos, os dados obtidos foram agrupados em *heatmaps* que apresentam a matriz de correlação das propriedades físico-químicas e imunológicas dos peptídeos imunodominantes reativos ao HLA-A*02:01 *in vitro* para todos os genótipos do HCV (Figura 23). As propriedades físico-químicas avaliadas incluíram a hidrofobicidade, hidrofiliabilidade, estereoquímica, pontes de hidrogênio, massa lateral, carga, hidropaticidade, ponto isoelétrico (pI), anfipaticidade e peso molecular (Mol wt) dos peptídeos. Já as propriedades imunológicas dos peptídeos incluíram a produção de IFN- γ , produção de IL-4 e reatividade ao HLA-A*02:01 nas concentrações de 1 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$.

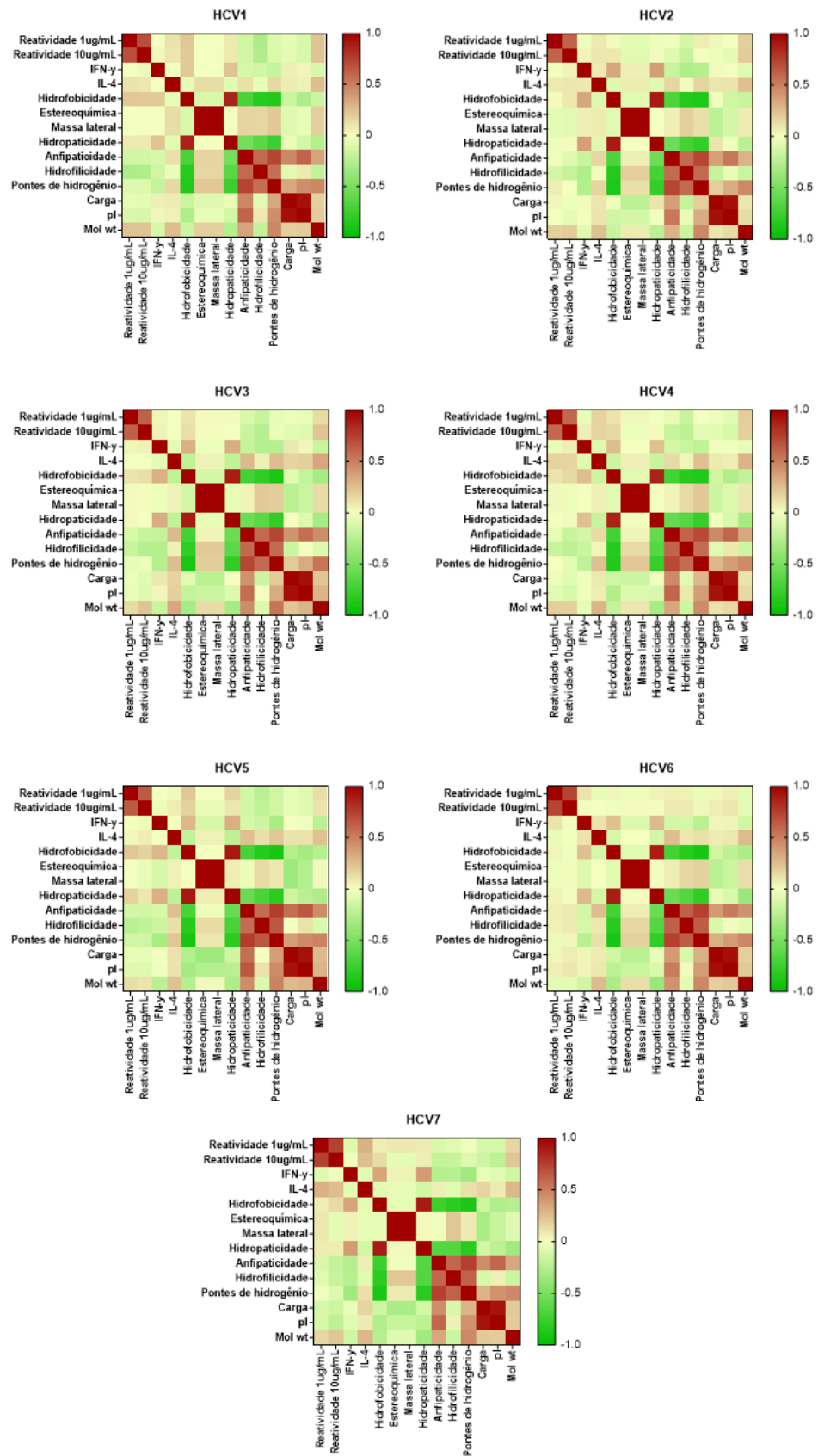


Figura 23 - Heatmaps demonstrando a correlação dos valores obtidos para a reatividade dos peptídeos ao HLA-A*02:01 nas concentrações de 1 µg e 10 µg da molécula, capacidade *in silico* de indução de citocinas no

eixo Th1 (IFN- γ) e Th2 (IL-4) e parâmetros físico-químicos para cada um dos genótipos avaliados neste estudo. As correlações foram obtidas pelo cálculo de coeficiente de correlação de Spearman. Quanto mais próximo de vermelho escuro, maior o coeficiente de correlação r , quanto mais próximo de verde escuro, menor o coeficiente de correlação r .

Para uma melhor visualização das correlações das propriedades físico-químicas dos peptídeos e imunológicas dos peptídeos imunodominantes reativos ao HLA-A*02:01, os dados obtidos foram também agrupados em redes de correlação que apresentam valores de correlação de Pearson e Spearman. As redes de correlação demonstram as relações fortes, moderadas e fracas entre os parâmetros analisados, bem como correlação positiva ou negativa.

Dentre os dados obtidos, ao analisar todos os peptídeos em conjunto não foi possível observar muitas correlações fortes entre os parâmetros avaliados. Hidrofobicidade se correlaciona de maneira positiva e forte com hidropaticidade e de maneira negativa com anfipaticidade, pontes de hidrogênio e hidrofiliçidade. Já estereoquímica se correlaciona de maneira positiva e forte com massa lateral e carga. Além disso, a reatividade ao HLA-A*02:01 a 1 $\mu\text{g/mL}$ se correlaciona de maneira positiva e forte com a reatividade ao HLA-A*02:01 a 10 $\mu\text{g/mL}$. Outro ponto importante é a correlação moderada entre IFN- γ e hidropaticidade (Figura 24A).

Enquanto isso, ao analisar apenas os peptídeos que possuem o aminoácido triptofano em qualquer posição, é importante destacar que a produção de IL-4 se correlaciona de maneira positiva e forte com estereoquímica, massa lateral, anfipaticidade, pontes de hidrogênio, pI e Mol wt e de maneira negativa fortemente com hidrofiliçidade. Também foi observado novamente que a reatividade ao HLA-A*02:01 a 1 $\mu\text{g/mL}$ se correlaciona de maneira positiva e forte com a reatividade ao HLA-A*02:01 a 10 $\mu\text{g/mL}$. Já na análise dos peptídeos que não possuem o aminoácido triptofano em sua composição, é importante destacar que não há correlações fortes de IL-4 com outros parâmetros avaliados e correlações moderadas de IFN- γ com hidropaticidade e hidrofobicidade (Figura 24B).

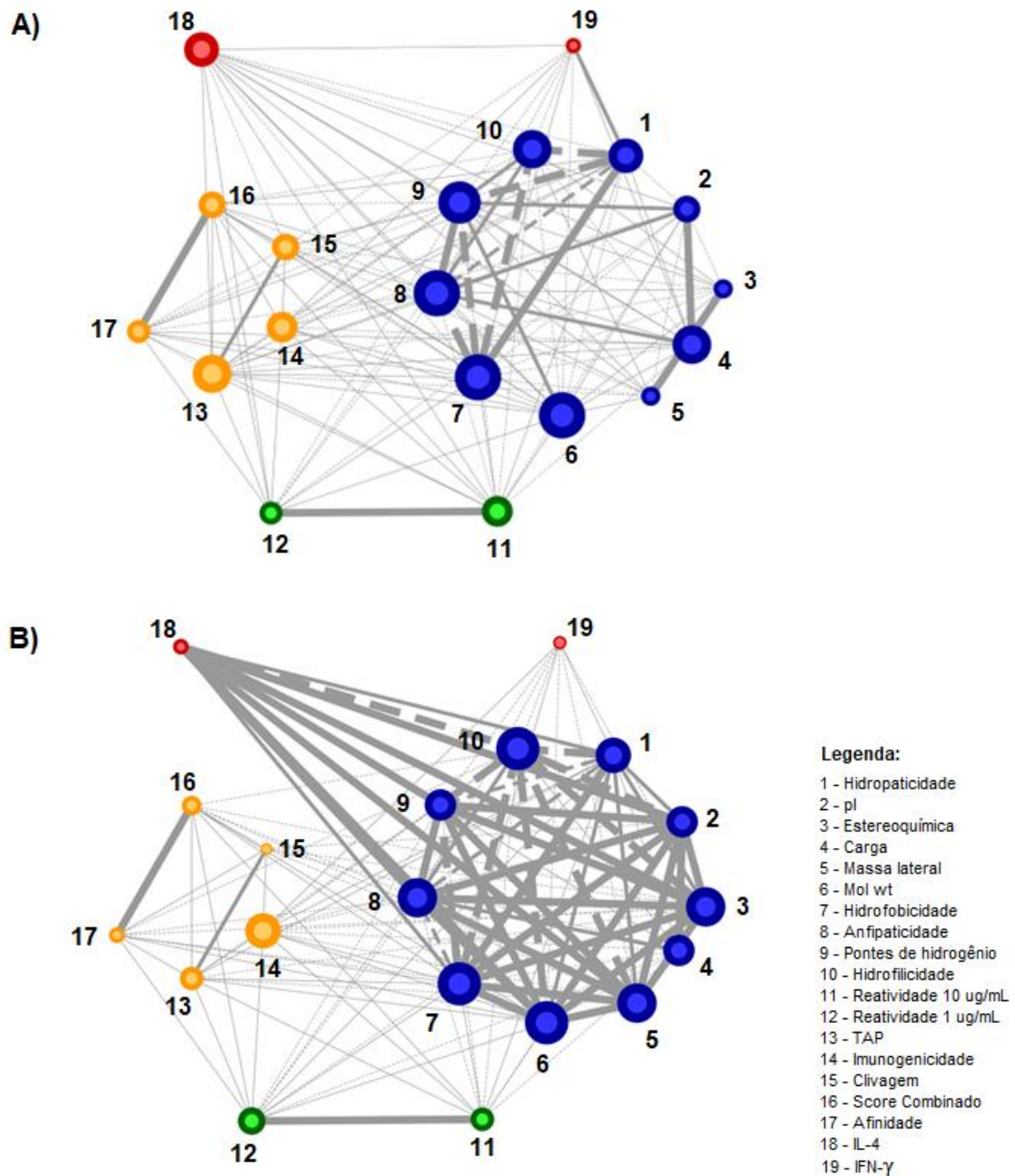


Figura 24 – Redes de correlação com os parâmetros físico-químicos dos peptídeos em azul, reatividade *in vitro* em verde, análises *in silico* em amarelo e indução de citocinas em vermelho. Em (A) está representada a rede de correlação entre todos os peptídeos analisados e em (B) está representada a rede de correlação entre apenas os peptídeos que possuem triptofano. Os dados obtidos foram agrupados em redes de correlação utilizando os valores de correlação de Pearson e Spearman.

6 DISCUSSÃO

Embora o tratamento da hepatite C crônica com os DAAs apresente diversas vantagens, tais como uma resposta virológica sustentada (RVS) elevada, boa tolerância do paciente e uma curta duração do tratamento, há também limitações, como a possibilidade de reinfeção, resistência aos antivirais utilizados e dificuldade de tratamento de alguns genótipos, como o HCV3. Diante disso, o desenvolvimento de uma vacina contra diversos genótipos do HCV emerge como a principal ferramenta para diminuir a transmissão do vírus (Echeverría *et al.*, 2021; Martinez; Franco, 2020; Parlati *et al.*, 2021).

Atualmente, não há um imunizante aprovado contra o HCV e seu desenvolvimento é dificultado pela falta de investimentos, escassez de modelos *in vivo* e *in vitro* para o vírus, lacunas no conhecimento sobre a persistência viral, exaustão da resposta celular e principalmente a diversidade e variabilidade genética do vírus. Mesmo assim, ao longo dos anos diversas estratégias já foram utilizadas na tentativa de desenvolver uma vacina eficaz. Abordagens como vacinas de subunidades, *virus-like-particles* e vacinas de DNA utilizando proteínas estruturais do vírus já foram testadas, bem como abordagens utilizando proteínas não estruturais do vírus como vacinas de vetores virais e vacinas de peptídeos (Duncan *et al.*, 2020; Echeverría *et al.*, 2021; Manne *et al.*, 2021).

Uma vacina preventiva ideal contra a hepatite C deve ter a capacidade de estimular a resposta imune humoral e celular, induzindo a produção de anticorpos neutralizantes e respostas específicas de células T CD4⁺ e T CD8⁺, além de ser efetiva contra todos os 7 genótipos do HCV. Os estudos de imunizantes contra o HCV para a indução de anticorpos neutralizantes utilizam principalmente as glicoproteínas do envelope E1 e E2 em sua composição, enquanto vacinas voltadas para a indução da resposta de células T se concentram na expressão de proteínas não estruturais como NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B, que são mais conservadas entre os genótipos (Hartlage; Kapoor, 2021; Walker, 2017).

Estudos em modelo animal de primatas não-humanos, utilizando anticorpos para a depleção de células T CD4⁺ e T CD8⁺ demonstraram a importância das células T de memória para a proteção contra a persistência do HCV. Além disso, outros estudos observaram que algumas infecções pelo HCV são autoresolutivas mesmo na ausência de resposta de anticorpos, indicando que imunizantes capazes de estimular a resposta de células T pode ser

suficiente para prevenir a persistência do HCV. Embora as células T CD8⁺ sejam as principais células efetoras no controle do HCV, a manutenção de suas funções é dependente da resposta de células T CD4⁺. Assim, o desenvolvimento de uma resposta T CD4⁺ e T CD8⁺ específica forte e duradoura é associada com um controle espontâneo da infecção pelo HCV (Baskic *et al.*, 2017; Echeverría *et al.*, 2021; Shoukry *et al.*, 2003; Swadling *et al.*, 2013; Walker, 2017).

Durante a infecção aguda pelo HCV, os linfócitos T citotóxicos (CTLs) atuam mediando o *clearance viral*, reconhecendo peptídeos apresentados pelo MHC-I na superfície dos hepatócitos infectados e induzindo apoptose dessas células. Na infecção crônica, a capacidade proliferativa e produção de citocinas das células T CD4⁺ é limitada, o que desregula a resposta T CD8⁺ e favorece o escape viral por mutações em epítomos reconhecidos pelo MHC-I. Adicionalmente, a exaustão das células T CD8⁺ desencadeada pela estimulação contínua de antígenos virais, pode resultar em danos hepáticos extensos (Echeverría *et al.*, 2021; Hartlage; Kapoor, 2021; Thimme, 2021; Walker, 2017).

A identificação de epítomos apresentados pelas células T é essencial para compreender a resposta imune celular e fornecer informações importantes para o desenvolvimento de uma vacina. Diversos estudos visando ampliar os conhecimentos sobre os epítomos de HCV já foram realizados por pesquisadores como Idrees e A Ashfaq (2013), por exemplo, que empregaram análises de imunoinformática utilizando a sequência de uma glicoproteína E1 isolada no Paquistão e foram capazes de identificar regiões da proteína com potencial para induzir resposta imune celular e humoral. De maneira análoga, glicoproteínas E1 e E2 recombinantes também já foram avaliadas como potenciais alvos para o design de uma vacina contra o HCV (Calis *et al.*, 2013; Filskov *et al.*, 2019; Fytily *et al.*, 2008; Idrees; A Ashfaq, 2013; Yost *et al.*, 2018).

Paralelamente, epítomos de proteínas não estruturais também são alvos promissores para serem empregados em imunizantes devido a sua ampla capacidade de indução de resposta celular antiviral específica. Diversos epítomos já foram estudados para serem utilizados para uma vacina como um epítomo bastante conhecido, o NS31073 derivado da proteína NS3 e bem conservado entre os genótipos, e epítomos de p7, capazes de induzir a produção multifuncional de citocinas por T CD4⁺ e T CD8⁺ (Calis *et al.*, 2013; Filskov *et al.*, 2019; Fytily *et al.*, 2008; Idrees; A Ashfaq, 2013; Yost *et al.*, 2018).

Neste contexto, esse estudo apresenta uma visão ampla de epítomos imunodominantes restritos ao HLA-A*02:01 e derivados dos 7 genótipos do vírus da hepatite C, capazes de induzir resposta de células T CD8⁺ antivirais específicas.

Nossos resultados sobre as análises funcionais realizadas *in silico* dos parâmetros utilizados para a predição de peptídeos, indicaram a presença de diversos peptídeos imunodominantes altamente reativos ao HLA-A*02:01 derivados do HCV e altamente conservados entre os diversos genótipos do vírus. Dessa forma, mesmo que os genótipos se diferenciem entre si em 30-35% de nucleotídeos, os peptídeos preditos possuem valores similares de afinidade ao HLA-A*02:01, potencial de clivagem do peptídeo pelo proteassoma, a capacidade do peptídeo ser transportado para o retículo endoplasmático via TAP e imunogenicidade (Cuypers *et al.*, 2015; Messina *et al.*, 2014).

De maneira similar, os dados de hidrofobicidade observados ao longo das poliproteínas dos 7 genótipos do HCV também indicou uma alta conservação entre os genótipos, com perfis semelhantes em relação as porções de alta e baixa hidrofobicidade. Dentre os pontos de hidrofobicidade significativa se destacam as porções finais das proteínas estruturais C, E1 e E2, as proteínas não estruturais p7, NS2, NS4A e a porção final da proteína NS5B. A análise dos peptídeos reativos ao HLA-A2 no ensaio *in vitro* de microarranjo de peptídeos, indicou que um número significativo dos peptídeos capazes de se ligarem *in vitro* a molécula de MHC-I estão concentrados nessas proteínas, corroborando com dados de Chowell *et al.* (2015), segundo o qual porções hidrofóbicas possuem maior potencial de ligação ao MHC-I indução da resposta T CD8⁺.

A proteína C possui o domínio hidrofóbico C-terminal 2, responsável por mediar a associação do vírus com moléculas de lipídeos para a formação de partículas lipo-virais, além de auxiliar na morfogênese e liberação de partículas infecciosas (Moradpour; Penin, 2013; Shavinskaya *et al.*, 2007). Já as glicoproteínas E1 e E2 possuem domínio C-terminal transmembrana com porções hidrofóbicas importantes para a penetração viral e fusão de membrana, contribuindo para ancoragem dessas proteínas no envelope viral (Beeck; Dubuisson, 2003; Moradpour; Penin, 2013). Da mesma forma, dados da literatura tem mostrado que, além das proteínas estruturais, as proteínas não estruturais p7, NS2, NS4A e NS5B também possuem sítios altamente hidrofóbicos com funções importantes no ciclo de multiplicação do HCV, que corroboram o encontrado em nossas análises (Moradpour; Penin, 2013).

Em relação ao padrão de resposta imune observado em pacientes com hepatite C crônica, os dados atualmente disponíveis na literatura são inconsistentes e controversos. Alguns autores já relataram a prevalência de citocinas do eixo Th1, como IL-2 e principalmente IFN- γ , capazes de ativar a resposta imune celular e desencadear uma resposta imune antiviral, sendo constantemente associadas com resistência a infecção. Por outro lado, a prevalência de citocinas do eixo Th2, como IL-10 e IL-4, também já foi descrita. Nesse caso, tais mediadores são responsáveis pela ativação da resposta imune humoral e podem inibir mecanismos efetores antivirais, contribuindo para persistência da infecção. Entretanto, outros estudos indicam que ambas as respostas Th1 e Th2 interagem na infecção pelo HCV e o desbalanço dessa interação pode implicar nos diferentes desfechos da doença (Baskic *et al.*, 2017; Essa *et al.*, 2021; Gramenzi *et al.*, 2005; Sofian *et al.*, 2012).

Dessa forma, em relação à avaliação do potencial dos peptídeos derivados do HCV, e incluídos neste estudo, de induzirem a produção de citocinas do eixo Th1, IFN- γ , e do eixo Th2, IL-4, via MHC-II, nossos resultados demonstraram que peptídeos derivados dos sete genótipos possuem capacidade semelhante de estimular ambos os eixos da resposta imune celular sem diferença estatística entre eles. A única exceção ocorre para a indução de IFN- γ , que se mostra aumentada em HCV2 quando comparado com o HCV1, provavelmente pelo maior número de peptídeos derivados de HCV2, a maior diversidade genética desse genótipo e maior quantidade de sequências de subtipos utilizados na predição.

Sabe-se que o IFN- γ tem dois papéis principais durante a infecção pelo HCV: controlar a infecção aguda impedindo a multiplicação viral de maneira não citolítica e modulando a resposta imune adaptativa. O controle da multiplicação viral de maneira não citolítica se dá pelo fato de que o IFN- γ pode inibir indiretamente a penetração viral por meio do controle da expressão e/ou distribuição dos receptores essenciais para a infecção viral, CD81 e SRB1, reduzindo a susceptibilidade das células hepáticas à infecção pelo HCV. Além disso, essa citocina exerce diversos papéis indiretos na atividade das células T CD8⁺, por exemplo, a produção de IFN- γ induz o aumento da expressão do imunoproteossoma, o transportador TAP e de moléculas de MHC-I, proporcionando uma resposta celular mais eficaz. Ademais, estudos em modelo animal com primatas não-humanos demonstraram que animais que foram capazes de eliminar a infecção pelo HCV produzem mais IFN- γ do que animais que se tornaram infectados cronicamente, demonstrando o papel essencial dessa citocina no controle

da infecção (Edlich *et al.*, 2011; Frese *et al.*, 2002; Kang, Brown e Hwang, 2018; Whitmire, Tan e Whitton, 2005).

Entretanto, embora os peptídeos incluídos neste trabalho tenham sido preditos com restrição a um haplótipo específico de MHC-I, o HLA-A2*02 a análise da capacidade de indução de citocinas pela interação das sequências com moléculas de MHC-II é importante, uma vez que não só o MHC-II pode apresentar peptídeos adquiridos por vias não-clássicas, como os peptídeos de 9 aminoácidos preditos nesse estudo podem estar contidos dentro de peptídeos maiores apresentados às células T CD4⁺ via MHC-II. Nesse contexto, nossas análises demonstraram uma tendência à estimulação do eixo Th2 pelos peptídeos preditos para os sete genótipos e uma prevalência de peptídeos com capacidade de induzir a produção de IL-4. Anteriormente, Gramenzi *et al.* (2005), observou uma associação entre a patogênese e gravidade da doença hepática e um perfil Th2 prevalente. Batsaikhan *et al.* (2019) demonstrou que a IL-4 é uma citocina importante para prever fibrose hepática em pacientes com HCV, encontrando-se mais elevada no grupo de pacientes com fibrose avançada. A IL-4 é capaz de regular o sistema imune e manter efeitos anti-inflamatórios por meio da inibição da ativação das células Th1, contribuindo para a patogênese e cronicidade da doença, uma vez que a uma resposta específica, robusta e sustentada de citocinas do eixo Th1 é necessária para a resistência à infecção (Batsaikhan *et al.*, 2019; Essa *et al.*, 2021; Lee *et al.*, 2015; Tsai *et al.*, 1997).

Para a triagem de peptídeos imunodominantes de células TCD8⁺, a reatividade *in vitro* a um dímero recombinante de HLA-A*02:01 foi avaliada pelo ensaio de microarranjo de peptídeos (PEPperCHIP®, PEPperPRINT). Inicialmente, 2888 peptídeos únicos derivados dos 7 genótipos do foram testados, tendo sido possível identificadas 615 peptídeos reativos com ausência de dose dependência. Os maiores números de peptídeos reativos foram observados nos genótipos HCV1 e HCV2, o que pode ser explicado pelo maior número de sequências analisadas nesse estudo quando comparadas aos demais genótipos. Além disso, o HCV1 apresentou os peptídeos com maiores valores de reatividade dentre os outros genótipos. Tal fato pode ter relação com a maior prevalência desse genótipo no mundo, representando cerca de 46% das infecções pelo HCV (Bukh, 2016).

A partir dos resultados de reatividade dos peptídeos ao HLA-A*02:01, a próxima etapa do estudo consistiu em mapear os peptídeos ao longo das poliproteínas virais dos genótipos de HCV, visando a identificação de “*hot-spots*” para potenciais epítomos. Os resultados obtidos

indicaram um número significativo de peptídeos reativos principalmente nas regiões das proteínas estruturais C e E2 e das proteínas não estruturais p7, NS2, NS4A e NS5A. Nesse contexto, sabe-se que epítomos derivados de proteínas estruturais virais geralmente são mais bem reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro, principalmente no que se refere às respostas de células B e produção de anticorpos neutralizantes, entretanto, tais sequências também podem ser capazes de levar a ativação de respostas de células T CD4⁺ e T CD8⁺ (Alvarez-Obregón *et al.*, 2001; Drane *et al.*, 2009; Hartlage; Kapoor, 2021; Walker, 2017).

A proteína C é capaz de se ligar ao RNA, atuando no seu empacotamento e interagindo tanto com proteínas celulares quanto com vias de transdução de sinais, podendo contribuir assim para a persistência da doença (Dehghani *et al.*, 2019; Kasprzak; Damek, 2008). Além disso, sabe-se que a proteína C é uma das proteínas mais conservadas entre os genótipos e subtipos do HCV, com diversos estudos associando a resposta imune celular desencadeada por essa proteína à uma resposta antiviral efetiva, levando a resolução rápida da doença. Essas características tornam a proteína C e seus epítomos um dos candidatos mais promissores para a indução de uma resposta protetora à infecção pelo HCV (Alvarez-Obregón *et al.*, 2001; Drane *et al.*, 2009).

Já as glicoproteínas do envelope, E1 e E2, também são muito estudadas para indução de uma resposta imune à infecção pelo HCV, principalmente por serem alvos naturais para uma resposta protetora de anticorpos. Isso ocorre porque a proteína E2 especificamente interage com os correceptores virais SRB1 e CD81 durante a penetração viral, dessa forma os anticorpos neutralizantes visam principalmente epítomos conformacionais de E2 (Fauvelle *et al.*, 2016). Porém, epítomos de E2 também são capazes de estimularem resposta de células T como relatado no estudo feito por Koziel *et al.* (1993), demonstrando uma resposta de CTLs estimulada não só por epítomos de E2 mas também por epítomos de C. Nesse contexto é importante destacar que os genes codificantes de E1 e E2 são variáveis, tendo sido identificados várias regiões hipervariáveis em E2, com diferença de até 80% entre os genótipos do HCV (Moradpour; Penin, 2013). Assim, para o desenvolvimento de uma vacina que proteja contra todos os genótipos de HCV seria interessante buscar epítomos repetidos ou incluir epítomos derivados de E1 e E2 de diferentes genótipos em sua formulação.

A proteína não estrutural p7 é uma pequena proteína integral de membrana que forma canais iônicos seletivos na membrana da célula hospedeira, facilitando a produção viral, sendo considerada uma viroporina. Embora essa proteína seja dispensável na replicação do

RNA, ela é essencial para a produção e liberação de partículas virais infecciosas. Além das funções previamente citadas, estudos ainda sugerem uma capacidade de interação entre a p7 e outras proteínas, como NS2, podendo auxiliar ainda no dobramento correto das glicoproteínas do envelope, E1 e E2 (Bentham *et al.*, 2013; Chandler *et al.*, 2012; Steimann *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2021). No que se refere à epítomos de p7 apresentados pelo MHC-I, Rao *et al.* (2015) demonstrou que os alelos de HLA-I apresentam preferencialmente epítomos dessa proteína e, mesmo essa proteína sendo a segunda menor proteína codificada pelo genoma do HCV, ela apresenta uma maior quantidade de epítomos quando comparadas a outras proteínas maiores como NS5B, corroborando os dados encontrados nas nossas análises.

Ainda em relação aos epítomos de p7, uma heterogenicidade significativa entre os genótipos de HCV já foi demonstrada, porém, apesar disso, alguns aminoácidos em regiões específicas dessa proteína são altamente conservados, indicando um potencial dessa proteína como antígeno vacinal capaz de induzir respostas de células T CD4⁺ e T CD8⁺. Além disso, características como a presença de aminoácidos cíclicos nessa proteína, como o triptofano e a tirosina, são importantes por serem considerados determinantes importantes da estrutura e função das viroporinas da influenza A e do HIV. Tal observação suporta a classificação da p7 do HCV como viroporina, uma vez que a substituição dos resíduos altamente conservados de triptofano e tirosina em determinadas posições possui a capacidade de reduzir a liberação de novas partículas virais infecciosas (Filskov *et al.*, 2019).

Outra proteína com um considerável número de peptídeos reativos *in vitro* ao HLA-A*02 foi a NS2, uma autoprotease que cliva a junção NS2/NS3, responsável por desempenhar um papel essencial na montagem viral e interagir com as proteínas estruturais E1 e E2, e também com as proteínas não estruturais p7, NS3-NS4A e, em menor grau, a NS5A. Durante a montagem das partículas virais, NS2 desempenha o papel de atrair as glicoproteínas do envelope para os locais de montagem e promove, juntamente com p7, o recrutamento de nucleocapsídeo para esses locais facilitando o encontro do nucleocapsídeo e as proteínas do envelope (Boson *et al.*, 2011; Moradpour; Penin, 2013). Nesse contexto, epítomos dessa proteína já foram estudados em relação ao seu potencial de desencadear resposta imune celular e humoral. Em um estudo realizado por Khalid e Ashfaq (2020), que também foram utilizadas ferramentas de bioinformática para predição de epítomos do HCV, observou que há regiões de NS2 bem conservadas entre os genótipos do HCV e epítomos que possuem potencial para induzir resposta imune de células T. Outro trabalho utilizando células

mononucleares do sangue periférico (PBMCs) também foi capaz de demonstrar que um epítipo restrito ao HLA-A*02 encontrado na região de NS2 possui uma forte capacidade estimulante de CTLs e uma frequência aumentada de produção de IFN- γ (Guo *et al.*, 2012).

Por fim, as proteínas NS5A e NS5B também tiveram números consideráveis de peptídeos reativos *in vitro* ao HLA-A*02 e ambas estão envolvidas no processo de replicação do RNA viral, sendo a NS5B a RNA polimerase dependente de RNA viral (MacDonald; Harris, 2004; Moradpour; Penin, 2013). Estudos já verificaram que fortes respostas proliferativas de células T contra a proteína NS5A e NS5B estão associadas a uma infecção por HCV autolimitada (Li *et al.*, 2007; Rao *et al.*, 2015). No trabalho de Rao *et al.* (2015) foi demonstrado que epítipos de NS5B são preferencialmente apresentados a células T CD8⁺ em haplótipos protetores contra o HCV como HLA-B*27 e HLA-B*57. Além disso, devido ao papel chave dessas proteínas na replicação do material genético viral, NS5A e principalmente NS5B possuem epítipos conservados entre os genótipos do HCV que podem ser apresentados por diversos haplótipos de HLA, sugerindo um grande potencial imunogênico dessas proteínas (Li *et al.*, 2007).

Em relação aos padrões de aminoácidos observados nos peptídeos, nossos resultados corroboram o que já vimos em outros trabalhos acerca importância das posições 2 e 9 dos peptídeos como pontos de ancoragem para a ligação do HLA-A*02 enquanto a prevalência de leucina e valina, respectivamente, nessas posições em peptídeos com alta afinidade ao HLA-A*02 indica que esses aminoácidos desempenham funções importantes nessa ligação. A presença desses resíduos nessas posições aumenta a capacidade de um epítipo ser reconhecido *in vitro* pelo TCR, aumentando a força de ligação ao MHC-I e aumento da afinidade ao TCR. Da mesma forma, a presença de leucina na última posição de peptídeos com baixa afinidade também corresponde ao que já foi descrito por outros autores. Esses mesmos padrões já foram observados em alguns arbovírus, dentre eles o vírus da febre amarela, também pertencente à família *Flaviviridae* (Calis *et al.*, 2013; Karapetyan *et al.*, 2019; Lopes-Ribeiro *et al.*, 2022; Pereira-Santos *et al.*, 2023).

O alinhamento dos peptídeos reativos ao HLA-A*02:01 *in vitro* mostrou uma prevalência de aminoácidos apolares como observado em estudos anteriores que associaram a hidrofobicidade dos peptídeos com a ligação ao MHC-I e a indução de resposta de células T CD8⁺ (Chowell *et al.*, 2015; Klatt *et al.*, 2020; Lopes-Ribeiro *et al.*, 2022; Pereira-Santos *et al.*, 2023). Esse trabalho ainda observou um padrão interessante de prevalência de triptofano

nas posições 3 e 7 nos peptídeos reativos. O triptofano é um aminoácido apolar e hidrofóbico com um grande resíduo aromático e normalmente está presente em baixas frequências em peptídeos e proteínas (Barik *et al.*, 2020; Moreira *et al.*, 2007). Alguns trabalhos já mostraram a preferência de células T por alguns aminoácidos, especialmente aqueles com grandes resíduos aromáticos e uma associação positiva entre triptofano e imunogenicidade. Além disso, estudos anteriores também indicam que o triptofano na posição 3 é importante na ligação ao TCR, ativação de células T CD8⁺ e na morte celular induzida pelos CTLs, o que tem relação com os nossos dados obtidos (Calis *et al.*, 2013; Karapetyan *et al.*, 2019).

De maneira geral os dados aqui apresentados indicam que a associação entre epítomos derivados de proteínas não estruturais conservadas de alta hidrofobicidade e proteínas estruturais derivadas de mais de um genótipo de HCV seriam uma boa estratégia vacinal para desencadear resposta imune celular.

7 CONCLUSÃO

Esse projeto permitiu a avaliação dos padrões peptídicos dos 7 genótipos do vírus da hepatite C restritos ao HLA-A*02:01 utilizando estratégias *in silico* e *in vitro*. Quando os genótipos de HCV foram comparados, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Estes resultados indicam que HCV apresenta peptídeos imunodominantes reativos ao MHC de classe I mais prevalente na população mundial e que estas sequências são bem conservadas entre os genótipos do vírus. Paralelamente, análise *in silico* do potencial de indução de produção de citocinas dos peptídeos revelou uma tendência à estimulação do eixo Th2 da resposta imune demonstrado pelo grande número de peptídeos capazes de induzir a produção de IL-4. Além disso, a triagem dos peptídeos reativos *in vitro* ao HLA-A*02:01 permitiu identificar as regiões com maior número de peptídeos reativos na poliproteína viral. De um modo geral, os padrões de peptídicos derivados do HCV e restritos ao HLA-A2*02:01 observados neste trabalho fornecem informações importantes para o desenvolvimento de uma vacina multi-epítopo que seja eficaz contra vários genótipos do vírus. Perspectivas futuras incluem a realização de ensaios *in vitro* e *ex vivo* utilizando a proteína dimérica de HLA-A2 e alguns dos peptídeos identificados nesse trabalho para confirmação de sua imunogenicidade.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Abdul K. *et al.* **Imunologia Celular e Molecular**. 9. ed. Saunders, 2019. 1581 p.

ABDEL-HAKEEM, Mohamed S.; SHOUKRY, Naglaa H.. Protective Immunity Against Hepatitis C: many shades of gray. **Frontiers In Immunology**, v. 5, p. 1-19, 16 jun. 2014. DOI 10.3389/fimmu.2014.00274. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2014.00274/full>. Acesso em: 7 jul. 2023.

ALVAREZ-OBREGÓN, Julio César *et al.* A truncated HCV core protein elicits a potent immune response with a strong participation of cellular immunity components in mice. **Vaccine**, v. 19, n. 28-29, p. 3940-3946, jul. 2001. DOI 10.1016/s0264-410x(01)00141-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11427269/>. Acesso em: 24 jul. 2023.

ANDRIEUX-MEYER, Isabelle *et al.* Disparity in market prices for hepatitis C virus direct-acting drugs. **The Lancet Global Health**, v. 3, n. 11, p. 676-677, 1 nov. 2015. DOI 10.1016/S2214-109X(15)00156-4. Disponível em: <https://www.thelancet.com/action/showPdf?pii=S2214-109X%2815%2900156-4>. Acesso em: 8 jul. 2022.

ANTONELLI, Alessandro *et al.* HCV infection: Pathogenesis, clinical manifestations and therapy. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 26, p. 39-47, 12 fev. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18570753/>. Acesso em: 20 maio 2022.

BARIK, Sailen *et al.* The Uniqueness of Tryptophan in Biology: properties, metabolism, interactions and localization in proteins. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, 20 nov. 2020. DOI 10.3390/ijms21228776. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/22/8776>. Acesso em: 11 jul. 2023.

BASKIC, Dejan *et al.* Cytokine profile in chronic hepatitis C: an observation. **Cytokine**, v. 96, p. 185-188, ago. 2017. DOI 10.1016/j.cyto.2017.04.008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28433893/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

BATSAIKHAN, Batbold *et al.* Elevated interleukin-4 levels predicted advanced fibrosis in chronic hepatitis C. **Journal Of The Chinese Medical Association**, v. 82, n. 4, p. 277-281, abr. 2019. DOI 10.1097/jcma.000000000000064. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30946707/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

BAYAT, Ardeshir. Science, medicine, and the future: Bioinformatics. **BMJ**, v. 324, p. 1018-1022, 27 abr. 2002. DOI 10.1136/bmj.324.7344.1018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11976246/>. Acesso em: 8 jul. 2022.

BEECK, Anne Op de; DUBUISSON, Jean. Topology of hepatitis C virus envelope glycoproteins. **Reviews In Medical Virology**, v. 13, n. 4, p. 233-241, 2003. DOI 10.1002/rmv.391. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12820185/>. Acesso em: 19 jul. 2023.

BENTHAM, Matthew J. *et al.* Mutations in hepatitis C virus p7 reduce both the egress and infectivity of assembled particles via impaired proton channel function. **Journal Of General**

Virology, v. 94, n. 10, p. 2236-2248, 1 out. 2013. DOI 10.1099/vir.0.054338-0. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.054338-0>. Acesso em: 21 jul. 2023.

BHASIN, M. *et al.* Pcleavage: an svm based method for prediction of constitutive proteasome and immunoproteasome cleavage sites in antigenic sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 202-207, 1 jul. 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15988831/>. Acesso em: 05 mar. 2024.

BOSON, Bertrand *et al.* A Concerted Action of Hepatitis C Virus P7 and Nonstructural Protein 2 Regulates Core Localization at the Endoplasmic Reticulum and Virus Assembly. **Plos Pathogens**, v. 7, n. 7, 21 jul. 2011. 10.1371/journal.ppat.1002144. Disponível em: <https://europepmc.org/article/PMC/3141040>. Acesso em: 05 ago. 2023.

BROWN, Pearl M Jacobson *et al.* Immunopathogenesis of hepatitis C viral infection: th1/th2 responses and the role of cytokines. **Clinical Biochemistry**, v. 34, n. 3, p. 167-171, maio 2001. [Http://dx.doi.org/10.1016/s0009-9120\(01\)00210-7](Http://dx.doi.org/10.1016/s0009-9120(01)00210-7). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11408013/>. Acesso em: 20 set. 2023.

BUKH, Jens. The history of hepatitis C virus (HCV): basic research reveals unique features in phylogeny, evolution and the viral life cycle with new perspectives for epidemic control. **Journal Of Hepatology**, v. 65, n. 1, p. 2-21, out. 2016. DOI 10.1016/j.jhep.2016.07.035. Disponível em: [https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278\(16\)30405-6/fulltext](https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278(16)30405-6/fulltext). Acesso em 8 jul. 2023.

CALIS, J.J. *et al.* Properties of MHC class I presented peptides that enhance immunogenicity. **PLoS Comput Biol.**, v. 9, n. 10, 2013. DOI 10.1371/journal.pcbi.1003266. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24204222/>. Acesso em: 29 jun. 2022.

CASTANEDA, Daniel *et al.* From hepatitis A to E: A critical review of viral hepatitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 27, n. 12, p. 1691-1715, 28 abr. 2021. DOI 10.3748/wjg.v27.i16.1691. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33967551/>. Acesso em: 16 maio 2022.

CHANDLER, Danielle E. *et al.* The p7 Protein of Hepatitis C Virus Forms Structurally Plastic, Minimalist Ion Channels. **Plos Computational Biology**, v. 8, n. 9, 20 set. 2012. DOI 10.1371/journal.pcbi.1002702. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23028296/>. Acesso em: 21 jul. 2023.

CHAVES, Gabriela Costa *et al.* Compras públicas de medicamentos para hepatite C no Brasil no período de 2005 a 2015. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 8, p. 2527-2538, 8 ago. 2017. DOI 10.1590/1413-81232017228.05602017. Disponível em: <https://www.scielo.org/article/csc/2017.v22n8/2527-2538/>. Acesso em: 8 jul. 2022.

CHIGBU, DeGaulle I. *et al.* Hepatitis C Virus Infection: Host–Virus Interaction and Mechanisms of Viral Persistence. **Cells**, v. 25, 25 abr. 2019. DOI 10.3390/cells8040376. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31027278/>. Acesso em: 20 maio 2022.

CHOWELL, Diego *et al.* TCR contact residue hydrophobicity is a hallmark of immunogenic CD8+ T cell epitopes. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 112, n. 14,

23 mar. 2015. DOI 10.1073/pnas.1500973112. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25831525/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

COLPITTS, Che C. *et al.* Hepatitis C Virus Entry: An Intriguingly Complex and Highly Regulated Process. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, p. 2091-2108, 21 mar. 2020. DOI 10.3390/ijms21062091. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7140000/>. Acesso em: 16 maio 2022.

CROOKS, Gavin E. *et al.* WebLogo: a sequence logo generator. **Genome Research**, v. 14, n. 6, p. 1188-1190, jun. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15173120/>. Acesso em: 05 mar. 2024.

CUYPERS, Lize *et al.* Genetic Diversity and Selective Pressure in Hepatitis C Virus Genotypes 1–6: significance for direct-acting antiviral treatment and drug resistance. **Viruses**, v. 7, n. 9, p. 5018-5039, 16 set. 2015. DOI 10.3390/v7092857. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26389941/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

DA SILVA, Alessandra Pereira *et al.* Incidence of viral hepatitis in Brazil from 2009 to 2018: an epidemiological study of confirmed cases of viral hepatitis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, p. 665-673, 21 dez. 2020. DOI 10.1590/0037-8682-0089-2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33338106/>. Acesso em: 18 maio 2022.

DEGHANI, Behzad *et al.* Bioinformatics Analysis of Domain 1 of HCV-Core Protein: iran. **International Journal Of Peptide Research And Therapeutics**, v. 26, n. 1, p. 303-320, 20 abr. 2019. DOI 10.1007/s10989-019-09838-y. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10989-019-09838-y>. Acesso em: 24 jul. 2023.

DEMSAR, J. *et al.* Orange: Data Mining Toolbox in Python. **Journal of Machine Learning Research**, v. 14, p. 2349-53, 2013. DOI 10.5555/2567709.2567736. Disponível em: <https://www.jmlr.org/papers/volume14/demsar13a/demsar13a.pdf>. Acesso em: 29 jun. 2022.

DENNIS, Brittany B *et al.* New hope for hepatitis C virus: Summary of global epidemiologic changes and novel innovations over 20 years. **World Journal of Gastroenterology**, v. 27, p. 4818-4830, 7 ago. 2021. DOI 10.3748/wjg.v27.i29.4818. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34447228/>. Acesso em: 15 maio 2022.

DHANDA, S.K. *et al.* Designing of interferon-gamma inducing MHC class-II binders. **Biol Direct.**, v. 8, n. 30, 2013a. DOI 10.1186/1745-6150-8-30. Disponível em: <https://biologydirect.biomedcentral.com/articles/10.1186/1745-6150-8-30>. Acesso em: 29 jun. 2022.

DHANDA, S.K. *et al.* Prediction of IL4 inducing peptides. **Clin Dev Immunol.**, 2013b. DOI 10.1155/2013/263952. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24489573/>. Acesso em: 29 jun. 2022.

DIEPOLDER, H. M. *et al.* The role of hepatitis C virus specific CD4+ T lymphocytes in acute and chronic hepatitis C. **Journal Of Molecular Medicine**, v. 74, n. 10, p. 583-588, out. 1996. [Http://dx.doi.org/10.1007/s001090050062](http://dx.doi.org/10.1007/s001090050062). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8912179/>. Acesso em: 20 set. 2023.

DORE, Gregory J.; BAJIS, Sahar. Author Correction: Hepatitis C virus elimination: laying the foundation for achieving 2030 targets. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 18, n. 143, 5 jan. 2021. DOI 10.1038/s41575-020-00407-z. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41575-020-00407-z>. Acesso em: 8 jul. 2022.

DRANE, Debbie *et al.* Priming of CD4+ and CD8+ T cell responses using a HCV core ISCOMATRIX™ vaccine: a phase I study in healthy volunteers. **Human Vaccines**, v. 5, n. 3, p. 151-157, mar. 2009. DOI 10.4161/hv.5.3.6614. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/hv.5.3.6614>. Acesso em: 24 jul. 2023.

DUNCAN, Joshua D. *et al.* Hepatitis C Virus Vaccine: challenges and prospects. **Vaccines**, v. 8, n. 1, p. 90-113, 17 fev. 2020. DOI 10.3390/vaccines8010090. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32079254/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

ECHEVERRÍA, Natalia *et al.* In the era of rapid mRNA-based vaccines: Why is there no effective hepatitis C virus vaccine yet?. **World Journal of Hepatology**, v. 13, p. 1234-1268, 27 out. 2021. DOI 10.4254/wjh.v13.i10.12341. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34786164/>. Acesso em: 23 maio 2022.

EDGAR, R.C. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Res.**, v.32, n.5, p.1792-1797, 2004.

EDLICH, Birgit *et al.* Early changes in interferon signaling define natural killer cell response and refractoriness to interferon-based therapy of hepatitis C patients. **Hepatology**, v. 55, n. 1, p. 39-48, 14 nov. 2011. [Http://dx.doi.org/10.1002/hep.24628](http://dx.doi.org/10.1002/hep.24628). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21898483/>. Acesso em: 21 set. 2023.

ESSA, Sahar *et al.* Modulation of Production of Th1/Th2 Cytokines in Peripheral Blood Mononuclear Cells and Neutrophils by Hepatitis C Virus Infection in Chronically Infected Patients. **Pathogens**, v. 10, n. 11, p. 1519-1530, 21 nov. 2021. DOI 10.3390/pathogens10111519. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34832674/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

FABRETI-OLIVEIRA, R. A. *et al.* The heterogeneous HLA genetic composition of the Brazilian population and its relevance to the optimization of hematopoietic stem cell donor recruitment. **Tissue Antigens**, v. 84, n. 2, p. 187-197, 2014. DOI 10.1111/tan.12352. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24724906/>. Acesso em: 28 jun. 2022.

FAUELLE, Catherine *et al.* Hepatitis C virus vaccine candidates inducing protective neutralizing antibodies. **Expert Review Of Vaccines**, v. 15, n. 12, p. 1535-1544, 13 jun. 2016. DOI 10.1080/14760584.2016.1194759. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27267297/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

FILSKOV, Jonathan *et al.* HCV p7 as a novel vaccine-target inducing multifunctional CD4+ and CD8+ T-cells targeting liver cells expressing the viral antigen. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 out. 2019. DOI 10.1038/s41598-019-50365-z. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31575882/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

FRESE, Michael *et al.* Interferon- γ inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs. **Hepatology**, v. 35, n. 3, p. 694-703, mar. 2002.

[Http://dx.doi.org/10.1053/jhep.2002.31770](http://dx.doi.org/10.1053/jhep.2002.31770). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11870386/>. Acesso em: 21 set. 2023.

FYTILI, P. *et al.* Cross-genotype-reactivity of the immunodominant HCV CD8 T-cell epitope NS3-1073. **Vaccine**, v. 26, n. 31, p. 3818-3826, jul. 2008. DOI 10.1016/j.vaccine.2008.05.045. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18582999/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

GEROLD, Gisa *et al.* Hepatitis C Virus Entry: Protein Interactions and Fusion Determinants Governing Productive Hepatocyte Invasion. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, v. 10, 3 fev. 2020. DOI 10.1101/cshperspect.a036830. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31427285/>. Acesso em: 16 maio 2022.

GEROLD, Gisa *et al.* Protein Interactions during the Flavivirus and Hepacivirus Life Cycle. **Molecular & cellular proteomics**, v. 16, n. 4, p. 75-91, 11 jan. 2017. DOI 10.1074/mcp.R116.065649. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28077444/>. Acesso em: 15 maio 2022.

GOWER, Erin *et al.* Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 61, p. 45-57, 30 jul. 2014. DOI 10.1016/j.jhep.2014.07.027. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25086286/>. Acesso em: 18 maio 2022.

GRAMENZI, A. *et al.* Cytokine profile of peripheral blood mononuclear cells from patients with different outcomes of hepatitis C virus infection. **Journal Of Viral Hepatitis**, v. 12, n. 5, p. 525-530, set. 2005. DOI 10.1111/j.1365-2893.2005.00634.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16108769/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

GUO, Zhongsheng *et al.* DCs Pulsed with Novel HLA-A2-Restricted CTL Epitopes against Hepatitis C Virus Induced a Broadly Reactive Anti-HCV-Specific T Lymphocyte Response. **Plos One**, v. 7, n. 6, 12 jun. 2012. Doi.org/10.1371/journal.pone.0038390. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22701633/>. Acesso em: 05 ago. 2023.

HANSEN, Ted H.; BOUVIER, Marlene. MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, p. 503–513, 9 jun. 2009. DOI <https://doi.org/10.1038/nri2575>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri2575/>. Acesso em: 28 jun. 2022.

HANUS, Juliét Silveira *et al.* Incidence of hepatitis C in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 665-673, dez. 2015. DOI 10.1590/0037-8682-0230-2015. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/QyP3KBbsrGwzRq3cNHwf4tm/?format=pdf>. Acesso em: 18 maio 2022.

HARTLAGE, Alex S.; KAPOOR, Amit. Hepatitis C Virus Vaccine Research: time to put up or shut up. **Viruses**, v. 13, n. 8, p. 1596-1613, 12 ago. 2021. DOI 10.3390/v13081596. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34452460/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

HEIM, Markus H. 25 years of interferon-based treatment of chronic hepatitis C: an epoch coming to an end. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 7, p. 535-542, 7 jun. 2013.

[Http://dx.doi.org/10.1038/nri3463](http://dx.doi.org/10.1038/nri3463). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23743475/>. Acesso em: 21 set. 2023.

IDREES, Sobia; A ASHFAQ, Usman. Structural analysis and epitope prediction of HCV E1 protein isolated in Pakistan: an in-silico approach. **Virology Journal**, v. 10, n. 1, 10 abr. 2013. DOI 10.1186/1743-422x-10-113. Disponível em: <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-10-113>. Acesso em: 15 jul. 2023.

KANG, Soowon; BROWN, Hailey M.; HWANG, Seungmin. Direct Antiviral Mechanisms of Interferon-Gamma. **Immune Network**, v. 18, n. 5, 17 out. 2018. [Http://dx.doi.org/10.4110/in.2018.18.e33](http://dx.doi.org/10.4110/in.2018.18.e33). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30402328/>. Acesso em: 21 set. 2023.

KARAPETYAN, Armen R. *et al.* TCR Fingerprinting and Off-Target Peptide Identification. **Frontiers In Immunology**, v. 10, 22 out. 2019. DOI 10.3389/fimmu.2019.02501. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31695703>. Acesso em: 15 jul. 2023.

KASPRZAK, Aldona; ADAMEK, Agnieszka. Role of hepatitis C virus proteins (C, NS3, NS5A) in hepatic oncogenesis. **Hepatology Research**, v. 38, n. 1, p. 1-26, jan. 2008. DOI 10.1111/j.1872-034x.2007.00261.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17894800/>. Acesso em: 24 jul. 2023.

KAUSHIK, Vikas; SINGH, Bhupender; SINGH, Joginder. Bioinformatics Techniques used in Hepatitis C Virus Research. **Journal Of Pure And Applied Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 921-932, 30 jun. 2017. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. <http://dx.doi.org/10.22207/jpam.11.2.32>. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/318122733_Bioinformatics_Techniques_used_in_Hepatitis_C_Virus_Research. Acesso em: 20 maio 2022.

KEIKHA, Masoud *et al.* HCV genotypes and their determinative role in hepatitis C treatment. **VirusDisease**, v. 31, p. 235-240, 4 maio 2020. DOI 10.1007/s13337-020-00592-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32904762/>. Acesso em: 23 maio 2022.

KEMMING, Janine; THIMME, Robert; NEUMANN-HAEFELIN, Christoph. Adaptive Immune Response against Hepatitis C Virus. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 21, n. 16, 6 ago. 2020. [Http://dx.doi.org/10.3390/ijms21165644](http://dx.doi.org/10.3390/ijms21165644). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32781731/>. Acesso em: 20 set. 2023.

KHALID, Hina; ASHFAQ, Usman Ali. Exploring HCV genome to construct multi-epitope based subunit vaccine to battle HCV infection: immunoinformatics based approach. **Journal Of Biomedical Informatics**, v. 108, ago. 2020. DOI 10.1016/j.jbi.2020.103498. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S153204642030126X?via%3Dihub>. Acesso em: 05 ago. 2023.

KHATUN, Mousumi; RAY, Ratna B. Mechanisms Underlying Hepatitis C Virus-Associated Hepatic Fibrosis. **Cells**, v. 8, 14 out. 2019. DOI 10.3390/cells8101249. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31615075/>. Acesso em: 20 maio 2022.

KHULLAR, Vikas; J FIRPI, Roberto. Hepatitis C cirrhosis: New perspectives for diagnosis and treatment. **World Journal of Hepatology**, v. 7, n. 14, p. 1843-1855, 18 jul. 2015. DOI 10.4254/wjh.v7.i14.1843. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26207166/>. Acesso em: 16 maio 2022.

KIYOTANI, Kazuma *et al.* Bioinformatic prediction of potential T cell epitopes for SARS-Cov-2. **Journal of Human Genetics**, v. 65, p. 564-575, 6 mar. 2020. DOI 10.1038/s10038-020-0771-5. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s10038-020-0771-5>. Acesso em: 8 jul. 2022.

KLATT, Martin G. *et al.* Solving an MHC allele-specific bias in the reported immunopeptidome. **Jci Insight**, v. 5, n. 19, 2 out. 2020. DOI 10.1172/jci.insight.141264. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32897882/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

KOZIEL, M J *et al.* Hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T lymphocytes recognize epitopes in the core and envelope proteins of HCV. **Journal Of Virology**, v. 67, n. 12, p. 7522-7532, dez. 1993. DOI 10.1128/jvi.67.12.7522-7532.1993. Disponível em: https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/jvi.67.12.7522-7532.1993?casa_token=hxSofcY61BgAAAAA:KV1W_hfSTO_QIBnZW1BoCn0z_EzaL4GwyXGLrq-L0-ItHaXVnGawyZ25JJINxxAm7Ms3H8jDNnsw. Acesso em: 24 jul. 2023.

KRETZER, Iara Fabricia *et al.* Hepatitis C Worldwide and in Brazil: Silent Epidemic—Data on Disease including Incidence, Transmission, Prevention, and Treatment. **TheScientificWorldJournal**, v. 2014, 10 jun. 2014. DOI 10.1155/2014/827849. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4070442/>. Acesso em: 18 maio 2022.

KUNA, Lucija *et al.* HCV Extrahepatic Manifestations. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, v. 7, p. 172-182, 28 jun. 2019. DOI 10.14218/JCTH.2018.00049. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6609844/>. Acesso em: 15 maio 2022.

KYTE, J.; DOOLITTLE, R.F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **J Mol Biol.**, v. 157, n. 1, p. 105-32, 1982. DOI 10.1016/0022-2836(82)90515-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7108955/>. Acesso em: 29 jun. 2022.

LARSEN, M.V. *et al.* Large-scale validation of methods for cytotoxic T-lymphocyte epitope prediction. **BMC Bioinformatics.**, v. 8, n. 424, 2007.

LAUGI, Hemshankar. Discovery of Hepatitis C Virus: 2020 Nobel Prize in Medicine. **Euroasian Journal of Hepato-Gastroenterology**, v. 10, p. 105-108, 30 dez. 2020. DOI 10.5005/jp-journals-10018-1326. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33511075/>. Acesso em: 16 maio 2022.

LEE, Ara *et al.* IL-4 Induced Innate CD8+ T Cells Control Persistent Viral Infection. **Plos Pathogens**, v. 11, n. 10, 9 out. 2015. [Http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1005193](http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1005193). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26452143/>. Acesso em: 21 jul. 2023.

LI, Hui-Chun *et al.* Hepatitis C Viral Replication Complex. **Viruses**, v. 13, p. 1-22, 22 mar. 2021. DOI 10.3390/v13030520. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33809897/>. Acesso em: 15 maio 2022.

LI, W. *et al.* Priming and stimulation of hepatitis C virus-specific CD4+ and CD8+ T cells against HCV antigens NS4, NS5a or NS5b from HCV-naive individuals: implications for prophylactic vaccine. **International Immunology**, v. 20, n. 1, p. 89-104, 15 nov. 2007. Doi.org/10.1093/intimm/dxm121. Disponível em: <https://academic.oup.com/intimm/article/20/1/89/690811?login=false>. Acesso em: 05 ago. 2023.

LINDENBACH, Brett D.; RICE, Charles M. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. **Nature reviews. Microbiology**, v. 11, p. 688-700, 11 out. 2013. DOI 10.1038/nrmicro3098. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24018384/>. Acesso em: 16 maio 2022.

LOPES-RIBEIRO, Ágata *et al.* In silico and in vitro arboviral MHC class I-restricted-epitope signatures reveal immunodominance and poor overlapping patterns. **Frontiers In Immunology**, v. 13, 17 nov. 2022. DOI 10.3389/fimmu.2022.1035515. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36466864/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

LUND, Ole *et al.* Definition of supertypes for HLA molecules using clustering of specificity matrices. **Immunogenetics**, v. 55, n. 12, p. 797-810, 1 mar. 2004. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00251-004-0647-4>. Acesso em: 10 dez. 2023.

MACDONALD, Andrew; HARRIS, Mark. Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. **Journal Of General Virology**, v. 85, n. 9, p. 2485-2502, 1 set. 2004. Doi.org/10.1099/vir.0.80204-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15302943/>. Acesso em: 05 ago. 2023.

MANGIA, Alessandra *et al.* Hepatitis C virus micro-elimination: Where do we stand?. **World Journal of Gastroenterology**, v. 27, p. 1728-1737, 28 abr. 2021. DOI 10.3748/wjg.v27.i16.1728. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33967553/>. Acesso em: 18 maio 2022.

MANNE, Vignan *et al.* Hepatitis C Vaccination: where we are and where we need to be. **Pathogens**, v. 10, n. 12, p. 1619-1627, 14 dez. 2021. DOI 10.3390/pathogens10121619. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34959574/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

MANNS, Michael P. *et al.* Hepatitis C virus infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, 2 mar. 2017. DOI <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.6>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrdp20176>. Acesso em: 29 jun. 2022.

MARTINEZ, Miguel Angel; FRANCO, Sandra. Therapy Implications of Hepatitis C Virus Genetic Diversity. **Viruses**, v. 13, 29 dez. 2020. DOI 10.3390/v13010041. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33383891/>. Acesso em: 23 maio 2022.

MESSINA, Jane P. *et al.* Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 61, p. 77-87, 28 jul. 2014. DOI 10.1002/hep.27259. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25069599/>. Acesso em: 18 maio 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais 2023**. 2023. Disponível em: https://www.gov.br/aids/pt-br/central-de-conteudo/boletins-epidemiologicos/2023/hepatites-virais/boletim-epidemiologico-hepatites-virais_-_2023.pdf/view. Acesso em: 10 dez. 2023.

MORADPOUR, Darius; PENIN, François. Hepatitis C Virus Proteins: from structure to function. **Current Topics In Microbiology And Immunology**, p. 113-142, 2013. DOI 10.1007/978-3-642-27340-7_5. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23463199/>. Acesso em: 19 jul. 2023.

MOREIRA, Irina S. *et al.* Hot spots-A review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 68, n. 4, p. 803-812, 1 jun. 2007. DOI 10.1002/prot.21396. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17546660/>. Acesso em: 11 jul. 2023.

NEEFJES, Jacques *et al.* Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 823-836, 11 nov. 2011. DOI 10.1038/nri3084. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22076556/>. Acesso em: 28 jun. 2022.

NEUMANN-HAEFELIN, Christoph *et al.* HLA-B27-mediated protection in HIV and hepatitis C virus infection and pathogenesis in spondyloarthritis. **Current Opinion In Rheumatology**, v. 25, n. 4, p. 426-433, jul. 2013. DOI 10.1097/bor.0b013e328362018f. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23656712/>. Acesso em: 13 jul. 2023.

NUSRAT, Salman *et al.* Cirrhosis and its complications: Evidence based treatment. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, p. 5442-5460, 14 maio 2014. DOI 10.3748/wjg.v20.i18.5442. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4017060/>. Acesso em: 18 maio 2022.

OKONECHNIKOV, K. *et al.* Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. **Bioinformatics.**, v. 28, n. 8, p. 1166-67, 2012. DOI 10.1093/bioinformatics/bts091. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22368248/>. Acesso em: 29 jun. 2022.

PARLATI, Lucia *et al.* Treatment of hepatitis C virus infection. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 45, n. 4, jul. 2021. DOI 10.1016/j.clinre.2020.11.008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2210740120303442?via%3Dihub>. Acesso em: 23 maio 2022.

PAWLOTSKY, Jean-Michel. Treatment failure and resistance with direct-acting antiviral drugs against hepatitis C virus. **Hepatology**, v. 53, n. 5, p. 1742-1751, 22 abr. 2011. DOI 10.1002/hep.24262. Disponível em: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/hep.24262>. Acesso em: 11 jul. 2023.

PEPperPRINT. **PEPperCHIP© Immunoassay Protocol & Data Quantification with PepSlide© Analyzer**. Heidelberg, Alemanha. 2020.

PEREIRA-SANTOS, Thaiza Aline *et al.* Diversity of HLA-A2-Restricted and Immunodominant Epitope Repertoire of Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) Tax Protein: novel insights among n-terminal, central and c-terminal regions. **Biomolecules**, v. 13, n. 3, p. 545-565, 16 mar. 2023. DOI 10.3390/biom13030545. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36979478/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

PETERS, Björn *et al.* Identifying MHC Class I Epitopes by Predicting the TAP Transport Efficiency of Epitope Precursors. **The Journal Of Immunology**, v. 171, n. 4, p. 1741-1749, 15 ago. 2003. DOI 10.4049/jimmunol.171.4.1741. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12902473/>. Acesso em: 05 mar. 2024.

PHAM, Long V. *et al.* HCV genotype 1-6 NS3 residue 80 substitutions impact protease inhibitor activity and promote viral escape. **Journal Of Hepatology**, v. 70, n. 3, p. 388-397, mar. 2019. DOI 10.1016/j.jhep.2018.10.031. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30395912/>. Acesso em: 11 jul. 2023.

PINZANI, Massimo *et al.* Liver cirrhosis. **Best practice & research. Clinical gastroenterology**, v. 25, p. 281-290, abr. 2011. DOI 10.1016/j.bpg.2011.02.009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21497745/>. Acesso em: 20 maio 2022.

PROMOCELL. 2019. **Histocompatibility: Piercing together the immunotherapy puzzle.** Disponível em: <https://promocell.com/cells-in-action/histocompatibility-piecing-together-the-immunotherapy-puzzle/>. Acesso em: 09 de agosto de 2022.

RAO, Xiangyu *et al.* HLA Preferences for Conserved Epitopes: a potential mechanism for hepatitis c clearance. **Frontiers In Immunology**, v. 6, 29 out. 2015. DOI 10.3389/fimmu.2015.00552. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26579127/>. Acesso em: 13 jul. 2023.

RIBEIRO, Ágata Lopes *et al.* A chimeric HLA-A2: β 2m. **Journal Of Immunological Methods**, v. 492, maio 2021. DOI 10.1016/j.jim.2021.112997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33600818/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

ROUDOT-THORAVAL, Françoise. Epidemiology of hepatitis C virus infection. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 45, n. 3, p. 1-6, 17 fev. 2021. DOI 10.1016/j.clinre.2020.101596. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2210740120303624?via%3Dihub>. Acesso em: 16 maio 2022.

SCHMIDT, Julia *et al.* Rapid Antigen Processing and Presentation of a Protective and Immunodominant HLA-B*27-restricted Hepatitis C Virus-specific CD8+ T-cell Epitope. **Plos Pathogens**, v. 8, n. 11, 29 nov. 2012. DOI 10.1371/journal.ppat.1003042. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23209413/>. Acesso em: 13 jul. 2023.

SCHNEIDER, Thomas D.; STEPHENS, R. Michael. Sequence logos: a new way to display consensus sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 20, p. 6097-6100, 1990. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2172928/>. Acesso em: 05 mar. 2024.

SERRE, Stéphanie B *et al.* Hepatitis C Virus Genotype 1 to 6 Protease Inhibitor Escape Variants: in vitro selection, fitness, and resistance patterns in the context of the infectious viral life cycle. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3563-3578, jun. 2016. DOI 10.1128/aac.02929-15. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27021330/>. Acesso em: 11 jul. 2023.

SHANNON, Paul *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Research**, v. 13, n. 11, p. 2498-2504, nov. 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14597658/>. Acesso em: 05 mar. 2024.

SHAVINSKAYA, Anna *et al.* The Lipid Droplet Binding Domain of Hepatitis C Virus Core Protein Is a Major Determinant for Efficient Virus Assembly. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 282, n. 51, p. 37158-37169, dez. 2007. DOI 10.1074/jbc.m707329200. Disponível em: <https://www.jbc.org/action/showPdf?pii=S0021-9258%2820%2955239-3>. Acesso em: 19 jul. 2023.

SHOUKRY, Naglaa H. *et al.* Memory CD8+ T Cells Are Required for Protection from Persistent Hepatitis C Virus Infection. **Journal Of Experimental Medicine**, v. 197, n. 12, p. 1645-1655, 16 jun. 2003. DOI 10.1084/jem.20030239. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12810686/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

SIMMONDS, Peter *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 1, p. 2-3, 17 jan. 2017. DOI 10.1099/jgv.0.000672. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5370391/>. Acesso em: 15 maio 2022.

SOFIAN, Masoomah *et al.* Serum Profile of T Helper 1 and T Helper 2 Cytokines in Hepatitis C Virus Infected Patients. **Hepatitis Monthly**, v. 12, n. 12, 29 dez. 2012. DOI 10.5812/hepatmon.6156. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23423691/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

SORIA-GUERRA, Ruth E. *et al.* An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: Implications on vaccine development. **Journal of Biomedical Informatics**, v. 53, p. 405-414, fev. 2015. DOI 10.1016/j.jbi.2014.11.003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25464113/>. Acesso em: 8 jul. 2022.

SPEARMAN, C Wendy *et al.* Hepatitis C. **The Lancet**, v. 394, p. 1451-1466, 19 out. 2019. DOI 10.1016/S0140-6736(19)32320-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31631857/>. Acesso em: 16 maio 2022.

STASI, Cristina *et al.* Update on Hepatitis C Epidemiology: Unaware and Untreated Infected Population Could Be the Key to Elimination. **SN Comprehensive Clinical Medicine**, v. 2, p. 2808–2815, 18 out. 2020. DOI 10.1007/s42399-020-00588-31. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7568689/>. Acesso em: 18 maio 2022.

STEINMANN, Eike *et al.* Hepatitis C Virus P7: a viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy. **Viruses**, v. 2, n. 9, p. 2078-2095, 27 set. 2010. DOI 10.3390/v2092078. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/2/9/2078>. Acesso em: 21 jul. 2023.

SWADLING, Leo *et al.* Ever closer to a prophylactic vaccine for HCV. **Expert Opinion On Biological Therapy**, v. 13, n. 8, p. 1109-1124, 7 maio 2013. DOI 10.1517/14712598.2013.791277. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23651228/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

TABATA, Keisuke *et al.* Hepatitis C Virus Replication. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 10, p. 1-22, 2 mar. 2020. DOI 10.1101/cshperspect.a037093. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31570388/>. Acesso em: 15 maio 2022.

THIMME, Robert. T cell immunity to hepatitis C virus: lessons for a prophylactic vaccine. **Journal Of Hepatology**, v. 74, n. 1, p. 220-229, jan. 2021. DOI 10.1016/j.jhep.2020.09.022. Disponível em: [https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278\(20\)33665-5/fulltext](https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278(20)33665-5/fulltext). Acesso em: 11 jul. 2023.

TSAI, S *et al.* Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis c virus chronicity. **Hepatology**, v. 25, n. 2, p. 449-458, fev. 1997. DOI 10.1002/hep.510250233. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9021963/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

VERMEHREN, Johannes *et al.* The role of resistance in HCV treatment. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 26, n. 4, p. 487-503, ago. 2012. DOI 10.1016/j.bpg.2012.09.011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1521691812000947?via%3Dihub>. Acesso em: 11 jul. 2023.

WALKER, Christopher M. Designing an HCV vaccine: a unique convergence of prevention and therapy?. **Current Opinion In Virology**, v. 23, n. 12, p. 113-119, abr. 2017. DOI 10.1016/j.coviro.2017.03.014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5763905/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

WEI, Shukun *et al.* Inhibitor Development against p7 Channel in Hepatitis C Virus. **Molecules**, v. 26, n. 5, 3 mar. 2021. DOI 10.3390/molecules26051350. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33802584/>. Acesso em: 21 jul. 2023.

WELSCH, C *et al.* Clinical relevance of HCV antiviral drug resistance. **Current Opinion In Virology**, v. 2, n. 5, p. 651-655, out. 2012. DOI 10.1016/j.coviro.2012.08.008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1879625712001344>. Acesso em: 11 jul. 2023.

WESTBROOK, Rachel H.; DUSHEIKO, Geoffrey. Natural history of hepatitis C. **Journal of Hepatology**, v. 61, p. 58-68, 3 nov. 2014. DOI 10.1016/j.jhep.2014.07.012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25443346/>. Acesso em: 15 maio 2022.

WHITMIRE, Jason K.; TAN, Joyce T.; WHITTON, J. Lindsay. Interferon- γ acts directly on CD8+ T cells to increase their abundance during virus infection. **The Journal Of Experimental Medicine**, v. 201, n. 7, p. 1053-1059, 4 abr. 2005. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20041463>.

WIECZOREK, Marek *et al.* Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 17 mar. 2017. DOI 10.3389/fimmu.2017.00292. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28367149/>. Acesso em: 28 jun. 2022.

WILKINS, Marc R. *et al.* Protein Identification and Analysis Tools in the ExPASy Server. **2-D Proteome Analysis Protocols**, p. 531-552, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10027275/>. Acesso em: 05 mar. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Hepatitis C. *In*: WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Hepatitis C.**, 27 jul. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>. Acesso em: 18 maio 2022.

XIA, Simo *et al.* MHC Class I Molecules Exacerbate Viral Infection by Disrupting Type I Interferon Signaling. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, 9 set. 2019. DOI 10.1155/2019/5370706. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31583257/>. Acesso em: 28 jun. 2022.

YOST, Samantha A. *et al.* Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins: a balancing act of order and disorder. **Frontiers In Immunology**, v. 9, 24 ago. 2018. DOI 10.3389/fimmu.2018.01917. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30197646/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

YUE, Ming *et al.* Th1 and Th2 cytokine profiles induced by hepatitis C virus F protein in peripheral blood mononuclear cells from chronic hepatitis C patients. **Immunology Letters**, v. 152, n. 2, p. 89-95, maio 2013. DOI 10.1016/j.imlet.2013.05.002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016524781300062X>. Acesso em: 13 jul. 2023.