

VIVIANE BRANDÃO GOMES DE SOUSA

Padronização de metodologias moleculares para detecção e genotipagem do HCV em soro e saliva



**Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO  
DEZEMBRO/ 2023

**Trabalho realizado no Laboratório de Hepatites Virais (IOC/FIOCRUZ) sob a orientação da Doutora Livia Melo Villar, coorientação da Doutora Vanessa Duarte da Costa.**

### CIP - Catalogação na Publicação

B725p Brandão Gomes de Sousa, Viviane  
Padronização de metodologias moleculares para  
detecção e genotipagem do HCV em soro e saliva /  
Viviane Brandão Gomes de Sousa. -- Rio de Janeiro,  
2023.  
70 f.

Orientadora: Livia Melo Villar.  
Coorientadora: Vanessa Duarte da Costa.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto  
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia, 2023.

1. sequenciamento nucleotídico. 2. hepatite C.  
3. saliva. I. Melo Villar, Livia, orient. II.  
Duarte da Costa, Vanessa, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ  
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

**ALUNO(A): Viviane Brandão Gomes de Sousa**

**DRE: 120015767**

**BANCA EXAMINADORA:**

Profa. Dra. Renata Campos de Azevedo (Presidente)

Dra. Nathália Alves Araújo de Almeida

Dra. Bárbara Vieira do Lago

Profa. Dra. Gabriella da Silva Mendes (Suplente)

**Título da Monografia: "Padronização de metodologias moleculares para detecção e  
genotipagem do vírus da hepatite C em soro e saliva"**

**Local: Sala D-27, IMPG / CCS / UFRJ**

**Data e hora de início: 11 de dezembro de 2023 às 09:00h**

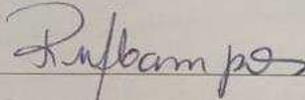
Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 11 de Dezembro de 2023.

**NOTA:**

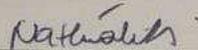
Banca Examinadora:

10



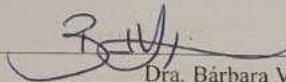
Profa. Dra. Renata Campos de Azevedo (Presidente)

10



Dra. Nathália Alves Araújo de Almeida

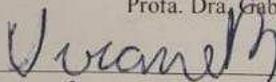
10



Dra. Bárbara Vieira do Lago

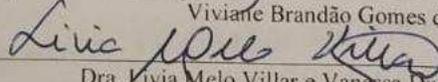
Profa. Dra. Gabriella da Silva Mendes (Suplente)

**Aluno(a):**



Viviane Brandão Gomes de Sousa

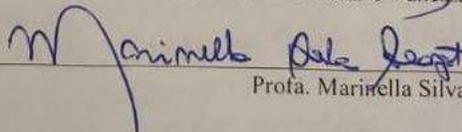
**Orientador(a)**



**(e coorientador):**

Dra. Livia Melo Villar e Vanessa Duarte da Costa

**Coordenadora de**



**TCC:**

Profa. Mariella Silva Laport

## AGRADECIMENTOS

No ensino fundamental, avisaram a minha mãe para não esperar muito do meu futuro acadêmico, devido a minha dislalia e sinais de autismo da época. Hoje, escrevendo meus agradecimentos de T.C.C., me lembrei de todas as pessoas que, de algum modo, me acolheram do jeito que eu sou, de forma que todas essas limitações que desde de sempre me alertaram, me limitavam, parecia algo muito distante. Essas palavras pessimistas se tornavam ruídos, inaudíveis, nesse ambiente de amor que eu pude construir inspirado e rodeado por vocês. Dessa forma, agradeço a todos vocês (Deus, amigos, família e minhas atentas orientadoras) que me ensinaram a nunca se resignar, me ensinaram que todo sonho pode se tornar realidade, tendo vontade o suficiente. E o meu sonho, hoje em dia? Defini-lo seria banal, o que desejo –o que vocês me ensinaram que eu posso desejar- ainda não tem nome.

Mas, eu já sei que o que desejo incluí mais um almoço de quarta feira com as meninas da micro -Livia, Johari, Mari, Crystal e Carol, incluí mais uma noite de jogos com o Rapha, Paula, Alex, Cecília e a Clara, incluí mais uma sessão de fofoca do mundo do pop com Daniel, incluí mais uma noite de powerpoint com o Berino, incluí mais um jantar em família hilário com meus pais, Letícia, Clara e Fernanda, mais um jogo do Flamengo chorando com a Giovanna, incluí mais uma sessão aleatória de cinema com Letícia, Clara e minha mãe, incluí rolês de uma vez por ano mas sempre marcante com os amigos da poli e muitos outros momentos que eu não quero que acabe nunca.

Dito isso, agradeço a todos que estiveram e ainda estão comigo.

Ademais, agradeço especialmente aos órgãos financiadores – CNPq e o maior órgão financiador que já encontrei: A taxa de bancada das minhas orientadoras.

## RESUMO

**Viviane Brandão Gomes de Sousa**

### **Padronização de metodologias moleculares para detecção e genotipagem do HCV em soro e saliva**

**Orientadora: Livia Melo Villar**

**Coorientadora: Vanessa Duarte da Costa**

Estima-se que 58 milhões de pessoas estejam cronicamente infectadas pelo vírus da hepatite C (HCV) mundialmente. Ademais se estima que 78,6% dos infectados por HCV ainda não são diagnosticados. Por isso, a Organização Mundial de Saúde (OMS) salienta a importância da pesquisa por fluidos biológicos alternativos que possam facilitar um maior alcance do diagnóstico e aumento da vigilância genômica, no intuito de atingir a eliminação de 80% dos casos de HCV até 2030. A genotipagem por sequenciamento nucleotídico, além de fornecer dados de vigilância genômica, também pode ser importante para direcionar pacientes em estado clínico ou que não responderam ao tratamento, dado que os genótipos 1 e 3 estão mais associados à cirrose. Dentre os fluidos alternativos, o HCV na saliva tem um menor risco de transmissão por possivelmente apresentar uma menor carga viral quando comparada ao soro (padrão-ouro), é menos invasiva e tem a opção de autocoleta. Por isso, este trabalho teve como objetivo principal avaliar a saliva como uma amostra alternativa para a genotipagem do HCV por sequenciamento nucleotídico. Trinta e um soros (padrão-ouro) e saliva pareados foram coletados, sendo 21 pacientes anti-HCV reagente e HCV RNA detectável e 10 como população saudável (grupo controle). Estratégias de extração de RNA (manual e automatizada) e amplificação por PCR do genoma parcial da NS5B (~370 nucleotídeos) (PCR *One-step/semi-nested* e transcrição reversa seguida de PCR) para a otimização do protocolo em saliva foram avaliadas. Posteriormente à padronização das etapas iniciais, os produtos de PCR foram purificados, quantificados e submetidos ao sequenciamento nucleotídico convencional. A edição de sequências a partir de eletroferogramas, geração de consensos e filogenia foi realizada a partir do programa MEGA X. O protocolo foi padronizado com a extração automatizada seguida por PCR *One-Step/semi-nested*. O sequenciamento em soro pontuou que 21 amostras (80,8%; 17/21) pertenciam ao genótipo 1 do HCV, sendo 58,9% (10/17) do subtipo 1a e 41,1% (7/17) do subtipo 1b. 9,6% (2/21) foram genotipadas como subtipo 3a, 4,8% (1/21) subtipo 4a e 4,8% (1/21) subtipo 2b. Das 21 amostras de saliva extraídas, 10 amplificaram por PCR. Dessas, foi possível realizar o sequenciamento e genotipar as estirpes do HCV de 7, o qual 3 amostras correspondiam ao subtipo 1a (43%; 3/7), 1 amostra ao subtipo 1b (14%; 1/7), 1 amostra ao subtipo 2b (14%; 1/7) e 2 amostras (29%; 2/7) ao genótipo 1 (sem classificação de subtipo). Todas estas 7 salivas apresentaram o genótipo/subtipo concordante ao soro. A distância genética média de todas as amostras de saliva em relação aos seus respectivos soros foi de  $0,2445 \pm 0,0722$  em nucleotídeo e de  $0,0935 \pm 0,1054$  em aminoácido. Esses achados salientaram a presença do RNA do HCV íntegro na saliva, tal como o seu potencial para genotipagem do HCV. Isso, por sua vez, pode ajudar as metas da OMS por aumentar o diagnóstico e vigilância genômica em micropopulações de punção venosa difícil.

Palavras-Chave: Sequenciamento nucleotídico, hepatite C, saliva.

## ABSTRACT

It is estimated that 58 million people are chronically infected with hepatitis C virus (HCV) worldwide. Furthermore, it is estimated that 78.6% of those infected with HCV are not yet diagnosed. Therefore, World Health Organization (WHO) highlights the importance of research into alternative biological fluids that can facilitate greater diagnostic reach and increased genomic surveillance, with the aim of achieving the elimination of 80% of HCV cases by 2030. Genotyping by nucleotide sequencing, in addition to providing genomic surveillance data, may also be important for targeting patients in a clinical state or who have not responded to treatment, given that genotypes 1 and 3 are more associated with cirrhosis. Among alternative fluids, saliva has a lower risk of transmission -given that the viral load is smaller than the viral load found in serum, is less invasive and has the option of self-collection. Therefore, the main objective of this work was to evaluate saliva as an alternative sample for HCV genotyping by nucleotide sequencing. Thirty-one paired sera (gold standard) and saliva were collected, 21 patients being anti-HCV reagent and HCV RNA detectable and 10 being a healthy population (control group). Strategies for RNA extraction (manual and automated) and PCR amplification of HCV NS5B partial genome (~370 nucleotides) (One-step/semi-nested PCR) and reverse transcription followed by PCR) for optimizing the protocol in saliva were evaluated. After standardizing the initial steps, the PCR products were purified, quantified and subjected to conventional nucleotide sequencing. Sequence editing from electropherograms, generation of consensus and phylogeny was performed using the MEGA X software. The protocol was standardized with automated extraction followed by One-Step/semi-nested PCR. Serum sequencing showed that 21 samples (80.8%; 17/21) belonged to HCV genotype 1, 58.9% (10/17) of subtype 1a and 41.1% (7/17) of subtype 1b. 9.6% (2/21) were genotyped as subtype 3a, 4.8% (1/21) subtype 4a and 4.8% (1/21) subtype 2b. Of the 21 saliva samples extracted, 10 were amplified by PCR. Of these, it was possible to sequence and genotype 7 HCV strains, of which 3 samples corresponded to subtype 1a (43%; 3/7), 1 sample to subtype 1b (14%; 1/7), 1 sample to subtype 2b (14%; 1/7) and 2 samples (29%; 2/7) to genotype 1 (without subtype classification). All of these 7 saliva samples showed the genotype concordant with the one found in the serum genotyping. The average genetic distance of all saliva samples in relation to their respective sera was 0.2445 in nucleotide and 0.0935 in amino acid. These findings highlighted the presence of intact HCV RNA in saliva, as well as its potential for HCV genotyping. This, in turn, may help WHO goals by increasing diagnostics and genomic surveillance in difficult venipuncture micro populations.

**KEYWORDS:** Nucleotide sequencing, hepatitis C, saliva

## **RESUMO PARA PESSOAS LEIGAS**

**Viviane Brandão Gomes de Sousa**

### **Padronização de um protocolo para identificação e classificação do vírus da hepatite C em saliva**

**Orientadora: Livia Melo Villar**

**Coorientadora: Vanessa Duarte da Costa**

O vírus da hepatite C é um vírus que possui uma alta variabilidade devido à sua alta taxa de mutação. Por isso, ele é classificado em muitos genótipos e subtipos. Ele também impacta muitas pessoas, cerca de 58 milhões no mundo. Porém, a hepatite C é uma doença silenciosa que pode começar a causar sintomas anos depois da transmissão e infecção. Ademais, o HCV infecta populações com dificuldade em coletar sangue, tais como idosos, moradores de rua e usuários de drogas. Logo, é importante pesquisar algum fluido biológico não dependente do sangue que consiga identificar o HCV e também informar a classificação do vírus. A saliva é um fluido biológico alternativo muito estudado, pois não é invasivo e é fácil de coletar. Por isso, o intuito desse trabalho foi criar um protocolo para identificar o HCV e classificá-lo em genótipo e subtipo a partir da saliva. Diversos parâmetros moleculares foram analisados para estabelecer um protocolo definitivo. A classificação em genótipo e subtipo foi feita por uma técnica chamada sequenciamento nucleotídico, no qual identifica a sequência de ácido nucléico que foi amplificada em etapas anteriores. Para ter um parâmetro, etapas de biologia molecular foram realizadas com a amostras padrão ouro de diagnóstico molecular do HCV: o soro. Para tal, 21 soros e salivas de indivíduos com hepatite C foram coletados. Para sete amostras de saliva, identificou-se o genótipo/subtipo do vírus, inclusive aqueles que são mais prevalentes no Brasil. Isso indica que a saliva tem potencial de ser uma alternativa para diagnóstico e classificação de genótipo para pacientes de difícil coleta, o que pode ajudar a aumentar a taxa de tratamento a hepatite C e aumentar também o conhecimento dos genótipos circulantes. Tudo isso poderá culminar em uma menor taxa de pessoas infectadas pelo HCV, ajudando a tornar a eliminação mundial do vírus algo possível de ser alcançado.

## FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura genômica do HCV.....	14
<b>Figura 2.</b> Replicação do HCV nos hepatócitos.....	15
<b>Figura 3.</b> Análise dos subtipos do HCV em nível global.....	23
<b>Figura 4.</b> Esquemas de tratamento com DAA para HCV.....	25
<b>Figura 5.</b> Fluxograma para genotipagem do HCV em soro estabelecido <i>in-house</i> .....	28
<b>Figura 6.</b> Fluxograma de metodologias moleculares para detecção do RNA do HCV em amostras de saliva.....	29
<b>Figura 7.</b> Região alvo do gene NS5B do HCV amplificada pelos iniciadores PR3-PR5-mod (~370 nucleotídeos).....	31
<b>Figura 8.</b> Comparação do perfil eletroforético de amostras submetidas à extração manual (A) e automatizada (B), respectivamente, seguidas de PCR para detecção do RNA do HCV.....	42
<b>Figura 9.</b> Comparação do perfil eletroforético do produto extraído amplificado de cada extração.....	44
<b>Figura 10.</b> One-Step vs cDNA.....	45
<b>Figura 11.</b> Perfil eletroforético resultante do protocolo otimizado de PCR one-step.....	47
<b>Figura 12.</b> Árvore filogenética das sequências de soro, saliva e referências dos principais subtipos do HCV.....	49
<b>Figura 13.</b> Árvore filogenética das sequências de saliva e soro pareadas e referências dos principais subtipos do HCV.....	50

## GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Genótipos do grupo amostral.....	48
<b>Gráfico 2.</b> Genotipagem resultante da saliva.....	51

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

### TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Quadro de perfis socioeconômicos do perfil amostral.....	41
<b>Tabela 2.</b> Comparação de concentração de RNA (ng/uL) obtida após extração automatizada e manual de saliva.....	42
<b>Tabela 3.</b> Análise estatística dos dados de concentração a partir de comparações múltiplas.....	43
<b>Tabela 4.</b> Distância média intra e entre subpopulações de soro e saliva para nucleotídeos e aminoácido.....	52
<b>Tabela 5.</b> Estimativas da divergência evolutiva entre soro e saliva de cada amostra pareada, em distância de nucleotídeo e distância de aminoácido.....	52
<b>Tabela 6.</b> Compilado dos resultados laboratoriais e de data de coleta das amostras genotipadas em saliva, com as duas amostras que divergiram na genotipagem a nível de subtipo em negrito.....	53

### QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Revisão Bibliográfica dos artigos encontrados na pesquisa com as palavras-chaves “saliva”, “sequencing” e “HCV” no PUBMED.....	21
<b>Quadro 2.</b> Sequências dos iniciadores para amplificação parcial do genoma do HCV, baseado em Sandres-Sauné <i>et al.</i> , 2003.....	31
<b>Quadro 3.</b> . Volumes utilizados para extração automatizada em saliva pelo “Prepito Pathogen NA Kit”.....	33
<b>Quadro 4.</b> Volumes utilizados para extração de membrana sílica em soro e em saliva pelo QIAamp Viral RNA Mini Kit .....	35
<b>Quadro 5.</b> Protocolo otimizado para amplificação parcial do gene NS5B do HCV em saliva.....	46

## ÍNDICE

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vii
RESUMO PARA LEIGOS .....	viii
LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS .....	ix
LISTA DE QUADROS E TABELAS .....	x
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Histórico.....	13
1.2 Organização do genoma do HCV.....	13
1.3 Replicação do HCV.....	14
1.4 Epidemiologia da hepatite C .....	16
1.5. Transmissão do HCV .....	16
1.6 Patogênese da infecção pelo HCV e manifestações clínicas .....	17
1.7 Diagnóstico da hepatite C.....	18
1.7.1 Diagnóstico sorológico.....	18
1.7.2 Diagnóstico molecular.....	19
1.7.3 Genotipagem do HCV.....	19
1.7.4 Uso de fluidos alternativos para o diagnóstico da hepatite C.....	20
1.8 Variabilidade genética.....	22
1.8.1 Genótipos e subtipos.....	22
1.8.2 Distribuição geográfica dos genótipos do HCV.....	22
1.9 Tratamento e Prevenção.....	24
1.9.1 Protocolo clínico atual.....	24
1.9.2 Resistência viral.....	25
2. JUSTIFICATIVA.....	26
3. OBJETIVO.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1. Seleção das amostras.....	29
4.1.1 Coleta das amostras de sangue e saliva.....	30
4.2 Procedimentos moleculares para detecção molecular do HCV em soro.....	30
4.2.1. Extração do RNA viral com membranas de sílica.....	30
4.2.2. Transcrição reversa, amplificação por PCR e eletroforese.....	31

4.3. Padronização de procedimentos moleculares para saliva.....	33
4.3.1. Estratégias de extração para saliva .....	33
4.3.1.1. Extração automatizada.....	33
4.3.1.2. Extração automatizada seguida por métodos de concentração de RNA.....	33
4.3.1.3. Extração manual com membranas de sílica.....	35
4.3.2. Estratégias de padronização para amplificação por PCR do RNA do HCV em saliva.....	35
4.3.2.1. Síntese de cDNA seguida por amplificação por PCR em 2 rounds.....	36
4.3.2.1.1. Síntese de cDNA seguida por concentração de DNA e amplificação por PCR em 2 rounds.....	36
4.3.2.2. <i>One-step</i> RT-PCR e <i>semi-nested</i> PCR .....	37
4.3. Quantificação e purificação do material amplificado a partir de soro e saliva.....	37
4.4. Reação de sequenciamento nucleotídico e precipitação de placa.....	38
4.5. Montagem e alinhamento de sequências nucleotídicas.....	39
4.6. Análise filogenéticas para genotipagem do HCV.....	39
4.6.1 Distância genética.....	39
4.7. Análise dos dados epidemiológicos.....	40
4.8. Avaliação estatística.....	40
5. RESULTADOS.....	40
5.1. Caracterização do grupo amostral.....	41
5.2. Padronização dos métodos de detecção molecular do HCV RNA em saliva.....	41
5.2.1 Avaliação dos métodos de extração de RNA em saliva.....	41
5.2.1.1 Extração automatizada seguida por métodos de concentração de RNA.....	43
5.2.2 Otimização dos métodos de PCR para amplificação do RNA do HCV em saliva..	44
5.3 Genotipagem do HCV.....	47
5.3.1 Genotipagem em soro.....	47
5.3.2 Genotipagem em saliva.....	50
5.3.3 Distância genética quando comparado soro e saliva.....	54
6. DISCUSSÃO.....	54
7. CONCLUSÃO.....	60
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Histórico

Os primeiros possíveis casos de hepatite C, antes chamada de hepatite não-A não-B, foram registrados ainda na década de 1960 (Seeff, 2009; Bukh, 2016; Manns e Maasoumy, 2022). A nomenclatura hepatite não-A não-B surgiu oficialmente em 1975, quando Feinstone e colaboradores observaram que uma boa porcentagem dos casos de hepatite associada a transfusão sanguínea não era causada pelos agentes da Hepatite A e B, previamente descobertos. O vírus dessa chamada hepatite não-A não-B foi isolado pela primeira vez em 1989 (Choo *et al.*, 1989), e ganhou o nome de vírus da hepatite C (HCV).

Com a descoberta do HCV, foi também descoberto a detecção do único anticorpo do HCV, o anti-HCV (Zuckerman, 1989). Logo a doença foi renomeada como hepatite C e em 1991 o *screening* do anti-HCV foi preconizado pelas instituições de saúde (Campollo *et al.*, 2022).

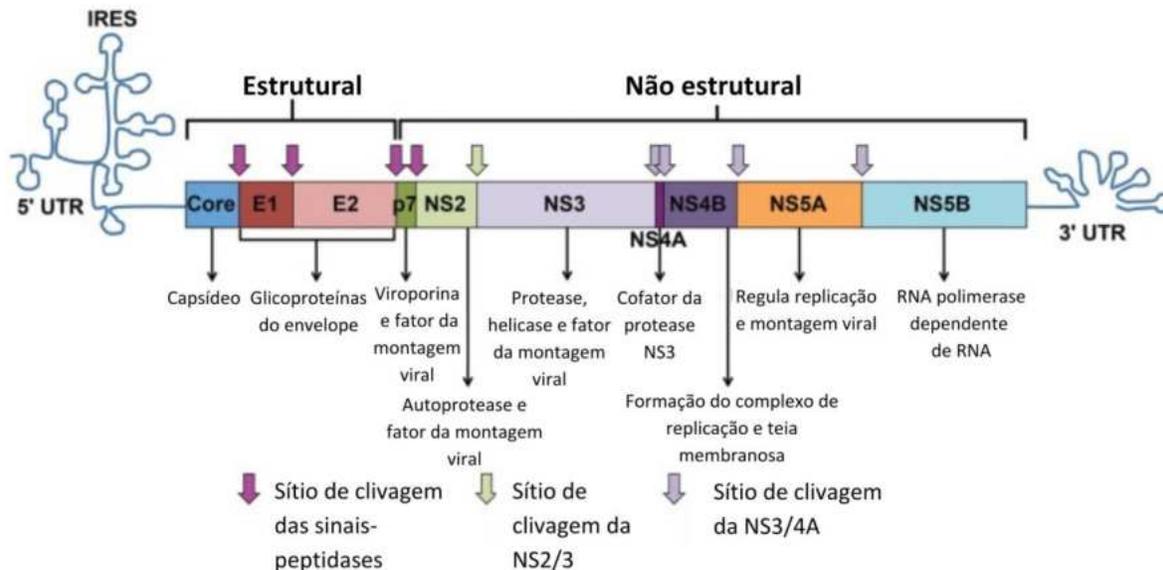
Com o início do tratamento da hepatite C com os antivirais de ação direta (DAAs) (Pol e Lagaye, 2019), a taxa de cura tem crescido, o que levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a estabelecer como meta para 2030 a eliminação das hepatites virais B e C (Basyte-Bacevice e Kupcinskias, 2020).

## 1.2 Classificação taxonômica e organização do genoma do HCV

O HCV é pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Hepacivirus*. Ele é envelopado, constituído por RNA fita simples com polaridade positiva e cerca de 9600 nucleotídeos. Além do exposto, o genoma possui uma única fase de leitura aberta (ORF, do inglês *open reading frame*) gerando uma poliproteína (Choo, 1991).

O processo de replicação do HCV é mediado pela RNA polimerase RNA dependente (a proteína viral NS5B), o que proporciona uma alta taxa de erro de incorporação de nucleotídeos, visto que a enzima não possui mecanismo de *proofreading* (correção de erros). Essa taxa é variável para cada tipo de trocas (*mismatches*), sendo especialmente alta em G:U e U:G (Tsukiyama-Kohara e Kohara, 2017), mas nos geral a taxa de *mismatches* por ciclo repetitivo é em média de  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  (Ribeiro, 2012 *apud* Martinez e Franco, 2021). Ademais, se estima que o vírus acumule 0,3-1,2 substituições de nucleotídeos por célula infectada (Martinez e Franco, 2021).

No processo de replicação, diante da presença de um RNA com polaridade positiva que exerce o papel de RNA mensageiro, ocorre a tradução de uma única poliproteína, sendo esta processada por proteases celulares e virais. As peptidases celulares clivam as proteínas E1, E2 e p7, indicadas pelas setas rosas da figura 1. A serino-protease viral NS3 se autocliva (seta verde) e, junto com o cofator NS4A, cliva as proteínas restantes.



**Figura 1. Estrutura genômica do HCV.** Figura ilustrando o genoma viral do HCV, indicando por setas os pontos e formas de clivagem das proteínas estruturais e não estruturais, tal como a função de cada proteína. Adaptado de Hakeem e Shoukry, 2014.

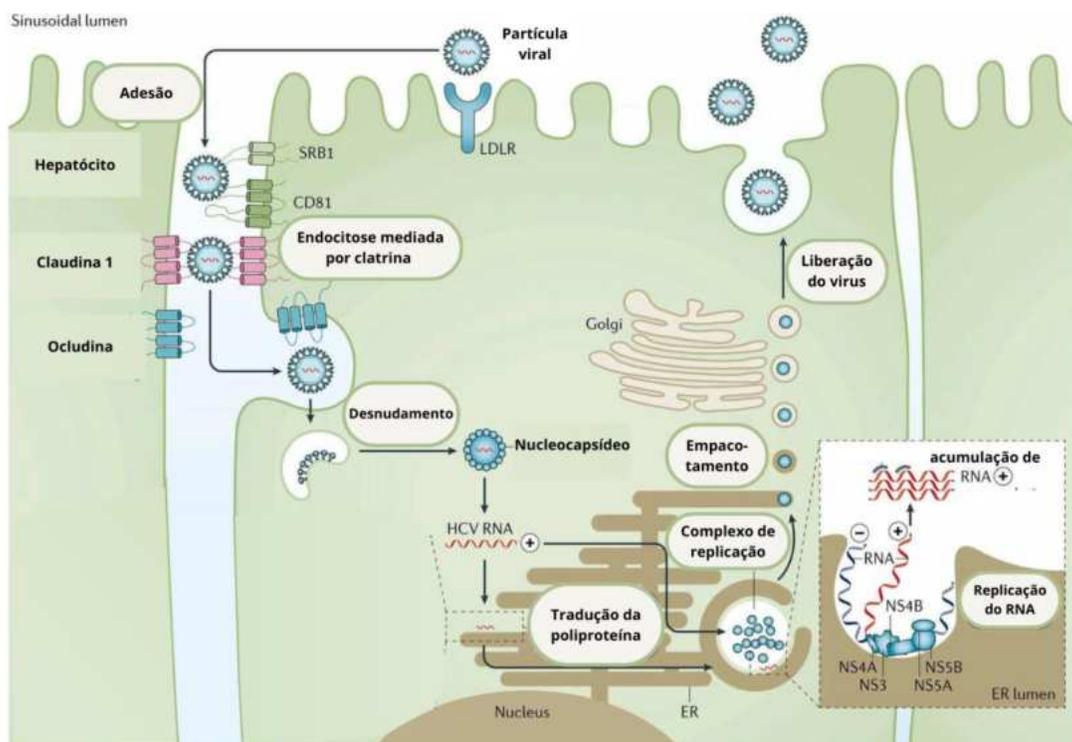
### 1.3 Replicação do HCV

O HCV infecta os hepatócitos causando a doença chamada de hepatite C. De forma geral, o vírus se adere à célula por intermédio da ligação das glicoproteínas de envelope E1 e E2 as moléculas de superfície celulares, em especial glicosaminoglicanos e o receptor de LDL (Zeisel *et al.*, 2013 *apud* Manns *et al.*, 2017). Em seguida, o vírus interage com uma gama de moléculas (incluindo CD81 e SCARB1), culminando na formação do complexo HCV–CD81–Claudin1–Ocludina, que, por sua vez, vai promover uma endocitose mediada por clatrina (Carriqui-Madroñal, 2023).

As partículas então são internalizadas nos endossomos acidificantes, o que acarreta na perda das membranas e fusão do HCV, permitindo que o RNA viral escape do endossomo para o citoplasma/citosol, agora sem envelope e capsídeo (Li *et al.*, 2021).

Neste ambiente, a parte 5' não codificante (5'UTR) do RNA vai servir como sítio interno de entrada de ribossomos (IRES, do inglês *internal ribosome entry site*), de forma que o próprio RNA viral é transcrito como molde de mRNA. Em seguida, ele é traduzido em uma única poliproteína (Choo, 1991). Depois, as proteínas se clivarão e formarão o complexo de replicação, como a figura 2 representa.

Como já dito, a replicação será mediada pela proteína NS5B, sendo ela uma das regiões mais conservadas do genoma viral. Por fim, há o empacotamento viral e a liberação do vírus.



**Figura 2. Replicação do HCV nos hepatócitos.** Figura representando o ciclo viral dentro dos hepatócitos. De forma geral, o ciclo começa com a adesão e endocitose, que são possíveis de acontecer devido a glicoproteínas E1 e E2 e o complexo HCV-CD81-Claudina1-Ocludina. Seguindo, acontece o desnudamento, tradução da poliproteína, o que vai acarretar na formação de um complexo de replicação, pelas proteínas não estruturais. Após isto, há a replicação, empacotamento e a liberação do vírus para o meio extracelular. Adaptado de Manns *et al.*, 2017.

## **1.4 Epidemiologia da hepatite C**

A infecção pelo HCV representa um grave problema de saúde pública mundial, acometendo 57,8 milhões de indivíduos (OMS 2023, Cui *et al.*, 2023). Ademais, representa cerca de 39,8% dos casos totais de hepatites virais diagnosticados no Brasil no período entre 2000-2022 (Ministério da Saúde, 2023).

De acordo com o boletim epidemiológico do Brasil (2023) a maior parte dos casos diagnosticados (77,4%) nas últimas duas décadas são quadros cronicados, enquanto menos de 4% são agudos (3,4%) ou fulminante (0,2%).

Nas últimas duas décadas a taxa de detecção da hepatite C (HCV RNA detectável ou anti-HCV reagente) era de 6,6 por 100 mil habitantes no país com cerca de 80.992 casos no Sul (com 12,4 casos a cada 100 mil habitantes) e 17.4250 no Sudeste (8,5 casos a cada 100 mil habitantes).

O caráter assintomático da maior parte dos quadros reflete também a faixa etária dos casos detectados. Metade dos casos (50,3%) foram detectados em pacientes a partir de 50 anos nas últimas duas décadas (Ministério da Saúde, 2023).

## **1.5 Transmissão do HCV**

A principal forma de transmissão viral é por contato direto com sangue -como casos por casos de transfusão sanguínea-, e também contato indireto, como por compartilhamento de perfuro cortantes e uso de drogas injetáveis (OMS, 2022). A contaminação por transfusão sanguínea historicamente foi a maior forma de infecção até os anos 90. Porém, ela tem gradativamente diminuído com a implementação de testagem para HCV nos bancos de sangue.

Entretanto, ela ainda é uma via de pertinente a ser estudada. Principalmente no Brasil, onde 22,3% dos casos das últimas duas décadas foram devido a transfusão sanguínea, de acordo com o último Boletim Epidemiológico (Ministério da Saúde, 2023).

A maior via de transmissão atualmente no Brasil é pelo uso de drogas injetáveis, correspondendo a 27% dos casos das últimas duas décadas (Ministério da Saúde, 2023). Essa é uma forma de infecção que tem preocupado órgãos de saúde mundialmente, devido à dificuldade de acesso a essa micropopulação e também a sua vulnerabilidade social, o que as deixam mais expostas a outras infecções, como HIV e tuberculose (OMS, 2016).

Dentro da categoria de compartilhamento de perfurocortantes, se salienta a transmissão por equipamentos de procedimentos estéticos, como tatuagem, procedimentos odontológicos e escarificação, este último sendo um fator de risco em algumas regiões da África Subsaariana (Agbor *et al.*, 2018).

Ademais, a transmissão vertical e sexual pode ser observada. Riscos da infecção materna são de cerca 6%, porém quando a gestante é coinfetada com HIV, o risco pode aumentar para até 12% (Benova *et al.*, 2014). Em relação à transmissão sexual, ela ocorre principalmente em casos de sexo anal, no qual o risco de contato direto com sangue é maior (Hoorneborg *et al.*, 2020).

### **1.6 Patogênese da infecção pelo HCV e manifestações clínicas**

A hepatite C é uma doença baseada na inflamação do fígado decorrente do estresse oxidativo e resposta imune ao HCV, que pode gerar quadros de fibrose e cirrose (Yamane *et al.*, 2013; Danilescu *et al.*, 2022). Um outro aspecto clínico importante da hepatite C é o alto índice de progressão à cronicidade, sendo que após a exposição ao vírus, 75-85% evoluem para a infecção crônica. Em média, 20% podem evoluir para cirrose ao longo de um período de 20 a 30 anos e 1% a 5% dos pacientes desenvolvem carcinoma hepatocelular (CHC) (Manns *et al.* 2017).

A doença é silenciosa e muitas das vezes assintomática. Porém, quando apresenta sintomas na fase aguda da doença, as mais encontradas são cansaço, febre, mal-estar, tontura, enjojo, vômitos, dor abdominal, icterícia, urina escura e fezes claras (Ministério da Saúde, 2023).

Por sua vez, durante a fase crônica da doença, a mesma possui majoritariamente um caráter assintomático. A doença é chamada de crônica quando há o anti-HCV e HCV RNA detectado por mais de seis meses. A cronificação (anti-HCV reagente e RNA do HCV detectável por mais de seis meses) ou quadro agudo grave dessa doença está fortemente associado à resposta imune, tanto devido à alta taxa de evasão viral pela variabilidade genética do HCV (Wiesch *et al.*, 2012 *apud* Manns *et al.*, 2017; Galli e Bukh, 2023) quanto por fatores do hospedeiro, como, por exemplo, o fato que linfócitos T intra-hepáticos serem fenotipicamente disfuncionais (Rehermann, 2012 *apud* Manns *et al.*, 2017), o que, por sua vez, facilita a exaustão da resposta imune, acarretando à cronificação da doença.

Apesar da etiologia da doença ser o fígado, já foram observadas também complicações extra-hepáticas, como em condições metabólicas (exemplo, diabetes tipo 2), autoimunes (como

crioglobulinemia), neoplasmas e cardiovasculares (Kuna *et al.*, 2019). Muitas dessas complicações estão diretamente associadas à resposta imune inadequada do hospedeiro, mas há estudos que indicaram que a viremia extra-hepática do vírus, ou seja, uma replicação viral fora do fígado, pode também corroborar com essas condições (Barría *et al.*, 2008). Ademais, o vírus pode ser encontrado em quantidades diferentes em diversos tipos de fluidos biológicos, como até mesmo na saliva (Mendonça, 2022), que é provavelmente resultante da circulação sanguínea. A presença do HCV na saliva já foi pontuada desde 1991 (Komiyama *et al.*, 1991), mas ainda há dúvidas pertinente a história natural do HCV na saliva: Alguns estudos sugerem que há replicação ativa no sítio (Roy *et al.*, 1998) enquanto outros sugerem que o HCV chega região carregados pelas células dendríticas e modulam uma resposta imune local (Maldonado *et al.*, 2022.)

## **1.7. Diagnóstico da hepatite C**

No Brasil, a detecção é preconizada pela testagem sorológica, podendo ser imunoensaio ou teste rápido, e confirmada pela testagem do HCV RNA por RT-qPCR. Entretanto, de acordo com o último Boletim Epidemiológico no Brasil, em média 35,5% dos pacientes entre 2015 a 2022 foram diagnosticados somente pela sorologia.

### **1.7.1 Diagnóstico sorológico**

As técnicas sorológicas têm o benefício de serem mais rápidas e baratas, como o teste rápido e os imunoensaios. Os imunoensaios são limitados a laboratório, devido ao seu equipamento, porém os testes rápidos auxiliam em um diagnóstico rápido, fácil de transportar e é o único diagnóstico dentre os preconizados que não precisam de uma punção venosa para ser realizado, podendo ser feito com o sangue furado no dedo. A sua sensibilidade média é de 96,4% podendo variar em certas micropopulações, como coinfectados com HBV (Jargalsaikhan *et al.*, 2020).

Porém, essas metodologias são limitantes ao passo que se embasam na reação do anti-HCV, que pode estar presente no paciente após cura espontânea, sendo, portanto, um bom método para *screening* de população geral, mas limitante no tocante ao monitoramento da doença.

### **1.7.2 Diagnóstico molecular**

O diagnóstico molecular, por sua vez, consegue preencher a lacuna do diagnóstico sorológico, por se embasar na detecção do HCV RNA. Que, por sua vez, consegue apontar se há, de fato, replicação viral, ou seja, infecção ativa.

Atualmente, o diagnóstico molecular preconizado é a detecção por reação em cadeia da polimerase (PCR), seja ela qualitativa ou quantitativa. Para o acompanhamento de tratamento, é importante a (RT-qPCR) (PCR de transcrição reversa quantitativa) para a quantificação de carga viral (Ministério da Saúde, 2018). A transcrição reversa é a síntese do cDNA do HCV a partir de seu RNA. Por sua vez, a reação em cadeia de polimerase é uma técnica que se embasa na amplificação exponencial da fita de DNA pela polimerase a partir de ciclos seguidos de desnaturação e extensão.

### **1.7.3 Genotipagem do HCV**

De acordo com o último Manual Técnico para o Diagnóstico das Hepatites Virais (2018), estabelecido pelo Ministério da Saúde do Brasil, não é obrigatório a genotipagem, sendo utilizado principalmente para pesquisa e vigilância genômica do país. Isso acontece pois o tratamento atual para a hepatite C se embasa em antivirais de ação direta, que são pangotípicos (Ding, 2021). Porém, quando o tratamento se embasava na terapia com interferon, o que acontece ainda em alguns países em desenvolvimento, a genotipagem do HCV é essencial. Ela também pode ser realizada para auxiliar em casos de pacientes de falha terapêutica, ou seja, que não responderam a terapia antiviral dos DAAs.

A genotipagem do HCV preconizada como padrão ouro se embasa em ensaios qualitativos envolvendo PCR e subsequente sequenciamento nucleotídico convencional (Sanger) com análise filogenética (Morozov e Lagaye, 2018). O sequenciamento nucleotídico convencional consiste no alongamento de uma fita de DNA com trifosfatos de desoxinucleotídeos (dNTPs) e com trifosfatos de didesoxinucleotídeos modificados (ddNTPs), que são dNTP que não possuem a hidroxila no 3' carbono, impedindo que a DNA polimerase incorpore um novo nucleotídeo, sendo, portanto, terminadores de cadeia. Eles também emitem uma fluorescência e, devido a terminação da cadeia, “param” a extensão da cadeia em pontos aleatórios do genoma, o que vai levar à formação de fragmentos de DNA de diversos tamanhos.

Quando submetidos à eletroforese, os tamanhos vão poder ser diferenciados por ordem crescente e, com a análise da fluorescência, será possível reconhecer cada nucleotídeo inserido e qual a ordem que foram inseridos (Dijk *et al.*, 2018).

#### **1.7.4 Uso de fluidos alternativos para o diagnóstico da hepatite C**

Em todas as metodologias supracitadas, o fluido biológico padrão-ouro é o soro, que é coletado por punção venosa através de um procedimento invasivo. Por isso, fluidos biológicos alternativos tais como, urina (Elsana *et al.*, 1998), líquido seminal (Fiore *et al.*, 1995), sangue seco em papel de filtro (Croom *et al.*, 2006) e saliva (Mendonça, 2022), devem ser estudados.

Recentemente, a saliva tem ganhado atenção como um potencial biomarcador em diversas áreas, sendo promissora para o diagnóstico de um grande escopo de doenças, desde cânceres (Farahani, 2019) até doenças infecciosas, como leishmaniose (Cantos-Barreta, 2019) e hepatites (Mendonça, 2022). Ela também apresenta uma vantagem sobre os outros fluidos biológicos por ser um procedimento não invasivo, seguro e de baixo custo que pode ser aplicado a diversas populações (Liu, Duan *apud* Farahani, 2019).

Em geral, ainda não há muitos estudos sobre a replicação extra-hepática bem como sobre o impacto da patogênese nas glândulas salivares. Porém, alguns estudos já demonstraram que a detecção do RNA do HCV e anti-HCV em saliva (Mendonça, 2022; Caldeira, 2013). Outros estudos indicaram a associação do HCV em cânceres de pescoço, cabeça (Borsetto, 2020), glândulas salivares (Carrozzo, 2008) e doenças periodontais (Gheorghe *et al.*, 2018). Logo, este fluido pode ser interessante para o diagnóstico molecular da hepatite C.

Além do exposto, a saliva é um fluido interessante visto que muitas vezes os pacientes com hepatites, como aqueles submetidos à hemodiálise, são de difícil punção venosa e, por isso, não é possível coletar o soro ou sangue, prejudicando a vigilância genômica. Ademais, devido a hepatite C ser uma doença crônica silenciosa, a maior parte da população em tratamento são idosos (Reid, 2018), que também podem apresentar uma punção venosa difícil.

Apesar de não descrito na literatura a padronização do sequenciamento de Sanger por saliva para genotipagem do HCV. Esta afirmativa se embasa a partir da revisão bibliográfica feita com o mecanismo de busca “PUBMED”, no qual resultou em somente dois artigos que se propõe a sequenciar o HCV da saliva: um por Sequenase PCR Product Sequencing Kit (produto da antiga empresa Amersham Life Sciences, Reino Unido que foi adquirida por GE Healthcare,

Estados Unidos) (Roy *et al.*, 1998) e o outro por RFLP e NASBA HCV-QT (Fariás *et al.*, 2010), como descrito o quadro abaixo.

**Quadro 1. Revisão Bibliográfica dos artigos encontrados na pesquisa com as palavras-chaves “saliva”, “sequencing” e “HCV” no PUBMED.**

<b>Autoria</b>	<b>Artigo</b>	<b>Forma de sequenciamento</b>
Liou <i>et al.</i> , 1992	Detection of HCV RNA in saliva, urine, seminal fluid, and ascites	Não realizado
Roy <i>et al.</i> , 1998	Predominance of HCV type 2a in saliva from intravenous drug users	Sequenase PCR Product Sequencing Kit
Komiyama <i>et al.</i> , 1991	HCV in saliva of chronic hepatitis patients having dental treatment	Não realizado
Fariás <i>et al.</i> , 2010	Detection of hepatitis C virus (HCV) in body fluids from HCV monoinfected and HCV/HIV coinfecting patients	RFLP e NASBA HCV-QT
Wang, 1992	Hepatitis C virus RNA in saliva of patients with posttransfusion hepatitis and low efficiency of transmission among spouses	Não realizado
Numata <i>et al.</i> , 1993	Demonstration of hepatitis C virus genome in saliva and urine of patients with type C hepatitis: usefulness of the single round polymerase chain reaction method for detection of the HCV genome	Não realizado
Jorgensen <i>et al.</i> , 1996	Sicca syndrome associated with hepatitis C virus infection	Não realizado
Komiyama <i>et al.</i> , 1995	Detection of hepatitis C virus (HCV)-RNA in saliva and gastric juice	Artigo não encontrado
Sugimura <i>et al.</i> , 1995	Correlation of detectability of hepatitis C virus genome in saliva of elderly Japanese symptomatic HCV carriers with their hepatic function	Não realizado
Young <i>et al.</i> , 1993	Detection of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells and in saliva	Não realizado
Couzigou <i>et al.</i> , 1993	Detection of HCV-RNA in saliva of patients with chronic hepatitis C	Não realizado
Artini <i>et al.</i> , 2008	Specific anti cross-infection measures may help to prevent viral contamination of dental unit waterlines: a pilot study	Não realizado
Portilho <i>et al.</i> , 2021	Applicability of oral fluid samples for tracking hepatitis B virus mutations, genotyping, and phylogenetic analysis	Não realizado para HCV
Law <i>et al.</i> , 2013	Identification of hepatotropic viruses from plasma using deep sequencing: a next generation diagnostic tool	Não realizado para saliva

Pugliese <i>et al.</i> , 2015	Oral prevalence and clearance of oncogenic human papilloma virus in a rehabilitation community for substance abusers in Italy: a case of behavioral correction?	Não realizado para HCV
Eugenia <i>et al.</i> , 2001	Investigation of saliva, faeces, urine or semen samples for the presence of GBV-C RNA	Não realizado
Puchhammer-Stöckl, 1994	Prevalence of hepatitis-C virus RNA in serum and throat washings of children with chronic hepatitis	Não realizado
Biasi <i>et al.</i> , 1995	HCV RNA detection in parotid gland biopsy in a patient with chronic hepatitis C virus liver disease	Não realizado

## 1.8 Variabilidade genética do HCV

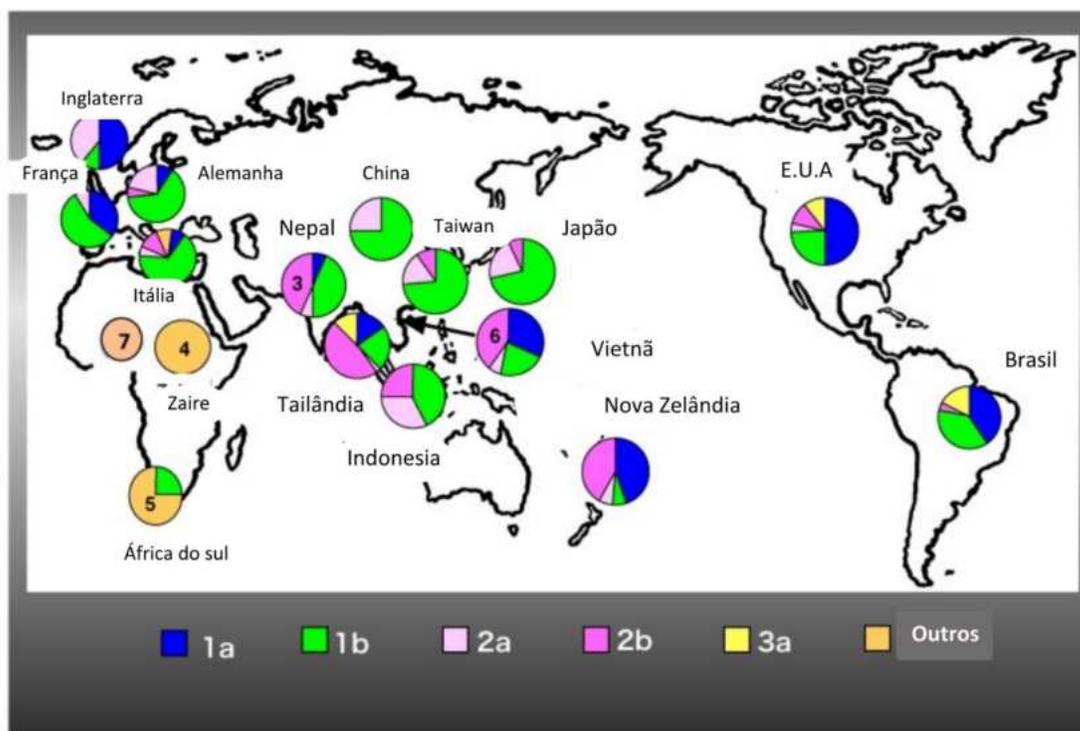
O HCV apresenta uma alta taxa de replicação estimada em  $1,3 \times 10^{12}$  vírions por dia (Li *et al.*, 2021). A elevada taxa de replicação viral e a ausência de atividade de revisão da RNA polimerase RNA dependente do HCV acarretam uma alta diversidade genética, que resulta em uma divisão taxonômica entre genótipos, subtipos e também na existência de subpopulações geneticamente distintas (Tsukiyama-Kohara e Kohara, 2017).

### 1.8.1 Genótipos e subtipos

Em maio de 2019, o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV, do inglês *International Committee on Taxonomy of Viruses*) atualizou a classificação do HCV para oito genótipos e 90 subtipos. Os genótipos se diferenciam entre si de 30 a 35% em nível genômico, enquanto os subtipos se diferem de 15% até 25%.

### 1.8.2 Distribuição geográfica dos genótipos do HCV

De acordo com o ICTV, o HCV tem oito genótipos. Os genótipos mais prevalentes mundialmente e no Brasil são 1 e 3 (Chen *et al.*, 2020). Seguindo este padrão, os subtipos mais encontrados mundialmente são o 1a, 1b e 3a, como a figura abaixo de Tsukiyama-Kohara e Kohara (2017).



**Figura 3. Análise dos subtipos do HCV em nível global.** Figura representando a circulação dos principais subtipos do HCV, sendo possível ver a prevalência do subtipo 1a, 1b e 3a em um quadro mundial e nacional. Adaptado de Tsukiyama-Kohara e Kohara, 2017

O quadro de prevalência dos genótipos 1 e 3 permanece similar nas Américas, porém em outras partes do mundo, eles se alteram. Na Ásia e Europa, junto com o genótipo 1, se é observado um grande aumento do genótipo 2 (Guntipalli *et al.*, 2021). Já na África, o genótipo mais encontrado é o 4. Se salienta também que países com histórico de colonização no continente africano possuem também uma taxa de genótipo 4 aumentada, como por exemplo, Portugal, com uma prevalência de aproximadamente 16% de genótipo 4 (Palladino *et al.*, 2018).

De acordo com estudos filogenéticos, o genótipo 1 é o mais antigo no Brasil, e a partir dos anos 90, o genótipo 3 começou a aparecer mais, provavelmente devido ao aumento de usuários de drogas injetáveis (Guntipalli *et al.*, 2021).

Atualmente, dados da vigilância genômica do HCV mostram uma redução na prevalência desse vírus devido a incorporação do tratamento por DAAs (do inglês, *direct-acting antivirals*), que são considerados pangenotípicos (Ding, 2021) em protocolos clínicos. Porém, mesmo com a queda de dados de vigilância genômica generalizada no país, estudos filogenéticos no país ainda demonstram uma supremacia maior dos subtipos 1a, 1b e 3a nos eventos de introdução ao país (Lampe, 2013; Silva, 2019).

Estudo de Castro e colaboradores (2020) demonstrou que a análise genômica do HCV em nível de genótipo pode influenciar na evolução da hepatite C crônica para quadros de cirrose e esteatose hepática. Além do exposto, mutações em proteínas não estruturais do HCV, como a NS5A e NS5B, podem influenciar no tratamento da hepatite C com os DAAs, sendo necessário um combinado de medicamentos, preferencialmente que não seja específico para apenas uma proteína viral.

## 1.9 Tratamento e Prevenção

### 1.9.1 Protocolo clínico atual

O Departamento de HIV/AIDS, Tuberculose, Hepatites Virais e Infecções Sexualmente Transmissíveis do Ministério da Saúde tornou pública a nota técnica 30/2023 que recomenda o esquema terapêutico para a hepatite C no SUS descrito nos dois quadros abaixo. O tratamento varia principalmente de acordo com a condição do fígado e de acordo com o histórico do paciente (se houve tratamento prévio ou falha terapêutica). A condição do fígado é classificada a partir da presença de fibrose ou cirrose, que pode ser categorizada pela classificação “Child Pugh”.

<b>Quadro 1</b> – Esquemas terapêuticos indicados para pacientes adultos e pediátricos (a partir de 12 anos) ou pesando pelo menos 30 kg, <b>sem tratamento prévio</b> com antivirais de ação direta (DAA <sup>1</sup> ), segundo o tempo de tratamento e condição clínica.			
	<b>Sem cirrose</b>	<b>Cirrose Child A</b>	<b>Cirrose Child B ou C</b>
<b>Opção terapêutica</b>	sofosbuvir/velpatasvir por <b>12 semanas</b>	sofosbuvir/velpatasvir por <b>12 semanas</b>	sofosbuvir/velpatasvir por <b>24 semanas</b> ou sofosbuvir/velpatasvir <b>+ribavirina, por 12 semanas</b>
<sup>1</sup> DAA: daclatasvir, ledipasvir, velpatasvir, elbasvir, ombitasvir/veruprevir/ritonavir + dasabuvir, pibrentasvir, simeprevir, glecaprevir, grazoprevir, sofosbuvir.			

<b>Quadro 2 – Esquemas terapêuticos indicados para pacientes adultos e pediátricos (a partir de 12 anos), tratados previamente<sup>2</sup> com antivirais de ação direta (DAA<sup>1</sup>), segundo o tempo de tratamento e condição clínica.</b>			
<b>Opção terapêutica</b>	<b>Sem cirrose</b>	<b>Cirrose Child A</b>	<b>Cirrose Child B ou C<sup>3</sup></b>
		glecaprevir/pibrentasvir por <b>16 semanas</b> + ou - ribavirina	glecaprevir/pibrentasvir por <b>16 semanas</b> + ou - ribavirina
<p><sup>2</sup>Deve-se considerar pacientes tratados previamente aqueles que não obtiveram resposta virológica sustentada (RVS) entre a 12ª e a 24ª semana após o término do tratamento. Pacientes que obtiveram RVS e adquiriram nova infecção (reinfecção), deverão ser tratados conforme o Quadro 1.</p> <p><sup>3</sup> Esquema de <b>retratamento</b> composto por sofosbuvir/velpatasvir pode ser utilizado em pacientes menores de 12 anos com cirrose Child B ou C, desde que pesem pelo menos 30 kg.</p>			

**Figura 4. Esquemas de tratamento com DAA para HCV.** Descrição dos esquemas terapêuticos preconizados para o SUS em 2023, em que em um quadro sem cirrose ou cirrose leve, se é recomendado um tratamento de 12 a 16 semanas, dependendo do histórico do paciente. Caso não haja falha terapêutica previamente, é recomendado tratamento com sofosbuvir e velpatasvir. Figura dos quadros retirados da nota técnica Número 30/2023-CGAHV/. DVIAHV/SVSA/MS.

Vale também ressaltar que o tratamento utilizado anteriormente era terapia embasada em interferon e ribavirina. Dependendo do genótipo, o tratamento era mais longo ou mais curto, sendo, portanto, uma terapia diretamente relacionada com o genótipo viral. A principal restrição ao uso desses imunomoduladores está relacionada à ocorrência de graves efeitos colaterais. Além disso, baixas taxas de RVS (40-50% para o genótipo 1 e 70-80% para os genótipos 2 e 3), o tempo de tratamento prolongado e a administração de alta quantidade de medicamentos por semana também representavam fatores limitantes para uma maior eficácia (Manns *et al.*, 2017). De acordo com a OMS, em 2018 ainda milhões de pessoas não possuíam acesso aos DAAs, principalmente países em desenvolvimento, e tinham que se tratar com terapia genótipo dependente (OMS, 2018 *apud* Lazarus *et al.*, 2018).

### 1.9.2 Resistência antiviral

O HCV, devido a sua alta taxa de erro e replicação, é altamente mutável. Isso se reflete também no seu tratamento, ao passo que se tem uma grande preocupação que o vírus vá adquirir resistência aos antivirais. A resistência é quando um vírus altera, de alguma forma, a parte de seu material genético/sua proteína na qual o fármaco irá atuar, tornando o fármaco menos eficaz.

Atualmente, o tratamento preconizado se embasa principalmente nos DAAs sofosbuvir (SOF) e velpatasvir (VEL).

O SOF é um análogo de nucleosídeo que atua na proteína não estrutural NS5B, cujas mutações nas posições 159, 282, 316 e 320 são relevantes no sentido de uma possível redução de eficiência no tratamento com este medicamento. Estas mutações já foram identificadas em estirpes do subtipo 1b em amostras brasileiras (Peres-da-Silva, 2017). Por sua vez, o VEL é um DAA que atua na proteína NS5A, que é uma proteína caracteristicamente mutável (Irekeola *et al.*, 2022). Dentre as substituições associadas à resistência (RAS, do inglês *resistance-associated substitutions*) salientam-se as posições de aminoácidos 28, 30, 31, e 93 (Lontok, 2015). Igualmente, essas mutações já foram associadas a casos de falha terapêutica no Brasil, principalmente as RAS A30K e Y93N (Costa, 2019).

## 2. JUSTIFICATIVA

Considerando a morbidade e mortalidade relacionadas às hepatites virais, a Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou o documento “Global Health Sector Strategy on Viral Hepatitis 2016–2021: Towards Ending Viral Hepatitis” cujo objetivo é a eliminação das hepatites virais como ameaça à saúde pública até 2030. Para a hepatite C, foi dada ênfase em diminuir os casos crônicos em 80%, para qual, torna-se necessário um aumento na testagem em micropopulações (visto que a hepatite C crônica pode ser assintomática durante muito tempo), na otimização dos métodos de diagnóstico (Pedrana *et al.*, 2021) e na genotipagem do HCV a fim de facilitar a identificação de mutações nas proteínas virais que podem estar relacionadas à resistência aos DAAs (Perales, 2018).

De acordo com o último boletim epidemiológico nacional, durante o período de 2000 a 2021, 76,1% dos óbitos por hepatites virais envolviam o HCV, sendo este vírus a causa básica de 52,2% dos óbitos. Este dado demonstra nitidamente que a hepatite C é uma doença mortal, salientado pelo caráter assintomático da doença, o que a torna difícil de ser diagnosticada com antecedência. É estimado que cerca de 78,6% dos infectados por HCV ainda não são diagnosticados (Cui *et al.*, 2023), fato que a OMS salientou como obstáculo para o cumprimento da meta de eliminação da hepatite C (2016).

As metas da OMS, porém, trazem à tona duas principais problemáticas: (i) as populações mais afetadas por HCV muitas das vezes são micropopulações vulneráveis (como idosos,

hemodialisados e usuário de drogas) que são de punção venosa complicada, e muitas das vezes não é viável a obtenção do soro, o padrão-ouro, impossibilitando a testagem; (ii) dados de vigilância genômica estão cada vez mais se tornando escassos, em virtude da integração da terapia pangenotípica.

Devido a primeira problemática, é enfatizado ainda mais a importância de padronização de técnicas em fluidos biológicos alternativos, principalmente aqueles de coleta independente à punção venosa, como saliva, líquido seminal ou urina. Por ser menos invasiva e mais prática, a saliva torna-se promissora para os estudos da hepatite C. Consequentemente, este projeto é de grande importância nesta vertente, ao passo que a padronização de sequenciamento em saliva também vai implicar na padronização das técnicas de extração e PCR para saliva, gerando um aumento da testagem de micropopulações. Ademais, o uso deste fluido biológico é considerado menos invasivo. A busca por um fluido biológico menos invasivo é ainda mais importante para a hepatite C, visto que o vírus é transmitido por contato direto, o que torna os profissionais de saúde que manipulam diretamente sangue um grupo de saúde altamente suscetíveis à infecção pelo HCV (Westermann *et al.*, 2015).

Ademais, o projeto irá trazer dados pertinentes a vigilância genômica do HCV no Brasil, o que é importante, ao passo que pode corroborar ou refutar dados antigos da circulação viral no país.

### **3. OBJETIVO**

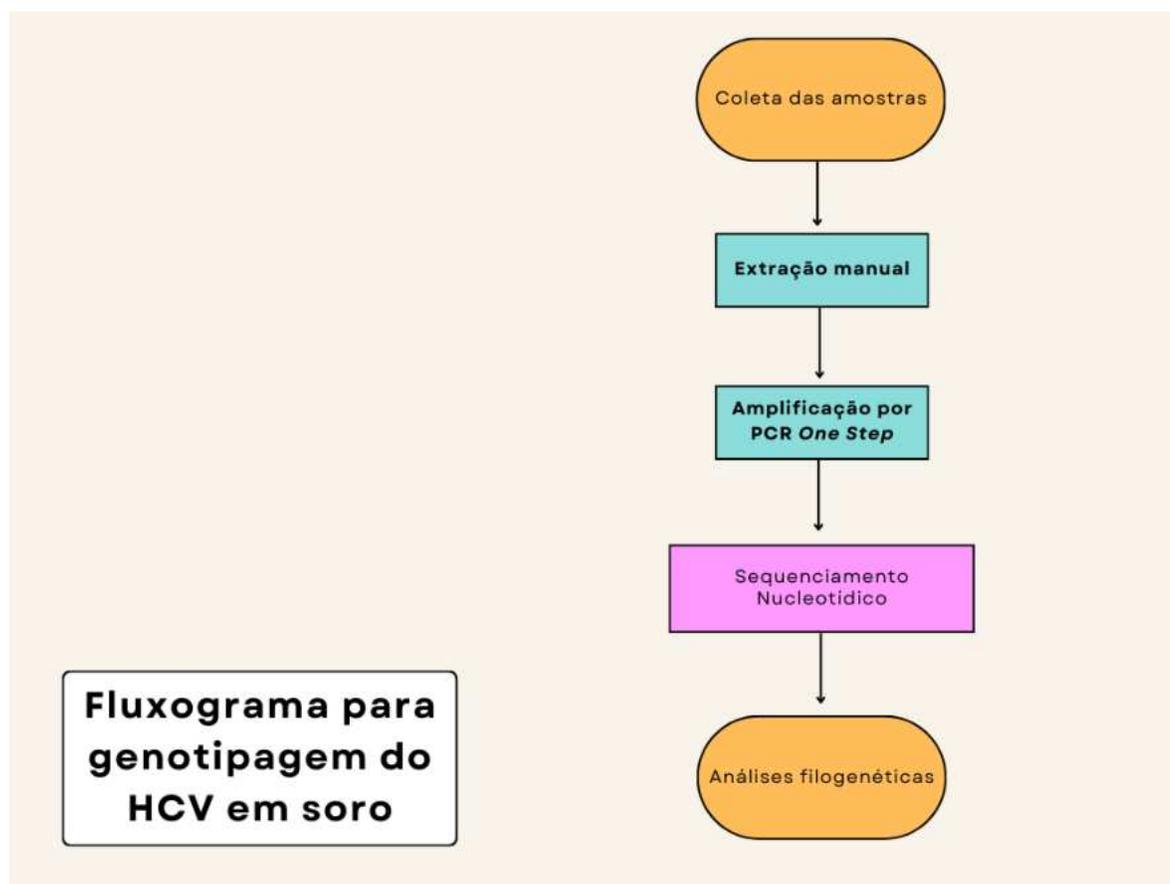
O objetivo geral do trabalho é otimizar técnicas de detecção molecular e genotipagem do HCV em soro e saliva a fim de contribuir com a meta da OMS 2030 que visa a eliminação das hepatites B e C. Para esta finalidade, o projeto terá os objetivos específicos listados:

- Estabelecer o método de extração de RNA do HCV em saliva através da comparação de diferentes protocolos;
- Padronizar protocolo de amplificação do gene NS5B para amostras de saliva de pacientes cronicamente infectados pelo HCV;
- Genotipar o HCV amostras de saliva de pacientes cronicamente infectados pelo HCV e comparar com os resultados das amostras de soro (padrão-ouro);

- Avaliar a filogenia das sequências de HCV obtidas de soro e saliva e fazer a análise comparativa de distância genética.

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

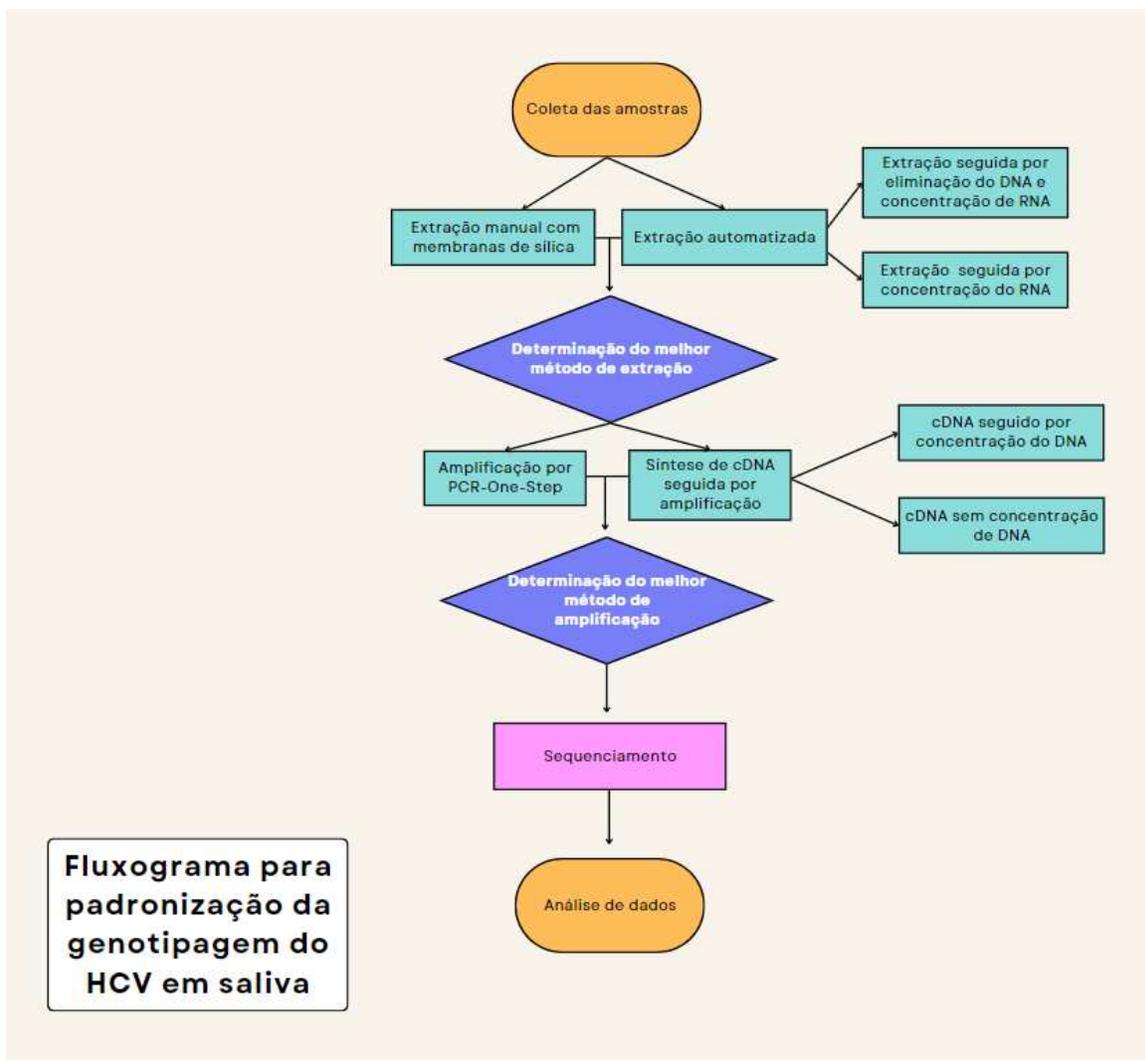
A metodologia do projeto pode ser dividida em dois momentos. Primeiramente, foi realizado o sequenciamento das amostras de soro conforme o fluxograma já padronizado *in-house* pelo laboratório (Medonça *et al.*, 2022) que pode ser resumido na figura 4.



**Figura 5. Fluxograma para genotipagem do HCV em soro estabelecido *in-house*.** As etapas representadas por uma forma arredondada simbolizam início ou final de um processo. Resumidamente, o fluxograma foi unilateral sem ramificação, dado que este processo já foi padronizado *in-house* para soro.

A partir desse fluxo de trabalho, estratégias de extração do RNA viral (manual ou automatizada) e amplificação por PCR de fragmento parcial do gene NS5B do HCV (síntese de

DNA complementar (cDNA) prévia à PCR ou PCR *one-step*) foram analisadas para otimização do sequenciamento nucleotídico em saliva conforme a figura 6 representa.



**Figura 6. Fluxograma de metodologias moleculares para detecção do RNA do HCV em amostras de saliva.** Fluxograma de processo indicando as estratégias analisadas para padronização do método em saliva. As etapas representadas por uma forma arredondada simbolizam início ou final de um processo, as etapas em formato de losango representam um momento de tomada de decisão. Devido as estratégias analisadas, o fluxograma teve ramificações nas etapas de extração e amplificação, mas as outras etapas permaneceram igual ao respectivo fluxograma em soro.

#### 4.1. Seleção das amostras

O biorepositório do Laboratório de Hepatites Virais (LAHEP) conta com o material biológico armazenado de pacientes atendidos no Ambulatório de Hepatites Virais (AHV/IOC-

Fiocruz RJ) cujas amostras de conveniência de soro e saliva foram obtidas no período entre 2020 a 2023 sendo posteriormente armazenadas a -70 °C. Essas amostras estocadas correspondem a pacientes atendidos no AHV/IOC, inclusive aqueles atendidos durante a pandemia da Covid-19. A amostragem foi dividida entre 21 pacientes com infecção crônica pelo HCV (anti-HCV reagente e RNA do HCV detectável por mais de seis meses) e 10 indivíduos sem sorologia reagente para anti-HCV ou HIV e HBV (grupo controle).

Os critérios de inclusão foram indivíduos com idade igual ou maior a 18 anos, que tenham assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e preenchido o questionário sócio epidemiológico. Foram excluídos pacientes com sorologia reagente para HIV ou hepatite B, que se recusem a assinar o TCLE ou preencher o questionário, com tratamento para hepatite C em andamento e que não possuíam saliva e soro pareados. Este projeto está inserido no projeto “Padronização de testes de diagnóstico da infecção pelos vírus das hepatites B e C em amostras de saliva” (aprovado pelo CEP da FIOCRUZ, sob o parecer no 889.582, CAAE 34055514.9.0000.5248 – 27/11/2014).

#### **4.1.1 Coleta das amostras de sangue e saliva**

As amostras de sangue da soroteca foram coletadas por punção venosa periférica utilizando-se agulhas hipodérmicas e tubos tipo vacutainer estéril com gel de 8,5 mL (SST™ II Advance, BD Vacutainer, EUA). A coleta da saliva foi realizada mediante Salivette® (Sarstedt, Alemanha) e posteriormente diluídas em 1 mililitro (mL) de tampão PBS (*Phosphate-buffered saline*) com 1% de BSA (*Bovine serum albumin*), centrifugado por 10 minutos e armazenada em -70 °C (Villar *et al.*, 2021). Ambas as coletas foram feitas juntas, no mesmo atendimento.

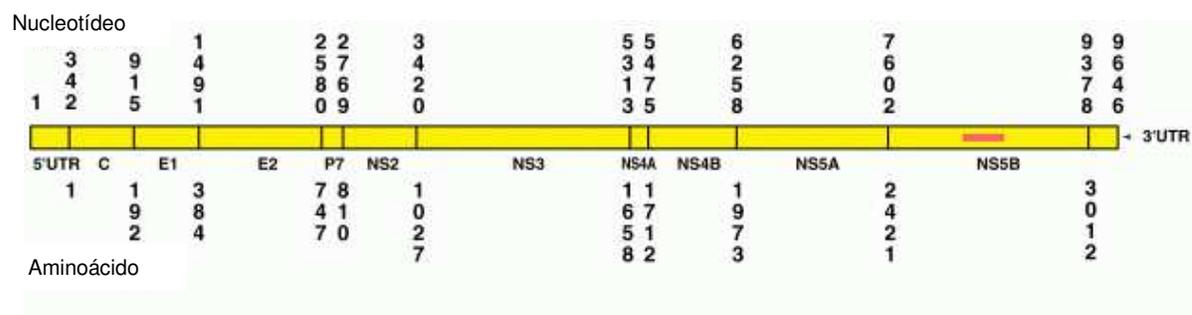
## **4.2. Procedimentos moleculares para detecção molecular do HCV em soro**

### **4.2.1. Extração do RNA viral com membranas de sílica**

A extração de soro foi realizada com o reagente comercial “QIAamp Viral RNA Mini Kit” (QIAGEN, Hilden, Alemanha) conforme as indicações da empresa, extraindo 140 µL do material biológico e eluindo-o em 50 µL do tampão de eluição.

#### 4.2.2. Transcrição reversa, amplificação por PCR e eletroforese

O material extraído foi submetido à amplificação parcial do gene NS5B (cerca de 370 nucleotídeos, representado na figura abaixo) por transcrição reversa associada à amplificação por PCR em um passo único (RT-PCR *one-step*) e subsequente *semi-nested* PCR. Os iniciadores (*primers*) utilizados nos *rounds* de PCR 1 e 2 foram baseados no artigo de Sandres-Sauné *et al.* (2003), porém o iniciador antisense da PCR 2 modificado para um maior alcance de todos os genótipos, como o quadro 2 representa. A RT-PCR foi realizada a partir de 5 µL de RNA extraído do soro com volume final de 25 µL.



**Figura 7. Genoma do HCV, contendo a região amplificada no estudo (~370 nucleotídeos).** Na figura está representado em vermelho a região utilizada para a amplificação pelos iniciadores PR3-PR5mod, dentro do gene NS5B. Figura realizada pelo software Los Alamos – HCV de Kuiken C *et al.*, 2006

**Quadro 2. Sequências dos iniciadores para amplificação parcial do genoma do HCV, baseado em Sandres-Sauné *et al.* 2003.**

Iniciador	Sentido	Sequência
PR3	Senso (PCR1, PCR2)	5'-TATGAYACCCGCTGYTTTGACTC-3'
PR4	Antisense (PCR1)	5'-GCNGARTAYCTVGTCATAGCCTC-3'
PR5 modificado (PR5-mod)	Antisense (PCR2)	5' -CCTVGTCATAGCCTCCGT -3'

O conjunto de reagentes “Superscript™ III One Step RT-PCR system” (Thermo FisherScientific, Califórnia, EUA), contendo as enzimas “Superscript™ III RT” e “Platinum® Taq DNA polymerase”, foram utilizados para a transcrição reversa do RNA viral extraído em

cDNA e subsequente amplificação por PCR. O mix de reagentes da PCR 1 contou com: 1 µl da mistura das enzimas SuperScript III RT/Platinum Taq, 4,5 µl de água destilada livre de DNA e RNA (utilizada como controle negativo da reação de PCR), 12,5µl de Reaction Mix 2x (1X), 0,5 µl de iniciadores senso e antisenso (0,8 µM) e 1 µl de “RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor” (Thermo Fisher Scientific). Com o mix de reação planejado, adicionou-se 3 µl do RNA extraído, totalizando um volume final de 25 µl. *A posteriori*, as misturas de reagentes com RNA foram incluídas em termociclador com um ciclo para transcrição reversa seguida por um ciclo de PCR denominado *touchdown* (queda de -0,3 °C a cada ciclo), com o objetivo de aumentar a especificidade da amplificação. Desta forma, o ciclo está representado a seguir: 42° °C por 45 minutos (transcrição reversa); 94°C por 2 minutos (desnaturação inicial); 5 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60 °C por 45 segundos e 72 °C por 1 minuto. Em seguida, 35 ciclos foram programados da seguinte forma: 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 45 segundos e 72 °C por 1 minuto, com um *touchdown* de -0,3 °C a cada ciclo na etapa de hibridização dos iniciadores.

Uma segunda PCR com iniciadores internos (*semi-nested-PCR*) foi realizada utilizando-se 5 µl da primeira reação. Para a segunda PCR, foi feito um mix contendo: 0,2 µl da enzima Platinum Taq DNA Polymerase (5 U/µL), 26,8 µl de água destilada livre de DNA e RNA, 8 µL de dNTPs (1,25 mM), 5 µl de PCR Buffer 10X (2X), 2 µl de MgCl<sub>2</sub> 50mM (2mM) e 1µl (0,4 µM) de iniciadores senso e antisenso para cada amostra, totalizando um volume de 50 µl. Colocam-se as misturas no termociclador com o referido ciclo: 95 °C por 5 minutos (desnaturação inicial), iniciando 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos (desnaturação), 55 °C por 30 segundos (hibridização dos iniciadores) e 72° C por 30 segundos (extensão da fita pela atividade da polimerase).

Para visualização do perfil eletroforético, 5 µL do produto amplificado foram misturados com 3 µL de “BlueJuice™ Gel Loading Buffer” (ThermoFisher Scientific) e aplicados em gel de agarose a 1,5% (dissolvido em tampão TAE contendo 3 µL de brometo de etídio para cada 100 mL de TAE). Depois, dois microlitros do padrão de peso molecular “100 pb DNA Ladder” (ThermoFisher Scientific) foram incluídos em um dos poços do gel para certificação do correto tamanho dos fragmentos amplificados na *semi-nested PCR*. Os produtos em gel depois foram submetidos à eletroforese (100 volts) durante aproximadamente 1 hora, os quais os produtos amplificados migram do pólo negativo para o pólo positivo e o gel é visualizado em câmara com luz ultravioleta “UVP Transilluminator” (ClinX, Shanghai, China).

### 4.3. Padronização de procedimentos moleculares para saliva

#### 4.3.1. Estratégias de extração para saliva

Para a determinação dos métodos de extração do RNA em saliva, foram inicialmente avaliadas amostras de saliva de 10 indivíduos com infecção crônica pelo HCV (HCV RNA detectado em soro) para uma avaliação inicial do método de extração, sendo o resto do grupo amostral depois extraído com o método escolhido. Para uma melhor avaliação das metodologias, os produtos extraídos tiveram o seu RNA quantificado a partir do aparelho “Espectrofotômetro NanoDrop® 2000 Thermo Scientific” (ThermoFisher Scientific), que é um biofotômetro capaz de quantificar material genético a partir do cálculo de absorbâncias.

##### 4.3.1.1. Extração automatizada

Foi empregado o extrator automatizado “chemagic Prepito” da PerkinElmer (Massachusetts, EUA) em conjunto com o “Prepito Pathogen NA Kit” seguindo as instruções do fabricante. Em resumo, é aplicado 250 µL de amostra onde ocorre a lise da partícula viral a partir de um tampão de lise e de protease, seguido por separação com partículas magnéticas. O equipamento emprega 6 tampões de lavagem diferentes e, por fim, o material é eluído com 60µL do tampão de eluição (Chemagen, 2021), conforme o Quadro 2 apresenta. A reação demora de 40 a 60 minutos no total.

**Quadro 3. Volumes utilizados para extração automatizada em saliva pelo “Prepito Pathogen NA Kit”**

Componente	Extração de soro	Extração de saliva
Amostra	250 µL	250 µL
Tampão de Eluição	60 µL	60 µL

##### 4.3.1.2. Extração automatizada seguida por estratégias para a concentração do RNA viral

Considerando que a saliva naturalmente tem uma concentração de RNA circulante menor e mais contaminantes, foram avaliados dois métodos de concentração de RNA após a extração automatizada. Os métodos foram: (i) Ação da enzima Turbo DNase” (ThermoFisher

Scientific) e posteriormente à concentração do RNA através do kit “RNA Clean and Concentration System” (Zymo Research, Califórnia, EUA); (ii) Concentração do RNA através do kit “ReliaPrep RNA” (PROMEGA, Wisconsin, EUA). A concentração de ambos protocolos foi a partir de 50 µL de RNA extraído.

O primeiro protocolo de concentração do material salivar extraído se embasa na retirada do DNA, que é um possível inibidor para transcrição reversa, por meio da enzima TurboDNase. Após a atuação enzimática, o RNA é concentrado pelo kit “RNA Clean and Concentration System” (Zymo Research). Para este protocolo, foi primeiramente adicionado 1 µL de TurboDNase (2 U), 5µL de “10X Turbo DNase buffer” e incubado a 37°C por 30 minutos para a reação enzimática. Para a inativação da enzima foi adicionado 5 µL do DNase Inactivation Reagente, e a solução foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Para a retirada da enzima, DNA degradado e do buffer, houve uma centrifugação de 10000xg por 1 minutos e 30 segundos, seguida pela retirada do sobrenadante. Para aumentar a concentração de RNA e eliminação de contaminantes, o protocolo continuou com o kit “RNA Clean and Concentration System”, que se embasa na extração e concentração de RNA por membrana sílica. Desta forma, foi adicionado 100 µL de RNA binding buffer, 150 µL de etanol a 95% e a solução foi transferida para uma coluna, no qual em seguida foi centrifugada a 14000xg por 30 segundos. Em seguida, foi adicionado 400 µL de RNA prep. Buffer e centrifugado a 14000xg por 30 segundos. Um último tampão foi adicionado, 700 µL de RNA wash buffer, o qual foi centrifugado a 14000xg por 2 minutos.

Por fim, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5mL final, o qual houve a eluição do RNA em 15 µL de água livre de DNase/RNase, por meio de uma centrifugação final de 14000x a 30 segundos.

O segundo método analisado para a concentração do material extraído foi o kit “ReliaPrep RNA” (PROMEGA). Diferentemente do anterior, esse kit não tem a atuação da Turbo DNase para eliminação do DNA, sendo apenas uma concentração por membrana de sílica. Desta forma, ele possui menos etapas, o que pode acarretar em uma menor chance de perda de RNA durante o processo. Ademais, a eluição final é realizada por um tampão de eluição, o que pode garantir uma maior estabilidade do RNA, ao contrário da eluição por água livre de DNase/RNase, conforme a recomendação da bula do kit.

Primeiramente, se adiciona 25 µL de *Membrane Binding Solution* para 50 µL de amostra extraída. Em seguida, foi adicionado 75µL de Isopropanol 100%.

A solução foi transferida para uma coluna do kit e em seguida centrifugada por 30 segundos a 10000 xg. Depois, foi adicionado 200µL de Column Wash Solution, e centrifugado por 15 segundos a 10000xg. Um último tampão de limpeza foi adicionado, 300 µL de RNA Wash Solution, e centrifugado a 15 segundos por 10000xg. O tampão de RNA Wash Solution foi adicionado e centrifugado novamente.

Por fim, o RNA foi eluído em 15 µL do tampão de eluição (TE) e centrifugado na velocidade máxima (140000 xg) por 30 segundos.

#### 4.3.1.3. Extração manual com membranas de sílica

O reagente comercial “QIAamp Viral RNA Mini Kit” (QIAGEN) é o método de padronizado para a extração de soro e também foi testado para a saliva. Foi seguido o protocolo previamente utilizado por Mendonça *et al.*, 2022, onde empregamos 280 µL de amostra de saliva em comparação ao soro (140 µL). Outras modificações nas instruções do fabricante foram realizadas, conforme a indicação da bula do protocolo, sendo elas: A inclusão do dobro de volume para o tampão de lise, carreador de RNA e etanol. Para os tampões de lavagem, os volumes não foram alterados. A fim de concentrar ainda mais o RNA, o volume de eluição foi diminuído para 30 µL, para tornar a técnica mais sensível.

De forma resumida, o quadro abaixo apresenta os volumes utilizados para a extração pelo kit “QIAamp Viral RNA Mini Kit” em soro (esquerda), e saliva (direita).

#### Quadro 4. Volumes utilizados para extração de membrana sílica em soro e em saliva pelo QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)

Componente	Extração de soro	Extração de saliva
Amostra	140 µL	280 µL
Tampão de Eluição	60 µL	30 µL

#### 4.3.2. Estratégias de padronização para amplificação por PCR do RNA do HCV em saliva

Após a extração, as seguintes abordagens foram testadas para amplificação do RNA na saliva.

#### 4.3.2.1. Síntese de cDNA seguida por amplificação por PCR em 2 rounds

A síntese de cDNA foi realizada mediante uso da enzima “SuperScript™ III Reverse Transcriptase” (ThermoFisher Scientific) (1µL) com 0,5 µL (0,75 mM) de iniciadores aleatórios (*random primers*), 1µL (5 mM) de DTT, 4 µL (1X) de Superscript III buffer, 1µL (0,5 mM) de dNTP e 10µL de amostra.

Em seguida, dois *rounds* de PCR foram realizados com os iniciadores descrito em Sandres-Sauné *et al.* (2003), porém o iniciador antisense da PCR 2 modificado (PR5-mod). Em ambas as PCRs, a enzima “Platinum® Taq DNA polymerase” (ThermoFisher Scientific) foi utilizada.

Na primeira PCR, utilizou-se 0,5 µl da enzima, 1 µl de iniciadores senso e antisense (0,4 µM), 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 50mM (3 mM), 4 µl de Buffer 10X (1,6X), 4 µl de dNTPs 10mM (1,6 mM), 8 µl de água nuclease-free e 5 µl de cDNA, totalizando um volume final de 25 µl. A posteriori a reação foi realizada em uma desnaturação inicial 94° por 2 minutos e pelo ciclo para a amplificação, com 25 repetições de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 45 segundos e 72 °C por 1 minuto, seguido por uma extensão final de 72 °C por 10 minutos.

A segunda PCR foi realizada utilizando 2 µl da primeira reação. O mix foi feito contendo os seguintes compostos: 0,5 µl da enzima, 1 µl de iniciadores senso e antisense (0,4 µM), 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM (3 mM), 2,5 µl de Buffer 10X (1,6X), 4 µl de dNTPs 10mM (1,6 mM) e 12 µl de água nuclease-free, totalizando um volume final de 25µl. A ciclagem foi realizada aquecendo inicialmente as amostras a 94 °C por 4 minutos, seguida por 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 60 segundos e 72° C por 30 segundos, finalizando por uma única etapa de 72° C por 10 minutos.

Para a otimização deste protocolo, a concentração de magnésio foi avaliada entre 1,5 e 1 µl (respectivamente, 3 mM e 2 mM) e o *input* amostral foi avaliado entre 2 µl e 5 µl.

##### 4.3.2.1.1 Síntese de cDNA seguida por concentração de DNA e amplificação por PCR em 2 rounds

A síntese de cDNA foi realizada mediante uso da enzima “SuperScript™ III Reverse Transcriptase” (ThermoFisher Scientific), conforme descrito no tópico anterior. Depois. Foi realizada a concentração do DNA através do reagente comercial “DNA ReliaPrep” (PROMEGA, Wisconsin, EUA), afim de eliminar inibidores e tornar o protocolo de amplificação mais

sensível. Posteriormente, os ensaios de PCR foram realizados conforme descritos no tópico anterior.

#### **4.3.2.2. *One-step RT-PCR e semi-nested PCR***

O procedimento foi realizado a partir do reagente comercial “Superscript™ III One Step RT-PCR system” e “Platinum Taq DNA Polymerase” (ThermoFisher Scientific) conforme o protocolo para amplificação de soro, no qual os reagentes são: A primeira PCR com 1µl da mistura das enzimas SuperScript III RT/Platinum Taq, 12,5µl de Reaction Mix 2x (1X), 0,5 µl de iniciadores senso e antisenso (0,8 µM), 1 µl de “RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor” (ThermoFisher Scientific), 3 µl do RNA extraído e 4,5 µl de água destilada. E a segunda PCR com 0,2 µl da enzima Platinum Taq DNA Polymerase (5 U/µL), 8 µL de dNTPs 1,25 mM (0,2mM), 5 µl de PCR Buffer 10X (2X), 2 µl de MgCl<sub>2</sub> 50mM (2mM), 1µl (0,4 µM) de iniciadores senso e antisenso para cada amostra, 3 µl de PCR1 e 26,8 µl de água destilada livre de DNA e RNA.

Para a otimização da reação em saliva, foram avaliadas algumas modificações: *Input* amostral entre 2, 5 e 7 µL em cada PCR, concentração de enzima da primeira PCR (0,5 e 1,5 µL de Superscript™ III RT”), da enzima da segunda PCR (0,2; 0,5 e 1 µL de Taq DNA Polymerase, o que corresponde respectivamente a 1U; 2,5U e 5U), de magnésio da segunda PCR (1,5 e 2µl, o que corresponde a uma concentração de 1,5 mM e 2 mM) e de iniciadores em ambas PCR (0,4mM e 0,8mM, ou seja, 0,5 e 1 µl respectivamente).

Para a confirmação de amplificação do fragmento alvo foi também realizado eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

### **4.3. Quantificação e purificação do produto de PCR obtido a partir de soro e saliva**

Posteriormente, o produto amplificado de ambos soro e saliva foi purificado através do reagente comercial “QIAquick PCR Purification” (QIAGEN) conforme instruções do fabricante. Resumidamente, essa técnica se baseia em uma pequena extração por membrana sílica do produto amplificado, de forma a eliminar os reagentes da PCR, isolando desta forma os *amplicons*. Esta técnica garante a eliminação de contaminantes da amostra, como os próprios reagentes da PCR, tornando-a mais pura para o sequenciamento. A concentração de DNA do produto purificado foi quantificada pelo fluorímetro “Qubit® dsDNA BR Assay Kit” (Thermo

FisherScientific) seguindo o protocolo recomendado pela empresa. O conteúdo de DNA é importante para o sequenciamento nucleotídico convencional, visto que quando o DNA se encontra em baixa concentração, o leitor dos capilares do aparelho de sequenciamento pode ter uma maior dificuldade em reconhecer os sinais, perdendo assim informações valiosas. Ao contrário, caso o DNA esteja muito concentrado, a passagem pelos capilares do sequenciador pode ser retardada, o que também vai atrapalhar no reconhecimento dos sinais. Como o alvo a ser sequenciado tem em torno de 370 nucleotídeos, recomenda-se 40 ng de material genético.

#### **4.4. Reação de sequenciamento nucleotídico e precipitação de placa**

O sequenciamento de Sanger se embasa no alongamento de uma fita de DNA com trifosfatos de desoxinucleotídeos (dNTPs) e com trifosfatos de didesoxinucleotídeos modificados (ddNTPs) que param a extensão de DNA em pontos aleatórios e emitem fluorescência, levando a formação de uma biblioteca de *amplicons* de diversos tamanhos de fragmentos. Devido à divergência de tamanho dos fragmentos, é possível a análise de cada nucleotídeo por sua ordem. Subsequente, todas as informações dos nucleotídeos vão ser condensadas para dar o resultado da sequência inteira, de forma que o sequenciamento leva o resultado de análise geral, porém superficial, das populações majoritárias.

A reação de sequenciamento foi realizada com o reagente comercial “BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit” (Thermo Fisher Scientific), sendo posteriormente incluída no termociclador. A mistura de reagentes conta com 1 µL de BigDye, 1,5 µL de tampão 5X e 1 µL do iniciador a 3,2 micromolar por poço. Dado o acréscimo da amostra conforme quantificação recomendada foi utilizado água para chegar a um volume final de 10 µL. No termociclador, um ciclo constituído de 94 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos se repete por 40 vezes.

Posteriormente, uma etapa de precipitação *in house* da reação de sequenciamento foi feita. Na precipitação adiciona-se 8 vezes da quantidade do poço em isopropanol 75% e a placa é incubada a temperatura ambiente por 15 minutos. Depois, a placa é centrifugada a 4000 RPM (1500 xg) por 45 minutos e, posteriormente, invertida para centrifugação por até 600 RPM. Posteriormente, a evaporação do álcool foi feita em termociclador com 60 °C de temperatura por 10 minutos. Por fim, adicionou-se 10 µL de formamida em cada poço e a placa foi incubada por

3 minutos a 95 °C. Dado a preparação da placa, a corrida da mesma ocorreu no sequenciador “3500 Genetic Analyzer” (ThermoFisherScientific).

#### **4.5. Montagem e alinhamento de sequências nucleotídicas**

As sequências nucleotídicas obtidas (senso e reverso complementar) de cada amostra foram alinhadas através do algoritmo CLUSTAL W e montadas/editadas no programa MEGA 7.0 para a obtenção do consenso, da seguinte forma: após conferir o número da amostra com a placa de sequenciamento, foi aberto o arquivo AB1. Na sequência de iniciadores antisense foi realizada a operação “Reverse Complement Sequence” do programa. Feito isso, a sequência é transferida para o alinhamento com as referências obtidas no banco de dados de HCV (Los Alamos; <http://hcv.lanl.gov/content/hcv-db/index>). Em caso de dúvidas de nucleotídeos diferentes com os demais, observa-se os picos em eletroferograma para confirmar o nucleotídeo correto. Após extensa análise, foi montado o consenso dos 2 iniciadores utilizados para cada amostra. O arquivo é salvo como “FASTA” para futuras análises.

#### **4.6. Análises filogenéticas para genotipagem do HCV**

A árvore filogenética foi construída através do programa Mega 7.0, pelo método de máxima verossimilhança. Para chegar em um modelo de árvore adequado, um arquivo FASTA com todas as sequências consenso e sequências de referências foi submetido ao algoritmo “Models” do programa, que avalia qual modelo de substituição é mais apropriado para as sequências em questão. Com o melhor modelo indicado, a árvore foi então feita ao selecionar a opção “Construct/Test Maximum Likelihood Tree”. A confiabilidade da árvore filogenética foi avaliada pelo teste “Ultrafast Bootstrap” (1000 replicatas). O processo de criação de árvore a partir do programa Mega também é descrito no trabalho de Hall, 2013.

A árvore final foi editada através do programa FigTree v.1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

##### **4.6.1 Distância genética**

A distância genética foi realizada pelo programa MEGA 7.0 conforme as indicações sugeridas pelo programa, que podem ser encontradas no site MegaSoftware.

#### **4.7. Análise dos dados epidemiológicos**

Os dados demográficos, epidemiológicos e genéticos foram compilados em uma planilha no software Microsoft Excel, versão 2007, na qual foi feita a análise estatística descritiva pelo cálculo de médias e frequências.

#### **4.8. Avaliação estatística**

A comparação estatística entre as metodologias de concentração pós extração foi realizada pelo programa “GraphPad InStat”, por meio de um inicialmente teste de normalização seguido pelo teste Kruskal-Wallis e, por fim, pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. Esses dois testes vão calcular se os valores da variável em questão diferencem estatisticamente entre si e qual a significância (*p-value*<0,005) dessa diferença (Storopoli e Vils, 2021). Os testes foram realizados conforme as indicações sugeridas pelo programa, que podem ser encontradas em: <https://sciexperts.com/instat/features/>

### **5. RESULTADOS**

#### **5.1. Caracterização do grupo amostral**

Conforme tabela 1 a seguir, as características sociais e demográficas obtiveram os referidos resultados. O grupo de trinta e um pacientes foi composto por 71% (22/31) de indivíduos correspondentes ao gênero feminino e 29% (9/31) ao gênero masculino. A idade média do grupo total foi de 46,5 ± 12,1 anos, enquanto o subgrupo dos HCV reagente foi de 68,1 ± 12,1 anos. O subgrupo dos pacientes infectados por HCV foi composto por 21 indivíduos com infecção crônica pelo HCV, sendo 71,4% (15/21) referentes às mulheres e 28,6% (6/21) aos homens. Em relação ao subgrupo do controle negativo, o mesmo foi composto por 10 indivíduos saudáveis, sendo 70% (7/10) mulheres e 30% (3/10) homens. Em relação à carga viral do soro do subgrupo dos infectados, a média foi de 5,58 ± 0,63 log<sub>10</sub> UI/mL. Quando comparado ao perfil socioeconômico dos pacientes, o subgrupo dos infectados (n=21) apresentou uma menor formação acadêmica quando comparado ao subgrupo anti-HCV não reagente e uma maior incidência de icterícia. Ademais, 57,2% da população dos infectados já haviam realizado uma cirurgia antes e todos os pacientes que já haviam realizado hemotransfusão se encaixavam no subgrupo dos pacientes infectados, sendo 23,8% do total deste grupo.

**Tabela 1. Quadro de dados demográficos da população estudada**

	Subgrupo Anti-HC reagente	%	Subgrupo Anti-HCV Não reagente	%	Total
Gênero					
Feminino	15	71,4	7	70	22
Masculino	6	28,6	3	30	9
Total	21	100,0	10	100	31
Formação					
Ensino Fundamental Incompleto	4	19,05	0	0	4
Ensino Fundamental Completo	5	23,8	0	0	5
Ensino Médio Completo	8	38,1	0	0	8
Ensino Superior Completo	4	19,05	10	100	14
Total	21	100	10	100	31
Autodeclaração de cor					
Branco	7	33,3	4	40	11
Preto	5	23,8	1	10	6
Pardo	8	38,1	5	50	13
Não respondeu	1	4,8	0	0	1
Total	21	100	10	100	31
Icterícia					
Sim	15	71,42	3	30	18
Não	6	28,58	7	70	13
Total	21	100	10	100	31
Renda Familiar					
Até 1 salário mínimo	3	14,2	1	10	4
Entre 1 a 3 salários mínimo	13	62	1	10	14
Mais de 3 salários mínimo	5	23,8	8	80	13
Total	21	100	10	100	31
Realização de cirurgia					
Sim	12	57,2	7	70	19
Não	9	42,8	3	30	12
Total	21	100	10	100	31
Hemotransfusão					
Sim	5	23,8	0	0	5
Não	16	76,2	10	100	26
Total	21	100	10	100	31

## 5.2. Padronização dos métodos de detecção molecular do HCV RNA em saliva

### 5.2.1 Avaliação dos métodos de extração de RNA em saliva

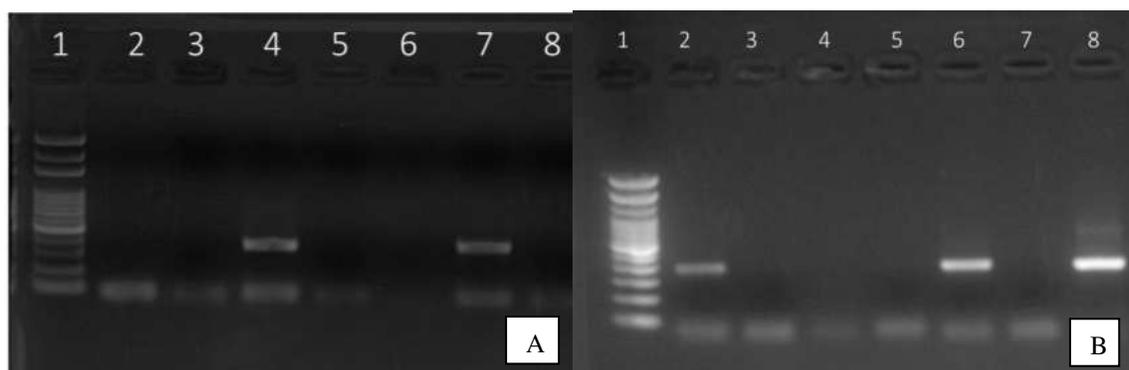
Inicialmente foram avaliados dois métodos: (i) uso de membranas de sílica pelo kit manual “QIAamp Viral RNA Mini Kit” (Qiagen) e (ii) uso de partículas magnéticas pelo extrator automatizado “chemagic Prepito” da PerkinElmer. Preliminarmente, 10 amostras de saliva foram extraídas pelos dois métodos citados. Utilizando-se o protocolo de PCR *One-Step*

padronizado para soro, duas amostras pareadas foram amplificadas em ambas as extrações de saliva., sendo que uma terceira amostra foi ampliada somente pela extração automatizada. Ao avaliar-se a concentração pelo “NanoDrop” (ThermoFisher Scientific), percebeu que houve uma maior concentração de RNA extraído através da extração automatizada (Tabela 2).

**Tabela 2. Comparação de concentração de RNA (ng/μL) de amostras amplificadas obtida após extração automatizada e manual de saliva.**

	Mediana	Mínimo	Máximo
<b>Extração Automatizada</b>	43,45	28,1	58,8
<b>Extração Manual</b>	26,25	18,1	34,4

As amostras foram amplificadas na PCR qualitativa para o gene NS5B do HCV, no qual pode-se observar na figura 8 que as amplificações resultantes pela extração automatizada apresentaram bandas mais nítidas em comparação à extração manual.



**Figura 8. Comparação do perfil eletroforético de amostras de saliva submetidas à extração manual (A) e automatizada (B), respectivamente, seguidas de PCR para detecção do RNA do HCV.** A – O primeiro poço representa um peso molecular de 100 pb (ThermoFisher Scientific) e os poços de 2-8 representam amostras com anti-HCV e HCV RNA detectável em soro. B- O primeiro poço representa um peso molecular de 100 pb (ThermoFisher Scientific), enquanto que os poços 2-8 representam amostras com anti-HCV e HCV RNA detectável em soro. As amostras não são as mesmas em ambas figuras, servindo apenas para elucidar a divergência do perfil eletroforético encontrado na extração automatizada (B) quando comparado ao perfil eletroforético que foi encontrado na extração manual (A).

### 5.2.1.1 Extração automatizada seguida por métodos de concentração de RNA

A fim de aumentar a pureza e concentração do RNA obtido após a extração automatizada, dois métodos de concentração de RNA foram empregados, um que consistia na eliminação do DNA e concentração pelo kit “RNA Clean and Concentration System” (Zymo Research) e outro que consistia somente na concentração pelo kit “ReliaPrep RNA” (PROMEGA).

Quando comparados a média e desvio padrão de concentração de RNA das metodologias de concentração referidas com a extração sem nenhuma metodologia de concentração foi possível identificar que as concentrações de RNA pós-extração automatizada não foram eficazes em aumentar a concentração de material genético. Para confirmar esses dados foi feita uma análise estatística de comparações múltiplas (também chamada de comparações intergrupos), a partir de um teste de Kruskal-Wallis seguido por um teste de Dunn, representada na Tabela 3.

A análise estatística confirmou que a melhor metodologia de processamento de amostras foi a extração automatizada sem concentração *a posteriori*, com uma significância de  $p=0,0177$ . Logo, a extração automatizada sem concentração foi determinada como a melhor metodologia de extração para saliva e o resto do grupo amostral foi então extraído com ela.

**Tabela 3. Análise estatística dos dados de concentração (ng/ $\mu$ L) a partir de comparações múltiplas**

Método	Mediana	Mínimo	Máximo
Zymo	9,100	6,000	52,700
ReliaPrep	38,330	1,500	51,800
Extração sem concentração	54,780	3,100	70,600

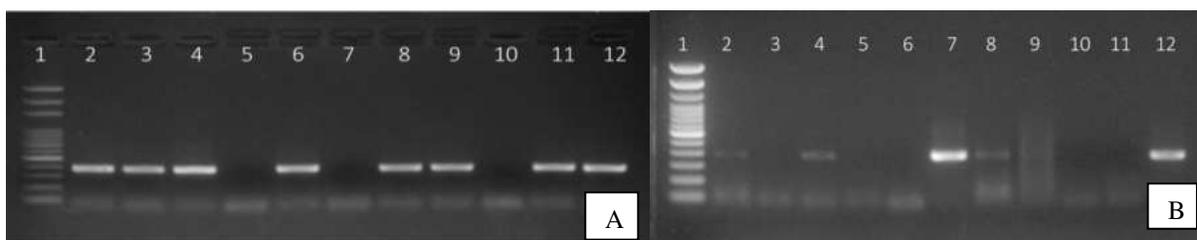
  

Comparação	Diferença na ordem média	P
------------	--------------------------	---

Zymo x ReliaPrep	-0,0416	Ns
Zymo x Extração sem concentração	-8,339	Ns
ReliaPrep x Extração sem concentração	-8,298	P<0,05 (0,0177)

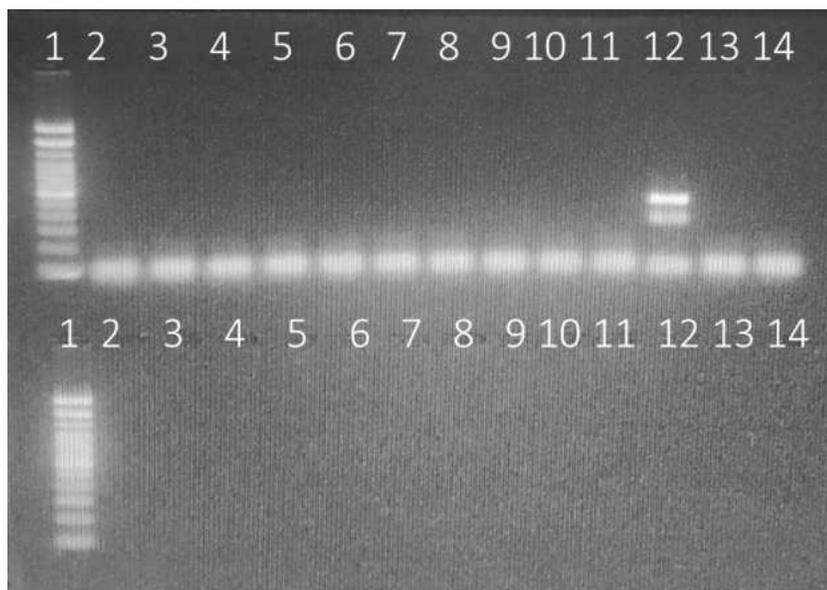
### 5.2.2 Otimização dos métodos de PCR para amplificação do RNA do HCV em saliva

Para um teste inicial de padronização do protocolo de amplificação de PCR do gene NS5B do HCV, 11 salivas com coleta mais recente (a partir de 2020) foram armazenadas a -70 °C foram selecionadas. Inicialmente, testou-se protocolo de PCR *One-Step in house* padronizado para soro. Porém, esta amplificação apresentou bandas de baixa intensidade e foi pouco sensível na detecção do RNA do HCV comparado ao soro, conforme a figura 9 representa, em que é representado o perfil eletroforético resultante da amplificação em soro e saliva. Apesar de não ser amostras pareadas, é possível analisar a divergência do na nitidez da banca amplificada quando comparada a foto A (amostras de soro) e B (amostras de saliva).



**Figura 9. Comparação do perfil eletroforético do produto extraído amplificado em cada fluido biológico.** A – Gel resultante da amplificação de amostras extraídas do soro. B- Gel resultante da amplificação de amostras extraídas de saliva. Em ambos, o primeiro poço representa um peso molecular de 100 pb (ThermoFisher Scientific), enquanto os outros poços representam amostras com anti-HCV reagente e HCV RNA detectável em soro. As amostras não são as mesmas em ambas figuras, servindo apenas para elucidar a divergência do perfil eletroforético encontrado na saliva (B) quando comparado ao perfil eletroforético que é normalmente encontrado no protocolo já padronizado em soro (A).

Vinte e uma amostras de saliva provenientes dos indivíduos cronicamente infectados pelo HCV foram submetidas à amplificação pelas técnicas de (i) PCR *one-step* (transcrição reversa e amplificação por PCR em passo único) e (ii) síntese de cDNA seguida de amplificação por PCR em dois *rounds* (iniciadores da PCR *one-step*). Através da PCR *one-step*, verificou-se a detecção do RNA do HCV no controle positivo utilizado (soro com RNA do HCV detectável), porém as modificações do protocolo de *one-step* utilizado (PCR 1: 1 µL de cada um dos iniciadores e 1,5 µL de “SuperScript III RT/Platinum *Taq*”; input da PCR 1 na PCR 2: 5 µL; PCR 2: 0,5 µL de “Platinum *Taq* DNA Polymerase” e volume final de reação de 25 µL) não corroboraram com a detecção do RNA do HCV para as amostras de saliva, como representado na Figura 10. Já para o protocolo de cDNA + PCR, na Figura 10 verificamos que não houve detecção do RNA do HCV nas amostras de saliva e também do controle positivo.



**FIGURA 10. *One-Step* vs cDNA.** Gel resultante da amplificação de amostras extraídas por *One-Step* PCR (Primeira fileira) e por cDNA (segunda fileira). Os primeiros poços de ambas as fileiras representam um peso molecular de 100 pb (ThermoFisher Scientific), enquanto os poços 2-11 representa amostras de saliva com anti-HCV e HCV RNA detectável em soro, e o poço 12 representa uma amostra de soro com anti-HCV reagente e HCV RNA detectável. O poço 13 de cada fileira é uma amostra anti-HCV e HCV RNA não detectável e o último poço 14, representa a reação feita com água destilada livre de DNA/RNA.

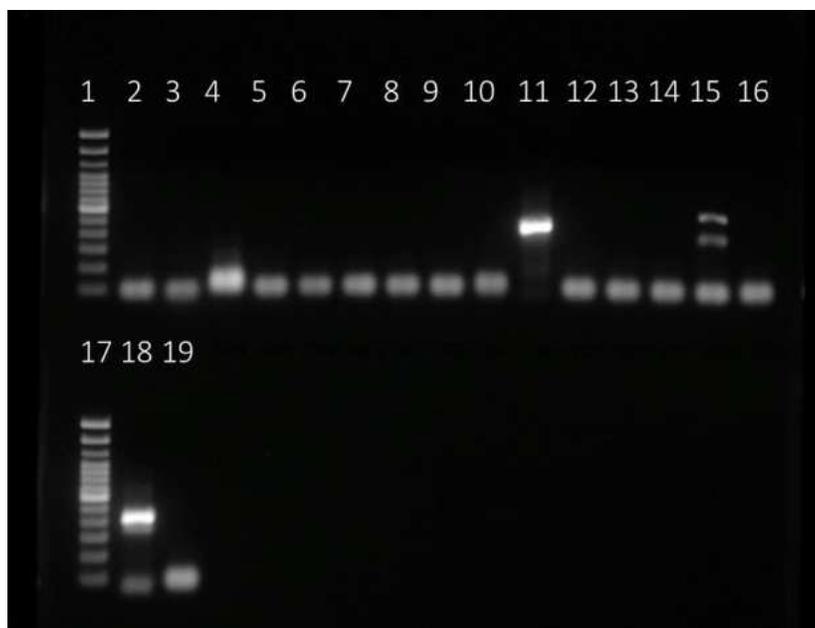
Para tentar aumentar a sensibilidade do protocolo de cDNA, foi testado um protocolo de cDNA, concentração de DNA pelo Kit “DNA ReliaPrep” (PROMEGA) seguida pelas duas PCR

*Semi-Nested*. Porém, este protocolo também não houve detecção do RNA do HCV nas amostras de saliva e também do controle positivo.

Diante dos resultados mais promissores associados à extração automatizada e PCR *one-step*, as 21 amostras de saliva com RNA do HCV detectável foram submetidas a uma nova extração através do “chemagic Prepito” da PerkinElmer. As seguintes modificações no protocolo de PCR *one-step* + *Semi-Nested* PCR foram realizadas: Aumento de “SuperScript III RT/Platinum *Taq*” (de 1 µL para 1,5µL), aumento da concentração de iniciadores da duas PCRs (de 0,4 µM para 0,8 µM), aumento do *input* amostral (de 3 µL de material extraído para 7 µL de material extraído na primeira PCR; de 3 µL do produto da primeira PCR para 5 µL de produto para a mistura da segunda PCR) e, por fim, diminuição da concentração de cloreto/sulfato de magnésio na segunda PCR (de 2mM para 1,5mM). A versão final do protocolo ficou conforme descrito a seguir e o gel referente ao protocolo está demonstrado na figura 11.

**Quadro 5. Protocolo otimizado para amplificação parcial do gene NS5B do HCV em saliva**

<i>RT-PCR one-step</i>	
Reaction Mix 2x (1X)	12,5 µL
PR3 20uM (0,8 µM)	1 µL
PR4 20uM (0,8 µM)	1 µL
RNaseOUT	1 µL
SuperScript III One Step RT/Platinum <i>Taq</i> Mix	1,5 µL
Água <i>nuclease-free</i>	1 µL
RNA extraído	7 µL
<i>PCR Semi-Nested</i>	
dNTPs 10Mm (0,2 mM)	0,5 µL
Buffer 10X (2X)	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub> 50mM (1,5 mM)	0,75 µL
PR3 20uM (0,8 µM)	0,5 µL
PR5 modificado 20 uM (0,4 µM)	0,5 µL
Platinum <i>Taq</i> DNA Polymerase (2,5 U)	0,5 µL
Água <i>nuclease-free</i>	14,75 µL
Produto da RT-PCR	5 µL



**Figura 11. Perfil eletroforético resultante do protocolo otimizado de PCR *one-step*.** Os poços 1 e 17 representam um peso molecular de 100 pb (ThermoFisher Scientific), enquanto os poços 2-16 representam amostras de saliva e o poço 18 representa uma amostra de soro (controle positivo).

Por fim, o protocolo de PCR otimizado apresentou uma sensibilidade de 47,6% (10/21), especificidade de 100% (10/10), valor preditivo positivo de 47,6% (10/21) e valor preditivo negativo de 100% (10/10). Em soro, esses valores foram de 100%.

### 5.3 Genotipagem do HCV

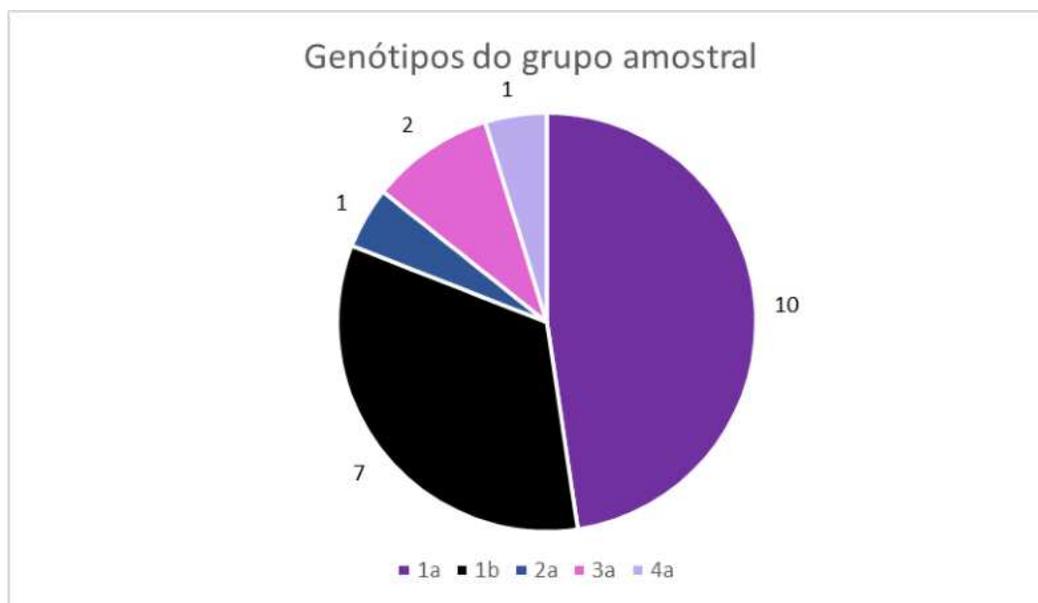
No total, 28 amostras foram sequenciadas, sendo 21 soros e 7 salivas. Dez salivas amplificaram na PCR *one-step*, porém três delas salivas não foram possíveis de serem genotipadas, devido a má qualidade dessas sequências, conforme observado na análise do eletroferograma.

#### 5.3.1 Genotipagem em soro

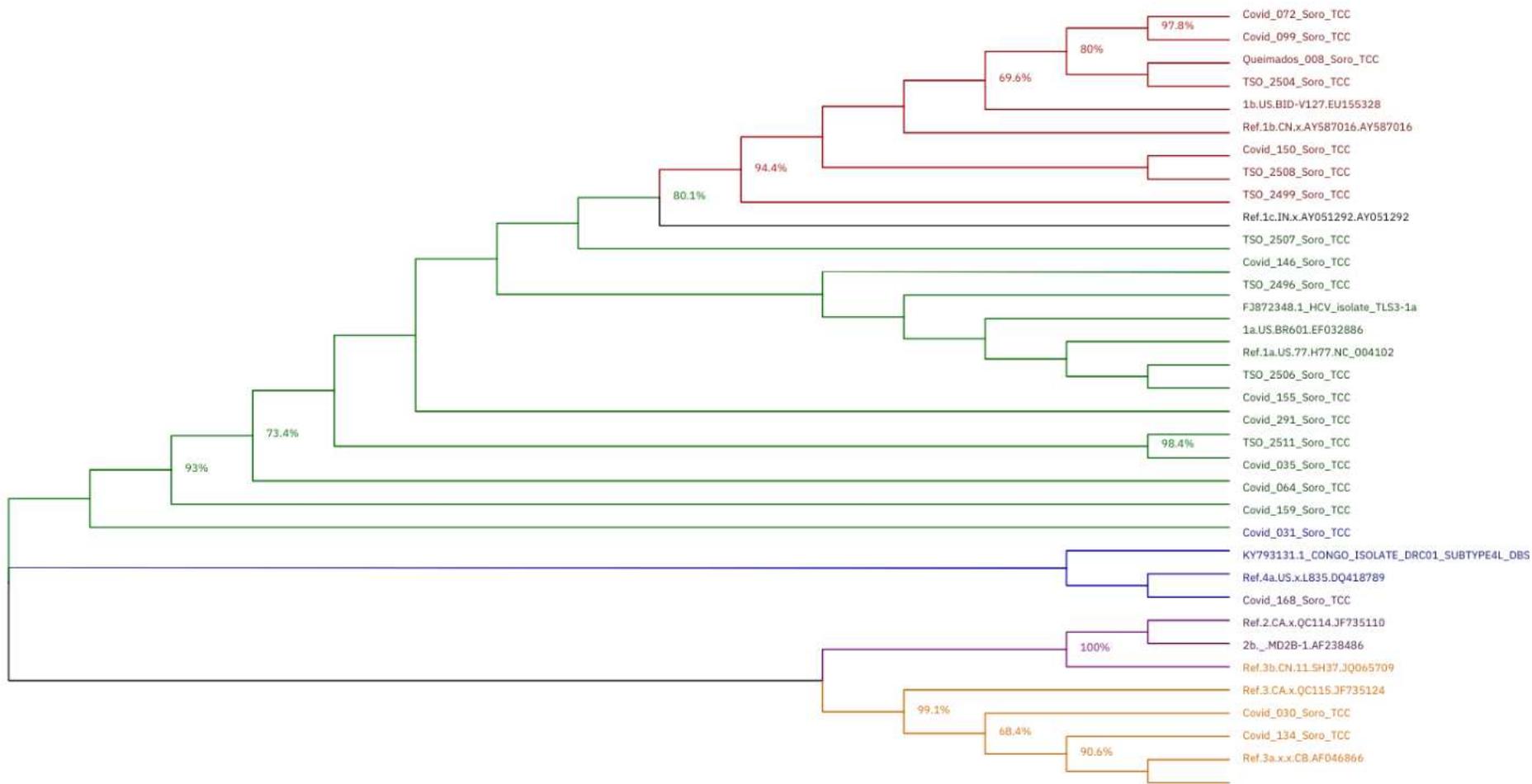
Das 21 amostras de soro incluídas no presente trabalho, observou-se a seguinte prevalência genotípica das estirpes do HCV: 80,8% (17/21) do genótipo 1, sendo 58,9% (10/17) do subtipo 1a e 41,1% (7/17) do subtipo 1b, 9,6% (2/21) do subtipo 3a, 4,8% (1/21) do subtipo

4a e 4,8% (1/21) do subtipo 2b (gráfico 1). A figura 12 representa uma árvore filogenética demonstrando a relação evolutiva das seqüências de soro analisadas com um consenso de seqüências referência representativo dos subtipos 1a, 1b, 2a, 3a e 4a do HCV.

Nenhum paciente anti-HCV não reagente foi detectado na PCR ou no sequenciamento, confirmando a especificidade da genotipagem de 100%.



**Gráfico 1. Genótipos do grupo amostral.** O primeiro gráfico de pizza representa os genótipos do HCV mais prevalentes do grupo amostral, sendo 7 amostras do subtipo 1a e 10 do subtipo 1b. Os genótipos do HCV das 4 amostras restantes, 19% (4/21) do grupo amostral, foi respectivamente 2 amostras 3a, 1 amostra 4a e uma 2a.

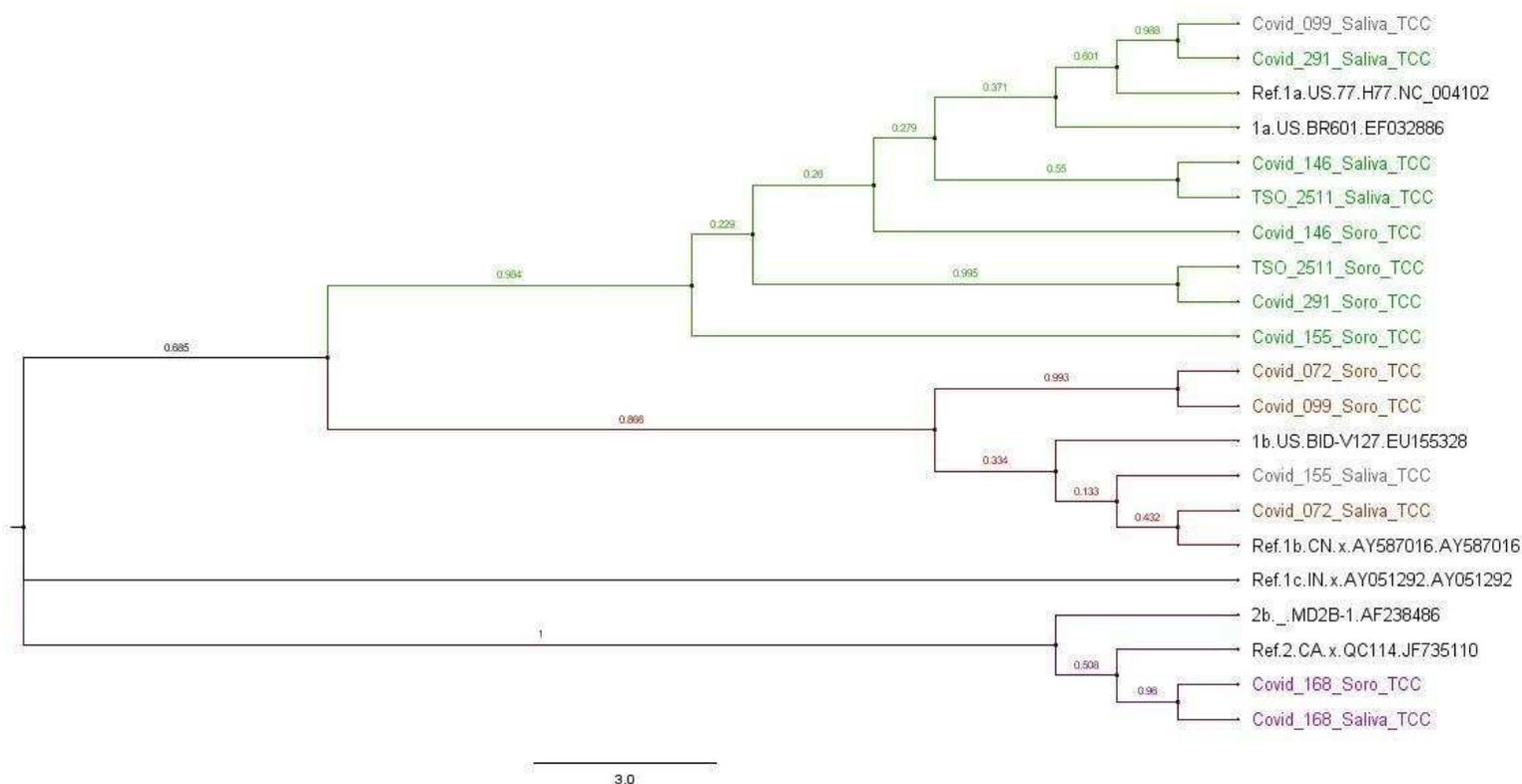


**Figura 12.** Árvore filogenética das sequências de soro e referências dos principais subtipos do HCV. As sequências que representam referências de subtipos estão coloridas com a cor representativa de seu clado, sendo 1a verde, 1b vermelho, 2b roxo, 3a laranja e 4a ciano. A árvore filogenética foi feita com o modelo Tamura Nei com distribuição de Gamma (T92+G) e 1000 replicatas.

### 5.3.2 Genotipagem em saliva

Como já dito antes, dez amostras de salivas extraídas amplificaram na PCR e todas foram sequenciadas. Porém, somente 7 delas conseguiram ser classificadas a nível de genótipo e subtipo, visto que as três amostras restantes resultaram em um eletroferograma com muita degradação.

A figura 13 abaixo representa a árvore filogenética das sete amostras de saliva possíveis de ser classificada em genótipo e subtipo, as sequências geradas de seus respectivos soros e sequências de referências dos subtipos.

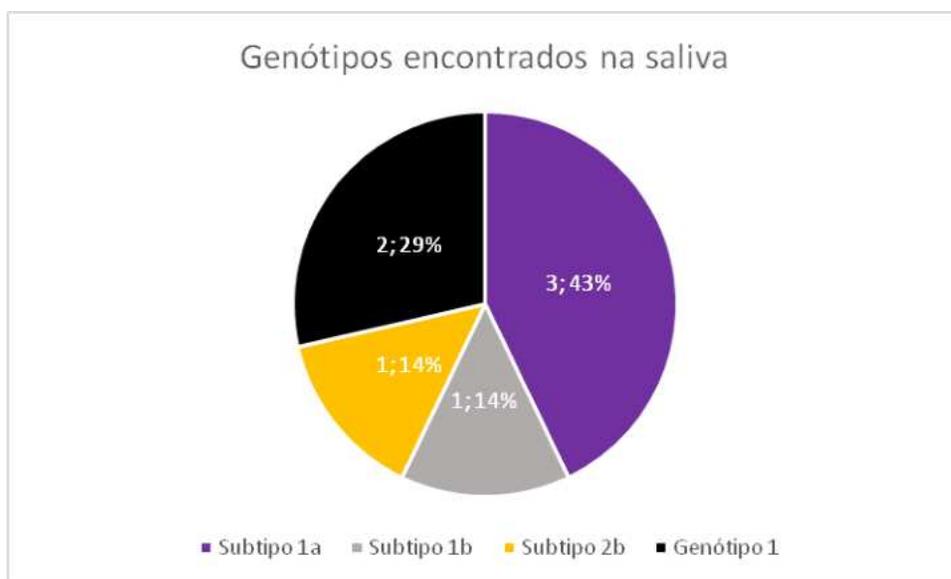


**Figura 13.** Árvore filogenética das sequências de saliva e soro pareadas e referências dos principais subtipos do HCV. As sequências que representam referências de subtipos estão coloridas com a cor representativa de seu clado, sendo 1a verde, 1b vermelho e 2b roxo. As sequências de saliva que não foram subtipo concordante com seus respectivos soros estão

grifadas em cinza. A árvore filogenética foi feita com o modelo Tamura Nei com distribuição de Gamma (T92+G) e 1000 replicatas.

De forma geral, todas as amostras de saliva tiveram classificação em genótipo correspondente com a sua sequência de soro, o que resultou em uma concordância de 100% entre os genótipos das amostras pareadas. Porém, duas amostras divergiram na classificação em subtipo de seus respectivos soros, resultando uma concordância de 71% entre os subtipos das amostras pareadas.

Conforme o gráfico abaixo demonstra, o resultado da genotipagem em saliva foi: 3 amostras corretamente classificadas do subtipo 1a (43%, 3/7), 1 amostra do subtipo 1b (14%, 1/7), 1 amostra do subtipo 2b (14%,1/7) e 2 amostras (29%,2/7) foram classificadas corretamente a nível de genótipo somente, conforme o gráfico 2 representa.



**Gráfico 2. Genotipagem resultante da saliva.** O gráfico representa a genotipagem de saliva que foi concordante com o soro. 71% das amostras foram classificadas corretamente em subtipo (1a:3, 1b:1, 2b:1) e 2 amostras (29%) foram classificadas corretamente em genótipo, mas divergiram de sua respectiva sequência de soro em subtipo.

#### 5.3.4 Distância genética quando comparado soro e saliva

A distância genética foi calculada par a par (*pairwise*) dentro da subpopulação de soro, da saliva e entre as duas subpopulações para um melhor entendimento das sequências geradas

nos fluídos. A distância média foi calculada para nucleotídeos (distância nucleotídica) e aminoácidos (distância peptídica) destas populações. Os resultados estão descritos na Tabela 4.

**Tabela 4. Distância média intra e entre subpopulações de soro e saliva para nucleotídeos e aminoácido.**

<b>Grupo</b>	<b>Distância Média</b>
De Nucleotídeos	
<b>Soro</b>	<b>0,214</b>
<b>Saliva</b>	<b>0,272</b>
<b>Entre soro e saliva</b>	<b>0,227</b>
De aminoácidos	
<b>Soro</b>	<b>0,156</b>
<b>Saliva</b>	<b>0,213</b>
<b>Entre soro e saliva</b>	<b>0,169</b>

Ademais, a distância entre a sequência amplificada na saliva para a sua respectiva sequência amplificada do soro de cada amostra individualmente foi estimada. Essa análise foi feita tanto para distância nucleotídica como também para distância peptídica, conforme a Tabela 5 apresenta.

**Tabela 5.** Estimativas da divergência evolutiva entre soro e saliva de cada amostra pareada, em distância nucleotídica peptídica

<b>Amostra</b>	<b>Distância nucleotídica</b>	<b>Distância peptídica</b>
<b>Covid 72 TCC</b>	0,089	0,051
<b>Covid 99 TCC</b>	0,211	0,123
<b>Covid 146 TCC</b>	0,235	0,044
<b>Covid 155 TCC</b>	0,854	0,339
<b>Covid 168 TCC</b>	0,020	0,012
<b>Covid 291 TCC</b>	0,152	0,062
<b>TSO 2511 TCC</b>	0,151	0,024

Quando relacionado o resultado da genotipagem em saliva e a distância genética, foi possível observar que a distância média de todo o grupo de saliva em relação aos seus

respectivos soros foi de  $0,2445 \pm 0,0722$  em nucleotídeo e de  $0,0935 \pm 0,1054$  em aminoácido. O subgrupo da genotipagem concordante em subtipo (5/7) teve uma média de distância nucleotídica de  $0,1294 \pm 0,071$  e peptídica de  $0,0386 \pm 0,0181$ . Enquanto o subgrupo que teve a genotipagem concordante somente em nível de genótipo (2/7) teve uma média de distância nucleotídica de 0,5325 e peptídica de 0,231. A diferença entre os dois subgrupos foi de uma distância média nucleotídica de 0,4031 e peptídica de 0,1924.

Também, quando compilados todos os resultados laboratoriais e de data de coleta das amostras de saliva (Tabela 6), não é possível encontrar algum padrão que justifique a divergência em subtipo das duas amostras.

**Tabela 6.** Compilado dos resultados laboratoriais e de data de coleta das amostras genotipadas em saliva, com as duas amostras que divergiram na genotipagem a nível de subtipo em negrito.

Amostra	Genotipagem em soro	Genotipagem em saliva	Distância nucleotídica de seu respectivo soro	Carga viral encontrado no soro (log)	DO/CO resultante do anti-HCV	Data de coleta
Covid 72 TCC	1b	1b	0,089	5.35	4.172	4/6/2020
<b>Covid 99 TCC</b>	<b>1b</b>	<b>1a</b>	<b>0,211</b>	<b>4,78</b>	<b>4,087</b>	<b>25/6/2020</b>
Covid 146 TCC	1a	1a	0,235	5.51	4.149	7/8/2020
<b>Covid 155 TCC</b>	<b>1a</b>	<b>1b</b>	<b>0,854</b>	<b>6.32</b>	<b>4.110</b>	<b>11/8/2020</b>
Covid 168 TCC	2b	2b	0,020	6.1	3.695	21/8/2020
Covid 291 TCC	1a	1a	0,152	6.38	4.121	15/12/2020
TSO 2511 TCC	1a	1a	0,151	6.67	12	16/12/2022

## 6. DISCUSSÃO

De acordo com o plano de eliminação das hepatites virais B e C da OMS (OMS, 2016), um maior alcance e mapeamento de certas micro populações são essenciais para a eliminação do HCV. Dentre essas micropopulações, se saliente as quais possuem uma punção venosa difícil, como pacientes em situação de rua, usuários de droga e pessoas de maior idade. Desta forma, o objetivo geral desta pesquisa foi padronizar um fluxograma de trabalho para a genotipagem do HCV em sequenciamento nucleotídico a partir da saliva.

A saliva é um material biológico não invasivo, de fácil coleta e com detecção do HCV RNA comprovada (Mendonça *et al.*, 2022). Apesar de a saliva ser um fluido com citocinas, RNAses e outros possíveis agentes de degradação de RNA (Ostheim *et al.*, 2020), alguns trabalhos da literatura indicaram que possa ocorrer alguma manifestação extra-hepática resultante infecção nas glândulas salivares, como câncer nas glândulas salivares ou associação com doenças periodontais (Carozzo, 2008; Borsetto, 2020). Todo esse compilado de informações pode indicar uma possibilidade de que o RNA do HCV presente na saliva seja íntegro o suficiente para ser sequenciado. Na literatura, poucos estudos pesquisaram o potencial de sequenciamento do RNA do HCV RNA. Especificamente, dois estudos apontaram a possibilidade deste RNA ser genotipado: um com genotipagem por RFLP (Farías *et al.*, 2010) e um por Sequenase (produto da antiga empresa Amersham Life Sciences, Reino Unido que foi adquirida por GE Healthcare, Estados Unidos) (Roy *et al.*, 1998). Essas metodologias, porém, são ultrapassadas e não apresentam o escopo de informação que o sequenciamento nucleotídeo pode oferecer.

O trabalho teve um grupo amostral de 31 pacientes atendidos no Ambulatório de Hepatites Virais (AHV, Fiocruz), sendo 21 pacientes crônicos com anti-HCV reagente e HCV RNA detectável. O grupo amostral total tinha uma idade média de  $46,5 \pm 12,1$  anos, enquanto o subgrupo HCV reagente tinha uma idade média relativamente mais alta, de  $68,1 \pm 12,1$  anos. A idade média alta é comum na epidemiologia da hepatite C, visto que sendo uma doença silenciosa, a notificação e diagnóstico desta pode acontecer até décadas após a infecção (Licata *et al.*, 2022). Corroborando esta hipótese, de acordo com o último Boletim Epidemiológico do Brasil (2023), 23,3% do total de casos das últimas duas décadas foram diagnosticados em pessoas acima de 60 anos. Este fato, por sua vez, enfatiza ainda mais a necessidade de ampliação

do diagnóstico da hepatite C. O subgrupo dos pacientes infectados pelo HCV (n=21) apresentou um nível de formação e renda familiar menor quando comparado ao grupo controle.

De acordo com Kardashian e colaboradores (2023), as hepatites como um todo são doenças socioeconômicas, ao passo que populações mais pobres e com menor nível de formação são mais vulneráveis a ela, ao passo que estas populações possuem uma maior dificuldade a um diagnóstico primário, acarretando em uma maior taxa de cronificação e conseqüente espalhando da doença. O que é corroborado com os dados socioepidemiológicos encontrados neste presente estudo.

A fim de alcançar um fluxograma de trabalho otimizado para genotipagem de saliva, estratégias para uma otimização da extração e amplificação do HCV RNA em saliva foram analisadas, de forma a (i) aumentar a pureza e concentração do RNA (ii) tornar o protocolo mais sensível a baixas concentrações de ácido nucléico, visto que a carga viral do HCV na saliva é menor do que a encontrado no soro (Mendonça *et al*, 2022). Ademais, um método de extração otimizado é ainda mais importante para a amplificação de RNA em especial, devido à necessidade da transcrição reversa *a priori*, como elaborado por Marques e colaboradores em 2013.

No intuito de aperfeiçoar a extração de RNA do material salivar, foram analisadas as seguintes estratégias: Extração manual de membrana de sílica pelo kit “QIAamp Viral RNA Mini Kit”; Extração automatizada pelo equipamento “chemagic Prepito” (PerkinElmer) com o “Prepito Pathogen NA Kit”; Extração automatizada seguida por TurboDNase (ThermoFisher Scientific) com posterior concentração pelo kit “RNA Clean and Concentration System” (Zymo Research); Extração automatizada seguida por concentração pelo kit RNA ReliaPrep (PROMEGA). De acordo com Marques *et al.* (2013), a extração manual pelo kit “QIAamp Viral RNA Mini Kit” correspondeu ao melhor método de extração por membrana de sílica para HCV em fluidos alternativos, como sangue seco em papel de filtro. Ademais, estudo de Hongjaisee e colaboradores (2022), o qual comparou a extração de HCV RNA em plasma por partículas magnéticas, membrana de sílica e um outro protocolo (ebulição com água destilada tratada com pirocarbonato de dietilo), apresentou que os dois primeiros métodos de extração supracitados possuem uma eficácia parecida, porém a extração por membrana de sílica conseguiu reter uma concentração de RNA maior.

Entretanto, para a extração do HCV RNA em saliva, a extração automatizada por partículas magnéticas apresentou melhores resultados e um perfil eletroforético mais nítido. Acredita-se que a divergência desse resultado com os estudos anteriores seja devido ao ambiente salivar. Em específico, acredita-se que a membrana de sílica não seja tão eficaz em reter alguns componentes do ambiente salivar, de forma a contaminar e inibir o ácido nucléico extraído. Essas dificuldades são bem relatadas no trabalho de Bhati e colaboradores (2021), que padronizou um método de extração de partículas magnéticas para extração do DNA genômico a partir da saliva.

Ademais, no trabalho de Bhati e colaboradores, é salientado a importância do processamento da amostra para a estabilidade do fluido salivar. De acordo com Bhati, o fluido salivar é muito instável e o tampão de eluição da coleta do fluido e a forma de armazenamento são as principais variáveis pertinentes ao trabalho molecular deste fluido. Essa hipótese também se confirmou nos nossos resultados, ao passo que as amostras que amplificaram possuíam um escopo variado de carga viral e nível de DO/CO variado na reação com anti-HCV, induzindo que o que foi essencial para a amplificação ou não do genoma foram fatores inerentes ao processamento da amostra em si. No trabalho de Cruz e colaboradores (2012), é também pontuado que o coletor utilizado influencia diretamente na sensibilidade. Neste trabalho, foi analisado o uso de diferentes coletores, como o Salivette e cuspe, para detecção do anti-HCV. Para o estudo em questão, o Salivette apresentou uma sensibilidade de 93,94% e especificidade de 100%, enquanto o cuspe 84,85% e 98,41%.

Outra hipótese pertinente a extração, seria a de que para a realização da extração automatizada não há a manipulação humana inerente à extração manual, o que pode também ter diminuído a concentração final no método pelo kit “QIAamp Viral RNA Mini Kit”.

Dada a escolha da extração automatizada como método de extração, foi analisado o impacto de uma posterior concentração de RNA para uma melhor sensibilidade. Desta forma, foram analisadas duas estratégias de concentração, (i) pela enzima “TurboDNase” e kit “RNA Clean and Concentration System” da empresa Zymo Research e (ii) pelo kit “ReliaPrep RNA” da empresa Promega. Suponha-se que a atuação da “TurboDNase” possa ter interferido na integridade do RNA da saliva, e por isso não conseguiu concentrar o ácido nucléico. E, tal como dito por Bhati *et al.* (2021), suponha-se que a concentração por “ReliaPrep RNA” não tenha sido

tão eficaz por ser uma metodologia que se embasa por membrana de sílica. Desta forma, a metodologia de extração escolhida foi a extração automatizada sem nenhuma concentração *a posteriori*. Quando comparados os resultados de concentração de RNA extraído e o perfil das amostras amplificadas, percebeu-se que as amostras mais antigas obtiveram um pior resultado. Isto corrobora com os achados de Cruz e colaboradores (2011) visto que a saliva em ambientes exógenos é pouco estável, salientando a importância de um tampão de eluição extração imediatamente após a coleta. Isso, por sua vez, apresenta uma limitação, ao passo que que é necessária uma certa infraestrutura local para já acontecer a extração seguida imediatamente após a coleta, o que não é a realidade de todos os hospitais e laboratórios do país.

No intuito de otimizar a amplificação, duas diferentes estratégias foram analisadas: (i) PCR *One-Step* e (ii) cDNA com PCR, a qual a PCR *One-Step* apresentou melhores resultados. Como o RNA extraído de saliva possui contaminantes, é possível que a PCR por cDNA não tenha funcionado porque esses contaminantes e os reagentes de 3 reações moleculares diferentes (cDNA, primeira PCR e segunda PCR) possam ter inibido a reação. Por sua vez, a PCR *One-Step* funcionou melhor. Para otimizá-la ainda mais, a concentração de diferentes reagentes foi analisada.

Com o protocolo otimizado, foi possível obter uma sensibilidade de 47,6% na amplificação. Esse número não é tão sensível como o diagnóstico em soro já preconizado pelo Ministério de Saúde. Porém, estima-se que 78,6% dos infectados por HCV ainda não foram diagnosticados (Cui *et al.*, 2023), principalmente devido à falta de uma infraestrutura para armazenamento e transporte para o sangue ou por uma dificuldade da punção venosa, em micropopulações como usuários de drogas e idosos. Apesar de não ser tão sensível, o protocolo em saliva poderia ser uma forma de facilitar o diagnóstico para essas populações, sendo um meio para corroborar um diagnóstico por teste rápido, ao passo que a realização de um teste rápido seguida por uma genotipagem da saliva poderia fornecer resultados moleculares para pacientes que não possam realizar punção venosa. Porém, novos estudos deverão ser realizados para aumentar a sensibilidade do fluxograma em saliva. Um dos parâmetros que pode ser reavaliado para uma melhor sensibilidade, são os parâmetros pertinente ao processamento da saliva, tal como bem descrito por Bathi e colaboradores (2021).

A genotipagem do HCV através de sequenciamento nucleotídico e posterior filogenia foi realizada para as amostras amplificadas. O genótipo mais prevalente no grupo amostral em soro foi o 1, seguido pelo 3. Esse enquadramento é similar ao quadro epidemiológico mundial, ao passo que os genótipos mais prevalentes mundialmente são o genótipo 1 (33,4% para o subtipo 1b e 31% para o subtipo 1a) seguido do genótipo 3 (30,2%) (Gower *et al.*, 2014). No referido estudo, o subtipo 1b apresentou maior prevalência, tal como na população do presente trabalho. Dados de vigilância genômica para o HCV, principalmente monoinfectados são escassos, então não foi possível afirmar se o perfil do grupo amostral foi semelhante ao quadro epidemiológico da população brasileira atualmente. Porém, estudo de Campiotto e colaboradores (2005) indicou uma prevalência significativa dos genótipos 1 (64,9%) e 3 (30,2%), o que também foi corroborado por Lampe (2013). Da mesma forma, o trabalho de Silva e colaboradores (2019) sobre o perfil das hepatites em pacientes coinfectados com HIV demonstrou uma prevalência 73,8% do genótipo 1 e 21,4% do genótipo 3 no Brasil. A prevalência dos subtipos 1a e 1b na epidemiologia do HCV se dá por dois fatores: (i) associação específica com rota de infecção, ou seja, uma maior associação dos subtipos 1a e 3a à infecção por via intravenosa a partir de substâncias ilícitas (Asten, 2004 *apud* SawadaI, 2011) e (ii) mutações de resistência em proteínas do HCV de estirpes virais dos subtipos 1a e 3a que influenciam diretamente na falha terapêutica (Ding *et al.*, 2021).

Das amostras de saliva amplificadas, foi possível genotipar 70% (7/10), visto que três amostras apresentaram um eletroferograma com uma alta quantidade de *gaps* e degenerações o que dificultou sua análise. Todas as amostras de salivas genotipadas apresentaram concordância em genótipo (100%) e 71% apresentaram concordância em subtipo. Resultando, desta forma, em 3 amostras do subtipo 1a (43%), 1 amostra do subtipo 1b (14%), 1 do subtipo 2b (14%) e 2 amostras (29%) classificadas corretamente a nível de genótipo somente. Uma discussão específica e pertinente a genotipagem do HCV em saliva por sequenciamento nucleotídica é difícil devido à ausência de dados sobre o tema, visto que somente dois estudos propuseram-se a genotipar o HCV por este fluido. Porém, nos estudos anteriores de genotipagem por saliva (Farías *et al.*, 2010; Roy *et al.*, 1998) os autores obtiveram respectivamente uma sensibilidade da genotipagem de 14,2% e 18,7% em pacientes HCV monoinfectados. Em contra ponto, o presente estudo apresentou uma sensibilidade de 47,6% (10/21) na amplificação; A acurácia do sequenciamento foi de 100% (7/7) na genotipagem a nível de genótipo e 71,4% (5/7) a nível de

subtipo. Desta forma, o presente estudo foi o com maior capacidade de genotipagem do HCV em saliva já realizado. Não obstante, é provável que a sensibilidade da genotipagem aumente ainda mais com futuras padronizações do protocolo de amplificação da PCR *One-Step*.

Outrossim, foi realizado o cálculo de distância genética. A distância genética nucleotídica dentro do grupo de soro foi de 0,214 enquanto a peptídica foi de 0,156. Essa distância genética relativamente alta dentro o grupo amostral demonstra que o vírus apresenta uma alta taxa de diversidade genética, como apontado por Tsukiyama-Kohara e Kohara (2017). Mais especificamente, a taxa de mutação do HCV é considerada uma das maiores taxas de mutações de vírus de RNA, incluindo retrovírus (Kim, 1996 *apud* Echeverría, 2015). O que justifica essa divergência nucleotídica e peptídica mesmo dentro de um grupo que pareça, em primeira instância, pouco diverso (sendo 80,8% (17/21) das amostras genótipo 1, 9,6% (2/21) genótipo 3, 4,8% (1/21) genótipo 4 e 4,8% (1/21) genótipo 2).

Ademais, os dados de distância genética entre a população de soro e saliva foram relativamente baixos, à luz da alta diversidade genética do HCV, sendo uma distância nucleotídica de 0,227 e peptídica de 0,169.

Entretanto, quando comparada à distância genética entre o soro e a saliva das amostras que tiveram uma genotipagem de subtipo concordante em saliva, identificou-se uma média de distância de 0,1294 em soro e 0,0386 em aminoácido. Como esse cálculo de distância em específico feita por fluídos biológicos de um mesmo paciente, se esperasse que a distância genética fosse menor. Em estudos de Lago e colaboradores (2023) a distância genética entre as amostras de HBV, um vírus com uma variabilidade genética bem menor, coletado por soro e saliva foi de até 0.006, enquanto a distância genética coletada entre soro e sangue seco em papel de filtro (SSPF, em inglês *dried blood spot*) foi de até 0.115. Isso pode induzir que o aumento significativo na distância genética do soro e saliva de uma mesma amostra de HCV deste estudo possa ser (i) devido à alta taxa de degradações encontradas (ii) devido a replicação ativa do HCV no sítio salivar, como sugerido por Roy e colaboradores (1998). Uma replicação ativa com a alta taxa de mutação e replicação do HCV, aumentaria a distância genética da estirpe encontrada no soro e na saliva. De acordo com Roy em sua discussão, é debatido que talvez a divergência genética em diferentes sítios de replicação do HCV seja tão grande a justificar subtipos e genótipos diferentes em um mesmo indivíduo, o que também já foi sugerido por Domingo e

Perales (2019) em seu trabalho sobre quasispecies. Esse dado, por sua vez, corroboraria o dado das 2 amostras de saliva em que foi encontrado o mesmo genótipo do que o soro, porém subtipos diferentes.

Desta forma, foi possível observar um grande potencial da saliva para genotipagem do HCV e uma estabilidade genômica suficiente para analisar posições e resíduos de interesse, por exemplo, o que Adeboyejo e colaboradores (2023) salientou ser importante analisar em pacientes de falha terapêutica para o alcance da eliminação do HCV até 2030 como a OMS estabeleceu.

De forma geral, devido à baixa sensibilidade do fluxograma, o protocolo de genotipagem do HCV em saliva não seria capaz de substituir o protocolo em soro, mas poderia auxiliá-lo em uma atuação nas micropopulações o qual não é possível a realização da punção venosa. Ademais, a distância nucleotídica e peptídica das amostras sequenciadas apresentou uma integridade genômica promissora, o que salienta que a saliva é um fluido biológico interessante e que pode agregar nas pesquisas do HCV e ajudar a cumprir as metas que a OMS estabeleceu em 2016.

## 7. CONCLUSÃO

- O método de extração padronizado para a saliva foi de extração automatizada pelo equipamento da PerkinElmer;
- Conforme já estabelecido na rotina laboratorial, o protocolo de amplificação por PCR *in house* do gene NS5B do HCV demonstrou ser eficiente na detecção qualitativa de RNA do HCV em amostras de soro. Já para saliva, após modificações de protocolo, o RNA do HCV foi detectado, porém, o ideal seria evitar o armazenamento prolongado por meses visto que pode ocorrer degradação do RNA viral;
- Conforme esperado, o genótipo 1 do HCV demonstrou ser o mais prevalente tanto em amostras de soro quanto saliva;

- As sequências de nucleotídeos genotipadas a partir de amostras de saliva apresentaram uma distância genética relativamente baixa, sugerindo que este fluido pode ser utilizado para análises nucleotídicas e peptídicas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adeboyejo, K.; King, B.J.; Tsoleridis, T.; Tarr, A.W.; McLauchlan, J.; Irving, W.L., *et al* (2023). Hepatitis C subtyping assay failure in UK patients born in sub-Saharan Africa: Implications for global treatment and elimination. *J Med Virol*.v.95, pag.e28178.
- Agbor, V. N.; Tagny, C. T; Kenmegne, J; *et al.* (2018). Prevalence of anti-hepatitis C antibodies and its co-infection with HIV in rural Cameroon. *BMC Research Notes*, v. 11, pag. 459.
- Artini, M.; Scoarughi, G.L; Papa, R.; Dolci, G.; De Luca, M.; Orsini, G.; Pappalardo, S.; Costerton, J.W.; Selan, L. (2008). Specific anti cross-infection measures may help to prevent viral contamination of dental unit waterlines: a pilot study. *Infection*. vol.36, pag.467-71.
- Bagaglio, S.; Uberti-Foppa, C.; Di Serio, C.; Trentini, F.; Andolina, A.; Hasson, H.; Messina, E.; Merli, M.; Porrino, L.; Lazzarin, A.; Morsica, G. (2015). Dynamic of Mixed HCV Infection in Plasma and PBMC of HIV/HCV Patients Under Treatment With Peg-IFN/Ribavirin. *Medicine*. vol. 94, pag. e1876
- Barría, M.I.; Vera-Otarola, J.; León, U.; Vollrath, V.; Marsac, D.; Riquelme, A.; López-Lastra, M.; Soza, A. (2008). Influence of extrahepatic viral infection on the natural history of hepatitis C. *Ann Hepatol*. vol. 7, pag.136-43.
- Basyte-Bacevice, V.; Kupcinskis, J. (2020). Evolution and Revolution of Hepatitis C Management: From Non-A, Non-B Hepatitis Toward Global Elimination. *Digestive Diseases*, v. 38, pag. 137–142.
- Benova, L.; Mohamoud, Y.; Calvert, C.; *et al.* (2014). Vertical transmission of hepatitis C virus: systematic review and meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 59, pag. 765–773.
- Benzaken, A.S.; Girade, R.; Catapan, E. (2019) Hepatitis C disease burden and strategies for elimination by 2030 in Brazil. A mathematical modeling approach. *The Brazilian journal of infectious diseases*. vol. 23, pag.182-90.
- Bhati, A.; Varghese, A.; Rajan, G.; Sridhar, V.; Mohan, Y.; Pradeep, S.; *et al.* (2021). An effective method for saliva stabilization and magnetic nanoparticles based DNA extraction for genomic applications. *Anal Biochem*. pag. 624:114182.
- Biasi, D.; Colombari, R.; Achille, A.; Carletto, A.; Caramashi, P.; Corrocher, R.; Bambara, L.M. (1995). HCV RNA detection in parotid gland biopsy in a patient with chronic hepatitis C virus liver disease. *Acta Gastroenterol Belg*. vol. 58, pag.465-9.
- Borsetto, D.; Fussey, J.; Fabris, L. (2020). HCV infection and the risk of head and neck cancer: A meta-analysis. *Oral Oncology*, v. 109, pag. 104869.
- Brasil. Ministério da Saúde. (2018). Manual Técnico para o Diagnóstico das Hepatites Virais - 2ª Ed, 2018. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções. Sexualmente Transmissíveis, do HIV/AIDS e das Hepatites Virais. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/noticias/manual-tecnico-para-odiagnostico-das-hepatites-virais-e-atualizado>. Acesso em: 24 mar. 2023.
- Bukh, Jens. (2016) 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, pag. S2–S21.
- Cacoub, P.; Comarmond, C.; Domont, F.; Savey, L.; Desbois, A.C.; Saadoun, D. (2016). Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C virus infection. *Ther Adv Infect Dis*. vol. 3, pag. 3-14.

- Caldeira, P. C.; Oliveira, K. R. O. e S.; Silva, T. A.; Grossmann, S. de M. C.; Teixeira, R.; Carmo, M. A. V. do. (2013). Correlation between salivary anti-HCV antibodies and HCV RNA in saliva and salivary glands of patients with chronic hepatitis C. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v. 42, pag. 222–228.
- Cantos-Barreda, A.; Escribano, D.; Egui, A.; Thomas, M. C. (2019). One-year follow-up of anti-Leishmania antibody concentrations in serum and saliva from experimentally infected dogs. *International Journal for Parasitology*, v. 49, pag. 893–900.
- Carriquí-Madroñal, B.; Lasswitz, L.; Von Hahn, T.; *et al.* (2023). Genetic and pharmacological perturbation of hepatitis-C virus entry. *Current Opinion in Virology*, v. 62, pag. 101362.
- Carrozzo, M. (2008). Oral diseases associated with hepatitis C virus infection Part 1. sialadenitis and salivary glands lymphoma. *Oral Diseases*, v. 14, pag. 123–130.
- Castro, G. L. C. d; Amoras, E. da G. S.; Araújo, M. S. M. de; Conde, S. R. S. de S., Vallinoto, A. C. R. (2020). Hepatitis C virus genotypes and associated risk factors in the state of Pará, Northern Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 24, pag. 304–309.
- Campiotto, S.; Pinho, J. R. R.; Carrilho, F. J.; Silva, F. J. D. da, Souto, V., Spinelli, L. M.M. B., Pereira, H.S. M., Coelho, A. O., Silva, J. C., Fonseca H., Rosa, C.M.C, Lacet, Bernandin, A.P. (2005). Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 38, pag. 41–49.
- Campollo, O.; Amaya, G.; McCormick, P. A. (2022). Milestones in the discovery of hepatitis C. *World Journal of Gastroenterology*, v. 28, pag. 5395–5402.
- Cecere, A.; Marotta, F.; Vangieri, B.; Tancredi, L.; Gattoni, A. (2004). Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection is related to altered cellular immune response and to different cytokine profile. *Panminerva Med.* Vol. 46, pag.171-87.
- Chanes, C. R. (2018). Sequenciamento e análise filogenética de amostras de Zika virus no Brasil. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) - Universidade Católica de Brasília.
- Chen, Q.; Perales, C.; Soria, M.E.; García-Cehic, D.; Gregori, J.; Rodríguez-Frías, F. *et al.* (2020). Deep-sequencing reveals broad subtype-specific HCV resistance mutations associated with treatment failure. *Antiviral Res.* vol. 174.
- Chigbu, D. I.; Loonawat, R.; Sehgal, M.; Patel, D.; Jain, P. (2019). Hepatitis C Virus Infection: Host-Virus Interaction and Mechanisms of Viral Persistence. *Cells*, vol. 8, pag 376
- Child, C.G.; Turcotte, J.G. (1964) Surgery and Portal Hypertension. In: Child, C.G., Ed., *The Liver and Portal Hypertension*, Saunders, pag. 50-64.
- Choo, Q. L.; Richman, K. H.; Han, J. H.; *et al.* (1991). Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 88, pag. 2451–2455.
- Choo, Q.L.; Kuo, G.; Weiner, A.J.; Overby, L.R.; Bradley, D.W.; Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. v.62, pag.244:359.
- Couzigou, P.; Richard L.; Dumas F.; Schouler L.; Fleury H. (1993). Detection of HCV-RNA in saliva of patients with chronic hepatitis C. *Gut*. vol. 34(2 Suppl)
- Croom, H.A.; Richards, K.M.; Best, S.J.; Francis, B.H.; Johnson, E.I.; Dax, E.M.; Wilson, K.M. (2006). Commercial enzyme immunoassay adapted for the detection of antibodies to hepatitis C virus in dried blood spots. *J Clin Virol.* vol. 36, pag. 68-71

Cruz, H.M.; da Silva, E.F.; Villela-Nogueira, C.A.; Nabuco, L.C.; do Ó, K.M.; Lewis-Ximenez, L.L.; Yoshida, C.F.; Lampe, E.; Villar, L.M. (2011). Evaluation of saliva specimens as an alternative sampling method to detect hepatitis B surface antigen. *J Clin Lab Anal.* v25

Cui, F.; Blach, S.; Mingiedi, C. M.; et al. (2023) Global reporting of progress towards elimination of hepatitis B and hepatitis C. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, vol. 8, pag. 332–342.

Cuevas, J. M.; González-Candelas, F.; Moya, A.; *et al.* (2009). Effect of Ribavirin on the Mutation Rate and Spectrum of Hepatitis C Virus In Vivo. *Journal of Virology*, v. 83, pag. 5760–5764.

Danilescu, C. M.; Ionescu, M.; Sandulescu, D., L.; *et al.* (2022) Perceived Stress in Hepatitis C Virus Infected Patients under the DAA-Based Therapy. *Diagnostics*, v. 12, pag. 1177.

Dijk, E. L. van; Jaszczyszyn, Y.; Naquin, D.; Thermes, C. (2018). The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends in Genetics*, vol. 34, pag. 666–681.

Ding, Y.; Lu, C.; Chen, W.; Tung, S.; Wei, K.; Shen C.; Hsieh, Y.; Yen, C.; Chang, K.; Chiu, W.; Hung, C.; Lu, S.; Chang, T. (2021.) Pangenotypic direct-acting antiviral agents for mixed genotype hepatitis C infection: A real-world effectiveness analysis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol 36, pag. 2911–2916.

Domingo, E.; Perales, C. (2019). Viral quasispecies. *PLoS Genetics*, vol. 15, pag. e1008271.

Dörr, J. B. (2012) .Escalonamento de tarefas no fechamento de lacunas em plataformas de sequenciamento genético de nova geração. Dissertação (Mestrado em Informática) - Universidade Federal do Paraná.

Dubuisson, J.; Cosset, F. (2014). Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle – An update. *Journal of Hepatology*, v. 61, pag. S3–S13.

Elsana, S.; Sikuler, E.; Yaari, A.; Shemer-Avni, Y.; Abu-Shakra, M.; Buskila, D.; Katzman, P.; Naggan, L.; Margalith, M. (1998). HCV antibodies in saliva and urine. *J Med Virol.* vol. 55, pag. 24-7.

Erensoy, S. (2021). Diagnosis of hepatitis C infection and laboratory monitoring of its therapy. *Journal of Clinical Virology*, vol. 21, pag. 271-281.

Eugenia, Q.R.; Ana, Q.R.; Carmen, M. (2001). Investigation of saliva, faeces, urine or semen samples for the presence of GBV-C RNA. *Eur J Epidemiol.* vol. 17, pag.271-4.

Farahani, H.; Alae, M.; Amri, J.; Baghinia, M.; Rafiee, M. (2020). Serum and Saliva Concentrations of Biochemical Parameters in Men with Prostate Cancer and Benign Prostate Hyperplasia. *Laboratory Medicine*, v. 51, pag. 243–251.

Farías, A.; Ré, V.; Mengarelli, S.; Kremer, L.; Pisano, M.B.; Allende, L.; Nicolás, J.; Elbarcha, O.; Contigiani, M. (2010). Detection of hepatitis C virus (HCV) in body fluids from HCV monoinfected and HCV/HIV coinfecting patients. *Hepatogastroenterology.* vol 57, pag.300-4.

Fraiture, M.; Saltykova, A.; Hoffman, S.; Winand, R.; Deforce, D.; Vanneste, K.; Keersmaecker, S. C. J. de; Roosens, N. H. C. (2018). Nanopore sequencing technology: a new route for the fast detection of unauthorized GMO. *Sci Rep* vol. 8.

Feinstone, S. M.; Kapikian, A. Z.; Purcell, R. H.; *et al.* (1975). Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *The New England Journal of Medicine*, v. 292, pag. 767–770.

Ferreiro, M.C.; Prieto, M.H.; Rodríguez, S.B.; Vázquez, R.L.; Iglesias, A.C.; Dios, P.D. (2002). Whole stimulated salivary flow in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Oral Pathol Med.* vol. 31, pag.117-20.

Fiore, R.J.; Potenza, D.; Monno, L.; Appice, A.; DiStefano, M.; Giannelli, A.; LaGrasta, L.; Romanelli, C.; DiBari, C.; Pastore, G. (1995) Detection of HCV RNA in serum and seminal fluid from HIV-1 co-infected intravenous drug addicts. *J Med Virol.* vol 46, pag. 364-7.

Galli, A.; Bukh, J. (2023). Mechanisms and Consequences of Genetic Variation in Hepatitis C Virus (HCV). *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 439, pag. 237–264.

Gheorghe, D.N.; Foia, L.; Toma, V.; Surdu, A.; Herascu, E.; Popescu, D.M.; Surlin, P.; Vere, C.C.; Rogoveanu, I. (2018). Hepatitis C Infection and Periodontal Disease: Is there a Common Immunological Link? *J Immunol Res.*

Glynn, S.A.; Wright, D.J.; Kleinman, S.H.; Hirschhorn, D.; Tu, Y.; Heldebrandt, C.; Smith, R.; Giachetti, C.; Gallarda, J.; Busch, M.P. (2005). Dynamics of viremia in early hepatitis C virus infection. *Transfusion.* vol. 45, pag. 994-1002.

Gower, E.; Estes, C.; Blach, S.; Shearer, K., R.; Razavi, H. (2014). Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology*, v. 61, page S45–S57.

Guntipalli, P; Pakala, R.; Kumari Gara, S.; *et al.* (2021) Worldwide prevalence, genotype distribution and management of hepatitis C. *Acta Gastro-Enterologica Belgica*, v. 84, pag. 637–656.

Hall, B. G. (2013). Building Phylogenetic Trees from Molecular Data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution*, v. 30, pag. 1229–1235.

Hoorneborg, E.; Coyer, L.; Boyd, A.; Achterbergh, R.C.A.; Schim van der Loeff, M.F.; Bruisten, S.; de Vries, H.J.C.; Koopsen, J.; van de Laar, T.J.W.; Prins, M.; Amsterdam PrEP Project team in the HIV Transmission Elimination AMsterdam (H-TEAM) Initiative. (2020). High incidence of HCV in HIV-negative men who have sex with men using pre-exposure prophylaxis. *J Hepatol.* vol. 72, pag. 855-864.

Hongjaisee, S.; Jabjainai, Y.; Sakset, S; Preechasuth, K; Ngo-Giang-Huong, N; Khamduang, W. (2022). Comparison of Simple RNA Extraction Methods for Molecular Diagnosis of Hepatitis C Virus in Plasma. *Diagnostics.* v.12, pag.1599.

Irekeola, A. A; Ear, E. N. S.; *et Al.* (2022). Antivirals against HCV infection: the story thus far. *Journal of Infection in Developing Countries*, vol. 16, pag. 231–243.

Jargalsaikhan, G.; Eichner, M.; Boldbaatar, D.; *et al.* 2020. Sensitivity and specificity of commercially available rapid diagnostic tests for viral hepatitis B and C screening in serum samples. *PLoS One.*

Jorgensen, C.; Legouffe, M.C.; Perney, P.; Coste, J.; Tissot, B.; Segarra, C.; Bologna, C.; Bourrat, L.; Combe, B.; Blanc, F.; Sany, J. (1996). Sicca syndrome associated with hepatitis C virus infection. *Arthritis Rheum.* vol. 39, pag. 1166-71.

Kahyesh-Esfandiary, R.; Sadigh, Z.A.; Esghaei, M.; Bastani, M.N.; Donyavi, T.; Najafi, A.; Fakhim, A.; Bokharai-Salim, F. (2018). Detection of HCV genome in peripheral blood mononuclear cells of Iranian seropositive and HCV RNA negative in plasma of patients with beta-thalassemia major: Occult HCV infection. *J Med Virol.* vol.91, pag.107-114.

Kardashian, A; Serper, M; Terrault, N; Nephew, L.D. (2023). Health disparities in chronic liver disease. *Hepatology.* vol.77, pag.1382-1403.

Korber B. e Myers, G. (1992). Signature Pattern Analysis: A Method for Assessing Viral Sequence Relatedness. *AIDS Research and Hum. Retroviruses*, 1992 Sep; vol. 8, pag. 1549-1560.

- Klofera, M.; Chalupa, P.; Jezek, P. (1994). Hepatitis C antibodies (anti-HCV) in blood donors at the transfusion department in Brno. *Cas Lek Cesk* . vol. 133, pag. 459-62.
- Komiyama, K.; Moro, I.; Mastuda, Y.; Morshed, S.A.; Nishioka, M.; Hayashi N.; Shikata T. (1991). HCV in saliva of chronic hepatitis patients having dental treatment. *Lancet*. vol.338, pag. 572-3.
- Komiyama, K.; Kawamura, F.; Arakawa, Y.; Mastuo, H.; Hayashi, N.; Shikata, T.; Moro, I. (1995). Detection of hepatitis C virus (HCV)-RNA in saliva and gastric juice. *Adv Exp Med Biol*. vol. 371B, pag.995-7.
- Kuna, L.; Jakab, J.; Smolic, R.; Wu, G.Y.; Smolic, M. (2019). HCV Extrahepatic Manifestations. *J Clin Transl Hepatol*. vol. 7, pag.172-182.
- Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.
- Lago, B.V. do; Bezerra, C.S.; Moreira, D.A.; Parente, T.E.; Portilho, M.M.; Pessôa, R.; Sanabani, S.S.; Villar, L.M. (2023) Genetic diversity of hepatitis B virus quasispecies in different biological compartments reveals distinct genotypes. *Sci Rep*. v13, pag.17023.
- Lang, J. E.; Magbanua, M. J. M.; Scott, J. H.; Makrigiorgos, G. M.; Wang, G.; Esserman, L. J.; Park, J. W.; Hagg, C. M. (2009). A comparison of RNA amplification techniques at sub-nanogram input concentration. *BMC Genomics*, vol. 10, pag 326.
- Law, J.; Jovel, J.; Patterson, J.; Ford, G.; O'keefe, S.; Wang, W.; Meng, B.; Song, D.; Zhang, Y.; Tian, Z.; Wasilenko, S.T.; Rahbari, M.; Mitchell, T.; Jordan, T.; Carpenter, E.; Mason, A.L.; Wong, G.K. (2013). Identification of hepatotropic viruses from plasma using deep sequencing: a next generation diagnostic tool. *PLoS One*. vol. 8, pag. e60595.
- Lawitz, E. J.; Dvory-Sobol, H.; Doehle, B.P.; Worth, A. S.; McNally, J.; Brainard, D. M.; Link, J. O.; Miller, M. D.; Mo, H. (2016). Clinical Resistance to Velpatasvir (GS-5816), a Novel Pan-Genotypic Inhibitor of the Hepatitis C Virus NS5A Protein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 60, pag. 5368–5378.
- Li, H.; Yang, C.; Lo, S. (2021). Cellular factors involved in the hepatitis C virus life cycle. *World Journal of Gastroenterology*, v. 27, pag. 4555–4581.
- Li, H.; Yang, C.; Lo, S. (2021). Hepatitis C Viral Replication Complex. *Viruses*, v. 13, pag. 520.
- Liou, T.C.; Chang, T.T.; Young, K.C.; Lin, X.Z.; Lin, C.Y.; Wu H.L. (1992). Detection of HCV RNA in saliva, urine, seminal fluid, and ascites. *J Med Virol*. vol. 37, pag.197-202.
- Licata A.; Minissale, M.G.; Giannitrapani, L.; Montalto, F.A.; Lombardo, C.; Mirarchi, L, *et al.* (2022). Comorbidities impact and de-prescribing in elderly with HCV-related liver disease: analysis of a prospective cohort. *Intern Emerg Med*. vol.17, pag. 43-51.
- Liu, J. e Duan, Y. (2012). Saliva: a potential media for disease diagnostics and monitoring. *Oral Oncology*, vol.48, pag. 569-7.
- Lo Re V. (2017). Extrahepatic Complications of Hepatitis C Virus Infection in HIV and the Impact of Successful Antiviral Treatment. *Clin Infect Dis*. vol. 64, pag. 498-500.
- Lontok, E.; Harrington, P.; Howe, A; Kieffer, T.; Lennerstrand, J.; Lenz, O.; McPhee, F.; Mo, H.; Parkin, N.; Pilot-Matias, T.; Miller, V. (2015). Hepatitis C virus drug resistance-associated substitutions: State of the art summary. *Hepatology*, vol. 62, pag. 1623–1632

Maldonado, J.O., Beach, M.E., *et al.* 2022. HCV Infection Alters Salivary Gland Histology and Saliva Composition. *J Dent Res*.

Manns, M.; Maasoumy, B. (2022). Breakthroughs in hepatitis C research: from discovery to cure. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, v. 19, pag. 533–550.

Manns, M.P.; Buti, M.; Gane, E.; Pawlotsky, J.M.; Razavi, H.; Terrault, N.; Younossi, Z. (2017). Hepatitis C Virus Infection. *Nature Reviews Disease Primers*. vol. 2, pag. 17006.

Marques, B. L. C.; do Espírito-Santo, M.P.; Marques, V. A.; Miguel, J. C.; da Silva, E. F.; Villela-Nogueira, C. A.; Villar, L. M. (2016). Evaluation of dried blood spot samples for hepatitis C virus detection and quantification. *Journal of Clinical Virology*, vol.82, pag. 139–144.

Martins, P. P. (2010). Avaliação de metodologias moleculares para detecção e quantificação do vírus da Hepatite C. 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro

Martins, P. P.; Lampe, E.; Lewis-Ximenez, L.L.; de Souza, P.S.; Fernandes, C.A.; Villar, L. M. (2013). Performance of molecular methods for hepatitis C virus diagnosis: usefulness among chronic cases and during the course of infection. *Clin. Lab*. vol.59, pag. 1031-9.

Martinez, M. A.; Franco, S. (2020). Therapy Implications of Hepatitis C Virus Genetic Diversity. *Viruses*, v. 13, pag. 41.

Mega X. Estimating Evolutionary Distances. Disponível em: <[https://www.megasoftware.net/web\\_help\\_11/Part\\_I\\_Getting\\_Started/A\\_Walk\\_Through\\_MEGA/Estimating\\_Evolutionary\\_Distances.htm](https://www.megasoftware.net/web_help_11/Part_I_Getting_Started/A_Walk_Through_MEGA/Estimating_Evolutionary_Distances.htm)>. Acesso em: 10 nov 2023

Mendonca, A. C. F.; Portilho, M.M. ; Silva, J. C. ; Caetano, A. R. ; Lewis, L. L. ; Villar, L.M. (2022) .Optimization Of A Real Time PCR Methodology For HCV RNA Quantification In Saliva Samples. *Journal Of Virological Methods*, vol. 302, pag. 114470.

Minh, B.Q.; Schmidt, H.A.; Chernomor, O.; Schrempf, D.; Woodhams, M.D.; von Haeseler, A.; Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Mol. Biol. Evol.* Vol. 37, pag. 1530–1534.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2023. Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2023>>. Acesso em 17 de setembro de 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2023) Nota técnica Número 30/2023-CGAHV/.DVIAHV/SVSA/MS. Rio de Janeiro: MS. Disponível em <[https://www.gov.br/aids/pt-br/centrais-de-conteudo/notas-tecnicas/2023/nota-tecnica-no-30-sei\\_ms-0031654799.pdf/view](https://www.gov.br/aids/pt-br/centrais-de-conteudo/notas-tecnicas/2023/nota-tecnica-no-30-sei_ms-0031654799.pdf/view)>. Acesso 15 maio 2023.

Morozov, V. A.; Lagaye, S. (2018). Hepatitis C virus: Morphogenesis, infection and therapy. *World J Hepatol*, vol. 10, pag. 186-212.

Murayama, A.; Sugiyama, N.; Suzuki, R.; Moriyama, M.; Nakamura, N.; Mochizuki, H.; Wakita, T.; Kato, T. (2017). Amino Acid Mutations in the NS4A Region of Hepatitis C Virus Contribute to Viral Replication and Infectious Virus Production. *Journal of Virology*, v. 91, pag. e02124-16.

Numata, N.; Otori, H.; Hayakawa, Y.; Saitoh, Y.; Tsunoda, A.; Kanno A. (1993). Demonstration of hepatitis C virus genome in saliva and urine of patients with type C hepatitis: usefulness of the single round polymerase chain reaction method for detection of the HCV genome. *J Med Virol*. vol.41, pag.120-8.

Nutini, M. F. R.; Hunter, J.; Giron, L.; Pires, A. F. N.P.C.; Kohiyama, I. M.; Camargo, M.; Sucupira, M. C. A.; Benzaken, A. S.; Ferreira, P. A.; Truong, H. M.; Diaz, R. S. (2020). HCV genotype profile in Brazil of mono-infected and HIV co-infected individuals: A survey representative of an entire country. PLOS ONE, v. 15, pag. e0227082.

Organização Mundial da Saúde (OMS). (2021a). Hepatitis C. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>>. Acesso em 15 de Outubro de 2022.

Organização Mundial da Saúde (OMS). (2016) Combating Hepatitis B and C to reach elimination by 2030. Disponível em: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/206453/WHO\\_HIV\\_2016.04eng.pdf;jsessionid=BBE2DFFFD9C483C03094CFE9C10ACFA5?sequence=](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/206453/WHO_HIV_2016.04eng.pdf;jsessionid=BBE2DFFFD9C483C03094CFE9C10ACFA5?sequence=). Acesso em 10 de Fevereiro de 2023.

Organização Mundial Da Saúde (OMS). (2023). Global health sector strategies on, respectively, HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections for the period 2022-2030. Disponível em: <<https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240053779>>. Acesso em 10 de Maio de 2023.

Ostheim, P; Tichý, A.; Sirak, I.; Davidkova, M.; Stastna, M.M.; Kultova, G.; Paunesku, T.; *et al* (2020). Overcoming challenges in human saliva gene expression measurements. Sci Rep. v10, pag. 11147.

Palladino, C.; Ezeonwumelu, I. J.; Marcelino, R.; *et al.* (2018). Epidemic history of hepatitis C virus genotypes and subtypes in Portugal. Scientific Reports, v. 8, pag. 12266.

Pareek, C. S.; Smoczynski, R.; Tretyn, A. (2011). Sequencing technologies and genome sequencing. Journal of Applied Genetics, v. 52, pag. 413–435.

Park, S., Hahn, Y. S. (2023). Hepatocytes infected with hepatitis C virus change immunological features in the liver microenvironment. Clin Mol Hepatol.v.29, pag. 65-76.

Pater, A.A.; Bosmeny, M.S.; White, A.A.; Sylvain, R.J.; Eddington, S.B.; Parasrampur, M.; Ovington, K.N.; Metz, P.E.; Yinusa, A.O.; Barkau, C.L.; Chilamkurthy, R.; Benzinger, S.W.; Hebert, M.M.; Gagnon, K.T. (2021). High Throughput Nanopore Sequencing Of SARS-Cov-2 Viral Genomes From Patient Samples. J Biol Methods. vol. 27(COVID 19 Spec Iss), pag. e155.

Paolucci, S.; Premoli, M., Novati, S., Gulminetti, R., Maserati, R., Barbarini, G., Sacchi, P., Piralla, A., Sassera, D., Marco, Leone de, Girello, A., Mondelli, M. U., Baldanti, F., (2017). Baseline and Breakthrough Resistance Mutations in HCV Patients Failing DAAs. Scientific Reports, vol. 7, pag. 16017.

Pedrana, A.; Munari, S.; Stoové, M.; *Et Al.* (2021). The phases of hepatitis C elimination: achieving WHO elimination targets. The Lancet Gastroenterology & Hepatology, v. 6, pag. 6–8.

Perlejewski, K.; Bukowska-Oško, I.; Rydzanicz, M.; Pawelczyk, A.; Cortes, K. C.; Osuch, S.; Paciorek, M.; Dzieciatkowski, T.; Radkowski M.; Laskus, T. (2020). Next-generation sequencing in the diagnosis of viral encephalitis: sensitivity and clinical limitations. Sci Rep. vol.10, pag.16173.

Petersen, L. M.; Martin, I. W.; Moschetti, Wayne E.; *et al*(2019). Third-Generation Sequencing in the Clinical Laboratory: Exploring the Advantages and Challenges of Nanopore Sequencing. Journal of Clinical Microbiology, vol. 58, pag. e01315-19.

Perales, C. (2018). Quasispecies dynamics and clinical significance of hepatitis C virus (HCV) antiviral resistance. International journal of antimicrobial agents. vol. 10, pag. 105562.

Peres-da-Silva, A.; Brandão-Mello, C.; E., Lampe, E. (2017). Prevalence of Sofosbuvir Resistance-Associated Variants in Brazilian and Worldwide NS5B Sequences of Genotype-1 HCV. *antiviral therapy journal*. vol. 22, pag. 447-451.

PerkinElmer (2019). Protocol for Prepito DNA Blood250 Kit. Disponível em <<https://jp.chemagen.com/wp-content/uploads/2019/02/CMG-2002-Prepito-DNA-Blood250-Kit.pdf>>. Acesso em: 25 nov 2023

Pol, S.; Lagaye, S. (2019). The remarkable history of the hepatitis C virus. *Genes & Immunity*, v. 20, pag. 436–446.

Polo, M.L.; Laufer, N. (2017). Extrahepatic manifestations of HCV: the role of direct acting antivirals. *Expert Rev Anti Infect Ther*. vol. 15, pag. 737-746.

Portilho, M. M.; Bezerra, C. S.; Mendonça, A. C. Da F.; *Et Al.* (2021). Applicability of oral fluid samples for tracking hepatitis B virus mutations, genotyping, and phylogenetic analysis. *Archives of Virology*, v. 166, pag. 2435–2442.

Portilho, M.M.; Bezerra, C.S.; Mendonça, A.C.D.F.; Marques, V.A.; Nabuco, L.C.; Villela- Nogueira, C.A.; Ivantes, C.A.P.; Lewis-Ximenez, L.L.; Do Lago, B.V.; Puchhammer-Stöckl, E.; Mor, W.; Kundi, M.; Heinz, F.X.; Hofmann, H.; Kunz, C. (1994) Prevalence of hepatitis-C virus RNA in serum and throat washings of children with chronic hepatitis. *J Med Virol*.vol.43, pag.143-7.

Pugliese, D.B.; Bruzzesi, G.; Montaldo, C.; Porcu, L.; Landi, M.; Mastinu, A.; Torri, V.; Licitra, L.; Locati, L.D. (2015). Oral prevalence and clearance of oncogenic human papilloma virus in a rehabilitation community for substance abusers in Italy: a case of behavioral correction? *J Oral Pathol Med*. Vol. 44, pag, 728-33.

Reid, M.; Price, J. C.; Tien, P. C. (2017). Hepatitis C Virus Infection in the Older Patient. *Infectious disease clinics of North America*, vol. 31, pag. 827–838.

Ribeiro, R.M.; Li, H.; Wang, S.; Stoddard, M.B.; Learn, G.H.; Korber, B.T.; *et al.* (2012). Quantifying the diversification of hepatitis C virus (HCV) during primary infection: estimates of the in vivo mutation rate. *PLoS pathogens*. vol.8, pag.e1002881.

Roudot-Thoraval, F. (2021). Epidemiology of hepatitis C virus infection. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, v. 45, pag. 101596

Roy, K.M.; Bagg, J.; Mccarron, B.; Good, T.; Cameron, S.; Pithie, A. (1998). Predominance of HCV type 2a in saliva from intravenous drug users. *J Med Virol*. Vol.54, pag.271-5.

Sachithanandham, J.; Balagopal, A.; Leep-Lazar, J.; Quinn, J.; Bowden, K.; Ward, K.; Ribeiro, R.M.; Sulkowski, M.S. (2023). Second-Phase Hepatitis C Plasma Viral Kinetics Directly Reflects Reduced Intrahepatic Burden of Hepatitis C Virus. *J Infect Dis*. vol. 11, pag. 311-320.

Sandres-Sauné, K.; Deny, P.; Pasquier, C.; *et al.* (2003) Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of the NS5B region. *Journal of Virological Methods*, vol. 109, pag. 187–193.

Saldanha J., Minor, P. (1996). Collaborative study to assess the suitability of an HCV RNA reference sample for detection of an HCV RNA in plasma pools by PCR. *Vox Sang*. vol. 70, pag. 148-51.

Sawada, L.; Pinheiro, A. C. C.; Locks, D.; *et al.* (2011). Distribution of hepatitis C virus genotypes among different exposure categories in the State of Pará, Brazilian Amazon. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 44, pag. 8–12.

Schmidt, W.N.; Klinzman, D.; LaBrecque, D.R.; Macfarlane, D.E.; Stapleton J.T. (1995). Direct detection of hepatitis C virus (HCV) RNA from whole blood, and comparison with HCV RNA in plasma and peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol*. vol. 47, pag. 153-60.

SEEFF, Leonard B. (2009). The history of the “natural history” of hepatitis C (1968-2009). *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, v. 29 Suppl 1, pag. 89–99.

SciExperts. Instat. Disponível em <<https://sciexperts.com/instat/features/>>. Acesso em: 10 dez 2023

Silva, C. M. Da; Peder, L. D. De; Thomazella, M. V.T; Et Al. (2019). Profile of HCV genotypes and HIV-subtypes among HIV-coinfected patients in Southern Brazil. *Arquivos De Gastroenterologia*, vol. 56, pag. 344–350.

Simmonds, P.; Bukh, J.; Combet, C.; Deleage, G.; Enomoto, N.; Feinstone, S.; *et al.* (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. vol. 42, pag. 962-73.

Sociedade Brasileira de Hepatologia. Doença Hepática. Disponível em <[https://www.sbhepatologia.org.br/pdf/manual\\_hepatopatia\\_grave.pdf](https://www.sbhepatologia.org.br/pdf/manual_hepatopatia_grave.pdf)> Acessi en 17 de outubro de 2023.

Smith, D. B.; Bukh, J.; Kuiken, C.; *et al.* HCV Classification -A web resource to manage the classification and genotype and subtype assignments of hepatitis C virus. ICTV. Disponível em: <[https://talk.ictvonline.org/ictv\\_wikis/flaviviridae/w/sg\\_flavi/56/hcv-classification](https://talk.ictvonline.org/ictv_wikis/flaviviridae/w/sg_flavi/56/hcv-classification)>. Acesso em: 07 setembro 2022.

Storopoli, J. e Vils, L. (2021). Teste de Médias – ANOVA Paramétrica e Não-Paramétrica. Disponível em <https://storopoli.io/Estatistica/4-ANOVA.html>. Acesso em 20 nov. 2023

Sugimura, H.; Yamamoto, H.; Watabiki, H.; Ogawa, H.; Harada, H; Saitoh, I.; Miyamura, T; Inoue, M.; Tajima, K.; Kino, I. (1995). Correlation of detectability of hepatitis C virus genome in saliva of elderly Japanese symptomatic HCV carriers with their hepatic function. *Infection*. vol. 23, pag. 258-62.

Tsukiyama-Kohara, K.; Kohara, M. (2017). Hepatitis C Virus: Viral Quasispecies and Genotypes. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, pag. 23.

Villalba, B.; Johnson, K. A. (2020). Rate-limiting pyrophosphate release by hepatitis C virus polymerase NS5B improves fidelity. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 295, pag. 16436–16444.

Villar, L. M; Costa, V; D. Da; Marques, B. C. L.; *et al.* (2021). USEFULNESS OF SALIVA SAMPLES FOR DETECTING SARS-CoV-2 RNA AMONG LIVER DISEASE PATIENTS. *The Journal of Infection*, v. 82, pag. e4–e5.

Wang, J.T.; Wang, T.H.; Sheu, J.C.; Lin, J.T.; Chen, D.S. (1992). Hepatitis C virus RNA in saliva of patients with posttransfusion hepatitis and low efficiency of transmission among spouses. *J Med Virol*. vol. 36, pag. 28-31.

Westermann, C.; Peters, C.; Lisiak, B. (2015). The prevalence of hepatitis C among healthcare workers: a systematic review and meta-analysis. *Occupational and Environmental Medicine*, v. 72, pag. 880–888.

Young K.C.; Chang T.T.; Liou T.C.; Wu H.L. (1993). Detection of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells and in saliva. *J Med Virol*. vol. 41, pag.55-60.

Zhang, M.; Huang, Y.; Godson, D. L.; Et Al. (2020). Assessment of Metagenomic Sequencing and qPCR for Detection of Influenza D Virus in Bovine Respiratory Tract Samples. *Viruses*, vol. 12, pag. 814.

Zuckerman, A. J. The elusive hepatitis C virus. (1989). *British Medical Journal*, v. 299, pag. 871–873.

Zuckerandl E.; Pauling L. (1965). Evolutionary divergence and convergence in proteins. *Evolving Genes and Proteins* by V. Bryson and H.J. Vogel, pag. 97-166.