

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 31/07/2021.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO
DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Cristiane Nonato da Silva

**Avaliação da Variabilidade de uma Biblioteca
de Anticorpos construída a partir de sangue
de pacientes com Hepatite C Crônica com
diferentes Graus de Fibrose**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Rejane Maria Tommasini Grotto
Coorientador(a): Dr(a). Flávia Hebelers Barbosa Trovão

**Botucatu
2019**

Cristiane Nonato da Silva

Avaliação da Variabilidade de uma Biblioteca de
Anticorpos construída a partir de sangue de pacientes
com Hepatite C Crônica com Diferentes Graus de
Fibrose

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Patologia.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Rejane Maria Tommasini Grotto
Coorientador(a): Dr(a). Flávia Hebeler Barbosa Trovão

Botucatu
2019

Ficha Catalográfica

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Silva, Cristiane Nonato da.

Avaliação da variabilidade de uma biblioteca de anticorpos construída a partir de sangue de pacientes com hepatite C crônica com diferentes graus de fibrose / Cristiane Nonato da Silva. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Rejane Maria Tommasini Grotto
Coorientador: Flávia Hebelers Barbosa Trovão
Capes: 40105008

1. Cirrose hepática. 2. Hepatite C. 3. Imunoglobulinas.

Palavras-chave: Fibrose Hepática; Hepatite C; Imunoglobulina.

Dedicatória

Dedico este trabalho...

...À minha amada família, pela oportunidade de uma boa formação, por todo amor e paciência durante essa jornada...

Agradecimentos

Aos meus pais, sem vocês, nada disso seria possível.

À professora e orientadora Dra. Rejane, pela oportunidade, apoio e pela confiança até mesmo nos momentos que duvidei da minha capacidade. Muito obrigada pela oportunidade e ensinamentos.

À minha coorientadora Dra. Flávia, pelo auxílio técnico e disponibilidade para resolução de problemas, para que conseguíssemos chegar ao objetivo proposto.

À Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini, por disponibilizar o laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro, para realização deste trabalho.

Aos queridos funcionários e amigos do laboratório (Rotina e Pesquisa) pelo nosso cafezinho de todos os dias, por todo apoio e suporte.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Com vocês, divido minha alegria.

Epígrafe

*Bem-aventurado o homem que acha sabedoria, e o homem que
adquire conhecimento... (Provérbios 3:13)*

Prefácio

Neste volume é apresentada a Dissertação de Mestrado de Cristiane Nonato da Silva.

*Este trabalho foi subdividido em capítulos da forma que se segue: (I) Levantamento Teórico: breve descrição dos conceitos e bibliografia para contextualizar o cenário de desenvolvimento do trabalho; Objetivos do trabalho; (II) Versão preliminar do artigo: *Profile of Expressed Antibodies in Patients with Chronic Hepatitis with Different Degrees of Hepatic Fibrosis*, nas normas da revista *Frontiers in Immunology*; (III) Conclusão: breve conclusão do trabalho realizado evidenciando sua contribuição para a academia.*

Resumo

Resumo:

A progressão da fibrose hepática somada à infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) tem sido associada à resposta imunológica permanente. O estudo no repertório de anticorpos Anti-VHC na progressão da fibrose hepática foi explorado através de ferramentas de sequenciamento em larga escala (NGS) possibilitando uma análise de repertórios altamente variáveis como as porções variáveis VH (cadeia pesada) e V κ (cadeia leve) das imunoglobulinas, e a determinação de famílias e subfamílias dos genes V-D-J associadas à resposta humoral encontrada nas diferentes fases da doença proporcionam uma ferramenta importante no entendimento da resposta imune frente à infecção viral pelo VHC. As porções VH e V κ das imunoglobulinas foram obtidas a partir da amplificação de RNA de sangue de paciente VHC positivos e com diferentes graus de fibrose, e sequenciadas na plataforma Illumina® Miseq, fornecendo uma grande variabilidade de sequências que foram pré-processadas por ferramentas de bioinformática e analisadas em dois bancos de anticorpos diferentes: IgBlast (NCBI) e IMGT® quanto às famílias e subfamílias mais expressas. A expressão restrita de algumas famílias e subfamílias:IGHV1, IGHV3, IGHV4 e subfamílias já descritas em vários estudos associados ao VHC corrobora com nossos achados de que existe uma tendência do uso de algumas subfamílias como: IGHV1-2, IGHV1-8, IGVH1-69, IGHV3-11, IGHV3-21, IGHV3-23, IGVH3-30, IGHV4-4, IGHV4-34 IGHV4-39 na cadeia pesada; assim como IG κ V3-15 e IG κ V3-20 na cadeia leve, porém as subfamílias: IGHV1-8, IGHV3-11, IGHV4-39, IG κ V1-5, IG κ V1-12, IG κ V1-39 também estavam entre as mais expressas, indicando que estas subfamílias também podem estar relacionadas a expressão preferencial induzida pelo vírus em detrimento de outras; como encontramos na família IGVH3 que estava menos expressa no grupo F3/F4 de fibrose avançada; resultado esse inovador na literatura relacionada ao VHC o sugere uma mudança no padrão de resposta imunológica à medida que a doença progride.

Palavras-chave: Fibrose Hepática, Hepatite C, Imunoglobulina.

Abstract

Abstract:

The progression of hepatic fibrosis in the hepatitis C virus (HCV) infection has been linked with permanent immune response. The study in the repertoire of Anti-HCV antibodies in the progression of hepatic fibrosis was analysed for large-scale sequencing (NGS) tools enabling a highly variable analysis such as the VH (heavy chain) and V κ (light chain) portions of immunoglobulins and the determination of families and subfamilies of the V-D-J genes in the humoral response found in the different phases of the disease, a great tool in the understanding of the immune response to HCV viral infection. The VH and V portions of the immunoglobulins were obtained from the amplification of HCV positive HCV patient blood with different degrees of fibrosis and sequenced on the Illumina® Miseq platform, providing a large sequence variability that was preprocessed by tools of bioinformatics and analyzed in two different antibody banks: IgBlast (NCBI) and IMGT® for the most expressed families and subfamilies. The restricted expression of some families: IGHV1, IGHV3, IGHV4 and subfamilies already described in several HCV-related studies confirm our findings that there is a tendency to use some subfamilies, such as: IGHV1-2, IGHV1-8, IGVD1-69, IGHV3-11, IGHV3-21, IGHV3-23, IGVD3-30, IGHV4-4, IGHV4-34 IGHV4-39 in the heavy chain; as well as IG κ V3-15 and IG κ V3-20 in the light chain, but the subfamilies: IGHV1-8, IGHV3-11, IGHV4-39, IG κ V1-5, IG κ V1-12, IG κ V1-39 were also among the most expressed, indicating that these subfamilies may also be related to preferential expression induced by the virus over others; as found in the IGVD3 family, which was less expressed in the advanced fibrosis group F3/F4; result this groundbreaking finding in the HCV literature suggests a change in the pattern of immune response as the disease progresses.

Key words: Hepatic Fibrosis, Hepatitis C, Immunoglobulin.

Sumário

Sumário

Resumo	
Abstract	
Capítulo I: Revisão de Literatura	18
1.0 A infecção pelo vírus da Hepatite C	19
1.1 Fibrose Hepática	20
1.2 Tratamento da infecção pelo VHC	21
1.3 Anticorpos	21
1.4 Sequenciamento de Nova Geração (NGS) e Ferramentas de Análise	23
1.5 Software de Análise: IgBlast e IMGT	24
1.6 Alvos para o VHC	25
2. Referências Bibliográficas	27
3. Objetivo	31
Capítulo II: Artigo a ser submetido na <i>Frontiers Immunology</i>	32
1. Título: PERFIL DE ANTICORPOS EXPRESSOS EM PACIENTES PORTADORES DE HEPATITE C CRÔNICA COM DIFERENTES GRAUS DE FIBROSE HEPÁTICA	33
Capítulo III: Conclusão	62
1. Conclusão	63
2. Referências Bibliográficas	64

1. Capítulo I: Revisão de Literatura

1.0 A infecção pelo Vírus da Hepatite C

O vírus da hepatite C (VHC), pertence à família *Flaviviridae*, possui tropismo preferencial por células hepáticas e é atualmente uma das maiores causas de doença hepática no mundo. Dados recentes da Organização Mundial de Saúde mostram uma alta taxa de infecção pelo VHC com estimativas de aproximadamente 71 milhões de pessoas em todo mundo. A infecção pelo VHC causa distúrbios hepáticos e cerca de 70% dos indivíduos infectados desenvolvem uma infecção crônica que pode levar a cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC). A infecção possui caráter silencioso na fase inicial da doença, sendo inicialmente assintomática na maioria dos casos, e os infectados geralmente desconhecem a infecção até os sintomas aparecerem nas fases tardias da doença, quando o dano hepático já na maioria das vezes é irreversível. A necessidade de diagnóstico nas fases iniciais da doença determina o sucesso na resposta ao tratamento para eliminação do vírus (1).

O vírus da hepatite C é um vírus de RNA, de polaridade positiva, pertence ao gênero *Hepacivirus*. Atualmente são descritos sete genótipos e 67 subtipos que possuem pelo menos 33 ou 15% de variação na sequência de nucleotídeos, e é constituído por um capsídeo que contém o genoma viral envolto por uma membrana derivada do retículo endoplasmático coroado pelas proteínas do envelope E1-E2. As proteínas E1 e E2 são glicoproteínas tipo I com domínios transmembranares C-terminais que formam um heterodímero no envelope viral que promove a entrada do vírus nas células hospedeiras, o que envolve interações do vírus com glicosaminoglicanos de superfície celular da célula hospedeira e com outras proteínas necessárias à ligação e internalização do vírus, como a tetraspanina CD81, membro de classe B do receptor de limpeza 1 (SR-B1), claudina-1, e ocludina que são essenciais para entrada do vírus (1,10).

A proteína E2 atua como a proteína de ligação ao receptor do VHC e interage diretamente com o CD81 e o SR-B1. Enquanto a proteína E1 parece ajudar a modular as interações do receptor E2 e a fusão com a membrana da célula hospedeira. A proteína E2 tem sido amplamente estudada como alvo de anticorpos neutralizantes (bNAbs) sugerindo um papel importante no mecanismo de neutralização viral e o bloqueio das interações entre E2 e seu receptor CD81 (27).

2. Referências Bibliográficas:

1. Alazard-Dany N, Denolly S, Boson B, Cosset FL. Overview of HCV Life Cycle with a Special Focus on Current and Possible Future Antiviral Targets. *Viruses*. 2019; 11(1): 1-18. doi: 10.3390/v11010030.
2. Andrews S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
3. Arcaini, L et al. Splenic marginal zone lymphoma: Clinical clustering of immunoglobulin heavy chain repertoires. *Blood Cells, Molecules, And Diseases*. 2009; 42 (3):286-291. doi:10.1016/j.bcmd.2009.01.004.
4. Bailey JR. et al. Broadly neutralizing antibodies with few somatic mutations and hepatitis C virus clearance. *Jci Insight*. 2017; 2 (9):1-17. <http://dx.doi.org/10.1172/jci.insight.92872>. American Society for Clinical Investigation.
5. Barreto K. et al. Next-generation sequencing-guided identification and re-construction of antibody CDR combinations from phage selection outputs. *Nucleic Acids Research*. 2019; 47 (9): 1-13. doi: 10.1093/nar/gkz131. Oxford University Press (OUP).
6. Bazzill JD. et al. Interrogation of Antigen Display on Individual Vaccine Nanoparticles for Achieving Neutralizing Antibody Responses against Hepatitis C Virus. *Nano Letters*, 2018; 18 (12): 7832-7838. doi: 10.1021/acs.nanolett.8b03601. American Chemical Society (ACS).
7. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014; 30 (15): 2114-2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170. Oxford University Press (OUP).
8. Brochet X, Lefranc MP, Giudicelli V. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Research*. 2008; 36: W503-508. doi: 10.1093/nar/gkn316. Oxford University Press (OUP).
9. Buonaguro L. et al. Immune signatures in human PBMCs of idiotypic vaccine for HCV-related lymphoproliferative disorders. *Journal Of Translational Medicine*. 2010; 8 (1): 1-11. doi: 10.1186/1479-5876-8-18. Springer Nature.
10. Charles ED. et al. Clonal expansion of immunoglobulin M+CD27+ B cells in HCV-associated mixed cryoglobulinemia. *Blood*. 2007; 111 (3): 1344-1356. doi: 10.1182/blood-2007-07-101717. American Society of Hematology.
11. Chaudhary N, Wesemann DR. Analyzing Immunoglobulin Repertoires. *Frontiers In Immunology*. 2018; 9: 1-18. doi: 10.3389/fimmu.2018.00462.

12. Chen F. et al. VH1-69 antiviral broadly neutralizing antibodies: genetics, structures, and relevance to rational vaccine design. *Current Opinion in Virology*. 2019; 34: 149-159. doi: 10.1016/j.coviro.2019.02.004.
13. Cowton VM. et al. Predicting the Effectiveness of Hepatitis C Virus Neutralizing Antibodies by Bioinformatic Analysis of Conserved Epitope Residues Using Public Sequence Data. *Frontiers in Immunology*. 2018; 9:1-13. doi: 10.3389/fimmu.2018.01470. Frontiers Media SA.
14. Eliyahu S. et al. Antibody Repertoire Analysis of Hepatitis C Virus Infections Identifies Immune Signatures Associated With Spontaneous Clearance. *Frontiers in Immunology*. 2018; 9: 1-16. doi:10.3389/fimmu.2018.03004. Frontiers Media SA.
15. Flyak AI. et al. HCV Broadly Neutralizing Antibodies Use a CDRH3 Disulfide Motif to Recognize an E2 Glycoprotein Site that Can Be Targeted for Vaccine Design. *Cell Host & Microbe*. 2018; 24 (5): 703-716. doi: 10.1016/j.chom.2018.10.009. Elsevier BV.
16. Giudicelli V, Duroux P, Kossida S, Lefranc MP. IG and TR single chain fragment variable (scFv) sequence analysis: a new advanced functionality of IMGT/V-QUEST and IMGT/HighV-QUEST. *Bmc Immunology*. 2017; 18 (1): 1-13. doi: 10.1186/s12865-017-0218-8. Springer Nature.
17. Han Q. et al. Difficult-to-neutralize global HIV-1 isolates are neutralized by antibodies targeting open envelope conformations. *Nature Communications*. 2019; 10 (1): 1-15. doi: 10.1038/s41467-019-10899-2. Springer Science and Business Media LLC.
18. Houimel M. The analysis of VH and VL genes repertoires of Fab library built from peripheral B cells of human rabies virus vaccinated donors. *Human Immunology*. 2014; 75 (8): 745-755. doi: 10.1016/j.humimm.2014.05.005. Elsevier BV.
19. Huang X. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. *Genome Research*. 1999; 9 (9): 868-877. doi: 10.1101/gr.9.9.868. Cold Spring Harbor Laboratory.
20. Krawczyk K. et al. Structurally Mapping Antibody Repertoires. *Frontiers In Immunology*. 2018; 9: 1-8. doi: 10.3389/fimmu.2018.01698. Frontiers Media SA.
21. Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2011; 25 (2): 195-206. doi: 10.1016/j.bpg.2011.02.005. Elsevier BV.
22. Sebastiani G. Chronic hepatitis C and liver fibrosis. *World Journal of Gastroenterology*. 2014; 20 (32): 11033-11053. doi: 10.3748/wjg.v20.i32.11033. Baishideng Publishing Group Inc.
23. Shoukry NH. Hepatitis C Vaccines, Antibodies, and T Cells. *Frontiers in Immunology*. 2018; 9: 1-7. doi: 10.3389/fimmu.2018.01480. Frontiers Media SA.

24. Swann Re. et al. Broad Anti-Hepatitis C Virus (HCV) Antibody Responses Are Associated with Improved Clinical Disease Parameters in Chronic HCV Infection. *Journal of Virology*. 2016; 90 (9): 4530-4543. doi: 10.1128/jvi.02669-15. . American Society for Microbiology.
25. Thörnqvist L, Ohlin M. Critical steps for computational inference of the 3'-end of novel alleles of immunoglobulin heavy chain variable genes - illustrated by an allele of IGHV3-7. *Molecular Immunology*. 2018; 103: 1-6. doi: 10.1016/j.molimm.2018.08.018.. Elsevier BV.
26. Tucci FA. et al. Biased IGH VDJ gene repertoire and clonal expansions in B cells of chronically hepatitis C virus–infected individuals. *Blood*. 2017; 131 (5): 546-557. doi: 10.1182/blood-2017-09-805762. American Society of Hematology.
27. Tzarum N, Wilson IA, Law M. The Neutralizing Face of Hepatitis C Virus E2 Envelope Glycoprotein. *Frontiers In Immunology*. 2018; 9: 1-8. doi: 10.3389/fimmu.2018.01315. Frontiers Media SA.
28. Tzarum N. et al. Genetic and structural insights into broad neutralization of hepatitis C virus by human VH1-69 antibodies. *Science Advances*. 2019; 5 (1): 1-11. doi: 10.1126/sciadv.aav1882.American Association for the Advancement of Science (AAAS).
29. Ye J. et al. IgBLAST: an immunoglobulin variable domain sequence analysis tool. *Nucleic Acids Research*. 2013; 41 (1): 34-40. doi: 10.1093/nar/gkt382.Oxford University Press (OUP).
30. Zerbino DR, Birney E. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research*. 2008; 18 (5): 821-829. doi: 10.1101/gr.074492.107. Cold Spring Harbor Laboratory.

1. Capítulo III- Conclusão

2. Conclusão:

O uso preferencial de algumas subfamílias já descritas em vários estudos associados ao VHC corrobora com nossos achados de que existe uma tendência do uso de algumas subfamílias como: IGHV1-2, IGVH1-69, IGHV3-21, IGHV3-23, IGVH3-30, IGHV4-4, IGHV4-34 IGHV4-39 na cadeia pesada, assim como IG κ V3-15 e IG κ V3-20 na cadeia leve, esses dados evidenciam que o vírus pode influenciar a expressão de algumas famílias e subfamílias em detrimento de outras; como encontramos na família IGVH3 que estava menos expressa no grupo F3/F4 de fibrose avançada; resultado esse inovador na literatura relacionada ao VHC o sugere uma mudança no padrão de resposta imunológica à medida que a doença progride como encontrada em outras patologias virais já amplamente difundido na literatura como no caso do HIV. Outras subfamílias encontradas: IGHV1-8, IGHV3-11, IGHV4-39, IG κ V1-5, IG κ V1-12, IG κ V1-39 também estavam entre as mais expressas indicando que podem estar relacionadas também a uma expressão preferencial induzida pelo vírus e constituem achado novo na literatura relacionado ao VHC.

2.0 Referências Bibliográficas:

1. Eliyahu S. et al. Antibody Repertoire Analysis of Hepatitis C Virus Infections Identifies Immune Signatures Associated With Spontaneous Clearance. *Frontiers In Immunology*. 2018; 9: 1-17. doi: 10.3389/fimmu.2018.03004. Frontiers Media SA.
2. World Health Organization. WHO Hepatitis C. [homepage on the internet] World Health Organization; Acesso em: 01 de Agosto de 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>>.
3. Gu J. et al. Escape of Hepatitis C Virus from Epitope I Neutralization Increases Sensitivity of Other Neutralization Epitopes. *Journal Of Virology*. 2018; 92 (9): 1-19. doi: 10.1128/jvi.02066-17. American Society for Microbiology.
4. Irshad M, Gupta P, Irshad K. Immunopathogenesis of Liver Injury During Hepatitis C Virus Infection. *Viral Immunology*. 2019; 32 (3): 112-120. doi: 10.1089/vim.2018.0124. Mary Ann Liebert Inc.
5. Prentoe J, Bukh J. Hypervariable Region 1 in Envelope Protein 2 of Hepatitis C Virus: A Linchpin in Neutralizing Antibody Evasion and Viral Entry. *Frontiers In Immunology*. 2018; 9: 1-11. doi: 10.3389/fimmu.2018.02146. Frontiers Media SA.
6. Yan Q. et al. Next generation sequencing reveals novel alterations in B-cell heavy chain receptor repertoires associated with acute-on-chronic liver failure. *International Journal Of Molecular Medicine*. 2018; 43 (1): 243-255. doi: 10.3892/ijmm.2018.3946. Spandidos Publications.
7. Ajorloo M. et al. Detection of specific antibodies to HCV-ARF/CORE+1 protein in cirrhotic and non-cirrhotic patients with hepatitis C: A possible association with progressive fibrosis. *Arch Iran Med*. 2015; 18 (5): 304 – 307.
8. Bhattacharya D. et al. Isolated Hepatitis B Core Antibody is Associated With Advanced Hepatic Fibrosis in HIV/HCV Infection But Not in HIV Infection Alone. *J AIDS Journal Of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2016; 72 (1): 14-17. doi: 10.1097/qai.0000000000000941. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).
9. Kassela K. et al. High prevalence of antibodies to core+1/ARF protein in HCV-infected patients with advanced cirrhosis. *Journal of General Virology*. 2017; 98 (7): 1713-1719. doi: 10.1099/jgv.0.000851. Microbiology Society.
10. Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2011; 25 (2): 195-206. doi: 10.1016/j.bpg.2011.02.005. Elsevier BV.
11. Pedersen J, Lundbo LF, Krarup H, Bukh J, Weis N. Neutralizing antibodies in patients with chronic hepatitis C and correlation to liver cirrhosis and estimated duration of infection. *Journal of Medical Virology*. 2016; 88 (10): 1791-1803. doi: 10.1002/jmv.24537. Wiley.

12. Sebastiani G. Chronic hepatitis C and liver fibrosis. *World Journal Of Gastroenterology*. 2014; 20 (32): 11033-11053. doi: 10.3748/wjg.v20.i32.11033. Baishideng Publishing Group Inc.
13. Smorodin E, Sergeyev B, Kurtenkov O, Kuznetsova T, Geller J. IgG Antibodies to GlcNAc β and Asialo-GM2 (GA2) Glycans as Potential Markers of Liver Damage in Chronic Hepatitis C and the Efficacy of Antiviral Treatment. *Disease Markers*. 2018; 2018: 1-13. doi: 10.1155/2018/4639805. Hindawi Limited.
14. Pickhardt PJ. et al. Multiparametric CT for Noninvasive Staging of Hepatitis C Virus–Related Liver Fibrosis: Correlation With the Histopathologic Fibrosis Score. *American Journal Of Roentgenology*. 2019; 212 (3): 547-553. doi: 10.2214/ajr.18.20284. American Roentgen Ray Society.
15. Barreto K, et al. Next-generation sequencing-guided identification and re-construction of antibody CDR combinations from phage selection outputs. *Nucleic Acids Research*. 2019; 47 (9): 1-13. doi: 10.1093/nar/gkz131. Oxford University Press (OUP).
16. Re. et al. Type II mixed cryoglobulinaemia as an oligo rather than a mono B-cell disorder: evidence from GeneScan and MALDI-TOF analyses. *Rheumatology*. 2006; 45: 685–693. doi:10.1093/rheumatology/kei278.
17. Ping Y, Song M, Wang M, Li Z, Zhang Y. CDR3 repertoire diversity of CD8+ T lymphocytes in patients with HCV. *Cellular Immunology*. 2019; 336: 34-39. doi: 10.1016/j.cellimm.2018.12.007. Elsevier BV.
18. Hwang JK, Alt FW, Yeap LS. Related Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. In: *Mobile DNA III*. American Society of Microbiology. 2015; 3 (1): 325–348. doi: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0037-2014.
19. Jiang Y, Nie K, Redmond D, Melnick AM, Tam W, Elemento O. VDJ-Seq: Deep Sequencing Analysis of Rearranged Immunoglobulin Heavy Chain Gene to Reveal Clonal Evolution Patterns of B Cell Lymphoma. *Journal of Visualized Experiments*. 2015; (106): 1-10. doi: 10.3791/53215. MyJove Corporation.
20. Bailey JR. et al. Broadly neutralizing antibodies with few somatic mutations and hepatitis C virus clearance. *Jci Insight*. 2017; 2 (9): 1-17. doi: 10.1172/jci.insight.92872. American Society for Clinical Investigation.
21. Bazzill JD. et al. Interrogation of Antigen Display on Individual Vaccine Nanoparticles for Achieving Neutralizing Antibody Responses against Hepatitis C Virus. *Nano Letters*. 2018; 18 (12): 7832-7838. doi: 10.1021/acs.nanolett.8b03601. American Chemical Society (ACS).
22. Chaudhary N, Wesemann DR. Analyzing Immunoglobulin Repertoires. *Frontiers in Immunology*. 2018; 9: 1-18. doi: 10.3389/fimmu.2018.00462. Frontiers Media SA.
23. Krawczyk K. et al. Structurally Mapping Antibody Repertoires. *Frontiers in Immunology*. 2018; 9: 1-8. doi: 10.3389/fimmu.2018.01698. Frontiers Media SA.

24. Aleman F. et al. Immunogenetic and structural analysis of a class of HCV broadly neutralizing antibodies and their precursors. *Proceedings of The National Academy Of Sciences*. 2018; 115 (29): 7569-7574. doi: 10.1073/pnas.1802378115. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
25. Bailey JR. et al. Broadly neutralizing antibodies with few somatic mutations and hepatitis C virus clearance. *Jci Insight*. 2017; 2 (9): 1-17. doi: 10.1172/jci.insight.92872. *American Society for Clinical Investigation*.
26. Chen F. et al. VH1-69 antiviral broadly neutralizing antibodies: genetics, structures, and relevance to rational vaccine design. *Current Opinion In Virology*. 2019; 34: 149-159. doi: 10.1016/j.coviro.2019.02.004. *Elsevier BV*.
27. Christiansen D. et al. Immunological responses following administration of a genotype 1a/1b/2/3a quadrivalent HCV VLP vaccine. *Scientific Reports*. 2018; 8 (1): 1-13. doi: 10.1038/s41598-018-24762-9. *Springer Nature*.
28. Kinchen VJ. et al. Broadly Neutralizing Antibody Mediated Clearance of Human Hepatitis C Virus Infection. *Cell Host & Microbe*. 2018; 24 (5): 717-730. doi: 10.1016/j.chom.2018.10.012. *Elsevier BV*.
29. Tzarum N, Wilson IA, Law M. The Neutralizing Face of Hepatitis C Virus E2 Envelope Glycoprotein. *Frontiers In Immunology*. 2018; 9: 1-8. doi: 10.3389/fimmu.2018.01315. *Frontiers Media SA*.
30. Fukasawa M. et al. Monoclonal Antibodies against Extracellular Domains of Claudin-1 Block Hepatitis C Virus Infection in a Mouse Model. *Journal Of Virology*. 2015; 89 (9): 4866-4879. doi: 10.1128/jvi.03676-14. *American Society for Microbiology*.
31. Giang E, Aleman F, Law M. Probing the Antigenicity of HCV Envelope Glycoproteins by Phage Display Antibody Technology. *Methods In Molecular Biology*. 2018; 1911: 381-393. doi: 10.1007/978-1-4939-8976-8_26. *Springer New York*.
32. Keck ZY, Wang Y, Lau P, Fong SKH. Isolation of HCV Neutralizing Antibodies by Yeast Display. *Methods In Molecular Biology*. 2018; 1911: 395-419. doi: 10.1007/978-1-4939-8976-8_27. *Springer New York*.
33. Barbas III CF, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ. *Phage display : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
34. Giudicelli V. et al. IG and TR single chain fragment variable (scFv) sequence analysis: a new advanced functionality of IMGT/V-QUEST and IMGT/HighV-QUEST. *Bmc Immunology*. 2017; 18 (1): 1-13. doi: 10.1186/s12865-017-0218-8. *Springer Nature*.
35. Ye J, Ma N, Madden TL, Ostell JM. IgBLAST: an immunoglobulin variable domain sequence analysis tool. *Nucleic Acids Research*. 2013; 41 (1): 34-40. doi: 10.1093/nar/gkt382. *Oxford University Press (OUP)*.

36. Farfán-Arribas DJ. et al. The dynamics of immunoglobulin V-gene usage and clonotype expansion in mice after prime and boost immunizations as analyzed by NGS. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2017; 13 (12): 2987-2995. doi: 10.1080/21645515.2017.1379638. Informa UK Limited.
37. Kawajiri-Manako C. et al. Clonal immunoglobulin λ light-chain gene rearrangements detected by next generation sequencing in POEMS syndrome. *American Journal of Hematology*. 2018; 93 (9): 1161-1168. doi: 10.1002/ajh.25213. Wiley.
38. Andrews S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Acesso em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
39. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014; 30 (15): 2114-2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170. Oxford University Press (OUP).
40. Kim D, et al. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature Biotechnology*. 2019; 37 (8): 907-915. Springer Science and Business Media LLC. Doi: 10.1038/s41587-019-0201-4.
41. Stanton E, Chef B. Pairfq: Pairfq version 0.16.1. Zenodo, 2016.
42. Huang X. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. *Genome Research*. 1999; 9 (9): 868-877. doi: 10.1101/gr.9.9.868. Cold Spring Harbor Laboratory.
43. LANGMEAD, Ben; SALZBERG, Steven L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, [s.l.], v. 9, n. 4, p.357-359, 4 mar. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1923>.
44. Zerbino DR, Birney E. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research*. 2008; 18 (5): 821-829. doi: 10.1101/gr.074492.107. Cold Spring Harbor Laboratory.
45. Li W, Godzik A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*. 2006; 22 (13): 1658-1659. doi: 10.1093/bioinformatics/btl158. Oxford University Press (OUP).
46. Krey T, Meola A, Keck ZY, Damier-Piolle L, Fong SK, Rey FA.. Structural Basis of HCV Neutralization by Human Monoclonal Antibodies Resistant to Viral Neutralization Escape. *Plos Pathogens*. 2013; 9 (5): 1-10. doi: 10.1371/journal.ppat.1003364. Public Library of Science (PLOS).
47. Merat SJ. et al. Hepatitis C virus Broadly Neutralizing Monoclonal Antibodies Isolated 25 Years after Spontaneous Clearance. *Plos One*. 2016; 11 (10): 1-18. doi: 10.1371/journal.pone.0165047. Public Library of Science (PLOS).
48. Arcaini L. et al. Splenic marginal zone lymphoma: Clinical clustering of immunoglobulin heavy chain repertoires. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2009; 42 (3): 286-291. doi: 10.1016/j.bcmd.2009.01.004. Elsevier BV.

49. Chang Q. VH3 gene expression in children with HIV infection. *Journal of Infection*. 2004; 49 (4): 274-282. doi: 10.1016/j.jinf.2004.04.007. Elsevier BV.
50. Scamurra RW. et al. Impact of HIV-1 Infection on VH3 Gene Repertoire of Naive Human B Cells. *The Journal Of Immunology*. 2000; 164 (10): 5482-5491. doi: 10.4049/jimmunol.164.10.5482. The American Association of Immunologists.
51. Tucci FA. et al. Biased IGH VDJ gene repertoire and clonal expansions in B cells of chronically hepatitis C virus–infected individuals. *Blood*. 2017; 131 (5): 546-557. doi: 10.1182/blood-2017-09-805762. American Society of Hematology.
52. Marasca R. et al. Immunoglobulin Gene Mutations and Frequent Use of VH1-69 and VH4-34 Segments in Hepatitis C Virus-Positive and Hepatitis C Virus-Negative Nodal Marginal Zone B-Cell Lymphoma. *Molecular Immunology*. 2001; 159 (1): 253-261. Doi: 10.1016/S0002-9440(10)61691-4. American Journal of Pathology.
53. Perotti M. et al. Hepatitis C virus (HCV)-driven stimulation of subfamily-restricted natural IgM antibodies in mixed cryoglobulinemia. *Autoimmunity Reviews*. 2008; 7 (6): 468-472. doi: 10.1016/j.autrev.2008.03.008. Elsevier BV.
54. Sautto G, Mancini N, Solforosi L, Diotti RA, Clementi M, Burioni R. HCV Proteins and Immunoglobulin Variable Gene (IgV) Subfamilies in HCV-Induced Type II Mixed Cryoglobulinemia: A Concurrent Pathogenetic Role. *Clinical And Developmental Immunology*. 2012; 2012: 1-11. doi: 10.1155/2012/705013. Hindawi Limited.
55. Racanelli V. et al. Antibody Vh Repertoire Differences between Resolving and Chronically Evolving Hepatitis C Virus Infections. *Plos One*. 2011; 6 (9): 1-11. doi: 10.1371/journal.pone.0025606. Public Library of Science (PLoS).
56. Re V. et al. Characterization of Antibodies Directed against the Immunoglobulin Light κ Chain Variable Chain Region (VK) of Hepatitis C Virus-Related Type-II Mixed Cryoglobulinemia and B-Cell Proliferations. *Annals of The New York Academy Of Sciences*. 2009; 1173 (1): 152-160. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04677.x. Wiley.
57. Buonaguro L. et al. Immune signatures in human PBMCs of idiopathic vaccine for HCV-related lymphoproliferative disorders. *Journal of Translational Medicine*. 2010; 8 (1): 1-11. doi: 10.1186/1479-5876-8-18. Springer Nature.
58. Charles ED. et al. Clonal expansion of immunoglobulin M+CD27+ B cells in HCV-associated mixed cryoglobulinemia. *Blood*. 2007; 111 (3): 1344-1356. doi: 10.1182/blood-2007-07-101717. American Society of Hematology.
59. Brochet X, Lefranc MP, Giudicelli V. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Research*. 2008; 36: W503-508. doi: 10.1093/nar/gkn316. Oxford University Press (OUP).

60. Boisvert, M. et al. Novel E2 Glycoprotein Tetramer Detects Hepatitis C Virus–Specific Memory B Cells. *The Journal of Immunology*. 2016; 197 (12): 4848-4858. doi: 10.4049/jimmunol.1600763. The American Association of Immunologists.
61. Ping Y, Song M, Wang M, Li Z, Zhang Y. CDR3 repertoire diversity of CD8+ T lymphocytes in patients with HCV. *Cellular Immunology*. 2019; 336: 34-39. doi: 10.1016/j.cellimm.2018.12.007. Elsevier BV.
62. Flyak AI. et al. HCV Broadly Neutralizing Antibodies Use a CDRH3 Disulfide Motif to Recognize an E2 Glycoprotein Site that Can Be Targeted for Vaccine Design. *Cell Host & Microbe*. 2018; 24 (5): 703-716. doi: 10.1016/j.chom.2018.10.009. Elsevier BV.