

Luciana Bonome Zeminian

**Variabilidade da protease NS3 do Vírus da Hepatite
C e avaliação das mutações de resistência em
pacientes não tratados com inibidores de protease**

Botucatu – SP

2011

Luciana Bonome Zeminian

**Variabilidade da protease NS3 do Vírus da Hepatite
C e avaliação das mutações de resistência em
pacientes não tratados com inibidores de protease**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Botucatu – Unesp, Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia
Médica (Mestrado Profissional) para
obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dr^a Rejane Maria Tommasini Grotto

Botucatu – SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Zeminian, Luciana Bonome.

Variabilidade da protease NS3 do Vírus da Hepatite C e avaliação das mutações de resistência em pacientes não tratados com inibidores de protease / Luciana Bonome Zeminian. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Rejane Maria Tommasini Grotto

Capes: 20804008

1. Biologia molecular. 2. Inibidores enzimáticos proteolíticos.

Palavras-chave: Inibidores de protease; Protease NS3; VHC.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, por todo amor e carinho com que me envolve, ao meu pai pelo incentivo para seguir o caminho que escolhi, e também, ao meu namorado pela compreensão e suporte que me dá.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado força e paciência para conduzir este trabalho.

À minha mãe Clara, pelo amor, carinho e dedicação que me deu durante toda minha vida, apoiando minhas decisões e incentivando a correr atrás dos meus sonhos sendo que foi mérito dela a realização desses, e por ser a pessoa essencial e indispensável na minha vida.

Ao meu pai Reinaldo, que me despertou o interesse pela área médica e por tudo que me proporcionou durante sua vida, e mesmo que não esteja aqui, estará sempre comigo.

Ao meu namorado André, por ser uma pessoa tão especial, que me apóia, me compreende, me dá carinho, me aconselha, me protege, me acompanha, me instiga a ser uma pessoa melhor, enfim por simplesmente ser quem é e por estar ao meu lado.

À minha avó Lourdes, por estar sempre na torcida e rezando para que eu atinja meus objetivos.

À minha orientadora Dr^a Rejane Maria Tommasini Grotto, por tudo que me ensinou durante os dois anos que passei sob sua orientação, por estar sempre disponível a passar seus conhecimentos, esta pesquisa não teria sido possível sem ela.

À Dr^a Maria Inês de Moura Campos Pardini, por ter acreditado em mim e aberto as portas do laboratório para que eu me aprimorasse profissionalmente e realizasse meu mestrado.

À minha grande (pequena) parceira Aline Aki Tanikawa, por percorrer junto comigo este caminho, por ter sido parceira, companheira, amiga e conselheira durante esta jornada, e mesmo que agora tomemos caminhos diferentes, sempre a levarei comigo.

À minha querida amiga Juliane de Campos Inácio, pelo incentivo sempre, pelas risadas e momentos de descontração, pelas conversas tão alegres que tanto me ajudaram a passar pelos momentos difíceis.

À querida Regina, que como funcionária do laboratório foi tão dedicada ao me passar seus conhecimentos, e foi também uma grande e querida amiga durante minha passagem pelo Hemocentro.

Ao Maércio, pelos ensinamentos, incentivo, apoio e atenção.

À Sílvia e Rosângela, funcionárias do laboratório que me integraram à rotina de diagnóstico de Hepatites Virais, por me passarem todos os ensinamentos que me fizeram ser parte da equipe.

À Bete, pelas conversas, pelo incentivo, pela ajuda durante os procedimentos no laboratório.

À minha amiga, Juliana Lara Padovani, pelas palavras de incentivo e pela grande ajuda na amplificação das amostras.

Ao grupo que se formou durante esse ano que se tornou tão especial para mim, Natália, Sarita, Tainara, Priscila e Jovita, obrigada por tudo e, principalmente, pelos momentos bons que passamos juntas.

Aos aprimorandos, Gustavo e Luanda, pela ajuda na localização e separação das amostras.

À secretária do programa, Janisse, por sempre nos lembrar dos prazos, das datas das aulas e pelas risadas durante o horário do almoço.

Ao Dr Giovanni Faria Silva, por dividir seus conhecimentos comigo e por facilitar a obtenção das amostras junto aos pacientes.

Às funcionárias do ambulatório de Hepatites Virais, Fernanda, Juliana, Mariana, Iara, Daniela, Vanessa e Mari, pela ajuda ao pedir consentimento dos pacientes e obtenção de informações dos mesmos.

Aos 37 pacientes que concordaram voluntariamente em participar da minha pesquisa.

Ao meu grande amigo Raphael, por todo o conhecimento de informática que me ajuda tanto e pela amizade de tanto tempo e que espero dure muito mais.

À minha segunda família, D. Vera, Eliane, José Laércio, Vera Maria, João, Junior, Érica, Vânia, Juliani, Mariá, Murilo e Camila, que me acolheram sempre e pelo amor com que me tratam, e ao S. Laércio, que, enquanto estive entre nós, me fez companhia durante o caminho até Botucatu.

Aos meus grandes amigos, Felipe, Vanessa, Dalton, Natália (Taia), Manuel, Luciana, Caio, Laura, Alessandro e Keyla pelos inúmeros finais de semana que passamos juntos e pelos bons momentos que me ajudavam a atravessar com mais ânimo a semana.

Aos meus tios Cacilda e Luis Augusto, por serem tão presentes na minha vida e de minha família dando apoio sempre que precisamos.

À minha madrinha Carla, seu marido Antônio Carlos e seu filhinho Fabrício, por acreditarem tanto em mim, pelo carinho que me dedicam.

À Maria Inês Paravani, por ter sido a pessoa que me trouxe ao Hemocentro e por toda ajuda no início desta jornada.

À Cleo, recepcionista do Hemocentro, por ser uma pessoa alto astral que não nos deixava desanimar.

Ao Laboratório de Biologia Molecular, Rotinas Diagnósticas e Pesquisa Aplicada, da Divisão de Hemocentro da UNESP, na pessoa da Dr^a Maria Inês de Moura Campos Pardini, pela disponibilização da estrutura física e materiais de consumo utilizados nesta pesquisa.

Às funcionárias da biblioteca, pela correção das referências e edição da Ficha Catalográfica.

A todos aqueles que direta ou indiretamente ajudaram no desenvolvimento desta monografia.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

*“Não importa quão estreito o portal,
Quão carregada de punições a lista,
Sou o mestre do meu destino:
Sou o capitão da minha alma”.*
(William Ernest Henley)

RESUMO

O vírus da Hepatite C (VHC) é um importante patógeno associado com doença hepática crônica sendo que alguns infectados podem desenvolver cirrose e carcinoma hepatocelular. O tratamento da hepatite C crônica visa a resposta virológica sustentada (RVS), definida como níveis de RNA viral indetectáveis no soro por seis meses depois do término do tratamento. Atualmente, a terapia padrão ouro é a combinação de interferon α peguilado e ribavirina, porém esse esquema terapêutico vem se mostrando eficaz em, apenas, 50% dos pacientes infectados com o genótipo 1, o mais prevalente no Brasil. Portanto, novas drogas mais eficazes e menos tóxicas estão sendo desenvolvidas para melhorar a assistência aos pacientes infectados pelo VHC, entre as quais merecem destaque os inibidores da serina protease NS3, a qual é uma enzima essencial para a replicação do VHC e assim um potencial alvo para novas terapias antivirais. Entretanto, a emergência de variantes resistentes é o maior obstáculo para o sucesso da terapêutica. Variantes resistentes já foram isoladas em pacientes tratados com os inibidores de protease e, estão associadas com a falência terapêutica. Porém o impacto dessas variantes resistentes em pacientes virgens de tratamento ainda não foi esclarecido e, esse tipo de informação pode avaliar o impacto dos inibidores de protease na terapia antiviral. O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de mutações de resistência e polimorfismos genéticos na região genômica NS3 do VHC em 37 pacientes virgens de tratamento com inibidores de protease infectados com genótipo 1. RNA viral sérico foi utilizado como fonte para amplificação e seqüenciamento da região NS3 do VHC e, avaliar a presença de mutações de resistência e polimorfismos nesta região. Os resultados mostraram que apenas 07 (18,9%) amostras apresentavam variantes resistentes, sendo que as mutações já reportadas previamente T54A, T54S, V55A, R155K e V163L foram detectadas com igual frequência (2,7%) na população estudada e, a substituição A156T foi encontrada com uma frequência superior as demais (5,4%), e duas substituições simultâneas não foram encontradas em uma mesma amostra. Com relação aos polimorfismos genéticos 315 modificações de aminoácidos foram detectadas na amostra analisada, sendo que além das 07 mutações de resistência previamente relatadas foram encontradas outras substituições em códons de resistência como: T54N, V55D, V55F, A156D, V158E, V163G, V163K, V163R, V163M, I170V, I170F, todas com frequência de 2,7% exceto a V163G que apareceu com uma frequência um pouco superior (5,4%). Os resultados obtidos demonstram a conservação da tríade catalítica e dos aminoácidos de ligação ao zinco e; ocorrência do maior número de substituições nos códons 153 (94,6%), 40 (67,5%) e 91 (67,5%). Algumas substituições podem potencialmente desarranjar a estrutura tridimensional da protease NS3, resultantes de alterações elétricas com modificações de carga eletrostática que modificam as interações entre os resíduos. Assim, novos estudos de modelagem molecular podem facilitar o entendimento dos achados aqui apresentados.

Palavras-chave: VHC, protease NS3, inibidores de protease.

ABSTRACT

The Hepatitis C Virus (HCV) is an important pathogen associated with chronic hepatic disease and some infected patients can develop cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The treatment of chronic hepatitis C aimed the sustained virological response (SVR), defined as having undetectable serum HCV RNA at the end of therapy for at least 6 months. Currently, the gold standard therapy is a combination of pegylated interferon- α and the ribavirin, however this treatment present efficacy in only 50% of patients infected with genotypes 1, the most prevalent in Brazil. Then, new drugs more effective and less toxic have been developed to improve the attendance of the HCV infected patients as the serine protease NS3 inhibitors, which is an enzyme essential to HCV replication and main target of new antiviral therapies. However, the emergence of drug resistant variants has been the major obstacle to therapeutic successful. Resistant variants have already been isolated in patients treated with protease inhibitors and, these resistant variants are associated with non response to treatment. But the impact of the resistant variants in naïve protease inhibitors patients is unclear yet and, this information can evaluate the impact of protease inhibitors in antiviral therapeutic. The goal of this study was evaluate the presence of resistance mutations and genetic polymorphisms in the NS3 genomic region of HCV in 37 protease inhibitors-naïve genotype 1 HCV infected patients. Serum viral RNA was used as source to amplification and sequencing of NS3 region of HCV and, evaluates the presence of resistance mutations and polymorphisms in this region. The results showed that only 07 (18.9%) samples presented resistant variants, the mutations previously described T54A, T54S, V55A, R155K e V163L were detected with the same frequency (2.7%), the substitution A156T was found with a higher frequency than others (5.4%), and two simultaneous substitutions weren't found in the same sample. The analysis of these genetic polymorphisms showed 315 amino acids modifications in the studied sample, besides the 07 resistance mutations previously described were found others substitutions in resistance codons as: T54N, V55D, V55F, A156D, V158E, V163G, V163K, V163R, V163M, I170V, I170F, all a frequency of 2.7% except V163G which present a frequency of 5.4%. The obtained results demonstrated the catalytic triad conservation and also the amino acids that binds to the zinc ion; and a higher occurrence of substitutions in codons 153 (94.6%), 40 (67.5%) e 91 (67.5%). Some substitutions can potentially dismantle the tridimensional structure of NS3 protease, resulting from electric alterations with electrostatic charge modifications that can change the interaction between the residues. Therefore, new studies using molecular modeling can facilitate the understanding of the findings of this study.

Key-words: HCV, NS3 protease, protease inhibitors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática do (a) genoma do VHC, evidenciando regiões gênicas codificadoras das proteínas estruturais (vermelho) e não estruturais (amarelo), flanqueadas pelas duas regiões não traduzidas (5'UTR com *IRES* e 3'UTR); (b) poliproteína viral sintetizada com as proteínas core, E1 e E2 (vermelho) e não estruturais (amarelo).....25

Figura 2. Representação esquemática da estrutura da protease NS3 do VHC, evidenciando as estruturas β -pregueadas (verde), (a) a tríade catalítica de His-57, Asp-81 e Ser-139 e, (b) os três resíduos de cisteína nas posições 97, 99 e 145 (amarelo), uma histidina na posição 145 (vermelho) e o íon de zinco (verde calro).....27

Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 2%: (a) marcador de peso molécula 1kb (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil), (b), (c), (d), (e), (f), (g): amostras, (h) controle negativo da RT-PCR.....49

Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 2%: na porção superior da figura evidencia-se (a) marcador de peso molécula 1kb (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), (i), (j): amostras; na porção inferior: (a) marcador de peso molécula 1kb (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil), (b): amostra (c): controle negativo da RT-PCR.....50

Figura 5. Parte de um cromatograma da região NS3 do VHC evidenciando má definição dos picos, sobreposição de bases e linha de base alta e mal definida, exemplificando um seqüenciamento de qualidade ruim.....53

Figura 6. Parte de um cromatograma da região NS3 do VHC evidenciando a boa definição dos picos, sem sobreposição de bases, exemplificando um seqüenciamento de boa qualidade.....53

Figura 7. Frequência das substituições de aminoácidos na região NS3 do VHC. Os aminoácidos da sequência consenso são representados em azul, o número subscrito à direita corresponde a posição do aminoácido na sequência da proteína. Acima de cada aminoácido está representada a substituição e, sua frequência

absoluta. Destaque para a tríade catalítica (círculos vermelhos) e resíduos de ligação ao zinco (sublinhado verde).....61

Figura 8. Parte inicial (códon 1 a 120) do alinhamento múltiplo das sequências da região genômica NS3 do VHC realizada no programa *ClustalX*: sequência referência (AF009606) é mostrada na primeira linha do alinhamento (seta vermelha); cada linha representa uma sequência viral sendo que os aminoácidos concordantes com a sequência referência são vistos como ponto (.) e os discordantes pela respectiva sigla do aminoácido substituto.....62

Figura 9. Parte final (códon 120 a 215) do alinhamento múltiplo das sequências da região genômica NS3 do VHC realizada no programa *ClustalX*: sequência de referência (AF009606) é mostrada na primeira linha do alinhamento (seta vermelha); cada linha representa uma sequência viral sendo que os aminoácidos concordantes com a sequência referência são vistos como ponto (.) e os discordantes pela respectiva sigla do aminoácido substituto.....63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características demográficas, clínicas, virológicas dos pacientes infectados pelo VHC de subtipo 1a incluídos no estudo (n=37).....	41
Tabela 2. Sequência dos <i>primers</i> utilizados nas reações de amplificação da região genômica NS3 do VHC.....	43
Tabela 3. Mutações associadas à resistência aos inibidores de protease encontradas na população estudada (n=37).....	56
Tabela 4. Características físico-químicas das substituições encontradas nas amostras analisadas (n=37).....	65
Tabela 5. Polimorfismos genéticos na região da serina protease NS3 não associados à resistência aos inibidores de protease (n=37).....	67

SUMÁRIO

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	22
OBJETIVOS	38
CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	40
CASUÍSTICA.....	41
METODOLOGIA	42
a) Extração de RNA Viral	42
b) Transcrição Reversa	42
c) Amplificação da região genômica NS3 do VHC por Nested-PCR	44
d) Revelação dos Produtos Amplificados por Eletroforese em Gel de Agarose	44
e) Purificação do Produto Amplificado	44
f) Reação de Marcação Fluorescente	44
g) Precipitação	45
h) Desnaturação do DNA e Sequenciamento.....	45
i) Análise dos Dados.....	46
RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
Padronização da Metodologia para Genotipagem da região NS3 do VHC	48
Avaliação da Resistência Primária aos Inibidores de Protease	54
REFERÊNCIAS	70

INTRODUÇÃO

A hepatite C constitui um problema de saúde global com 170 milhões de infectados pelo Vírus da Hepatite C (VHC) no mundo, sendo 3 a 4 milhões de novos casos por ano (WHO, 2003). No Brasil, estima-se que 1,0 a 1,9% da população brasileira esteja infectada pelo VHC (Alter, 2007).

Clinicamente, a infecção apresenta diferentes formas de evolução, em 15% dos casos, a infecção pelo VHC apresenta clareamento espontâneo, ou seja, presença de RNA indetectável no soro do paciente com sorologia reagente para anticorpos anti-VHC, sendo esta ocorrência mais freqüente em mulheres e indivíduos jovens, enquanto que homens afro-americanos e indivíduos com infecção aguda assintomática estão mais propensos à cronicidade (Hoofnagle, 2002; Seeff, 2002).

A cirrose hepática ocorre em aproximadamente 20% dos casos, geralmente após 15 a 20 anos de infecção e o hepatocarcinoma é detectado em 1 a 3% dos casos de cirrose ao ano. No entanto, a evolução para cronicidade está na dependência de fatores virais, como carga viral e genótipo do VHC e fatores do hospedeiro como sexo, idade, uso de álcool ou coinfeção com outros vírus (Strauss, 2001).

O VHC, vírus da família *Flaviviridae*, foi descrito pela primeira vez em 1989 como sendo o agente etiológico associado a hepatites não-A e não-B por Choo e colaboradores. Possui genoma constituído por uma única fita de RNA de polaridade positiva com 9500 nucleotídeos e uma única fase aberta de leitura (*Open Reading Frame*, ORF), a qual codifica uma única poliproteína de, aproximadamente, 3000 aminoácidos, a qual posteriormente será clivada por enzimas virais e do hospedeiro produzindo 10 polipeptídeos (Lyra, 2004).

O genoma viral é constituído por regiões gênicas que codificam proteínas estruturais e não estruturais, flanqueadas por duas regiões não traduzidas altamente conservadas, de aproximadamente 341 e 230 nucleotídeos, denominadas 5'UTR e 3'UTR (Figura 1a). Essas regiões possuem elementos que desempenham papéis

essenciais no ciclo replicativo viral. A região 5'UTR contém uma região denominada *internal ribosome entry segment* (IRES) que direciona a tradução independente de *cap* da poliproteína viral e um sinal de RNA sobreposto que é necessário para a replicação viral. Já a região 3'UTR possui estruturas que se mostraram necessárias para a replicação viral e para uma infecção produtiva (Ivanyi-Nagy et al., 2006).

A heterogeneidade do genoma do VHC conduz a uma alta variabilidade genética que distingue, atualmente, seis genótipos (1 a 6), vários subtipos e *quasiespecies* (Simmonds et al., 2005). O genótipo 1 apresenta uma distribuição global, sendo o mais frequente. O genótipo 4 é prevalente na África do Norte e Oriente Médio e o 5 e 6 na África do Sul e Hong Kong, respectivamente (Zein, 2000). No Brasil, os genótipos 1, 3 e 2 são os mais frequentes nesta ordem, com predominância do genótipo 1 na maioria dos estados (Campiotto et al., 2005). Recentemente, foi descrito um novo genótipo designado genótipo 7 (Murphy et al., 2007).

Independente do genótipo viral, durante a replicação do VHC ocorre a síntese da poliproteína viral que, ao ser clivada origina as proteínas estruturais, liberadas da porção amino-terminal, que incluem a proteína do nucleocapsídeo C (*core*), duas glicoproteínas do envelope (E1 e E2) e uma proteína p7 gerada pelo processamento de um precursor do E2-p7 (Lohmann et al., 1996) e, as proteínas não estruturais, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B (Figura 1b) (Penin et al., 2004).

As proteínas não estruturais estão relacionadas funcionalmente com várias etapas do ciclo replicativo viral. A proteína não estrutural 2 (NS2) é uma cisteína protease hidrofóbica transmembrana de 23 kDa necessária a infectividade viral (Jones et al., 2007).

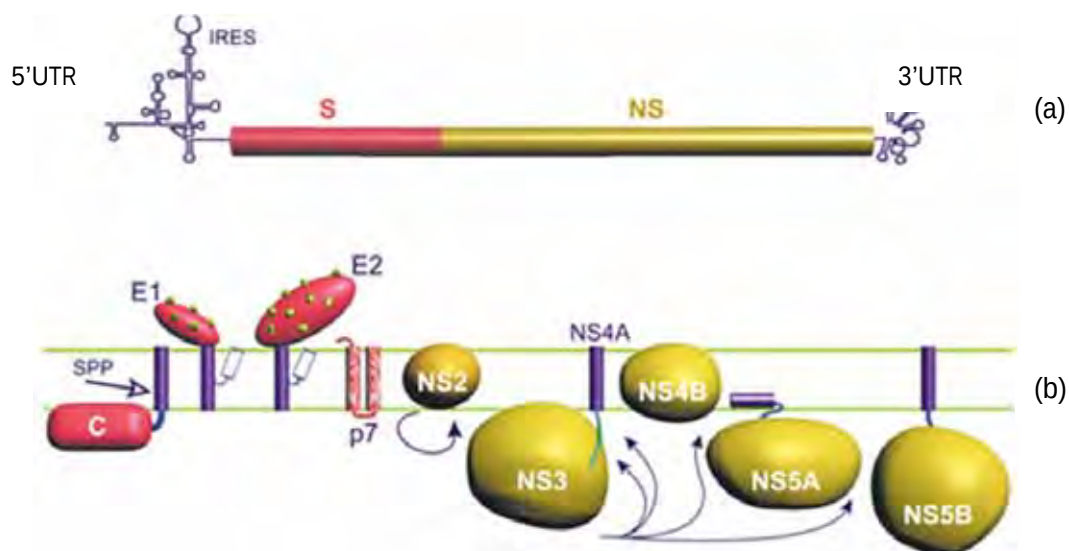


Figura 1: Representação esquemática do (a) genoma do VHC, evidenciando regiões gênicas codificadoras das proteínas estruturais (vermelho) e não estruturais (amarelo), flanqueadas pelas duas regiões não traduzidas (5'UTR com *IRES* e 3'UTR); (b) poliproteína viral sintetizada com as proteínas core, E1 e E2 (vermelho) e não estruturais (amarelo) (Adaptado de Penin et al., 2004).

A proteína não estrutural 3 (NS3) é um membro da superfamília protéica das helicases DExH/D-box, da família tripsina/quimiotripsina (Kim et al. 1996; Love et al., 1996), com 67kDa é constituída por um domínio serina protease e um domínio RNA helicase, se relaciona a separação das fitas de RNA positiva e negativa, durante a replicação, além de apresentar atividade NTPases (Hahm et al., 1995). A proteína NS3 é responsável pela clivagem da poliproteína viral durante o ciclo replicativo do VHC (Penin et al., 2004).

Uma tríade catalítica constituída por três resíduos de aminoácidos histidina, ácido aspártico e serina localizados respectivamente nas posições 57, 81 e 139 da proteína (Figura 2a) foi identificada pelo alinhamento de sequências da proteína NS3 do VHC e de muitas proteases virais e celulares conhecidas, pertencentes também à superfamília de proteases serinas (Bazan e Fletterick, 1989; Bazan e Fletterick, 1990; Gorbalenya et al., 1989; Miller e Purcell, 1990).

Esta tríade catalítica está localizada em uma fenda entre dois sub-domínios, com os aminoácidos histidina e ácido aspártico no subdomínio N-terminal e serina no C-terminal. O sub-domínio C-terminal (resíduos 96 a 180) contém seis estruturas secundárias β -pregueadas, comum na maioria dos membros da família quimi tripsina, seguido de uma estrutura em α -hélice estruturalmente conservada. O sub-domínio N-terminal consiste em oito estruturas β -pregueadas, sendo sete provenientes da proteína NS3 e uma do NS4A. No sub-domínio C-terminal existe, ainda, um sítio formado por três resíduos de cisteína (nas posições 97, 99 e 145) (Figura 2b) e uma histidina da posição 149, localizados de maneira oposta a tríade catalítica na proteína, o qual constitui o local de ligação de um íon metálico, o zinco (Lin, 2006). Estudos demonstraram que substituição de qualquer resíduo de cisteína envolvido no sítio de ligação do zinco por uma alanina conduzem à uma redução significativa na atividade da protease, enquanto que, uma mutação na histidina é menos significativo (Hijikata et al., 1993). Os resultados destes estudos e a localização do átomo de zinco em relação à Ser-139 sugerem que o papel desempenhado pelo zinco é mais de natureza estrutural do que catalítico, como no caso de outras proteases virais (Sommergruber et al., 1994; Voss et al., 1995; Yu e Loyd, 1992). Nesta mesma linha, estudos já mostraram que a proteína NS3 expressa em *E. coli* não adquiriu a estrutura adequada no espaço e, portanto, sua atividade proteolítica foi deficiente (De Francesco et al., 1996; Stempniak et al., 1997).

A substituição de qualquer resíduo da tríade catalítica anula a clivagem das quatro junções (NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A e NS5A/NS5B), porém não tem nenhum efeito na clivagem de outros locais da poliproteína do VHC, os quais estão localizados anteriormente no genoma aos sítios de clivagem dependente da protease serina NS3 (Lin, 2006). A atividade funcional da protease é determinada pelos 180 primeiros aminoácidos da porção N-terminal da proteína NS3. Deleções maiores que 22 aminoácidos dessa região conduzem a uma perda significativa de eficiência no processamento da poliproteína, e qualquer deleção na porção C-terminal desse domínio da protease anula completamente a atividade proteolítica (Bartenschlager et al., 1994; Failla et al., 1995; Tanji et al., 1994).

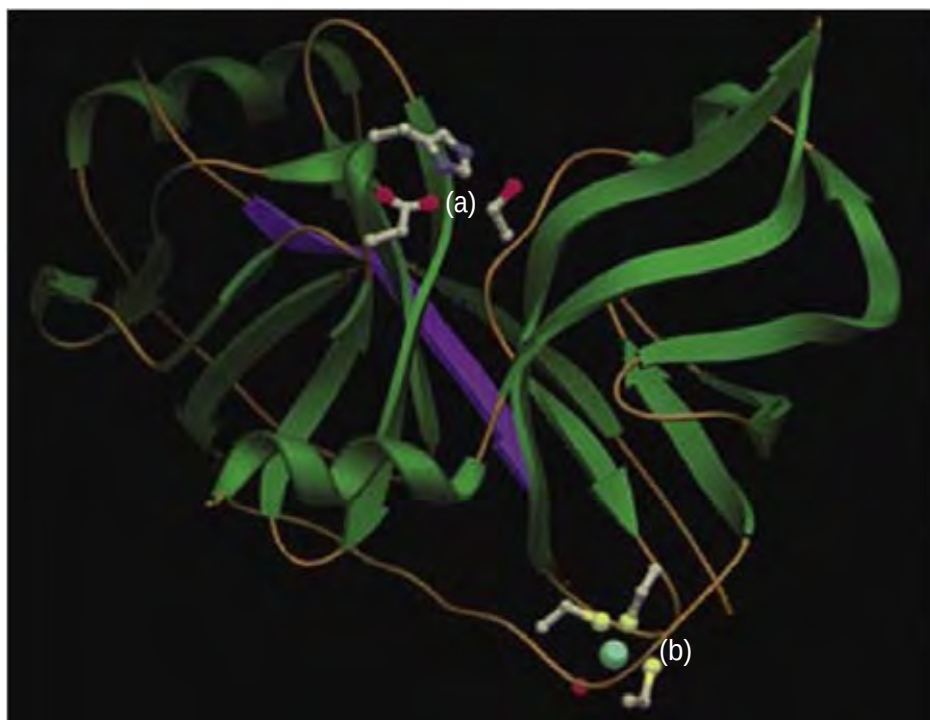


Figura 2: Representação esquemática da estrutura da protease NS3 do VHC, evidenciando as estruturas β -pregueadas (verde), (a) a tríade catalítica de His-57, Asp-81 e Ser-139 e, (b) os três resíduos de cisteína nas posições 97, 99 e 145 (amarelo), uma histidina na posição 145 (vermelho) e o íon de zinco (verde claro) (Adaptado de Lin, 2006).

O esclarecimento da atividade funcional da protease foi facilitado pela nomenclatura atribuída pelos pesquisadores Schechter e Berger (1967), amplamente aceita, na qual o substrato alvo de clivagem é constituído de 10 peptídeos, sendo seis resíduos na porção N-terminal e quatro resíduos na porção C-terminal, o qual é descrito $\text{NH}_2 - \text{P}_6 - \text{P}_5 - \text{P}_4 - \text{P}_3 - \text{P}_2 - \text{P}_1 - \text{P}_1' - \text{P}_2' - \text{P}_3' - \text{P}_4' - \text{OH}$. Os produtos da clivagem desse substrato seriam do lado P ($\text{NH}_2 - \text{P}_6 - \text{P}_5 - \text{P}_4 - \text{P}_3 - \text{P}_2 - \text{P}_1 - \text{OH}$) e do lado P' ($\text{NH}_2 - \text{P}_1' - \text{P}_2' - \text{P}_3' - \text{P}_4' - \text{OH}$). Os sítios da protease NS3/4A nos quais a cadeia do produto P1 se liga recebem as designações S1, S2, S3, S4, S5 e S6 e, para o produto P' a denominação será S1', S2', S3' e S4'. Alinhamento de sequências mostram a presença de um resíduo ácido (Asp ou Glu) em P6, um resíduo com terminação -SH (Ser ou Thr) na posição P1, e um resíduo de cadeia lateral pequena (Ala ou Ser) na posição P1' (Schechter; Berger, 1967).

No entanto, a ação de NS3 é dependente da atividade de uma das frações da proteína não estrutural 4 (NS4). Depois da clivagem, a proteína NS4A funciona

como cofator para a ação de NS3 (Bartenschlager et al., 1994; Bartenschlager et al., 1995; Failla et al., 1994; Lin et al., 1994; Tanji et al., 1995), enquanto a função de NS4B permanece desconhecida (Penin, 2003).

Desta forma, NS3 é responsável pelo início da clivagem da poliproteína viral durante o ciclo replicativo do VHC por meio de um corte intramolecular entre NS3 e NS4, dando origem a proteinase heterodimérica ativada NS3/4A, a qual processa primeiro NS5A/5B, originando a polimerase viral madura, NS5B, seguida de uma clivagem entre NS4A e NS4B, e finalmente processando a junção NS4B/NS5A (De Francesco et al, 2000). A NS5A atua na regulação da resposta ao Interferon (Moradpour e Blum, 2004) e, a NS5B constitui a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) viral, importante na replicação do VHC (Penin et al., 2004).

A proteína NS5B constitui a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), com um motivo proteico Glicina – Ácido Áspartico – Ácido Áspartico em seu sítio ativo (Lesburg et al. 1999) responsável por catalisar a polimerização do RNA durante a replicação. Constitui uma proteína integral de membrana e, inicia a síntese da fita de RNA de polaridade negativa complementar utilizando como molde o genoma viral (de polaridade positiva). Uma vez sintetizada a fita negativa funciona como molde para a síntese de novos genomas virais (fitas positivas) (Schmidt-Mende et al. 2001).

Da mesma forma que outras enzimas da mesma classe, sua estrutura cristalina permite distinguir uma imagem associada à figura de uma mão apresentando subdomínios como “dedos” (*fingers*), “palma” (*palm*) e “polegar” (*thumb*) (Schmidt-Mende et al. 2001). Sua função é dependente de íons magnésio, sendo tolerante a variações na concentração salina do meio e com atividade ótima em pH próximo a 7,5 (Behrens et al., 1996).

A RNA polimerase não apresenta atividade *proofreading*, sendo incapaz de corrigir erros que ocorram durante o processo de síntese da fita de RNA e, conduzindo a um nível de 10^{-3} a 10^{-5} mutações por nucleotídeo por replicação genômica (Duffy et al., 2008).

Desta forma, para o sucesso da replicação do VHC, embora seja necessária uma atividade coordenada das proteínas virais são extremamente importantes a NS3 e a NS5B, as quais atuam em cooperação para a replicação do RNA (Paolini et al., 2000, Piccininni et al., 2002, Zhang et al., 2005) além da NS3 atuar na clivagem proteolítica da poliproteína resultante do processo de tradução.

As atuais terapias anti-VHC não são efetivas em todos os casos e, portanto, existe uma necessidade crescente de novas abordagens terapêuticas mais eficientes e menos tóxicas (Water e Nelson, 2006).

O tratamento da infecção pelo VHC tem como objetivo o alcance da resposta virológica sustentada (RVS), que corresponde à persistência da viremia indetectável seis meses após o final do tratamento (Zeuzem et al., 2004). A primeira droga utilizada no tratamento da hepatite C crônica foi o Interferon alfa recombinante (IFN- α), o qual demonstrou eficiência limitada. A associação com a Ribavirina (RBV) melhorou a eficácia do esquema, potencializando o efeito do IFN- α (Fried, 2002). Em 2003, foram desenvolvidas formas modificadas de interferon e, a utilização do Interferon Peguilado, ainda associado com a RBV, demonstrou uma melhora significativa na porcentagem de RVS, sendo considerado o esquema terapêutico padrão ouro no tratamento da Hepatite C atualmente (Zeuzem et al., 2004).

No entanto, alguns fatores influenciam na resposta ao tratamento como características imunológicas do hospedeiro e genótipo viral. Pacientes infectados por vírus de genótipos 1 e 4 do VHC apresentam menores índices de RVS, quando comparados a portadores de VHC de outros genótipos. Desta forma, a escolha do esquema terapêutico, bem como o tempo de tratamento estão na dependência do genótipo viral (EASL, 1999).

No Brasil, a indicação do esquema terapêutico para a doença obedece à Portaria 34/SVS/MS, a qual recomenda que portadores de VHC de genótipo 1 sejam tratados com Interferon- α Peguilado associado com Ribavirina por até 48 semanas; enquanto portadores de vírus de genótipo não-1 devem receber Interferon α convencional associado com Ribavirina por 24 semanas (Brasil, 2007).

Apesar da melhora significativa no tratamento da hepatite C com a introdução do Interferon- α Peguilado, o esquema terapêutico é efetivo em apenas 50% dos infectados para portadores de vírus de genótipo 1. Dessa forma, outros agentes antivirais alternativos vêm sendo estudados. Neste grupo estão incluídos os medicamentos inicialmente designados Terapia Alvo-Específico para o VHC, do inglês, *Specifically Targeted Antiviral Therapy for HCV* ou STAT-C, atualmente designados *Direct Acting Antiviral* (DAA), entre os quais estão incluídos os inibidores de protease e da polimerase do VHC. Essas drogas estão em desenvolvimento clínico e, demonstraram eficácia antiviral potente, alcançando redução no número de cópias de vírus no paciente em tratamento precoce (Thompson e McHuntchison, 2009).

A protease codificada pela região NS3/4A cliva a poliproteína viral do VHC e a RdRp codificada pela região NS5B que sintetiza a fita de RNA durante a replicação, são essenciais para a sobrevivência e permanência do vírus no organismo do hospedeiro, portanto são, atualmente, os locais alvo para o desenvolvimento de novas terapias.

Uma vantagem para o desenvolvimento de drogas que tem como alvo as enzimas virais é que apesar do VHC mostrar uma heterogeneidade genética substancial (Choo et al., 1991), essa diversidade não é distribuída uniformemente no genoma. Estudos anteriores com o genoma completo levam a acreditar que o domínio NS3 do VHC é a região menos variável do genoma (Houghton, 1996; Farci e Purcell, 2000).

Os inibidores de protease bloqueiam a ação da serino-protease NS3 por inibição competitiva e, conseqüentemente impedem a replicação do VHC. Duas principais classes de drogas foram desenvolvidas com esta finalidade que divergem na forma de ligação à protease. O primeiro grupo inclui medicamentos capazes de inibir a protease por ligação não covalente e, no segundo grupo estão compostos que se ligam a protease por ligações covalentes reversíveis (De Francesco e Carfi, 2007).

O Telaprevir (VX-950) foi desenvolvido pela *Vertex Pharmaceuticals* e, é um inibidor da protease NS3 do VHC peptidomiméticos que age fazendo ligações covalentes reversíveis (Lin et al., 2006). Esse medicamento mostrou uma redução significativa na carga viral de pacientes portadores do vírus da hepatite C de genótipo 1 tratados com ele por um período de 14 dias (Reesink et al., 2006). Estudos multicêntricos realizados com o telaprevir vêm demonstrando resultados promissores nos Estados Unidos e Europa, principalmente em pacientes virgens de tratamento e infectados com o vírus de genótipo 1 (Kieffer et al., 2007; McHuntchison et al., 2007). O objetivo dos ensaios clínicos vem sendo definido como obtenção de RVS com RNA do VHC indetectável por 24 semanas depois do final do tratamento. Foram usados grupos que usaram o regime terapêutico baseado em IFN- α peguilado combinado com RBV, e também a terapia combinada de interferon mais o telaprevir (Lopez-Labrador, 2008). Os pacientes dos EUA mostraram RVS por 12 e 24 semanas pós-tratamento em 61-67% dos pacientes nos grupos que combinaram interferon e a terapia antiviral, comparado com 41% que mostraram RVS usando apenas a terapia baseada em interferon (McHuntchison et al., 2008). Já o grupo da Europa indicou que 62-68% dos pacientes atingiram RVS por 12 e 24 semanas pós-tratamento no grupo que usou o IFN+RBV+telaprevir comparado com 48% que atingiu RVS usando apenas IFN+RBV (Dusheiko et al., 2008). Desta forma, o uso do telaprevir vem demonstrando eficácia na inibição da replicação viral, principalmente quando utilizado em associação às drogas atualmente prescritas.

O Boceprevir (SCH503034) foi desenvolvido pela *Schering-Plough*, e é um inibidor de protease baseado em carboxiamida oral. Avançou para ensaios clínicos depois de demonstrar uma eficiência em reduzir a carga viral em pacientes infectados pelo VHC, não respondedores à terapia de IFN combinado à RBV, principalmente em infectados com vírus de genótipo 1 (Zeuzem et al., 2005). Testes clínicos ainda estão sendo conduzidos usando dois grupos: um submetido a terapia de IFN+RBV e outro submetido a uma terapia de IFN+RBV+ boceprevir. Dados preliminares mostraram uma RVS em 55-57% dos pacientes usando a terapia antiviral combinada com interferon (Kwo et al., 2008).

Os inibidores da polimerase do VHC apresentam dois mecanismos de ação distintos; podem atuar como finalizadores de cadeia, competindo com os nucleotídeos endógenos pela incorporação na cadeia de RNA, bloqueando a síntese da nova fita de RNA, sendo, neste caso, denominados de inibidores de polimerase análogos nucleosídeos (NIs); ou, agindo por inibição alostérica, alterando a conformação da enzima bloqueando a ligação do substrato natural, os quais recebem a designação inibidores de polimerase não análogos nucleosídeos (NNIs) (Thompson e McHuntchison, 2009).

No entanto, um obstáculo à utilização das drogas anti-VHC com alvo específico é a emergência de variantes resistentes (Kieffer et al., 2007). Quando se considera o aparecimento da resistência é importante definir as diferentes variantes virais que podem estar presentes em um indivíduo infectado.

Uma variante viral selvagem, do inglês *wild-type* é um organismo genético padrão, encontrado na natureza, enquanto que, uma variante mutante é aquela de caráter genético novo decorrente de uma ou mais substituições em seu genoma resultando em uma característica não encontrada no selvagem (Tanamy et al., 2008).

A elevada atividade replicativa do VHC associada a ausência de atividade de reparo da polimerase viral induzem uma grande variedade de mutações em seu genoma e, em um mesmo indivíduo infectado pode existir uma diversidade de variantes virais geneticamente distintas, são as denominadas *quasispecies* (Kuntzen et al, 2008). Desta forma, naturalmente diferentes populações virais coexistem em um mesmo indivíduo infectado sendo que, o principal fator que determina qual destas variantes se tornará predominante é a capacidade replicativa viral ou *fitness*, a qual pode ser influenciada pela pressão seletiva do sistema imunológico do hospedeiro (Kuntzen et al., 2007) ou presença de mutações de resistência às drogas antivirais (Sarrazin et al., 2007).

No contexto da utilização das novas terapias baseadas nas drogas que bloqueiam a ação das enzimas virais torna-se importante determinar a presença de variantes resistentes. A resistência a drogas antivirais aparece como resultado de

substituições de aminoácidos na proteína NS3 e/ou NS5B produzindo mudanças conformacionais que interferem na interação da droga com o seu alvo (Bartenschlager e Lohmann, 2000).

Quando se considera a resistência existem duas situações a serem consideradas, a resistência primária e a secundária. A resistência primária caracteriza-se pela presença natural de variantes resistentes e, cria condições para uma rápida seleção nos indivíduos tratados com o DAA (Bartels et al, 2008). Estudos recentes sugerem que variantes resistentes podem já estar presentes em baixas frequências entre as *quasiespecies* em pacientes virgens de tratamento, o que pode favorecer a emergência destas depois do início do tratamento (Kieffer et al, 2007; Sarrazin et al, 2007). Desta forma, a resistência primária pode ser um obstáculo ao sucesso terapêutico.

Já a resistência secundária envolve o tratamento com os novos inibidores, os quais podem induzir a seleção de mutantes resistentes, que apresentam vantagem seletiva crescente sobre os vírus selvagens e tornam-se rapidamente variantes dominantes (Cubero et al., 2008).

A fim de ser efetiva e resultar em RVS, um regime terapêutico usando drogas que inibem a replicação do VHC precisa ser capaz de inibir a replicação tanto da variante selvagem quanto das resistentes pré-existentes para alcançar um estado de eliminação sustentada do VHC (Kwong et al, 2008).

Devido a alta taxa de mutação e as grandes populações de vírus de RNA, essencialmente todo tipo de substituição não-letal de aminoácidos possível estará presente no início da terapia (Koev e Kati, 2008).

Quando se consideram os esquemas terapêuticos que utilizam inibidores da protease serina NS3 alguns estudos já demonstraram que algumas substituições podem alterar o arranjo tridimensional da enzima e conduzir a alterações de carga como as substituições Q68H, C97R, S174D e P131H, modificando a interação entre os resíduos na estrutura protéica. Porém, a perpetuação das substituições se encontra na dependência da tolerância da extensão da alteração, por exemplo, as

mutações S139P e D81G que ocorrem nos aminoácidos que formam a tríade catalítica, conduzem à perda da função enzimática e, portanto, são letais para a função da proteína e, não se perpetuam (Vallet et al, 2005).

Mutações em posições que constituem os sítios S1 e S2, sítio de ligação do inibidor, podem alterar a preferência por aminoácidos do substrato nas posições P1 e P2 (Schechter e Berger, 1967). Os polimorfismos de resíduos coadjuvantes na atividade de protease NS3 e de ligação ao substrato, mesmo que eles apareçam aleatoriamente na ausência da seleção pelos inibidores, podem sugerir a participação destes como mutações acessórias que contribuem para resistência à terapia com inibidores de protease (Doyon et al, 1996; Zennou et al., 1998).

Um estudo realizado por análises de sequências de clones da protease NS3 de um grupo de pacientes submetidos a monoterapia com telaprevir, revelou várias mutações desconhecidas previamente ao tratamento associados com resistência (Sarrazin et al., 2007). Várias mutações já foram associadas à resistência ao telaprevir *in vitro* (A156S/T/V) e *in vivo* (V36A/M, T54/A, R155/K/T e A156S/T/V) (Lin et al., 2004; Lin et al., 2005; Sarrazin et al., 2007). O perfil de resistência obtido pelo uso do telaprevir mostrou um grande número de variantes com uma alta variabilidade durante a monoterapia e aparenta ser comum para o VHC (Susser et al., 2009).

Já para o boceprevir, foram encontrados mutações em seis posições na protease NS3 associadas com diferentes níveis de resistência, localizadas nos sítios V36, T54, V55, R155, A156 e V170 (Susser et al., 2009). As variantes resistentes previamente identificadas incluem T54A, A156S/T, V170A, identificadas *in vitro* e V36A/L/M, F43C/S, T54A/S, R155K/Q/T/M, A156S, V170A/T, *in vivo* (Tong et al., 2006; Tong et al., 2008; Susser et al., 2008; Qiu et al., 2009).

Outras mutações vêm sendo relatadas como a V55A, descrita pela primeira vez em 2009, em pacientes em tratamento com boceprevir (Qiu et al., 2009; Susser et al., 2009), sendo esta mutação também importante no uso do telaprevir (Qiu et al., 2009). A mutação V170A confere uma resistência mais forte ao boceprevir quando comparado com o telaprevir evidenciado por um ensaio fenotípico, sendo que esta

mutação já havia sido descrita para o uso do boceprevir, porém não haviam sido descrita com muita frequência em pacientes tratados em monoterapia com telaprevir (Susser et al., 2009). Em 2009 uma nova mutação associada ao boceprevir foi revelada, a V158I, que foi detectada em populações virais minoritárias devido a utilização de um método de seqüenciamento de maior sensibilidade (Qiu et al., 2009).

Estudos recentes vêm mostrando a relevância das mutações V36A/M, T54A, R155K/T e A156V/T/S no que se refere a caracterização de mutantes duplos, como a presença da associação dos mutantes nos códons 36 e 155 ou 36 e 156. Análises fenotípicas dessas variantes mostraram que o V36A/M, T54A e R155K/T conferem uma resistência menos importante ao telaprevir, e A156V/T e os mutantes duplos conferiram uma resistência mais importante. Diferentemente da aids, na qual as variantes resistentes geradas durante a terapia antirretroviral mal-sucedida são arquivados na forma de provirus latentes integrados nas células T, nenhuma reserva tão antiga vem sendo encontrada para o VHC (Sarrazin et al, 2007).

No entanto, quando se considera a emergência das variantes resistentes um importante fator que afeta a dinâmica da infecção viral é a capacidade replicativa do vírus ou *fitness*, que vem se mostrando um parâmetro crítico para a persistência viral e como valor prognóstico (Martinez-Picado et al., 2000). Estudos vêm demonstrando que algumas mutações que conferem altos níveis de resistência reduzem o *fitness* viral (Croteau et al., 1997; Maguire et al., 2002), sendo que o aparecimento de mutações compensatórias restabelecem a capacidade replicativa viral mantendo a viabilidade da variante selecionada (Yi et al., 2005).

Estudos clínicos já demonstraram que tratamentos prolongados com boceprevir conduziram a emergência tardia de variantes resistentes e o aumento concomitante na prevalência da mutação A156T. A resistência à droga neste caso ocorreu devido a redução de ligação do inibidor ao seu substrato. Entretanto, a mutação A156T gradualmente desapareceu da população viral e foi substituída pela V170A. Essa modificação pode ser explicada pelo desempenho relativo das duas variantes sob condições seletivas. A mutação A156T, apesar de conferir uma

resistência mais importante, possui um desempenho replicativo tão ineficaz, que eventualmente as variantes com a mutação V170A se tornam a população majoritária (Tong et al., 2006).

É importante considerar que os mutantes resistentes podem já estarem presentes nas populações minoritárias, em uma frequência inferior a 1%, entre as *quasispecies* do paciente infectado (Lu et al., 2007; Cubero et al., 2008), podendo emergir rapidamente depois de poucos dias do início do tratamento (Kieffer et al., 2007; Sarrazin et al., 2007) embora, algumas mutações de resistência já foram detectadas em populações majoritárias de pacientes virgens de tratamento com inibidores de protease (Colson et al., 2008).

Diante dos aspectos aqui expostos torna-se evidente que o conhecimento do perfil de mutações de resistência em um paciente infectado pelo VHC é extremamente importante para que o esquema terapêutico adequado possa ser utilizado uma vez que variantes resistentes podem ser rapidamente selecionadas pela pressão exercida pelo inibidor de protease durante o tratamento antiviral, conduzindo a falência da terapia e desenvolvimento de resistência cruzada a outros medicamentos da mesma classe (Lin et al., 2005; Tong et al., 2008).

No Brasil, os inibidores de protease ainda não estão disponíveis para utilização clínica, nos Estados Unidos e Europa espera-se a introdução destes medicamentos para o ano de 2011 (FDA, 2010) e, com a disponibilização desta nova classe de drogas na terapêutica o desenvolvimento de técnicas rápidas e com bom custo-benefício, capazes de detectar variantes resistentes entre as *quasispecies* de um paciente infectado irá tornar-se vital para o monitoramento da eficácia da terapia como DAA, especialmente para avaliar os avanços virais (Bartels et al., 2008). Estes testes poderão estar também disponíveis para detecção de resistência primária, sendo realizado precocemente, na tentativa de prever a eficiência dos inibidores de protease (Kim et al., 2009). No entanto, atualmente testes de resistência a esta classe de drogas não estão disponíveis comercialmente.

Nesse cenário, a finalidade deste estudo foi propor uma metodologia *in house* para um teste de resistência às drogas para os inibidores de protease do VHC e,

determinar a presença de mutações na região NS3 em pacientes com hepatite C crônica, a fim de avaliar a resistência primária aos inibidores de protease do VHC.

OBJETIVOS

- ✓ Padronizar uma metodologia *in house* para genotipagem da região genômica NS3 do VHC para análise de resistência aos inibidores de protease;
- ✓ Avaliar a presença de mutações e polimorfismos genéticos na região codificadora da proteína NS3 do VHC, em pacientes que não utilizam inibidores de protease;
- ✓ Inferir sobre a resistência primária aos inibidores de protease na infecção pelo VHC;

CASUÍSTICA E MÉTODOS

CASUÍSTICA

Foram incluídos neste estudo 37 pacientes atendidos no Ambulatório de Hepatites da disciplina de Gastroenterologia Clínica, Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP), com sorologia positiva para o VHC, os quais apresentavam RNA viral detectado por técnicas de Biologia Molecular e, eram portadores de vírus de genótipo 1 determinado pela metodologia de hibridização reversa com o kit comercial *INNO-LIPA®* v.1.0. (Roche Molecular Systems, Alameda, CA). As características demográficas, clínicas e virológicas dos pacientes estão expressas na tabela 1.

Tabela 1: Características demográficas, clínicas, virológicas dos pacientes infectados pelo VHC de subtipo 1a incluídos no estudo (n=37).

Característica	(N = 37)
Idade, anos [média (IQR)]	47 (40-54)
Sexo, Masculino [N (%)]	27 (72,97)
Tratamento* [N (%)]	
Virgens de terapia	9 (24,32)
Peguinterferon e ribavirina	28 (75,68)
Grau da Fibrose* [N (%)]	
Leve a moderado (F0, F1, F2)	18 (48,65)
Avançado (F3, F4)	15 (40,54)
Não realizada	4 (10,81)

IQR, intervalo interquartil, *informação retirada do prontuário médico.

Este estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP mediante ofício de nº471/2009, em 07 de dezembro de 2009.

METODOLOGIA

A genotipagem da região genômica NS3 do VHC foi realizada por seqüenciamento automático de DNA utilizando protocolo otimizado *in house*.

a) Extração de RNA Viral

A extração do RNA viral a partir do plasma foi realizada utilizando o *QIAmp Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN, Valencia, CA, USA), segundo especificações do fabricante.

b) Transcrição Reversa

O RNA extraído foi utilizado como fonte para a síntese da cadeia de DNA complementar (cDNA) utilizando o *High-Capacity cDNA Archive kit* (Applied Biosystem, CA, USA), segundo as especificações do fabricante.

c) Amplificação da região genômica NS3 do VHC por Nested-PCR

A amplificação da região NS3 foi realizada utilizando, na primeira reação de amplificação, uma mistura de reação contendo 0,5 µM de cada um dos *primers* (Tabela 2), 1X Tampão Tris-HCl, 0,2mM de dNTP, 2,0mM de MgCl₂, 5,0U de *Taq Platinum DNA Polymerase* (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e 10µL de cDNA em um volume total de 50µL de reação. As condições de ciclagem foram 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, com uma etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos.

Uma segunda reação de amplificação (*Nested-PCR*) foi realizada utilizando 5µL do produto amplificado na primeira reação em uma mistura de reação com 0,5 µM de cada um dos *primers* (Tabela 2), 1X Tampão Tris-HCl, 0,2mM de dNTP, 2,0 mM de MgCl₂, 2,5U de *Easy Taq DNA Polimerase* (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil). As condições de ciclagem foram 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, com uma etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos.

Tabela 2: Seqüência dos *primers* utilizados nas reações de amplificação da região genômica NS3 do VHC.

<i>Primer</i>	Seqüência (5' → 3')	Posição*	Referência
NS2_487_1a	GAR CCM GTC GTC TTC TCC	2915- 2932	Mello et al. **
NS3_F3AS_1a	TGG TGG ACA GAG CRA CCT CCT	4109- 4089	Mello et al. **
NS3_F2AS_1a	GGT RGA GTA CGT GAT GGG G	3886- 3868	Mello et al. **
NS3_F2_1a	TAC TTG AAA GGC TCC TC	3479- 3495	Mello et al. **

NS: não estrutural, AS: *antisense*. R= A ou G; M= A ou C.

* Posição de acordo com a seqüência VHC-1 (nº de acesso no *GenBank*: M62321).

**Dados não publicados.

d) Revelação dos Produtos Amplificados por Eletroforese em Gel de Agarose

A visualização dos resultados obtidos nas reações de amplificação foi realizada em gel de agarose 2% com 0,25ng/μl de brometo de etídio, a 80V, 4mA por 40 a 60 minutos em tampão TBE (Tris-Borato 45mM/EDTA 1mM). A revelação foi realizada por exposição à luz ultra-violeta (UV) e foram consideradas positivas amostras que exibiam uma banda de, aproximadamente, 910 pares de bases (pb) para a região NS3 usando como marcador de peso molecular o *DNA Ladder 1Kb* (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil).

e) Purificação do Produto Amplificado

Os produtos amplificados foram purificados utilizando duas metodologias distintas na dependência do rendimento da reação de PCR. Quando a reação de PCR apresentou alto rendimento a purificação do produto amplificado foi realizada utilizando o *Invisorb® Fragment Clean Up* (Invitek, Berlin, Germany), no entanto quando o rendimento da PCR foi baixo a purificação do produto da PCR foi realizada o *Charge Switch – PCR Clean Up* (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), ambos segundo as especificações dos fabricantes.

f) Reação de Marcação Fluorescente

A reação de marcação fluorescente foi realizada em microplaca de 96 poços utilizando o kit *ABI Prism® Big Dye™ terminator Cycle Sequencing v.3.1*. (Applied Biosystems, CA, USA), utilizando um volume de 20μl de reação com 0,5μM de um dos *primers* (*forward* ou *reverse*), 4μl de *Big Dye* e, de 30 a 50ng de produto purificado.

Para a região genômica NS3 foram realizadas três reações, utilizando os *primers* NS2_487_1a (*forward*), NS3_F2_1a (*forward*), NS3_F2AS_1a (*reverse*).

As condições de ciclagem foram 95°C por 5 minutos; 40 ciclos de 95°C por 10 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos.

g) Precipitação

Finalizada a reação de marcação fluorescente, procedeu-se a etapa de precipitação com a finalidade de retirar os reagentes não incorporados. À reação foram adicionados 80µl de isopropanol 75% (*Merck S.A.*), deixando a placa em repouso por 15 minutos envolvida em papel alumínio à temperatura ambiente. Procedeu-se a centrifugação desta mistura a 1700g por 50 minutos à 25°C. Concluída esta fase, o isopropanol foi removido e foram adicionados 200µl de etanol 70% à placa, procedendo-se, então a centrifugação às mesmas condições anteriores por 20 minutos. Finalizada esta etapa todo o etanol foi removido e, uma incubação final da placa à 94°C por 2 minutos em termociclador foi realizada com o objetivo de eliminar o etanol residual.

h) Desnaturação do DNA e Sequenciamento

Depois da precipitação procedeu-se a desnaturação do DNA utilizando 2µl de uma mistura contendo 5 partes de formamida deionizada *Hi-Fi* (*Applied Biosystems, CA, USA*) para 1 do tampão de carregamento *blue dextran* (*Applied Biosystems, CA, USA*) e aquecimento à 94°C por 3 minutos.

A eletroforese foi conduzida no equipamento *ABI Prism 377* (*Applied Biosystems, CA, USA*) utilizando gel de poliacrilamida desnaturante *Acrigel 29:1* (*LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil*) em uma concentração de 4,75% preparado segundo especificações do fabricante. A duração da eletroforese foi de 7 horas sendo que os parâmetros de corrida e análise dos dados resultantes obedeceram às orientações do fabricante.

i) Análise dos Dados

A qualidade dos cromatogramas foi avaliada com o *software Phred* (Ewing *et al.*, 1998; Ewing *et al.*, 1998a). Para a validação dos cromatogramas foi utilizado um escore de 20. As sequências de boa qualidade obtidas com *primers forward* e *reverse* foram posteriormente analisadas por meio do *software BioEdit* (Hall *et al.*, 1999) e, as sequências consenso foram obtidas. As sequências consenso foram então submetidas pelo HCV-Blast disponível no banco de dados *The Los Alamos HCV Sequence* ([HTTP://hcv.lanl.gov](http://hcv.lanl.gov)) (Kuiken *et al.*, 2005), para validação do fragmento sequenciado.

A partir da sequência consenso de nucleotídeos foi obtida a sequência de aminoácidos da proteína no *frame* correto utilizando as ferramentas do *software BioEdit* (Hall *et al.*, 1999).

A identificação de códons de resistência e polimorfismos nas regiões genômicas foram realizadas por alinhamento múltiplo com sequências referência da região NS3 do VHC de genótipo 1a (AF009606, NC_004102, AF011751, AF011753, AF011752, AF290978, AF511950, AF271632, AF511948, AF511949, AY695436, AY695437, AB520610, AY956465, AY956468, AY956466, AY956469, AY615798, AY956464, AJ278830, AY956463) disponível nos bancos de dados *The Hepatitis C Virus (HCV) Database Project* (<http://hcv.lanl.gov/content/index>) e com a sequência referência do genoma completo do VHC-1 (nº de acesso: M62321) disponível no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando o *software ClustalX* (Higgins *et al.*, 1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Padronização da Metodologia para Genotipagem da região NS3 do VHC

A hepatite C crônica constitui um problema de saúde pública e, no Brasil seu tratamento segue a Portaria 34/SVS/MS, a qual determina a utilização de interferon- α para portadores de vírus de genótipos 2, 3 e 5 e interferon-peguilado para portadores de vírus de genótipos 1 e 4, ambos em associação com a ribavirina (Brasil, 2007). No entanto, esse tratamento apresenta eficiência em, somente 50% dos casos, sobretudo quando se considera vírus de genótipo 1. Desta forma, justifica-se o desenvolvimento de novas classes de medicamentos a serem utilizados no tratamento da infecção pelo VHC, principalmente drogas que bloqueiam enzimas envolvidas no ciclo replicativo viral (Soriano; Peters; Zeuzem, 2009).

No entanto, a utilização destas classes de medicamentos acaba selecionando variantes virais resistentes, as quais são consequência da alta taxa de mutações que ocorrem naturalmente resultantes da intensa atividade replicativa viral e ausência de atividade de reparo da polimerase do VHC (Kieffer et al., 2007).

O desenvolvimento de resistência já é bem documentado na literatura científica (Bartenschlager e Lohmann, 2000) e, ressalta a importância do desenvolvimento de testes de resistência para detectar, precocemente, a presença destas mutações de resistência.

O conhecimento do perfil de um indivíduo candidato ao tratamento com drogas antivirais é crítico para selecionar qual combinação de terapia seria apropriada para este determinado caso.

Atualmente não existem, no Brasil, tecnologias, na forma de kits comerciais, disponíveis, em nível de assistência à saúde, para a detecção de mutações associadas a resistência à drogas na infecção pelo VHC. No modelo de assistência brasileiro, um dos programas que disponibiliza o teste de resistência à drogas, para inferência de falência de um esquema terapêutico é o oferecido pelo Departamento de DST-AIDS e Hepatites Virais para a infecção pelo HIV, pelo teste de

Genotipagem para o HIV-1, o qual busca a detecção de mutações em códons específicos do genoma do vírus associados com redução da suscetibilidade aos antirretrovirais.

Seguindo este modelo implantado para o HIV, a primeira etapa deste trabalho foi a padronização de um protocolo *in house* para a genotipagem da região NS3 do VHC para inferência sobre resistência aos inibidores de protease.

A etapa de extração do RNA a partir do soro foi realizada com sucesso segundo o protocolo proposto, uma vez que o kit utilizado é considerado padrão ouro para obtenção de RNA viral, principalmente pela utilização do carreador de RNA, o qual permite a recuperação de maior quantidade de RNA da amostra isenta de células por realizar uma concentração da mesma (Qiagen, 1999).

Na fase de amplificação (RT-PCR) várias limitações técnicas estiveram presentes. O protocolo inicialmente proposto quando realizado resultou na amplificação do fragmento de 910 pb desejado, correspondente a região genômica NS3, no entanto, um grande número de fragmentos inespecíficos também foram observados (Figura 3), evidenciando condições inadequadas de anelamento dos *primers*.

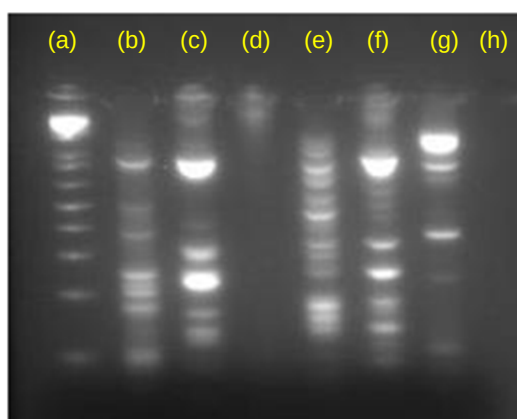


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose 2%: (a) marcador de peso molécula 1kb (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil), (b), (c), (d), (e), (f), (g): amostras, (h) controle negativo da RT-PCR.

A otimização da reação foi realizada alterando os padrões de ciclagem da primeira PCR para 94°C por 5 minutos, 5 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por

45 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, em seguida, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, com uma etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos. As concentrações dos reagentes e, as condições de ciclagem da *Nested-PCR* se mantiveram inalteradas. Depois destas alterações a reação se mostrou mais eficiente e específica (Figura 4).

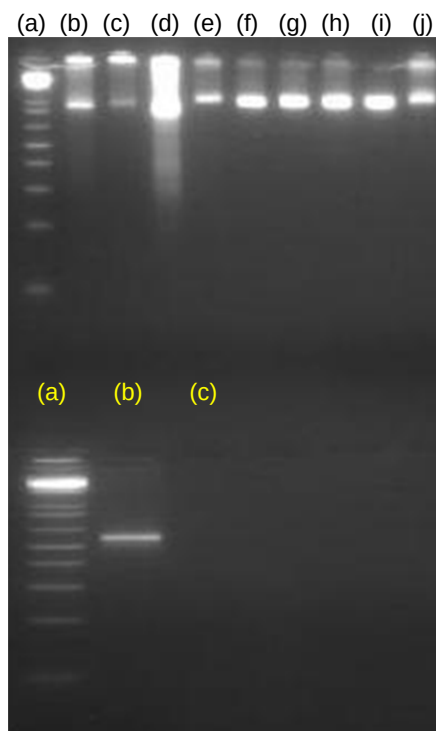


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose 2%: na porção superior da figura evidencia-se (a) marcador de peso molécula 1kb (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), (i), (j): amostras; na porção inferior: (a) marcador de peso molécula 1kb (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil), (b): amostra (c): controle negativo da RT-PCR.

Além das condições de ciclagem, outros fatores limitantes nesta fase de amplificação foram a qualidade e concentração do RNA extraído.

Amostras não detectadas por RT-PCR para o VHC não foram passíveis de amplificação, pois a quantidade de RNA viral presente na amostra é extremamente pequena e, portanto ineficiente para a amplificação. Seguindo o modelo proposto e, atualmente utilizado no teste de resistência a drogas para o HIV (Genotipagem para o HIV-1) pacientes com RNA viral inferior a 2.000 cópias de RNA/mL no plasma não são submetidos ao teste. A principal justificativa para se estabelecer este valor

mínimo de RNA detectável envolve limitações técnicas, uma vez que quantificações de RNA viral plasmáticas muito baixas, sobretudo inferiores a 1000 cópias de RNA/mL dificultam a amplificação por PCR impossibilitando o sequenciamento e a conclusão do exame (Learn et al., 1996; Gunthard et al., 1998; Schuurman et al., 1999; Shafer et al., 2001).

O sucesso da amplificação se mostrou dependente da qualidade da amostra, na qual foram fatores determinantes condições de transporte e armazenamento, visando a manutenção da integridade do RNA viral (Van der Poel et al., 1991 e 1991a).

A utilização de RNA como material fonte em análises de biologia molecular apresenta inúmeras limitações técnicas principalmente devido a baixa estabilidade do RNA. Moléculas de RNA podem ser rapidamente degradadas por endonucleases específicas e inespecíficas se a amostra não for estabilizada em um curto período de tempo após a coleta. Atualmente, várias estratégias para estabilização do RNA na amostra vêm sendo propostas como a utilização de tubos de coleta com soluções estabilizadoras de RNA (Fan e Hegde, 2005). No entanto, tais estratégias acabam aumentando o ônus financeiro do exame (Qiagen, 2009).

No que se refere a coleta da amostra o primeiro aspecto a ser considerado é a utilização da fração adequada da amostra na realização do teste. Considerando o ciclo replicativo do VHC o RNA viral pode ser detectado em amostras de soro ou plasma, de forma que estas frações devem ser obtidas a partir de amostras de sangue total provenientes dos pacientes infectados. Na prática laboratorial, estudos vêm demonstrando que a utilização de tubos de coleta que utilizam gel separador denominados *Plasma Preparation Tubes* (PPT) apresentam vantagem de fornecer um sistema fechado de coleta e transporte da amostra minimizando as etapas de manipulação na fase pré-analítica (Rainen et al., 1998). As amostras utilizadas no presente estudo foram coletadas por profissional habilitado no setor de coleta de amostras do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, em tubo Vacutainer® PPT™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA), com gel separador garantindo a integridade do RNA viral. Para a realização do teste de resistência a

garantia da integridade do RNA, no que se refere, ao transporte da amostra ao laboratório, se deu pela rápida separação do soro (período inferior a 4 horas) depois da coleta.

Outra condição crítica na manutenção da integridade do RNA é o armazenamento da amostra. As condições físicas de armazenamento das amostras também afetam a eficácia do PCR (Van der Poel et al., 1991a).

O armazenamento das amostras em temperaturas inferiores à 4°C pode reduzir a eficiência da PCR (Van der Poel et al., 1991a). Na prática laboratorial, o descongelamento do soro ou plasma armazenado, e a sua exposição à temperatura ambiente são frequentemente inevitáveis. Por outro lado, amostras descongeladas uma única vez e, submetidas à temperatura ambiente somente no momento da utilização minimizam a degradação do RNA e eleva a qualidade dos resultados obtidos na reação de PCR (Wang et al., 1992). Neste trabalho foram utilizadas amostras armazenadas à -70°C, as quais foram descongeladas uma única vez, visando a manutenção da integridade do RNA viral.

No que se refere a amplificação da região genômica de interesse para este estudo, a utilização de enzimas de alta especificidade com atividade *proofreading* foi a melhor abordagem para obtenção de um produto amplificado de qualidade. O uso de DNA polimerase permite análise precisa da diversidade atual de *quasispecies* (Malet et al., 2003). A utilização deste tipo de enzima limita interpretações errôneas da heterogeneidade das variantes virais presentes no paciente infectado pelo VHC (Mullan et al., 2001).

Embora a maior parte das limitações técnicas observadas se relacionava a fase de amplificação por RT-PCR, a etapa de seqüenciamento também conduziu a alguns problemas técnicos. Algumas das seqüências geradas não apresentaram qualidade adequada (Figura 5), dificultando a montagem do *contig* e, análise das mutações de resistência.

Muitos estudos vêm encontrando dificuldades semelhantes (Dunne et al., 2001; Shafer et al., 2001). A qualidade do produto da reação de PCR é muito

importante para a obtenção de seqüências de alta qualidade (Figura 6), o que pode ser obtido com a purificação do produto da PCR. As impurezas podem inibir a reação de marcação fluorescente. Os picos eletroforéticos devem ser claros e bem definidos (Shafer et al., 2001).

O sequenciamento detecta a variante majoritária e, algumas populações minoritárias, na dependência da sensibilidade da tecnologia utilizada. Algumas variantes podem ser indetectáveis por sequenciamento, havendo necessidade de utilização de técnicas mais sensíveis. No entanto, problemas de qualidade de seqüência podem ocorrer devido a presença de *quasispecies* na amostra, que podem gerar grande número de picos sobrepostos de difícil interpretação (Ballard; Cane; Pillay, 1998).

Para estas amostras novas abordagens técnicas, como clonagem do produto de PCR em etapa anterior ao sequenciamento podem ser empregadas a fim de obter seqüências de melhor qualidade que possibilitem a análise destes dados.

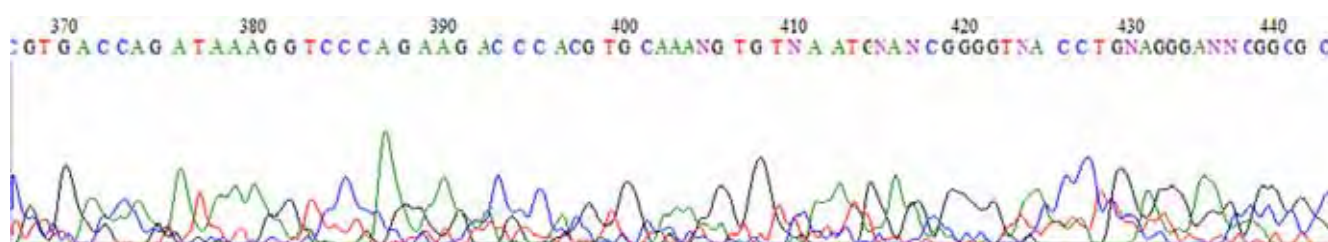


Figura 5: Parte de um cromatograma da região NS3 do VHC evidenciando má definição dos picos, sobreposição de bases e linha de base alta e mal definida, exemplificando um sequenciamento de qualidade ruim.

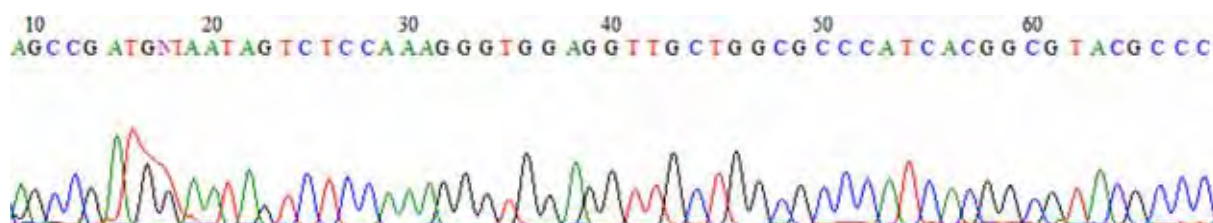


Figura 6: Parte de um cromatograma da região NS3 do VHC evidenciando a boa definição dos picos, sem sobreposição de bases, exemplificando um sequenciamento de boa qualidade.

O seqüenciamento automático para detecção de mutações de resistência na região NS3 do VHC, apesar de laborioso e de alto custo representa uma alternativa metodológica para avaliação da utilização das novas terapias para o tratamento da infecção pelo vírus da hepatite C.

Avaliação da Resistência Primária aos Inibidores de Protease

Quando se considera o desenvolvimento de medicamentos antivirais para utilização clínica, à modelo do sucesso obtido com a utilização dos inibidores da protease viral no tratamento da infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) a partir de 1996, e, os grandes benefícios terapêuticos advindos de sua introdução na terapêutica antirretroviral; a protease serina NS3 do VHC foi considerada um alvo potencial para o desenvolvimento de inibidores específicos visando bloquear o ciclo replicativo do vírus, permitindo o restabelecimento da imunidade natural (Li et al., 2005).

Embora já tenha sido demonstrado que a região genômica que codifica a protease serina NS3 do VHC é uma das regiões menos variáveis do genoma (Houghton, 1996; Farci e Purcell, 2000), estudos mostraram maior variabilidade desta região nos subtipos 1a e 1b do VHC (Lopez-Labrador *et al.*, 2008).

A replicação das *quasispecies* virais em um paciente infectado associada à pressão seletiva seleciona variantes minoritárias, menos suscetíveis a pressão e, que por isso, apresentam uma vantagem replicativa. Assim, a dinâmica da população viral é alterada e, variantes resistentes podem se tornar a população predominante no indivíduo infectado (Hammer et al., 2006).

Esta dinâmica assume particular importância quando se considera o paciente virgem de tratamento aos inibidores de protease, nos quais estas variantes resistentes apresentam potencial para emergir rapidamente no início da terapêutica. Se as variantes resistentes forem predominantes entre as *quasispecies* antes da

instituição da terapia os inibidores da protease podem ser ineficientes para bloquear a replicação viral (Colson et al., 2008).

No presente estudo 37 sequências da região genômica NS3 provenientes de pacientes virgens de tratamento com inibidores de protease, portadores de vírus de genótipo 1 foram analisadas, revelando que a tríade catalítica constituída pelos resíduos histidina, ácido aspártico e serina localizados respectivamente nas posições 57, 81 e 139 da proteína se mantinha conservada em 100% dos casos. Este dado é concordante com estudos anteriores (López-labrador et al., 2008; Vallet et al., 2005; Cubero et al., 2008; Kuntzen et al., 2008; Bartels et al., 2008), uma vez que a substituição de qualquer resíduo da tríade catalítica anula a clivagem das quatro junções (NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A e NS5A/NS5B), interferindo com a atividade da enzima (Lin, 2006). Substituições de aminoácidos próximas ao sítio ativo enzimático são pouco toleradas conduzindo a redução do *fitness* viral prejudicando a viabilidade da variante (Bartels et al., 2008).

No que se relaciona a presença de mutações de resistência já documentadas, apenas 07 (18,9%) amostras apresentavam variantes resistentes, sendo que as mutações já reportadas previamente T54A, T54S, V55A, R155K e V163L foram detectadas com igual frequência (2,7%) na população estudada e, a substituição A156T foi encontrada com uma frequência superior as demais (5,4%) (Tabela 3), e duas substituições simultâneas não foram encontradas em uma mesma amostra.

No entanto, deve-se observar o resultado aqui obtido considerando que a amostra era constituída de pacientes com infecção pelo VHC não tratados com inibidores de protease. Quando se considera a frequência total de variantes resistentes (18,9%) nota-se certa divergência com relação aos estudos anteriores, que vem relatando uma frequência muito inferior, próxima a 1% em pacientes sem tratamento com inibidores de protease (Bartels et al., 2008, Kuntzen et al., 2008). No entanto, esta divergência pode ser resultado do tamanho amostral utilizado, pois quando se considera a frequência individual das mutações de resistência encontradas neste estudo (Tabela 3) os resultados são muito próximos (2,7%) aos da literatura.

Tabela 3: Mutações associadas à resistência aos inibidores de protease encontradas na população estudada (n=37).

CÓDON	AMINOÁCIDO	SUBSTITUIÇÃO	QUANTIDADE, n (%)
54	T	A	1 (2,7)
54	T	S	1 (2,7)
55	V	A	1 (2,7)
155	R	K	1 (2,7)
156	A	T	2 (5,4)
163	V	L	1 (2,7)

Muitas mutações em códons específicos da proteína do NS3 já foram descritas em estudos com pacientes em tratamento com inibidores da protease serina NS3, evidenciando a emergência das variantes resistentes frente à pressão seletiva exercida pela droga, principalmente as substituições V36M, T54A/S, V55A/I, R155K, A156S, V158I, V163L e V170A (Qiu et al., 2009).

As substituições de aminoácidos na proteína NS3 encontradas neste estudo (T54A, T54S, V55A, R155K) possuem potencial para conduzir a resistência associada aos inibidores de protease. A T54A é uma mutação frequentemente encontrada relacionada com resistência ao boceprevir e mostra diferentes níveis de resistência ao telaprevir (Susser et al., 2008). A substituição T54S já foi encontrada previamente com uma frequência de 1,9% em pacientes virgens de inibidor de protease (Kuntzen et al., 2008), resultado bastante similar ao encontrado neste estudo.

A V55A caracteriza resistência tanto ao boceprevir quanto ao telaprevir, porém causa maiores danos à ação do boceprevir. Os estudos anteriores realizados em pacientes não tratados com inibidores de protease não relataram esta substituição, a qual foi encontrada em baixa frequência neste estudo. No entanto, mutações que conferem uma resistência mais significativa ao boceprevir como a V170A não foram encontrados na amostra analisada (Susser et al., 2008).

Análises *in silico* mostraram que a V55A interagindo com mutações no códon 139 ou 155 podem ser responsáveis por interferir na ligação do boceprevir com a proteína (Susser et al., 2008) e, embora a substituição V55A tenha sido encontrada em uma amostra deste estudo a mesma não exibia substituições em nenhum dos códons citados. A mutação V55A vem sendo relatada em amostras clínicas de pacientes após exposição aos antivirais (Susser et al., 2008) e, um estudo relatou sua presença em amostra clínica de paciente não exposto à inibidor de protease, mas após pressão seletiva do medicamento *in vitro* (Bae et al., 2010).

A mutação R155K encontrada no presente estudo já foi descrita como associada a resistência aos inibidores da protease, no entanto, principalmente em relação ao telaprevir esta mutação parece não comprometer totalmente a ação da droga, quando isolada. No entanto, quando combinada com outras substituições, como a V36A/M pode conduzir a bloqueio de ação do medicamento (Sarrazin et al., 2007). Na amostra em questão, na qual foi encontrada a substituição R155K, não foi encontrada alteração no códon 36, sugerindo que a variante apresentaria ainda suscetibilidade ao telaprevir. Esta substituição (R155K) tem sido muito discutida quando se considera pacientes não tratados com inibidores de protease, pois variantes com esta mutação foram relatadas como população dominante entre as *quasispecies* em pacientes virgens de terapia com esta classe de drogas (Colson et al., 2008).

Ainda, em relação ao telaprevir uma mutação de destaque é a A156V/T, que pode conferir uma redução de 95% no desempenho do medicamento como (Sarrazin et al., 2007), a qual foi encontrada em duas das 37 amostras analisadas nesse trabalho. Interessantemente, a variante A156T confere um maior grau de resistência, porém exibe o menor *fitness viral* em relação ao boceprevir (Reesink et al., 2006; Zeuzem et al., 2005).

Existem ainda outras posições relevantes descritas, que não conferem resistência ao boceprevir ou telaprevir, pois se localizam fora do sítio de ação dos medicamentos, mas podem comprometer outras drogas em desenvolvimento clínico como os códons 163 e 168 (Sarrazin et al., 2007). O códon 168 apresentava o

aminoácido selvagem nas amostras analisadas neste estudo sugerindo que as novas drogas em desenvolvimento clínico podem ter ação sobre as variantes circulantes nestes pacientes. Por outro lado, o códon 163 apresentou 01 amostra com a mutação V163L, alteração previamente associada à resistência.

Novamente na mesma linha da interpretação dos testes de resistência genotípica para o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) muitas vezes uma mutação é insuficiente para reduzir a suscetibilidade a um medicamento, sendo necessária a interação entre uma ou mais substituições para bloquear o efeito farmacológico da droga (Qiu et al., 2009). Neste aspecto é importante o conceito de barreira genética, ou seja, a distância genética para o desenvolvimento da resistência completa a um antiviral e pode relacionar-se ao número de mutações necessárias para diminuir a atividade do antiviral, à facilidade de seleção de mutações e ao perfil de mutações necessárias para a resistência a uma associação de antivirais (Diaz, 2007).

Embora estudos tenham demonstrado que os inibidores de protease apresentem uma menor barreira genética quando comparados aos inibidores da polimerase análogos nucleosídeos (McCown et al., 2008), diferenças vem sendo observadas quando se comparam os subtipos virais 1a e 1b (Bartels et al., 2008). VHC de subtipo 1a apresenta menor barreira genética aos inibidores de protease, quando comparados a variantes de subtipo 1b, sendo que um menor número de substituições já compromete a eficácia do medicamento (Kieffer et al., 2007). Desta forma, a interpretação da presença das mutações deve ser realizada na dependência do subtipo viral. No presente estudo nenhuma associação com o subtipo viral pode ser realizada, pois todas as amostras apresentavam vírus do subtipo 1a.

Além da barreira genética, outro fator importante que afeta a população viral resistente é o *fitness*, o qual é um parâmetro crítico para a viabilidade da variante resistente como população majoritária entre as *quasispecies* do paciente infectado (Martinez-Picado et al., 2000) e, tem influência na resistência primária, pois somente variantes prevalentes serão transmitidas (Blower et al., 2001; Brenner et al., 2002).

Embora de maneira geral, variantes resistentes pareçam ter menor *fitness* quando comparadas as variantes selvagens e, mutações relacionadas a baixo nível de resistência apresentam um efeito mínimo no *fitness* viral (Sarrazin et al., 2007), variantes portadoras da substituição R155K já foram relatadas como predominantes em pacientes virgens de terapia com inibidores de protease, com *fitness* comparável ao vírus selvagem (Colson et al., 2008).

Algumas hipóteses têm sido discutidas para explicar a presença desta variante em pacientes não tratados como ser resultado de um evento aleatório ou a substituição ser resultante de pressão do sistema imunológico do hospedeiro por esta região constituir um epítipo para reconhecimento antigênico (Lauer et al., 2004; Schulze et al., 2005). Neste estudo uma amostra apresentou a substituição relatada, a qual também é objeto de preocupação quando se considera sua relação com resistência cruzada ao telaprevir e boceprevir, potenciais inibidores de protease a serem liberados para utilização clínica.

Muitas vezes, diante da ocorrência de uma substituição que gera uma variante resistente e, conseqüente redução do *fitness* viral podem ocorrer modificações adaptativas ou compensatórias, na tentativa de melhorar a capacidade replicativa da variante (Qiu et al., 2009). Alguns códons já foram identificados como alvos de mutações compensatórias para recuperação do *fitness* viral como os códons 86, 89, 162 e 176 (Cubero et al., 2008). Neste estudo, não foram encontradas alterações de aminoácidos nestes códons.

O presente estudo analisou 655 nucleotídeos da região genômica codificadora da serina protease NS3, correspondente aos 218 primeiros aminoácidos da proteína possibilitando uma análise não somente quanto às mutações de resistência previamente reportadas na literatura, mas também quanto aos polimorfismos genéticos presentes nas variantes virais estudadas.

Algumas substituições podem potencialmente desarranjar a estrutura tridimensional da protease NS3, resultantes de alterações elétricas com modificações de carga eletrostática que modificam as interações entre os resíduos (Vallet et al., 2005).

A figura 7 mostra os resultados obtidos para as 37 amostras analisadas considerando os 218 aminoácidos da sequência da proteína NS3 analisada neste estudo, bem como a frequência em que cada substituição foi detectada.

As figuras 8 e 9 ilustram o alinhamento completo de aminoácidos da região NS3 das 37 amostras analisadas neste estudo.

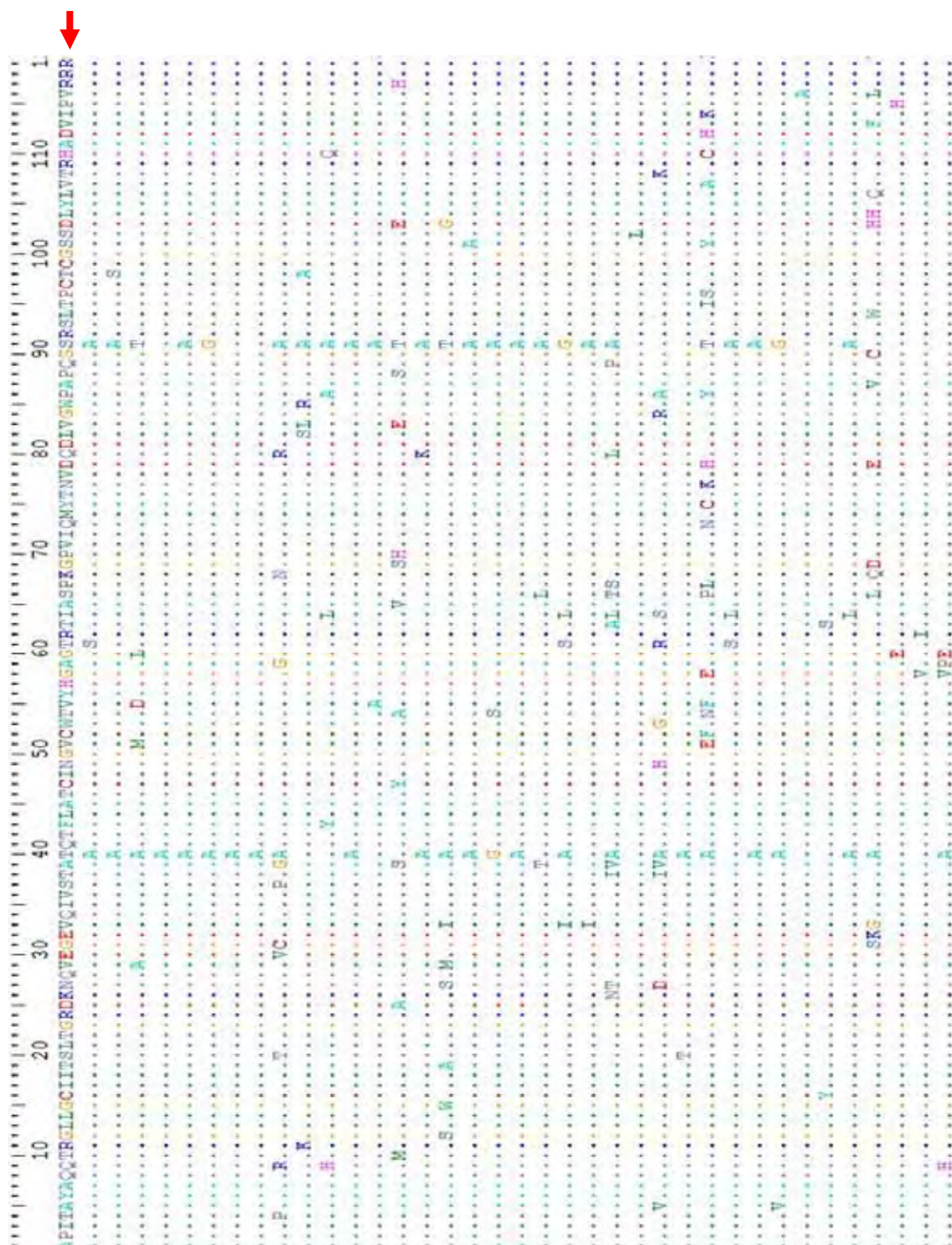


Figura 8: Parte inicial (códon 1 a 120) do alinhamento múltiplo das sequências da região genômica NS3 do VHC realizada no programa *ClustalX*: sequência referência (AF009606) é mostrada na primeira linha do alinhamento (seta vermelha); cada linha representa uma sequência viral sendo que os aminoácidos concordantes com a sequência referência são vistos como ponto (.) e os discordantes pela respectiva sigla do aminoácido substituído.

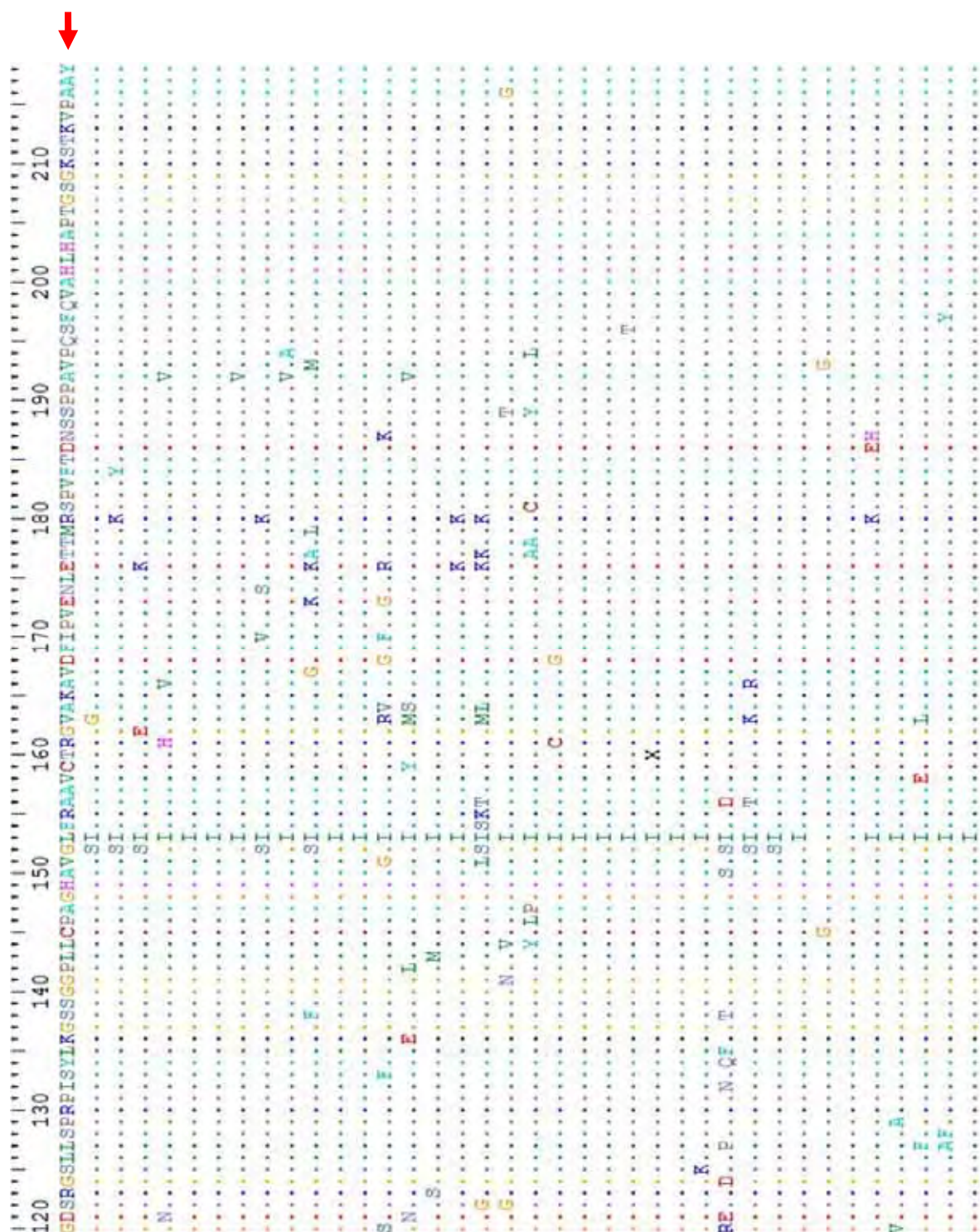


Figura 9: Parte final (códon 120 a 215) do alinhamento múltiplo das sequências da região genômica NS3 do VHC realizada no programa *ClustalX*: sequência de referência (AF009606) é mostrada na primeira linha do alinhamento (seta vermelha); cada linha representa uma sequência viral sendo que os aminoácidos concordantes com a sequência referência são vistos como ponto (.) e os discordantes pela respectiva sigla do aminoácido substituído.

Quando se analisou as substituições encontradas nas amostras estudadas nota-se a presença de 315 modificações de aminoácidos em relação à sequência referência da NS3 (Figura 7), número muito superior ao que poderia ser atribuído à artefatos técnicos. A utilização de uma *Taq DNA polimerase* de alta especificidade, com atividade *proofreading* possibilita uma análise das quasispecies com precisão, minimizando substituições que possam ocorrer devido à incorporação errônea de nucleotídeos durante a amplificação (Malet et al., 2003). Estudos já demonstraram que enzimas de alta especificidade devem ser as de primeira escolha para análise genética do VHC (Mullan et al., 2001), limitando a interpretação equivocada da heterogeneidade das variantes circulantes. Portanto, as substituições encontradas nos isolados da protease NS3 podem ser consideradas polimorfismos genuínos e, não variação artefactual.

Para avaliar o significado destas substituições é importante determinar as modificações químicas sofridas pela proteína.

Os aminoácidos são classificados em Aminoácidos com grupos R não-polares, os quais são hidrofóbicos e as cadeias laterais tendem a se agrupar dentro das proteínas estabilizando a estrutura protéica por meio de interações hidrofóbicas, como a alanina (Ala ou A), valina (Val ou V), Leucina (Leu ou L), Isoleucina (Ile ou I), Glicina (Gly ou G), metionina (Met ou M) e prolina (Pro ou P); Aminoácidos com R aromáticos ou polares neutros, que são, relativamente, não polares ou polares neutros como a fenilalanina (Phe ou F), tirosina (Tyr ou Y) e triptofano (Trp ou W); Aminoácidos Polares, cujos grupos R são mais solúveis em água pois formam pontes de hidrogênio com a água, como serina (Ser ou S), treonina (Thr ou T), cisteína (Cys ou C), asparagina (Asn ou N) e Glutamina (Gln ou Q); Aminoácidos com R carregados positivamente, básicos e mais hidrofílicos como a lisina (Lys ou K), arginina (Arg ou R) e histidina (His ou H); Aminoácidos com R carregados negativamente, são ácidos como aspartato (Asp ou D) e glutamato (Glu ou E) (Lehninger, 2006).

Desta forma, algumas substituições podem alterar a estrutura tridimensional da proteína NS3 e exercer algum efeito em sua atividade (Vallet et al., 2005). A

tabela 4 distribui as substituições encontradas nas amostras analisadas segundo as características físico-químicas.

Tabela 4: Características físico-químicas das substituições encontradas nas amostras analisadas (n=37).

Polar para polar	S20T, N27S, N27T, T54S, T54N, T61S, T63S, S66T, Q73N, S91T, T98S, S138T, N174S, S181C, S189T, S196T
Polar para não-polar	T4P, T10M, T19A, S37P, T38I, T40A, T40G, T54A, T63A, S66L, Q80L, Q89P, S91A, S91G, T95I, T98A, S101A, S102L, S122G, C145G, T177A, T178A
Polar para polar neutro	C16Y, C47Y, C52F, S101Y, S128F, S133F, S138F, C159Y, S189Y
Polar para ácido	N27D
Polar para básico	Q9R, Q9H, S20T, N49H, T61R, Q80R, N77K, Q80K, T108K, S125K, T177K, N187H, N187K
Polar neutro para polar neutro	F43Y, F184Y, F197Y
Polar neutro para polar	Y75C, Y134Q, F154S
Polar neutro para não-polar	W53G
Polar neutro para básico	W85R
Não-polar para não-polar	A5V, V29A, V29M, V33G, V33I, A39G, A39V, V51M, V55A, G58V, A59G, A59P, G60L, I64L, A65V, V83L, P86A, P86A, A87V, V107A, V116L, V116A, G120V, L127A, L127P, P129A, P142L, L143M, L144V, P146L, A147P, V151G, V151L, L153I, V163G, V163L, V163M, A164V, A164L, A166V, V167G, I170V, M179L, A192V, V193G, V193M, P194A, P194L
Não-polar para polar	G12S, G31C, G31S, A39T, A39S, I64S, P67S, G69S, L82S, P88S, G90C, P96S, L106Q, G120S, I132N, G141N, A150S, G152S, A156T, A164S
Não-polar para polar neutro	G15W, V55F, P86Y, L94W, V113F, L127F, L135F, L144Y, I170F
Não-polar para ácido	V51E, V55D, G58E, G60E, G69D, V83E, G124D, A156D, V158E, G162E
Não-polar para básico	P70H, G84R, L104H, I114K, G120R, P155H, V163R, V163K, A166R,
Básico para básico	R11K, R117H, R155K, R161H, R180K
Básico para ácido	K136E
Básico para polar	K26N, K68N, K68Q, H110Q, H110C, R123S, R161C
Básico para não-polar	R62I
Ácido para ácido	D79E, D103E, D121E, D186E
Ácido para básico	E32K, D79H, D103H, D112H, E173K, E176R, E176K
Ácido para polar	D121N
Ácido para não-polar	D25A, E30V, D103G, D168G, D168G, E173G

Das 315 variações de aminoácidos encontradas 19 (6%) ocorreram em códons de resistência, das quais apenas 6 (31,6%) (Tabela 3) constituíam mutações já associadas a resistência aos inibidores de protease.

Além das mutações citadas anteriormente, já associadas à resistência aos inibidores de protease, outras modificações de aminoácidos em códons de resistência foram detectadas: T54N, V55D, V55F, A156D, V158E, V163G, V163K, V163R, V163M, I170V, I170F (Figura 7), todas com frequência de 2,7% exceto a V163G que apareceu com uma frequência um pouco superior (5,4%).

Destas alterações em códons de resistência a T54N, V163G, V163M e I170V não exibiram alterações nas características físico-químicas dos aminoácidos substituintes em relação ao original (Tabela 4), no entanto, a implicação destas alterações na resistência ainda não é clara, uma vez que mutações de resistência já descritas podem apresentar substituintes de mesma característica físico-química do aminoácido selvagem.

Todas as demais alterações geraram modificações físico-químicas na proteína. As substituições V55D, A156D e V158E envolvem a troca de um aminoácido não polar por um aminoácido eletricamente carregado, ácido. Da mesma forma, as substituições V55F e I170F mostram a presença de um aminoácido polar neutro na posição que deveria ser ocupada por um não polar e; a V163R e V163K evidenciam a troca de um aminoácido não polar por um eletricamente carregado, básico. A modificação da interação entre os aminoácidos pode alterar a conformação da proteína NS3 e contribuir para o aparecimento de resistência. Um maior número de amostras deve ser analisado para avaliar o significado destes achados.

Os resultados obtidos demonstram vários polimorfismos genéticos nas variantes virais estudadas, no entanto destaca-se a conservação da tríade catalítica e dos aminoácidos de ligação ao zinco e; a ocorrência do maior número de substituições nos códons 153 (94,6%), 40 (67,5%) e 91 (67,5%). A tabela 5 mostra as substituições encontradas nos códons 40, 91 e 153.

A substituição T40A que envolve a troca de uma treonina por uma alanina pode ser sugestiva de alterações nas interações entre os resíduos de aminoácidos da serina protease NS3. A treonina (T ou Thr) é um aminoácido não-carregado ou polar, o qual possui seus grupos R mais solúveis em água ou mais hidrofílicos, por possuir seu grupo funcional polar hidroxila capaz de formar pontes de hidrogênio com a água. Por outro lado, a alanina (A ou Ala) é um aminoácido que possui grupos R alifáticos, portanto, não-polares. Os grupos R dessa classe são hidrofóbicos e suas cadeias laterais tendem a se agrupar dentro das proteínas, estabilizando a estrutura protéica por meio de interações hidrofóbicas (Lehninger, 2006).

A troca de uma treonina por uma alanina no códon 40 da proteína, provavelmente, localizada em um dobra β , conduz a uma mudança de carga e, embora, esse resíduo não esteja localizado nos sítios mais críticos como a tríade catalítica, no sítio de ativação ao NS4A e ao sítio de ligação do zinco, análises por modelagem molecular podem avaliar se este polimorfismo pode, de alguma forma, alterar a função enzimática.

Tabela 5: Polimorfismos genéticos na região da serina protease NS3 não associados à resistência aos inibidores de protease (n=37).

POSIÇÃO	AMINOÁCIDO	SUBSTITUIÇÃO	QUANTIDADE, n(%)
40	T	A	26 (64,86)
40	T	G	01 (2,700)
91	S	A	22 (48,65)
91	S	T	04 (10,81)
91	S	G	03 (8,11)
153	L	I	40 (94,6)

A substituição S91A envolve a troca de uma serina por uma alanina. A serina (S ou Ser) está agrupada com a treonina e, assim, mais hidrofílico e capaz de formar

pontes de hidrogênio com a água (Lehninger, 2006). A posição 91 está localizada numa estrutura β , e devido a sua localização mais próxima de um dos resíduos da tríade catalítica, a mudança de carga deve ser avaliada com cautela. Estudos de modelagem molecular podem ser úteis na elucidação do papel desta substituição.

Segundo Love e colaboradores (1996), o “caminho hidrofóbico” é vale longo, estreito e superficial com uma superfície molecular contínua e não-polar localizada principalmente na segunda conformação β . Especificamente, o caminho é formado pelas cadeias laterais de resíduos conservados Val-33, Val-35, Leu-44, Leu-94, Val-107, Leu-127, Ala-111, Val-113, Pro-115, Pro-142, Leu-144, Tyr-105 (porção aromática) e Arg-109 (porção da cadeia alquil). Desde que interações hidrofóbicas são frequentemente componentes chave do reconhecimento molecular, a associação de duas estruturas β com o caminho hidrofóbico pode simular uma ou mais interações moleculares que ocorrem durante o processamento da poliproteína.

A última substituição que foi encontrada numa frequência altíssima foi a L153I, onde ocorreu uma substituição de uma leucina (L ou Leu) por uma isoleucina (I ou Ile), em todas as amostras analisadas. Tanto a leucina quanto a isoleucina são da família dos aminoácidos não-polares, e desta forma, sugere-se que a alteração pode não afetar a estabilidade da estrutura da proteína. Além disso, é importante considerar que 09 amostras apresentaram a L153I associada à G152S, dado que deve ser visto com cautela, pois pode sugerir uma provável associação de substituições.

Estas substituições T40A, S91A e L153I podem estar associadas a algum grau de resistência a inibidores como telaprevir e boceprevir, e suas interações com outros polimorfismos e mutações podem interferir no desempenho dos medicamentos (Bae et al., 2010)

Portanto, é importante a análise de mutações e polimorfismos genéticos em associação, uma vez que embora não associados diretamente a resistência à drogas a presença deles pode afetar a atividade enzimática e prejudicar a replicação viral, além de que pode existir sinergismo ou antagonismo de substituições com potencialização ou redução de uma resistência. As interações entre as mutações

podem trazer mais obstáculos ao desenvolvimento desses tratamentos com alvo específicos (DAA) do que as mutações únicas.

REFERÊNCIAS

ALTER, M.J. Epidemiology of Hepatitis C virus infection. **World J Gastroenterol.** v.13, n.17, p.2436-2441, 2007.

ALVES, A.V. *et al.* Tratamento de pacientes com hepatite crônica pelo vírus C com Interferon- α e Ribavirina: a experiência da Secretaria de Saúde do Rio Grande do Sul. **Arq. Gastroenterol.** v.40, n.4, p.227-232, 2003.

BAE, A.; SUN, S.-C.; QI, X.; CHEN, X.; KU, K.; WORTH, A.; WONG, K.A.; HARRIS, J.; MILLER, M.D.; MO, H. Susceptibility of treatment-naïve Hepatitis C virus (HCV) clinical isolates to HCV protease inhibitors. **Antimicrob. Ag. Chem.** v.54, n.12, p.5288-5297, 2010.

BALLARD, A.L.; CANE, P.A.; PILLAY, D. HIV drug resistance: genotypic assays and their possible applications. **Sex. Transm Infect.** v.74, n.4, p.243-248, 1998.

BARTELS, D.J.; ZHOU, Y.; ZHANG, E.Z.; MARCIAL, M.; BYRN, R.A.; PFEIFFER, T.; TIGGES, A.M.; ADIWIJAYA, B.S.; LIN, C.; KWONG, A.D.; KIEFFER, T.L. Natural prevalence of Hepatitis C virus variants with decreased sensitivity to NS3-4A protease inhibitors in treatment-naïve subjects. **J. Infect. Dis.** v.198, n.6, p.800-807, 2008.

BARTENSCHLAGER, R.; AHLBORN-LAAKE, L.; MOUS, J.; JACOBSEN, H. Kinetic and structural analysis of Hepatitis C virus polyprotein processing. **J Virol.** v.68, p.5045-5055, 1994.

BARTENSCHLAGER, R.; LOHMANN, V.; WILKINSON, T.; AND KOCH, J. O. Complex formation between the NS3 serine-type proteinase of the Hepatitis C virus and ns4a and its importance for polyprotein maturation. **J Virol.** v.69, p.7519-7528, 1995.

BARTENSCHLAGER, R.; LOHMANN, V. Replication of Hepatitis C vírus. **J. Gen. Virol.** v.81, p.1631-1648, 2000.

BAZAN, J.F.; FLETTERICK, R.J. Detection of a trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses. **Virology.** v.171, p.637-639, 1989.

BAZAN, J.F.; FLETTERICK, R.J. Structural and catalytic models of trypsin-like viral proteases. **Semin. Virol.** v.1, p.311-322, 1990.

BEHRENS, S.E.; TOMEI, L.; DE FRANCESCO, R. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of Hepatitis C vírus. **EMBO J.** v.15, n.1, p12-22, 1996.

BLOWER, S.M.; ASCHENBACH, A.N.; GERSHENGORN, H.B.; KAHN, J.O. Predicting the unpredictable: transmission drug-resistance HIV. **Nat. Med.** v.7, n.9, p.1016-1020, 2001.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Portaria nº 34, de 28 de setembro de 2007. Dispõe sobre protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para a hepatite viral C. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília. 9 out. 2007; Seção I, n 195, p.60-63.

BRENNER, B.G.; ROUTY, J.P.; PETRELLA, M.; MOISI, D.; OLIVEIRA, M.; DETORIO, M.; SPIRA, B.; ESSABAG, V.; CONWAY, B.; LALONDE, R.; SEKALY, R.P.; WAINBERG, M.A. Persistence and fitness of multidrug-resistant human immunodeficiency vírus type 1 acquired in primary infection. **J. Virol.** v.76, n.4, p.1753-1761, 2002.

CAMPIOTTO, S. *et al.* Geografic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Braz J Med Biol Res.** v.38, n.1, p.41-49, 2005.

CHOO, Q.-L.; RICHMAN K.H.; HAN, J.H.; BERGER, K.; LEE, C.; DONG, C.; GALLEGOS, C.; COIT, D.; MEDINA-SHELBY, A.; BARR, P.J.; WEINER, A.J.; BRADLEY, G.K.; HOUGHTON, M. Genetic organization and diversity of the Hepatitis C virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.88, p.2451-2455, 1991.

COLSON, P.; BROUK, N.; LEMBO, F.; CASTELLANI, P.; TAMALET, C.; GÉROLAMI, R. Natural presence of substitution R155K within Hepatitis C vírus NS3 protease from a treatment-naïve chronically infected patient. **Hepatology.** v.47, n.2, p.766-767, 2008.

CROTEAU, G.; DOYON, L.; THIBEAULT, D.; McKERCHER, G.; PILOTE, L.; LAMARRE, D. Impaired fitness of human immunodeficiency virus type 1 variants with high-level resistance to protease inhibitors. **J. Virol.** v.71, n.2, p. 1089-1096, 1997.

CUBERO, M.; ESTEBAN, J.I.; OTERO, T.; SAULEDA, S.; BES, M.; ESTEBAN, R.; GUARDIA, J.; QUER, J. Naturally occurring NS3-protease-inhibitor resistant mutant A156T in the liver of a untreated chronic Hepatitis C patient. **Virology.** v.370, p.237-245, 2008.

DE FRANCESCO, R.; URBANI, A.; NARDI, M. C.; TOMEI, L.; STEINKÜHLER, C.; TRAMONTANO, A. A zinc binding site in viral serine proteinase. **Biochemistry**. v.35, p.13282-13287, 1996.

DE FRANCESCO, R.; NEDDERMANN, P.; TOMEI, L.; STEINKÜHLER, C.; GALLINARI, P.; FOLGORI, A. Biochemical and immunologic properties of the nonstructural proteins of the Hepatitis C virus: implications for development of antiviral agents and vaccines. **Seminars. Liv. Dis.** v.20, n.1, 2000.

DE FRANCESCO, R.; CARFI, A. Advances in the development of new therapeutic agents targeting the NS3-4A serine protease or the NS5B RNA-dependent RNA polymerase of the hepatitis C virus. **Adv. Drug. Del. Rev.** v.59, n.12, p.1242-1262, 2007.

DIAZ, R.S. Resistência ao Tenofovir. **Infectologia**. n.53, p.53-58, 2007.

DOYON, L.; CROTEAU, G.; THIBEAULT, D.; POULIN, F.; PILOTE, L.; LAMARRE, D. Second locus involved in human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors. **J Virol**. v.70, p.3763–3769, 1996.

DUFFY, S.; SHACKELTON L.A.; HOLMES, E.C. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. **Nat. Rev. Genet.** v.9, n.4, p.267-276, 2008.

DUNNE, E. The impact of iatrogenically acquired Hepatitis C infection on the well-being and relationships of a group of irish women. *J. Health. Psychol.* V.6, p.679-692, 2001.

DUSHEIKO, G.M.; HEZODE, C.; POL, S.; GOESER, T.; BRONOWICKI, J.-P.; BOURTIERE, M.; BUGGISCH, P.; SERFATY, L.; BERG, T.; COUZIGOU, P.; BENHAMOU, Y.; FORESTIER, N.; BENGTSSON, L.; GHARAKHANIAN, S.; KAUFFMAN, R.; ALAM, J.; FERENCI, P.; PAWLOTSKY, J.M.; ZEUZEM, S. Treatment of chronic Hepatitis C with telaprevir (TVR) in combination with peginterferon alfa-2a with or without ribavirin: interim results of the PROVE2 study. **43rd EASL Conference**, 2008.

EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. Paris, Consensus Statement. European Association for the Study of the Liver. **J Hepatol.** v.30, n.5, p.956-961, 1999.

EWING, B. *et al.* Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy Assessment. **Genome Res.** v.8, n.3, p.175-185, 1998.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res.** v.8, n.3, p.175-194, 1998a.

FAILLA, C.; TOMEI, L.; AND DE FRANCESCO, R. Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of Hepatitis C virus nonstructural proteins. **J Virol.** v.68, p.3753-3760, 1994.

FAILLA, C.; TOMEI, L.; AND DE FRANCESCO, R. An amino-terminal domain of the Hepatitis C virus NS3 protease is essential for interaction with NS4A. **J Virol.** v.69, p.1769-1777, 1995.

FAN, H.; HEGDE, P.S. The Transcriptome in blood: challenges and solutions for robust expression profiling. **Curr. Mol. Med.** v.5, n.1, p.3-10, 2005.

FARCI, P.; PURCELL, R.H.; Clinical significance of Hepatitis C virus genotypes and *quasiespecies*. **Semin. Liver. Dis.** v.20, p.103-126, 2000.

FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION. Hepatitis C Experts Sought for FDA Advisory Committee. Disponível em http://www.hivandhepatitis.com/hep_c/news/2010/1210_2010_a.html, 2010.

FRIED, M.W.; SHIFFMAN, M.L.; REDDY, K.R.; SMITH, C.; MARINOS, G.; GONÇALES, F.L.; HÄUSSINGER, D.; DIAGO, M.; CAROSI, G.; DHUMEAUX, D.; CRAXI, A.; LIN, A.; HOFFMAN, J. YU, J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic Hepatitis C virus infection. **N. Engl. J. Med.** v.347, p.975-982, 2002.

GORBALENYA, A.E.; DONCHENKO, A.P.; KOONIN, E.V.; BLINOV, V.M. N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. **Nucleic Acids Res.** v.17, n.10, p.3889–3897, 1989.

GUNTARD, H. F.; WONG, J.K.; IGNACIO, C.C.; HAVLIR, D.; RICHMAN, D.D. Comparative performance of high-density oligonucleotide sequencing and dideoxynucleotide sequencing of type 1 pol from clinical samples. **AIDS. Res. Hum. Retrovir.** v.14, p.869–876, 1998.

HAHM, B.; HAN, D.S.; BACK, S.H.; SONG, O.K.; CHO, M.J.; KIM, C.J.; SHIMOTOHNO, K.; JANG, S.K. NS3-4A of Hepatitis C virus is a chymotrypsin-like protease. **J. Virol.** v.69, n.4, p.2534-2539, 1995.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.** n.41, p.95-98, 1999.

HAMMER, S.M.; SAAG, M.S.; SCHECHTER, M.; MONTANER, J.S.G.; SCHOOLEY, R.T.; JACOBSEN, D.M.; THOMPSON, M.A.; CARPENTER, C.C.J.;

FISCHL, M.A.; GAZZARD, B.G.; GATELL, J.M.; HIRSCH, M.S.; KATZENSTEIN, D.A.; RICHMAN, D.D.; VELLA, S.; YENI, P.G.; VOLBERDING. Treatment for adult HIV infection: 2006 recommendations of the international AIDS society-USA panel. **Amer. Med. Assoc.** v.296, n.7, p.827-843, 2006.

HIGGINS, D.G.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. **Methods Enzymol.** v.266, p.383-402, 1996.

HIJIKATA, M.; MIZUSHIMA, H.; AKAGI, T.; MORI, S.; KAKIUCHI, N.; KATO, N.; TANAKA, T.; KIMURA, K.; AND SHIMOTOHNO, K. Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of Hepatitis C virus. **J Virol.** v.67, p.4665-4675, 1993.

HOOFNAGLE, J.H. Course and outcome of Hepatitis C. **Hepatology.** v. 36, n.5, p.S21-S29, 2002.

HOUGHTON, M. Hepatitis C viruses. IN: Howley DMKPM, editor. **Fields Virology.** 3^{ed}, p.1035-1058. Philadelphia: Lippincott-Raven.

IVANYI-NAGY, R. *et al.* Analysis of Hepatitis C virus RNA dimerization and core-RNA interactions. **Nucleic Acids Res.** v.34, n.9, p.2618-2633, 2006.

JONES, C.T.; MURRAY, C.L.; EASTMAN, D.K.; TASSELLO, J. RICE, C.M. Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. **J. Virol.** v.81, p.8374-8383, 2007.

KIEFFER, T.L.; SARRAZIN, C.; MILLER, J.S.; WELKER, M.W.; FORESTIER, N.; REESINK, H.W.; KWONG, A.D.; ZEUZEM, S. Telaprevir and pegylated interferon-alpha-2a inhibit wild-type and resistant genotype 1 Hepatitis C virus replication in patients. **Hepatology.** v.46, p.631-639, 2007.

KIM, J.L.; MORGENSTERN, K.A.; LIN, C.; FOX, T.; DWYER, M.D.; LANDRO, J.A.; CHAMBERS, S.P.; MARKLAND, W.; LEPRE, C.A.; O'MALLEY, E.T.; HARBESON, S.L.; RICE, C.M.; MURCKO, M.A.; CARON, P.R.; THOMSON, J.A. Crystal structure of the Hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. **Cell.** v.87, p.343-355, 1996.

KIM, A.Y.; TIMM, J.; NOLAN, B.E.; REYOR, L.L.; KANE, K.; BERICAL, A.C.; ZACHARY, K.C.; LAUER, G.M.; KUNTZEN, T.; ALLEN, T.M. Temporal dynamics of a predominant protease-inhibitor resistance mutation in a treatment naïve HCV-infected individual. **J. Infect. Dis.** v.199, n.5, p.737-741, 2009.

KOEV, G.; KATI, W. The emerging field of HCV drug resistance. **Informa Healthcare**. v.17, n.3, p.303-319, 2008.

KUIKEN, C.; YUSIM, K.; BOYKIN, L.; RICHARDSON, R. The Los Alamos Hepatitis C database. **Bioinformatics**. v.21, n.3, p.379-384, 2005.

KUNTZEN, T.; TIMM, J.; BERICAL, A.; LEWIS-XIMENEZ, L.L.; JONES, A.; NOLAN, B.; ZUR WIESCH, J.S.; LI, B.; SCHNEIDEWIND, A.; KIM, A.Y.; CHUNG, R.T.; LAUER, G.M.; ALLEN, T.M. Viral sequence evolution in acute Hepatitis C virus infection. **J. Virol**. v.81, n.21, p.11658-11668, 2007.

KUNTZEN, T.; TIMM, J.; BERICAL, A.; LENNON, N.; BERLIN, A.M.; YOUNG, S.K.; LEE, B.; HECKERMAN, D.; *et al.* Naturally occurring dominant resistance mutations to HCV protease and polymerase inhibitors in treatment-naïve patients. **Hepatology**. v.48, n.6, p.1769-1778, 2008.

KWO, P.; LAWITZ, E.; MCCONE, J.; *et al.* Interim results from HCV SPRINT-1 RVR/SVR from phase 2 study of boceprevir plus peginteron (peginterferon alfa 2b)/ribavirin in treatment-naïve subjects with genotype-1 CHC. **43rd Annual Meeting of the European Association for The study of the liver. J. Hepatol**. v.48, 2008.

KWONG, A.D.; McNAIR, L.; JACOBSON, I.; GEORGE, S. Recent progress in the development of selected Hepatitis C virus NS3-4A protease and NS5B polymerase inhibitors. **Curr. Opin. Pharmac**. v.8, p.522-531, 2008.

LAUER, G.M.; BARNES, E.; TIMM, J.; OUCHI, K.; KIM, A.Y.; DAY, C.L.; ROBBINS, G.K.; CASSON, D.R.; REISER, M.; DUSHEIKO, G.; ALLEN, T.M.; CHUNG, R.T.; WALKER, B.D.; KLENERMAN, P. High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent Hepatitis C virus infection. **Gastroenterology**. v.127, n.3, p.924-936, 2004.

LEHNINGER, A.L. *et al.* **Princípios de bioquímicas**. São Paulo: SARVER. 2000, 3ed.

LESBURG, C.A.; CABLE, M.B.; FERRARI, E.; HONG, Z.; MANNARINO, A.F.; WEBER, P.C. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from Hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. **Nat. Struc. Biol**. v.6, p.937-943, 1999.

LI, K.; FOY, E.; FERREON, J.C.; NAKAMURA, M.; FERREON, A.C.M.; IKEDA, M.; RAY, S.C.; GALE, M.; LEMON, S.M. Immune evasion by hepatitis C virus

NS3_4A protease mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. **PNAS**. v.102, n.8, p.2992-2997, 2005.

LIN, C.; PRÁGAI, B.M.; GRAKOU, A.; XU, J.; RICE, C.M. Hepatitis C virus NS3 serine proteinase: *trans*-cleavage requirements and processing kinetics. **J. Virol**. v.68, p.8147-8157, 1994.

LIN, C.; LIN, K.; LUONG, Y.-P.; RAO, B.G.; WEI, Y.-Y.; BRENNAN, D.L.; FULGHUM, J.R.; HSIAO, H.-M.; MA, S.; MAXWELL, J.P.; COTTRELL, K.M.; PERNI, R.B.; GATES, C.A.; KWONG, A.D. *In vitro* resistance studies of Hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061: Structural analysis indicates different resistance mechanisms. **J. Biol. Chem**. v.279, n.17, p. 17508-17514, 2004.

LIN, C.; GATES, C.A.; RAO, B.G.; BRENNAN, D.L.; FULGHUM, J.R.; LUONG, Y.-P.; FRANTZ, J.D.; LIN, K.; MA, S.; WEI, Y.-Y. *et al.* *In vitro* studies of cross-resistance mutations against two Hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061. **J. Biol. Chem**. v.280, p. 36784-36791, 2005.

LIN, K.; PERNI, R.B.; KWONG, A.D.; LIN, C. VX-950, a novel Hepatitis C virus (HCV) NS3-4A protease inhibitor, exhibits potent antiviral activities in HCV replicon cells. **Antimicrobiol. Ag. Chem**. v.50, n.5, p. 1813-1822, 2006.

LYRA, A.C. *et al.* Molecular biology and clinical implication of Hepatitis C virus. **Braz. J. Med. Biol. Res**. v.37, n.5, p.691-695, 2004.

LOHMANN, V.; KÖRNER, F.; KOCH, J.-O.; HERIAN, U.; THEILMANN, L.; BARTENSCHLAGER, R. Replication of subgenomic Hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. **Science**. v.285, n. 5424, p.110-113, 1999.

LEARN, G.H.; KORBERT, B.T.M.; FOLEY, B.; HAHN, B.H.; WOLINSKY, S M.; MULLINS, J.I. Maintaining the integrity of human immunodeficiency virus sequence databases. **J. Virol**. v.70, p.5720–5730, 1996.

LÓPEZ-LABRADOR, F.-X. Hepatitis C virus NS3-4A protease inhibitors. **Rec. Pat. Anti-Infec. Drug Disc**. v.3, p.157-167, 2008.

LOVE, R.A.; PARGE, H.E; WICKERSHAM, J.A.; HOSTOMSKY, Z.; HABUKA, N.; MOOMAW, E.W.; ADACHI, T.; HOSTOMSKA, Z. The crystal structure of Hepatitis C virus NS3 proteinase reveals a trypsin –like fold and a structural zinc binding site. **Cell**. v. 87, p.331-342, 1996.

LU, L.; DEKHTYAR, T.; MASSE, S.; PITHAWALLA, R.; KRISHNAN, P.; HE, W.; NG, T.; KOEV, G.; STEWART, K.; LARSON, D.; BOSSE, T.; WAGNER, R.; PILOT-MATIAS, T.; MO, H.; MOLLA, A. Identification and characterization of mutations conferring resistance to an HCV RNA-dependent RNA polymerase inhibitor *in vitro*. **Antiv. Res.** v.76, n.1, p.93-97, 2007.

MAGUIRE, M.; SHORTINO, D.; KLEIN, A.; HARRIS, W.; MANOHITHARAJAH, V.; TISDALE, M.; ELSTON, R.; YEO, J.; RANDALL, S.; XU, F.; PARKER, H.; MAY, J.; SWONDEN, W. Emergence of resistance to protease inhibitor amprenavir in human immunodeficiency virus type 1-infected patients: selection of four alternative viral protease genotypes and influence of viral susceptibility to coadministered reverse transcriptase nucleoside inhibitors. **Antimicrob. Ag. Chem.** v.46, n.3, p.731-738, 2002.

MALET, I.; BELNARD, M.; AGUT, H.; CAHOUR, A. From RNA to quasispecies: a DNA polymerase with proofreading activity is highly recommended for accurate assessment of viral diversity. **J. Virol. Methods.** v.109, p.161–170, 2003.

MARTINEZ-PICADO, J.; DEPASQUALE, M.P.; KARTSONIS, N.; HANNA, G.J.; WONG, J.; FINZI, D.; ROSENBERG, E.; GÜNTARD, H.F.; SUTTON, L.; SAVARA, A.; PETROPOULOS, C.J.; HELLMANN, N.; WALKER, B.D.; RICHMAN, D.D.; SICILIANO, R.; D'AQUILA R.T. Antiretroviral resistance during successful therapy of HIV type 1 infection. **PNAS.** v.97, n.20, p.10948-10953, 2000.

MELLO, I.M.V.G.C. Estudo de mutações primárias para inibidores de protease e polimerase para o vírus da Hepatite C em portadores crônicos da cidade de São Paulo. Dados não publicados.

McCOWN, M.F.; RAJYAGURU, S.; POGAM, S.L.; ALI, S.; JIANG, W.-R.; KANG, H.; SYMONS, J.; CAMMACK, N.; NAJERA, I. The Hepatitis C vírus replicon presents a higher barrier to resistance to nucleoside analogs than to nonnucleoside polymerase pr protease inhibitors. **Antimicrob. Ag. Chem.** v.52, n.5, p.1604-16112, 2008.

MCHUTCHISON, J.G. Understanding Hepatitis C. **Amer. J. Man. Care.** v.10, n.2, p. S21-S29, 2004.

MCHUTCHISON, J.G.; EVERSON, G.T.; GORDON, S.; *et al.* Results of an interim analysis of a phase 2 study of telaprevir (VX-950) with peginterferon-alfa-2a and ribavirin in previously untreated subjects with Hepatitis C. Annual meeting of the european association for the study of the liver. **J. Hepatol.** v.46, 2007.

MCHUTCHISON, J.G.; EVERSON, G.T.; GORDON, S.; *et al.* PROVE1 Study: results from a phase 2 study of telaprevir with peginterferon plus ribavirin in treatment-naïve subjects with Hepatitis C. Annual meeting of the European association for the study of the liver. **J. Hepatol.** v.48, 2008.

MILLER, R.H.; PURCELL, R.H. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.87, p.2057-2061, 1990.

MORADPOUR, D.; BLUM, H.E. A primer on the molecular virology of Hepatitis C. **Liver International.** v.24, n.6, p.519-525, 2004.

MULLAN, B.; KENNY-WALSH, E.; COLLINS, J.K.; SHANAHAN, F.; FANNING, L.J. Inferred Hepatitis C virus quasispecies diversity is influenced by choice of DNA polymerase in reverse transcriptase-polymerase chain reactions. **Anal. Biochem.** v.289, p.137–146, 2001.

MURPHY, D. *et al.* A new genotype of Hepatitis C virus originating from central Africa [Abstract]. **Hepatology.** v.46, n.623A, 2007.

PAOLINI, C.; LAHM, A.; DE FRANCESCO, R. Mutational analysis of Hepatitis C virus NS3-associated helicase. **J. Gen. Virol.** v.81, p.1649-1658, 2000.

PENIN, F. Structural biology of Hepatitis C virus. **Clin. Liver Dis.** v.7, n. 1, p. 1-21, 2003.

PENIN, F. *et al.* Structural biology of Hepatitis C virus. **Hepatology.** v.39, n. 1, p. 5-19, 2004.

PICCININNI, S.; VAQRAKLIOTI, A.; NARDELLI, M.; DAVE, B.; RANEY, K.D.; MCCARTHY, J.E. Modulation of the Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity by the non-structural (NS) 3 helicase and the NS4B membrane protein. **J. Biol. Chem.** v.277, n.47, p.45670-45679, 2002.

QIAGEN. QIAmp® Viral RNA Mini Kit Handbook, 1999.

QIU, P. *et al.* Identification of HCV protease inhibitor resistance mutations by selection pressure-based method. **Nucleic Acids Res.** v. 37, n.10, 2009.

REESINK, H.W.; ZEUZEM, S.; WEEGINK, C.J.; FORESTIER, N.; VAN VLIET, A.; ROOIJ, J.W.; McNAIR, L.; PURDY, S.; KAUFFMAN, R.; ALAM, J.; JANSEN, P.L. Rapid decline of viral RNA in Hepatitis C patients treated with VX-950: a phase Ib, placebo-controlled, randomized study. **Gastroenterology**. v.131, n.4, p.997-1002, 2006.

SARRAZIN, C.; KIEFFER, T.L.; BARTELS, D.; HANZELKA, B.; MUH, U.; WELKER, M.; WINCHERINGER, D.; ZHOU, Y.; CHU, H.-M.; LIN, C.; WEEGINK, C.; REESINK, H.; ZEUZEM, S. KWONG, A.D. Dynamic Hepatitis C virus genotypic and phenotypic changes in patients treated with the protease inhibitor telaprevir. **Gastroenterology**. v.137, p.1767-1777, 2007.

SCHECHTER, I.; AND BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.27, p.157-162, 1967.

SCHMIDT-MENDE, J.; BIECK, E.; HÜGLE, T.; PENIN, F.; RICE, C.M.; BLUM, H.E.; MORADPOUR, D. Determinants for membrane association of the Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. **J.Biol.Chem.** v.276, n.47, p.44052-44063, 2001.

ZUR WIESCH, J.S.; LAUER, G.M.; DAY, C.L.; KIM, A.Y.; OUCHI, K.; DUNCAN, J.E.; WURCEL, A.G.; TIMM, J.; JONES, A.M.; MOTHE, B.; ALLEN, T.M.; MCGOVERN, B.; LEWIS-XIMENEZ, L.; SIDNEY, J.; SETTE, A.; CHUNG, R.T.; WALKER, B.D. Broad repertoire of the CD4⁺ TH cell response in spontaneously controlled Hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes. **J. Immunol.** V.175, p.3603-3613, 2005.

SCHUURMAN, R.; DEMETER, L.; REICHELDERFER, P.; TIJNAGEL, J.; DE GROOT, T.; BOUCHER, C. Worldwide evaluation of DNA sequencing approaches for identification of drug resistance mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. **J. Clin. Microbiol.** V.37, p.2291–2296, 1999.

SEEFF, L.B. Natural history of chronic Hepatitis C. **Hepatology**. v. 36, n.5, p.S35-S46, 2002.

SHAFFER, R.W.; HERTOGS, K.; ZOLOPA, A.R.; WARFORD, A.; BLOOR, S.; BETTS, B.J.; MERIGAN T.C.; HARRIGAN, R.; LARDER, B.A. High degree of interlaboratory reproducibility of human immunodeficiency virus type 1 protease and

reverse transcriptase sequencing of plasma samples from heavily treated patients. **J. Clin. Microb.** v.39, n.4, p.1522-1529, 2001.

SIMMONDS, P. *et al.* Consensus proposals for a unified system of nomenclature of Hepatitis C virus genotypes. **Hepatology.** v.42, n.4, p.962-973, 2005.

SOMMERGRUBER, W.; CASARI, G.; FESSL, F.; SEIPELT, J.; SKERN, T. The 2A proteinase of human rhinovirus is a zinc containing enzyme. **Virology.** v.204, p.815-818, 1994.

SORIANO, V.; PETERS, M.G.; ZEUZEM, S. New therapies for Hepatitis C virus infection. **Clin. Infect. Dis.** v.48, n.3, p. 313-320, 2009.

STEMPNIAK, M.; HOSTOMSKA, Z.; NODES, B. R.; AND HOSTOMSKY, Z. The NS3 proteinase domain of Hepatitis C virus is a zinc-containing enzyme. **J. Virol.** v.71, p.2881-2886, 1997.

STRAUSS, E. Hepatite C. **Rev. Soc. Bras. Med. Tropical.** v.34, n.1, p.68-82, 2001.

Susser, S.; Welker, M.; Zettler, M.; Wohnsland, A.; Hughes, E.; Ralston, R.; Tong, X.; Zeuzem, S.; Sarrazin, C. Clonal analysis of mutations selected in the HCV NS3 protease domain of genotype 1 non-responders treated with boceprevir (SCH503034). **J. Hepatol.** v.48, 2008.

SUSSER, S.; WELSCH, C.; WANG, Y.; ZETTLER, M. DOMINGUES, F.S.; KAREY, U.; HUGHES, E.; RALSTON, R.; TONG, X.; HERRMANN, E.; ZEUZEM, S.; SARRAZIN, C. Characterization of resistance to the protease inhibitor boceprevir in Hepatitis C virus-infected patients. **Hepatology.** v.50, n.6, p.1709-1718, 2009.

RAINEN, L.; OELMUELLER, U.; JURGENSEN, S.; WYRICH, R.; BALLAS, C.; SCHRAM, J.; HERDMAN, C.; BANKAITIS-DAVIS, D.; NICHOLLS, N.; TROLLINGER, D.; TRYON, V. **Stabilization of mRNA** expression in whole blood samples. **Clin. Chem.** v.48, p.1883-1890, 2002.

TANAMY, M.G.; KECK, Z.-Y.; Y, M.; MCKEATING, J.A.; PATEL, A.H.; FOUNG, S.K.H.; LEMON, S.M. *In vitro* selection of a neutralization-resistant Hepatitis C virus escape mutant. **PNAS.** v.105, n.49, p.19450-19455, 2008.

TANJI, Y.; HIJIKATA, M.; HIROWATARI, Y.; AND SHIMOTOHNO, K. Identification of the domain required for trans-cleavage activity of the Hepatitis C viral serine proteinase. **Gene**. v.145, p.215-219, 1994.

Tanji, Y.; Hijikata, M.; Satoh, S.; Kaneko, T.; and Shimotohno, K. Hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS4A has versatile functions in viral protein processing. **J Virol**. v.69, p.1575-1581, 1995.

THOMPSON, A.J.V.; MCHUNTCHISON, J.G. Antiviral resistance and specifically targeted therapy for HCV (STAT-C). **J. Vir. Hep.** v.16, p.377-387, 2009.

VALLET, S.; GOURIOU, S.; NOUSBAUM, J.-B.; LEGRAND-QUILLIEN, C.; GOUDEAU, A.; PICARD, B. Genetic Heterogeneity of the NS3 protease gene in Hepatitis C virus genotype 1 from untreated infected patients. **J. Med. Virol.** v.75, p.528-537, 2005.

Tong, X.; Chase, R.; Skelton, A.; Chen, T.; Wright-Minogue, J; Malcolm, B.A. Identification and analysis of fitness of resistance mutations against the HCV protease inhibitor SCH503034. **Antiviral Res.** v.70, p.28–38, 2006.

Tong, X.; Bogen, S.; Chase, R.; Girjavallabhan, V.; Guo, Z.; Njoroge, F.G.; Prongay, A.; Saksena, A.; Skelton, A.; Xia, E. *et al.* Characterization of resistance mutations against HCV ketoamide protease inhibitors. **Antiviral Res.** v.77, p.177–185, 2008.

van der Poel, C., H. Cuypers, H. Reesink, Q.-L. Choo, G. Kuo,

VAN DER POEL, C.; CUYPERS, H.; REESINK, H.; CHOO, Q.-L.; KUO, G.; HAN, J.; QUAN, S.; POLITO, A.; VERSTRATEN, J.; VAN DE WOUW, J.; SCHAASBERG, W.; HOUGHTON, M.; LELIE, P. Risk factors in hepatitis C virus-infected blood donors. **Transfusion**. v.31, p.777-779, 1991.

VAN DER POEL, C. L.; CUYPERS, H.T.; REESINK, H. W.; WEINER, A. J.; QUAN, S.; DI NELLO, R.; VAN BOVEN, J.J.; WINKEL, I.; MULLER-FOLKERTS, D.; VAN EXEL-OEHLERS, P.J.; SCHAASBERG, W.; LEENTVAAR-KUYPERS, A.; POLITO, A.; HOUGHTON, M.; LELIE, P.N. Confirmation of hepatitis C virus infection by new four-antigen recombinant immunoblot assay. **Lancet**. v.337, p.317-319, 1991.

VOSS, T.; MEYER, R.; SOMMERGRUBER, W. Spectroscopic characterization of rhinoviral protease 2A: Zn is essential for the structural integrity. **Protein Sci.** v.4, p.1-10, 1995.

WANG, J.-T.; WANG, T.-H.; SHEU, J.-C.; LIN, S.-M.; LIN, J.-T.; CHEN, D.-S. Effects of anticoagulants and storage of blood samples on efficacy of the polymerase chain reaction assay for Hepatitis C virus. **J. Clin. Microb.** v.30, n.3, p.750-753, 1992.

WATERS, L.; NELSON, M. New therapeutic options for Hepatitis C. **Curr. Opin. Infect. Dis.** v.19, p.615-622, 2006.

WELLER, I.V.D.; WILLIAMS, I.G. ABC of AIDS: Antiretroviral Drugs. **Brit. Med. J.** v.322, n.7299, p.1410-1412, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Weekly Epidemiological Record. Hepatitis C Fact Sheet n.164, 2000. Disponível em <<http://www.who.int/inf-fs/en/fact164.html>>.

YI, M.; TONG, X.; SKELTON, A.; CHASE, R.; CHEN, T.; PRONGAY, A.; BOGEN, S.L.; SAKSENA, A.K.; NJOROGUE, F.G.; VESELENAK, R.L.; PYLES, R.B.; BOURNE, N.; MALCOLM, B.A.; LEMON, S.M. Mutations conferring resistance to SCH6, a novel Hepatitis C virus NS3-4A protease inhibitor: reduced RNA replication fitness and partial rescue by second-site mutations. **J. Biol. Chem.** v.281, n.12, p.8205-8215, 2005.

YU, S. F.; LOYD, R. E. Characterization of the roles of conserved cysteine and histidine residues in poliovirus 2A protease. **Virology.** v.186, p.725-735, 1992.

ZEIN, N.N. Clinical significance of Hepatitis C virus genotypes. **Clin. Microbiol. Rev.** v.13, n.2, p.223-235, 2000.

ZENNOU, V.; MAMMANO, F.; PAULOUS, S.; MATHEZ, D.; CLAVEL, F. Loss of viral fitness associated with multiple Gag and Gag-Pol processing defects in human immunodeficiency virus type 1 variants selected for resistance to protease inhibitors in vivo. **J Virol.** v.72, p.3300–3306, 1998.

ZEUZEM, S. *et al.* Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic Hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3*1, *2. **J. Hepatology.** v.40, n.6, p.993-999, 2004.

ZEUZEM, S.; PAWLOTSKY, J.M.; LUKASIEWICZ, E.; VON WAGNER, M.; GOULIS, I.; LURIE, Y.; GIANFRANCI, E.; VROLIJK, J.M.; ESTEBAN, J.I.; HEZODE, C.; LAGGINGI, M.; NEGRO, F.; SOULIER, A.; VERHEIJ-HART, E.; HANSEN, B.; TAL, R.; FERRARI, C.; SCHALM, S.W.; NEUMANN A.U. International, multicenter, randomized, controlled study comparing dynamically individualized versus standard treatment inpatients with chronic Hepatitis C. **J. Virol.** v.43, n.2, p.250-257, 2005.

ZHANG, C.; CAI, Z.; KIM, Y.-C.; KUMAR, R.; YUAN, F. SHI, P.-Y; KAO, C.; LUO, G. Stimulation of Hepatitis C virus (HCV) nonstructural protein 3 (NS3) helicase activity by the NS3 protease domain and by HCV RNA-dependent RNA polymerase. **J. Virol.** v.79, n.24, p.8687-8697, 2005.