

ANA CAROLINA GOMES JARDIM

Análise comparativa da variação entre *quasiespecies*
do Vírus da Hepatite C genótipo 1 em amostras pré-
tratamento de pacientes tratados com Peginterferon

ANA CAROLINA GOMES JARDIM

Análise comparativa da variação entre *quasiespecies*
do vírus da hepatite C genótipo 1 em amostras pré-
tratamento de pacientes tratados com Peginterferon

**Dissertação apresentada para obtenção do Grau de
Mestre em Genética**

Orientadora: Profa. Dra. Paula Rahal

Co-orientadora: Profa. Dra. Isabel M. V. G. C. Mello

São José do Rio Preto - SP

2007

Jardim, Ana Carolina Gomes.

Análise comparativa da variação entre *quasiespecies* do vírus da hepatite C genótipo 1 em amostras pré-tratamento de pacientes tratados com Peginterferon / Ana Carolina Gomes Jardim. – São José do Rio Preto: [s.n.], 2007

106 f. : il ; 30 cm.

Orientadora: Paula Rahal

Co-orientadora: Isabel Maria Vicente Guedes de Carvalho Mello

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Vírus. 2. Vírus da hepatite C. 3. Variabilidade (Vírus da hepatite C) 4. *Quasiespecies*. 5. NS5A. I. Rahal, Paula. II. Mello, Isabel Maria Vicente Guedes de Carvalho. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 578.53

ANA CAROLINA GOMES JARDIM

Análise comparativa da variação entre *quasiespecies*
do vírus da hepatite C em pacientes do genótipo 1 pré-
tratamento com Peginterferon

Dissertação apresentada para obtenção do Grau de
Mestre em Genética do Instituto de Biociências, Letras
e Ciências Exatas da Universidade Estadual “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Paula Rahal
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. João Renato Rebello Pinho
USP – São Paulo

Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira
FAMERP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 26 de fevereiro de 2007.

Dedico este trabalho...



*Às queridas da minha vida:
minha mãe Rosângela e minha avó Antônia.*

Obrigada...

Não apenas por serem meus exemplos de vida, mas por me ensinarem que os objetivos só são alcançados com muito trabalho, amor e dedicação.

Não apenas por investirem e confiarem em mim, mas por sempre me fazer acreditar que sou capaz.

Amo muito vocês!

Agradecimentos

- ✿ À minha orientadora Profa. Dra. Paula Rahal, pela amizade, companheirismo, carinho, dedicação, e acima de tudo por todos os ensinamentos profissionais e pessoais nestes anos de convivência. Obrigada por confiar em meu trabalho, por me incentivar em todos os momentos, mesmo nos momentos de devaneios, pela ajuda em alcançar meus objetivos e principalmente pela oportunidade de ser uma das “meninas super poderosas da Paula Rahal”.
- ✿ À minha co-orientadora Profa. Dra. Isabel M. V. G. C. Mello, por toda dedicação, empenho e cuidado que teve com este trabalho, especialmente no final tumultuado. Obrigada por me ajudar a obter novos conhecimentos, ter novas visões científicas e por se dedicar integralmente nos momentos de desespero e correria.
- ✿ À minha aluna de co-orientação Lílian Yamasaki, pela paciência, companheirismo, responsabilidade e dedicação que empregou não apenas neste trabalho, mas em todas as coisas que se propõe a fazer.
- ✿ À médica colaboradora deste projeto Roberta Maria Fachinni, por fornecer as amostras necessárias para a realização deste trabalho.
- ✿ Ao estatístico Prof. Dr. Antônio Cordeiro, por toda a paciência e disponibilidade na tentativa de me fazer entender os “princípios matemáticos”.
- ✿ Ao Dr. João Renato Rebello Pinho, pelo incentivo em trabalhar com Hepatite C e por estar sempre disposto a ajudar no que for preciso. Obrigada pela receptividade e pela confiança que deposita em nosso laboratório.

- ☀ Ao Dr. Maurício Lacerda Nogueira, por sempre recorrer com muito carinho os meus apelos, em todas as vezes que foi necessária a utilização de seu laboratório. Em especial, obrigada por permitir que usássemos a geladeira de leveduras para fins pessoais.
- ☀ Às amigas de todas as horas Carol, Cíntia, Marília, Lisandra e Symara, por todos os anos de companheirismo, amizade e pelos clubinhos cheios de bebidinhas e comilança, o que nós uniu até mesmo na hora de engordar. Obrigada por me alegrarem nos momentos de farra e me consolarem nos momentos difíceis, principalmente quando eu reclamava do meu amigo gerenciador (sinônimo utilizado pela Symara para se referir ao seqüenciador).
- ☀ Às amigas Karina, Larissa, Marcela, Marcella, Maysa e Renatinha, pelos momentos que passamos juntas e que nunca vou esquecer.
- ☀ Aos amigos que compartilharam a bancada, as discussões científicas, os problemas, as longas e cansativas horas de preparo de células competentes, e as conquistas no laboratório de Estudos Genômicos. Cíntia, Marília, Lílian, Paola, Érica, Jucimara, Fátima, Marina, Fernanda, Gustavo, Marcelo, Paulo, Gislaíne, Maira, Luciana, Patrícia e Tatiane, obrigada pelo apoio e pelo crescimento pessoal que o convívio com vocês me proporcionou.
- ☀ À amiga Lenira, por ajudar todos os alunos do laboratório e sempre nos receber com carinho quando estamos cheios de problemas, compromissos e trabalho.
- ☀ Aos meus novos amigos do Instituto Butantan Lúcia, Ronaldo, Gregório, Kátia, Marco, Alexandra, Mari, Renato, Soraia e Heloísa, pela receptividade e pelos momentos de descontração nas paradas para o cafezinho.

- ☀ AOs alunos da Pós-graduação em genética, pela amizade, pelos momentos de tensão compartilhados, e pelo companheirismo nos ideais que estamos batalhando juntos.
- ☀ AOs professores da Pós-graduação em genética, pelos ensinamentos, pela disponibilidade e dedicação aos alunos. Agradeço especialmente ao Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron e Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza, pela confiança e carinho no início de minhas atividades científicas.
- ☀ À coordenação da Pós-graduação em genética, pela prontidão em esclarecer todas as minhas dúvidas, escutar minhas reivindicações e ajudar no que foi possível.
- ☀ Ao Laboratório de Estudos Genômicos e ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, pela infra-estrutura de ensino e pesquisa, essenciais para a realização deste trabalho.
- ☀ À CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro disponibilizado para a realização deste trabalho.
- ☀ Ao gato mais lindo do mundo, meu bebê, por me fazer companhia em todas as noites de trabalho, mesmo quando estava dormindo em cima dos papers ou balançando a tela do computador.
- ☀ Às pessoas que não foram citadas, mas que participaram da minha vida, da minha formação e da minha luta, meu muito obrigada.
- ☀ A Deus, por tudo.

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.”

Albert Einstein

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	
1.1.	História e Patologia.....	02
1.2.	Epidemiologia e Transmissão.....	03
1.3.	O vírus da Hepatite C.....	05
1.3.1.	Estrutura genômica e proteínas virais.....	06
1.3.2.	Replicação.....	15
1.3.3.	Diversidade genética do genoma viral.....	16
1.4.	Tratamento.....	19
2.	OBJETIVOS.....	24
3.	MATERIAL E MÉTODOS	
3.1.	População e amostra.....	27
3.1.1.	Critérios de Inclusão e exclusão.....	28
3.1.2.	Aspectos Éticos.....	28
3.2.	Métodos.....	29
3.2.1.	Extração de RNA.....	29
3.2.2.	Síntese do DNA complementar (cDNA).....	29
3.2.3.	Amplificação da região genômica viral NS5A.....	30
3.2.4.	Detecção do produto amplificado.....	32
3.2.5.	Purificação dos fragmentos amplificados.....	34
3.2.6.	Clonagem dos produtos purificados.....	35
3.2.7.	Seqüenciamento.....	36
3.2.8.	Análise das seqüências.....	41
3.2.9.	Construção da topologia da árvore filogenética.....	43
3.2.10.	Análise estatística.....	44

4.	RESULTADOS	
4.1.	População e amostra.....	47
4.2.	Amplificação da região genômica viral NS5A.....	48
4.3.	Clonagem dos produtos amplificados.....	48
4.4.	Seqüenciamento.....	49
4.5.	Análise das seqüências.....	52
4.5.1.	Validação, Montagem da seqüência consenso e Alinhamento.....	52
4.5.2.	Análise das Seqüências de aminoácidos.....	54
4.5.3.	Análise das substituições de nucleotídeos e aminoácidos....	60
4.6.	Construção da topologia da árvore filogenética.....	69
4.7.	Análise estatística.....	71
5.	DISCUSSÃO.....	77
6.	CONCLUSÕES.....	90
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
8.	ANEXOS.....	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia do vírus da hepatite C: partícula viral.....	05
Figura 2. Estrutura genômica e proteômica do HCV.....	06
Figura 3. Proteína NS5A. Regiões <i>CRS</i> , <i>ISDR</i> , <i>PKR-binding</i> , <i>NLS</i> e <i>V3</i> , sítios de fosforilação, hiperfosforilação, sítios de clivagem e sítio de ligação à NS4A.....	12
Figura 4. Topologia das proteínas do HCV com relação à membrana celular.....	16
Figura 5. Variabilidade genética nas diferentes regiões do genoma do HCV.....	17
Figura 6. Resposta virológica à terapia de peginterferon e ribavirina.....	22
Figura 7. Sítio de anelamento dos <i>primers</i> degenerados e específicos para o genótipo 1b utilizados para amplificação da região NS5A completa do HCV.....	32
Figura 8. Fluxograma metodológico I: população, amostra e métodos utilizados para amplificação da região genômica viral NS5A.....	33
Figura 9. Seqüência de DNA compreendendo parte da seqüência do plasmídeo, parte da região NS4B ou NS5B e parte da NS5A resultante do seqüenciamento das amostras com os <i>primers</i> M13F e M13R.....	37
Figura 10. Esquema do sítio de anelamento dos <i>primers</i> utilizados para o seqüenciamento da região NS5A completa do HCV 1a e 1b.....	38
Figura 11. Fluxograma metodológico II: purificação, clonagem e seqüenciamento das amostras amplificadas.....	40
Figura 12. Fluxograma metodológico III: análise das seqüências, construção da topologia da árvore filogenética e análise estatística.....	45
Figura 13. Perfil de corrida eletroforética dos plasmídeos extraídos das colônias referentes às amostras de pacientes respondedores, não respondedores e respondedores ao final do tratamento. Representação dos plasmídeos das colônias 8, 10 e 12, que apresentaram perfil de corrida eletroforética diferenciado.....	49

Figura 14. Resultado do seqüenciamento das 183 colônias do estudo com os <i>primers</i> M13F e M13R.....	51
Figura 15. Esquema representativo da localização das substituições nas seqüências de aminoácidos deduzidas do alinhamento das seqüências consenso NS5A 1a de pacientes Respondedores, Não respondedores e Respondedores ao final do tratamento com relação à seqüência referência 1a (<i>GeneBank</i> NC_004102.1).....	56
Figura 16. Esquema representativo da localização das substituições nas seqüências de aminoácidos deduzidas do alinhamento das seqüências consenso NS5A 1b de pacientes Respondedores, Não respondedores e Respondedores ao final do tratamento com relação à seqüência referência 1b (<i>GeneBank</i> D50481.1).....	57
Figura 17 a. Diferenças de aminoácidos nas regiões <i>CRS</i> e <i>PKR-binding</i> comparadas às referencias 1a (<i>GeneBank</i> NC_004102.1) e 1b (<i>GeneBank</i> D50481.1).	58
Figura 17 b. Diferenças de aminoácidos nas regiões <i>ISDR</i> , <i>NLS</i> e <i>PKR-binding</i> comparadas às referencias 1a (<i>GeneBank</i> NC_004102.1) e 1b (<i>GeneBank</i> D50481.1).....	59
Figura 18. Comparação da média do número de mutações em nucleotídeos e da mediana do número de mutações em aminoácidos na NS5A completa e nas regiões <i>CRS</i> , <i>PKR-binding</i> , <i>ISDR</i> , <i>NLS</i> e <i>V3</i> entre pacientes respondedores (R), não respondedores (NR) e respondedores ao final do tratamento (RFT).....	67
Figura 19. Comparação da mediana da distância genética, freqüência de substituições sinônimas por sítios sinônimos (<i>Ks</i>) e freqüência de substituições não sinônimas por sítios não sinônimos (<i>Ka</i>) na NS5A completa e nas regiões <i>CRS</i> , <i>PKR-binding</i> , <i>ISDR</i> , <i>NLS</i> e <i>V3</i> entre pacientes respondedores (R), não respondedores (NR) e respondedores ao final do tratamento (RFT).....	68
Figura 20. Árvore filogenética, não enraizada, de 165 seqüências da região NS5A com 1344 (HCV1a) e 1341 (HCV1b) nucleotídeos (15 clones dos pacientes 02, 06, 11, 07, 08, 12, 09, 04, e 10, 14 clones dos pacientes 05 e 03 e 2 seqüências do <i>Genbank</i> sendo uma genótipo 1a e outra 1b, destacadas em vermelho) gerada pelo programa <i>PAUP</i> * utilizando-se o método de distância com o modelo HKY85 +I+G e algoritmo de Neighbor-joining para reconstrução de topologia. Valores de <i>bootstrap</i> obtidos com 1000 réplicas, com valores acima de 70 estão representados na figura.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.A. Sequência dos <i>primers</i> degenerados utilizados nas reações de amplificação da região NS5A do HCV 1a e 1b.....	30
Tabela 1.B. Sequência dos <i>primers</i> específicos utilizados nas reações de amplificação da região NS5A do HCV 1b.....	30
Tabela 2. Sequência dos <i>primers</i> M13 utilizados nas reações de seqüenciamento.....	37
Tabela 3. Sequência dos <i>primers</i> utilizados nas reações de seqüenciamento da região NS5A do HCV.....	38
Tabela 4. Número de acesso das seqüências do <i>GenBank</i> utilizadas como referência para a análise filogenética.....	43
Tabela 5. Características dos pacientes que constituem o estudo.....	47
Tabela 6. Número de nucleotídeos obtidos na montagem da seqüência consenso e posição no genoma referente aos clones das amostras dos pacientes infectados com HCV 1a e HCV 1b.....	53
Tabela 7. Mediana e diferença interquartílica da taxa de substituições sinônimas por sítios sinônimos, calculadas para NS5A completa e nas regiões <i>PKR-binding</i> , <i>ISDR</i> e <i>V3</i> para cada grupo.....	73

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Seqüências obtidas das reações de seqüenciamento com os primers utilizados no estudo.....	50
Quadro 2. Média do número de substituições de nucleotídeos observadas nas seqüências correspondentes aos clones obtidos da amostra de cada paciente.....	61
Quadro 3. Média do número de substituições de aminoácidos observadas nas seqüências correspondentes aos clones obtidos da amostra de cada paciente.....	61
Quadro 4. Média das freqüências de Ks e desvio padrão obtidos da análise par a par entre as seqüências consenso correspondente a cada paciente.....	62
Quadro 5. Média das freqüências de Ka e desvio padrão obtidos da análise par a par entre as seqüências consenso correspondente a cada paciente.....	62
Quadro 6. Média das distância genética calculadas par a par entre as seqüências consenso correspondente a cada paciente.....	63
Quadro 7. Características das quasispécies de HCV na NS5A completa e regiões internas em amostras pré-tratamento de pacientes avaliados de acordo com o tipo de resposta ao tratamento.....	64

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Mediana e diferença interquartílica, calculadas pelo Test Mood para Mediana, para Ks da NS5A. Diferença significativa observada entre os grupos: Respondedor e Respondedor ao final do tratamento ($p=0,026$)..... 73
- Gráfico 2.** Mediana e diferença interquartílica, calculadas pelo Test Mood para Mediana, para Ks da *PKR-binding*. Diferença significativa observada entre os grupos: Respondedor e Respondedor ao final do tratamento ($p=0,026$)..... 74
- Gráfico 3.** Mediana e diferença interquartílica, calculadas pelo Test Mood para Mediana, para Ks da *ISDR*. Diferença significativa observada entre os grupos: Respondedor e Respondedor ao final do tratamento ($p=0,026$)..... 74
- Gráfico 4.** Mediana e diferença interquartílica, calculadas pelo Test Mood para Mediana, para Ks da *V3*. Diferença significativa observada entre os grupos: Não-respondedor e Respondedor ao final do tratamento ($p=0,019$)... 75

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

pb	Pares de base
°C	Graus Celsius
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CRS	Sinal de Retenção Citoplasmático
ddNTPS	Didesoxinucleotídeos trifosfatos
DNA	Ácido desoxiribonucléico
dNTPS	Desoxinucleotídeos trifosfatos
EDTA	Ácido etilenodiamino-tetracético
eIF-2 α	Subunidade α do fator iniciador da tradução 2
ELISA	Ensaio imunoenzimático
<i>E.coli.</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>et al.</i>	e colaboradores
Gp	Glicoproteína
HBV	<i>Hepatitis B Virus</i>
HCL	Ácido Clorídrico
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IL-8	Interleucina 8
IRES	<i>Internal ribosomal entry site</i>
ISDR	Região Determinante de Sensibilidade ao Interferon
IFN	Interferon

ka	Substituições não sinônimas por sítio não sinônimo
kb	Quilobase
KCL	Cloreto de potássio
kDa	Quilodalton
ks	Substituições sinônimas por sítio sinônimo
M	Molar
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
mg	Miligrama
ml	Mililitro
NaCl	Cloreto de Sódio
NANB	Hepatite não-A e não-B
ng	Nanograma
NLS	Sinal de Localização Nuclear
nm	Nanometro
NR	Paciente Não respondedor ao tratamento
NS	Região / proteína não estrutural
NS5A	Região / proteína não estrutural 5A
nt	Nucleotídeos
ORF	Fase Aberta de Leitura (“ <i>open reading frame</i> ”)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEG-IFN	Interferon Peguilado
PKR	Proteína Quinase R

PKR-binding	Região de ligação à PKR celular
pmol	picomol
<i>Primer</i>	Oligonucleotídeo iniciador
R	Paciente Respondedor ao tratamento
RFT	Paciente Respondedor ao final do tratamento
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
RT	Transcrição reversa
RVS	Resposta virológica sustentada
TAE	Tris-acetato e EDTA
TBE	Tris-ácido bórico e EDTA
TEMED	Tetramethylethylenediamine
UTR	<i>Untranslated region</i>
U.V.	Luz ultra-violeta
V3	Região Variável 3
µg	Micrograma
µL	Microlitro

RESUMO

O HCV é uma das maiores causas de doença do fígado, sendo estimado que mais de 2% da população mundial está infectada. Este vírus possui um genoma de RNA (+) fita simples, que devido à falta de atividade corretiva da polimerase viral apresenta variabilidade genética em vários níveis: genótipos, subtipos e *quasispecies*. O genótipo 1 é o mais prevalente no Brasil e no mundo, sendo preditivo de uma baixa resposta à terapia antiviral, que atualmente é baseada na administração de PEG-IFN e ribavirina. A variabilidade genética da região viral NS5A tem sido relacionada à sensibilidade ou resistência ao IFN. Este estudo teve como objetivo investigar se a possível relação entre a composição de *quasispecies* da NS5A e a resposta ao tratamento. Foram selecionados 12 pacientes, sendo 4 respondedores (R), 4 não respondedores (NR) e 4 respondedores ao final do tratamento (RFT). As amostras pré-tratamento destes pacientes foram amplificadas, clonadas e seqüenciadas, resultando em 165 seqüências da NS5A completa. Estas seqüências foram alinhadas, editadas e a construção da topologia da árvore filogenética foi realizada. A NS5A e suas regiões específicas *CRS*, *PKR-binding*, *ISDR*, *NLS* e *V3* foram analisadas quanto às substituições e o grau de variabilidade genético. O grupo de pacientes RFT apresentou uma maior taxa de substituições sinônimas em relação aos demais grupos. Uma maior quantidade de mutações foi observada na região *downstream* à *ISDR*, principalmente na região *V3*. Nenhum sítio específico de mutação foi relacionado a um tipo particular de resposta, e não houve agrupamento filogenético das *quasispecies* de acordo com o tipo de resposta. Estes resultados sugerem que o número de mutações não é suficiente para predizer a sensibilidade ou resistência à terapia baseada em IFN, sendo necessário avaliar se estas mutações conservaram ou não as propriedades químicas dos aminoácidos.

Palavras-chave: Hepatite crônica, HCV; genótipo 1; *quasispecies*; PEG-IFN e NS5A.

ABSTRACT

Hepatitis C virus (HCV) is major causes of liver disease and about 2% of world's population are infected. This virus is a single strain RNA genome of approximately 9.6 kb. Genetics variability of HCV exists at several different levels: genotypes, subtypes and quasispecies. The high mutation rates are related to the low fidelity of viral RNA polymerase. Genotype 1 HCV is the most prevalent in Brazil, as well as worldwide. Genotypes 1a and 1b are predictive of lower sustained virological response in peginterferon (PEG-IFN) plus ribavirin combination therapy. Genetic variability of viral NS5A has been related to IFN sensibility or resistance. To evaluate whether HCV NS5A quasispecies composition are related to responsiveness to combined PEG-IFN and ribavirin therapy, this study analyzed before treatment sample of 12 treated patients (4 sustained responders - SR, 4 non responders - NR and 4 end of treatment responder - ETR). Samples were amplified, cloned and sequenced, resulting in 165 sequences of complete NS5A. Sequences were aligned, edited and phylogenetical tree was constructed. Mutations and mean of genetic distance were analyzed to NS5A and specific regions CRS, PKR-binding, ISDR, NLS and V3. The number of synonymous substitutions per synonymous sites was higher in ETR patients than in other patient groups. Mutations were more common downstream ISDR, mainly concentrated in V3 domain. No single amino acid position or motif was associated with different responses to therapy in any NS5A regions analyzed and phylogenetic analysis did not show clustering of nucleotide sequences of viral isolates from SR, NR or ETR. These results suggest that number of mutations is not sufficient to predict sensibility or resistance to IFN based therapy. Other studies are necessary to evaluate whether chemical characteristics of amino acids were altered for the mutations.

Key-words: Chronic hepatitis C; HCV; genotype 1; quasispecies; Peginterferon and NS5A.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. História e Patologia

Por muitos anos, a hepatite A e o vírus da hepatite B (HBV) foram considerados a maior causa de hepatite, incluindo os casos de hepatite pós transfusionais. Mesmo com o estabelecimento de métodos de prevenção e diagnóstico para estes tipos de hepatite, os casos de hepatite pós transfusionais continuaram a ocorrer, e foram chamados de hepatite não-A e não-B (NANB) (Kato, 2001).

Em 1989, mediante sucessivos estudos de biologia molecular foi possível a identificação de um agente denominado vírus da hepatite C (HCV), o qual correspondia a cerca de 90% dos casos de hepatite NANB (Choo et al., 1989; Choo et al., 1990). Desde então, tornou-se evidente que um considerável número de pessoas estão infectadas cronicamente com este vírus e que o HCV é um dos principais causadores de doenças hepáticas no mundo (Kew et al., 2004).

O fígado é o órgão alvo primário, e os hepatócitos são as células alvo primárias da infecção pelo HCV. A infecção aguda é geralmente assintomática, dificultando o diagnóstico precoce da infecção. Entretanto, uma característica da infecção pelo HCV é a tendência a se tornar crônica, sendo que aproximadamente 70% das infecções agudas tornam-se persistentes (Chisari, 2005).

A hepatite C crônica pode causar mudanças necroinflamatórias e fibrose hepática severa, que pode progredir para a cirrose e está associada com um

aumento do risco de carcinoma hepatocelular (Moreno-Otero, 2005). A consequência da infecção crônica pelo HCV é atualmente a maior indicação de transplante de fígado, compreendendo 40-50% de indivíduos que esperam a realização de transplante e pacientes que já realizaram um transplante prévio (Brown, 2005).

Acredita-se que o carcinoma hepatocelular ocorra pelo aumento na reposição de células do fígado, induzido pelo dano hepático crônico e regeneração durante a infecção viral. Entretanto, evidências experimentais indicam a possibilidade da contribuição direta do HCV na malignização dos hepatócitos. Diferentes proteínas virais estão sendo relacionadas ao desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (Levrero, 2006).

1.2. Epidemiologia e Transmissão

A Organização Mundial de Saúde (WHO) estima que mais de 2% da população mundial está infectada com o HCV, equivalente a mais de 123 milhões de portadores do vírus do mundo (Perz et al., 2004; Shepard, Finelli & Alter, 2005).

No entanto, essa distribuição não é homogênea. Países com alta taxa de prevalência estão localizados na África (>2.9%) e Ásia (2.0 a 2.9%) e áreas com baixa prevalência (0.6 a 1.1%) inclui as nações industrializadas na América do Norte, norte e oeste Europeu e Austrália (Shepard, Finelli & Alter, 2005). No Brasil, a estimativa de prevalência é de 1.5% a 1.7% para a população em geral e doadores de sangue (Lyra, Fan & Di Bisceglie, 2004), e nas diferentes

regiões brasileiras as prevalências são: 0,9 a 2,4% no Norte, 1,7 a 3,4% no Nordeste, 1,0 a 1,4% no Centro-Oeste, 0,8 a 2,8% no Sudeste e 1,1 a 2,1% no Sul (Carrilho & Corrêa, 1998; Campiotto et al., 2005).

Durante as décadas de 1970 e 1980, a fonte de infecção por HCV mais importante foi a transmissão por exposição parenteral de sangue (ou componentes do sangue) contaminado, ou pelo uso ilícito de drogas injetáveis. A transmissão via transfusional foi significativamente reduzida como consequência da introdução dos testes de triagem de doadores de sangue para anti-HCV no início da década de 1990 e pela utilização de procedimentos de inativação viral na produção de fatores coagulantes sanguíneos. Atualmente, o uso de drogas injetáveis é a principal via de transmissão do HCV, sendo responsável por mais de 40% das infecções (Kew et al., 2004).

Vários fatores de risco potenciais para aquisição de HCV incluem a prática de tatuagem, acupuntura, uso de “piercing”, uso de laminas em barbearias comerciais e outros. A Exposição ocupacional ao sangue, primariamente por ferimento com agulha contaminada, representa um fator de risco de infecção por HCV para os profissionais da saúde (Alter, 2002).

O vírus da Hepatite C é transmitido principalmente por via parenteral. No entanto, 15-40% dos pacientes infectados com HCV não apresentam um fator de risco parenteral evidente. Nesses casos, a transmissão do vírus por via perinatal, intrafamiliar e/ou sexual é suspeita (Ackerman et al., 1998).

1.3. O vírus da Hepatite C

O HCV pertence ao gênero *Hepacivirus* e é um membro da família *Flaviviridae*, apresentando uma organização genômica similar aos *Flavivirus* e *Pestivirus* (Francki et al., 1991; Giannini & Brechot, 2003).

A partícula viral mede aproximadamente 50 nm. É formada por um envelope viral derivado das membranas do hospedeiro, onde estão inseridas as glicoproteínas virais E1 e E2, um capsídeo protéico formado por proteínas do core, e pelo genoma viral constituído de uma molécula de RNA fita simples linear, constituída de 9600 nucleotídeos, e de polaridade positiva (Kaito et al., 1994). (Figura 1)

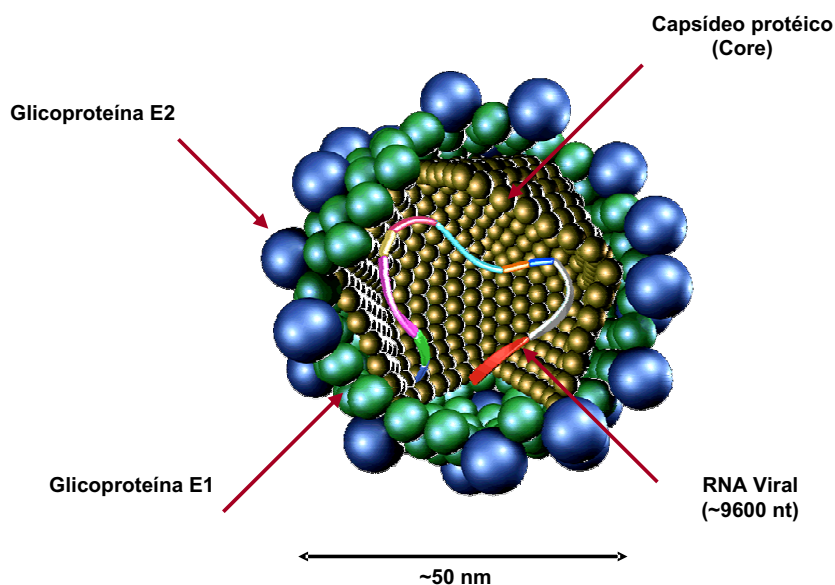


Figura 1. Morfologia do vírus da hepatite C: partícula viral. Fonte: adaptada de James, 2001.

1.3.1. Estrutura genômica e proteínas virais

O genoma do HCV possui uma única fase aberta de leitura (“open reading frame” ORF), flanqueada por regiões não traduzidas (UTR “untranslated region”) nas extremidades 5’ e 3’, de 341 e aproximadamente 230 nucleotídeos, respectivamente. Estas regiões são constituídas de estruturas de RNA altamente conservadas, essenciais para a tradução das proteínas virais e replicação do genoma do vírus (Penin et al., 2004). (Figura 2A)

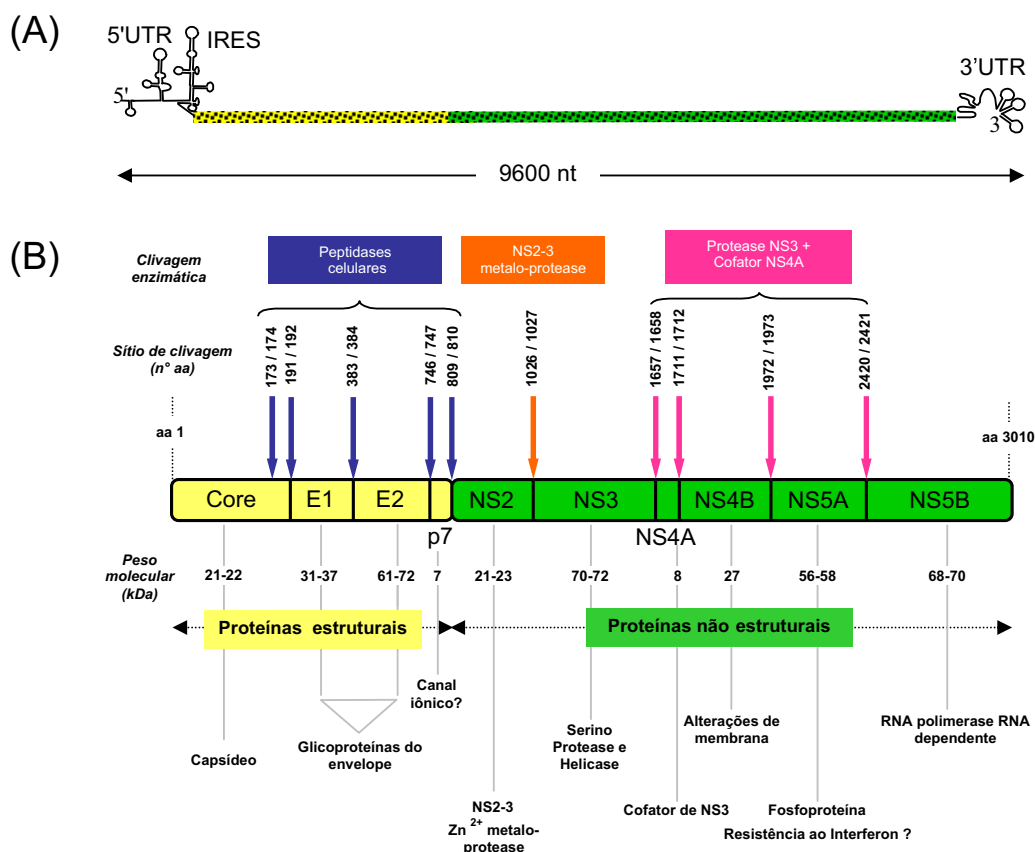


Figura 2. Estrutura genômica e proteômica do HCV. (A) Organização do genoma do HCV. Região aberta de leitura única flanqueada por regiões não traduzidas 5’UTR e 3’UTR. (B) Maturação da poliproteína. Setas azuis indicam os sítios de clivagem por proteases celulares, seta verde representa o sítio de clivagem da protease NS2-3, e setas vermelhas correspondem aos sítios de clivagem da NS3 protease. A função das proteínas do HCV está destaca. Fonte: adaptada de Penin et al., 2004 (A) e Rosenberg, 2001 (B).

Quatro domínios de RNA altamente conservados e um sítio de entrada no ribossomo (IRES “internal ribosomal entry site”) constituem a região não traduzida na extremidade 5'. A alta similaridade desta região entre as cepas virais (> 92%), sugere que a 5'UTR pode ter uma participação importante em processos chaves como a replicação do genoma viral e a tradução das proteínas virais (Kato, 2001). A IRES é responsável pelo início da tradução da poliproteína viral, de forma independente do “cap 5'”, fundamental para a tradução dos RNAs mensageiros celulares (Rosenberg, 2001).

Uma seqüência variável de aproximadamente 40 nucleotídeos, uma região poli U (polipirimidina), e uma seqüência única de 98 nucleotídeos que é altamente conservada entre os genótipos HCV fazem parte da porção não traduzida na extremidade 3' (3'UTR) (Penin et al., 2004).

A tradução da ORF do genoma do HCV produz uma poliproteína precursora de aproximadamente 3000 aminoácidos, que é clivada proteoliticamente em 10 proteínas virais. A região amino-terminal da poliproteína codifica as proteínas estruturais do vírion: a proteína do core (C), e as glicoproteínas E1 e E2. Após a região estrutural, uma pequena proteína integral de membrana é traduzida, a p7. Em seguida, encontram-se as proteínas não estruturais (NS) NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B, que estão envolvidas nos processos intracelulares do ciclo de vida do vírus. Proteases celulares clivam as proteínas estruturais entre C/E1, E1/E2 e E2/p7, e também a junção p7/NS2. O processamento proteolítico na região NS ocorre pela ação de duas enzimas virais: a NS2 e a NS3-4A serino protease (Lindenbach & Rice, 2005). (Figura 2B)

Após o processamento proteolítico da região estrutural, a proteína do Core é comumente encontrada no citoplasma, onde está ligada ao Retículo endoplasmático, ou pode estar localizada no núcleo em menor proporção. A região N-terminal desta proteína contém sinais de localização nuclear e sítios imunodominantes. A região C-terminal é responsável pela associação do core com lipídeos e membranas das células hospedeiras. Estas associações são necessárias para que ocorra a morfogênese correta da partícula viral. Além do papel de formação do nucleocapsídeo, a proteína do core pode estar envolvida na modulação da transcrição de genes, proliferação celular, apoptose e sinalização celular, podendo interferir no metabolismo de lipídeos e na supressão da resposta imune (Penin et al., 2004).

As duas glicoproteínas de envelope E1 e E2 estão envolvidas em diferentes fases do ciclo de vida do HCV. Existem evidências de que estas glicoproteínas estão envolvidas na entrada da célula hospedeira pela ligação com o receptor celular CD81, encontrado nas membranas de hepatócitos e linfócitos, e na indução de fusão com a membrana celular do hospedeiro (Bartosch, Dubuisson & Cosset, 2003). Nos primeiros 81 nucleotídeos da região E2 está localizada a região hipervariável 1 (HVR 1) que parece induzir a produção de anticorpos neutralizantes como um mecanismo de escape imunológico para as variantes virais (Lyra, Fan & Di Bisceglie, 2004). Além disso, a E2 pode inibir a atividade da proteína quinase R celular (PKR), devido a homologia de seqüências da E2 com o sítio de fosforilação da PKR (Rosenberg, 2001; Taylor et al., 2001).

Uma pequena proteína intrínseca de membrana denominada p7 é constituída de 63 aminoácidos. Não existem evidências se a p7 é uma proteína estrutural ou não estrutural, e estudos demonstraram que a presença desta proteína não é crítica para a replicação do RNA viral. O papel desta proteína no ciclo de vida do HCV ainda não foi determinado. Porém, a p7 pode estar envolvida em mecanismos de permeabilidade iônica de membrana, evidenciando uma função na liberação e maturação das partículas virais. Estudos sugerem que a p7 seja fundamental para a infectividade do HCV e que esta proteína realiza interações genótipo específica com outras regiões genômicas do vírus (Sakai et al., 2003; Penin et al., 2004).

A primeira proteína não estrutural é a NS2, uma proteína de 217 aminoácidos, que possui como única função conhecida à mediação de sua própria clivagem na junção NS2/NS3 (Figura 2B). Esta proteína parece ser uma metaloprotease, uma vez que é estimulada por zinco e inibida por EDTA (Kato, 2001; Rosenberg, 2001).

Seguida da NS2 está a NS3, uma proteína multifuncional constituída de um domínio N-terminal serino protease e um domínio C-terminal RNA helicase/NTPase. A serino protease e o cofator NS4A estabilizam e ativam a função protease para clivar os sítios NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A e NS5A/NS5B (Figura 2B). A helicase/NTPase usa a energia da hidrólise de NTP para desenrolar dupla fita de RNA na direção 3' → 5'. Esta função do HCV não é bem conhecida, mas pode estar envolvida na iniciação da síntese de RNA durante a replicação (Lindenbach & Rice, 2005). Além disso, a NS3 como enzima

multifuncional interage com NS4B, NS5A e NS5B no complexo de replicação. Interações da NS3 com componentes celulares como proteína Kinases, p53 e histonas tem sido descritas, mas a importância destas interações ainda não foi elucidada (Penin et al., 2004).

Duas proteínas são codificadas pela região NS4, a NS4A e NS4B. Como descrito anteriormente, a NS4A possui função de cofator da NS3. Outra função atribuída a esta proteína é a participação na hiperfosforilação de NS5A. Porém, o mecanismo pelo qual a NS4A afeta o mecanismo de hiperfosforilação não é determinado (Macdonald & Harris, 2004). Estudos demonstraram que a NS4B está envolvida na produção de uma estrutura de membrana citoplasmática (“membranous web”) que forma o complexo de replicação viral, junto com outras proteínas não estruturais e o RNA viral. Outras funções desta proteína ainda são desconhecidas (Egger et al., 2002; Mottola et al., 2002).

A NS5A é uma proteína fosforilada, por quinases celulares em resíduos de serina, que pode ser encontrada nas formas hipofosforilada (p56 - 56kDa) e hiperfosforilada (p58 - 58 kDa). A fosforilação basal da NS5A independente de NS4A produz a p56, e a forma hiperfosforilada p58 é dependente da presença da NS4A (Lindenbach & Rice, 2005). As posições onde a NS5A é fosforilada e hiperfosforilada podem ser observadas na figura 3. A fosforilação da NS5A é uma característica conservada entre os genótipos do HCV, e em outros membros da família Flaviviridae, sugerindo que a fosforilação e hiperfosforilação da NS5A seja funcionalmente importante. Embora a importância da fosforilação e

hiperfosforilação seja desconhecida, algumas hipóteses foram sugeridas. As hipóteses incluem a importância na regulação da localização subcelular da NS5A, fisiologia celular relacionada à patogênese viral, ou em alguns outros aspectos do ciclo de vida viral (Pawlotsky & Germanidis, 1999).

Análises bioquímicas e genéticas das interações proteína-proteína demonstraram que a NS5A é capaz de interagir independentemente com todas as proteínas não-estruturais, incluindo a interação NS5A-NS5A. Estes dados em concordância com a necessidade da presença de outra proteína não-estrutural para a realização da hiperfosforilação da NS5A, indicam a participação desta proteína no complexo de replicação multiprotéico (Dimitrova et al., 2003). Além disso, os 30 aminoácidos N-terminal da NS5A formam uma região altamente conservada que mostrou ser necessária e suficiente para mediar a associação da NS5A com a membrana do Retículo Endoplasmático, sendo conferida à NS5A a propriedade de proteína associada à membrana. Esta estrutura mostrou ser importante no processo de replicação viral (Macdonald & Harris, 2004).

Um evento pós-traducional observado na NS5A é o processamento proteolítico para ativar um sinal de localização nuclear (NLS aa 2326-2334) (Figura 3). Embora a proteína NS5A completa esteja localizada no citoplasma, formas da NS5A de 31 kDa (aa 2127 – 2361) (Figura 3), resultante de clivagens por caspases celulares, foram localizadas no núcleo, sugerindo que estas formas da NS5A podem migrar para dentro do núcleo e agir como ativadores transcricionais potentes. Outros estudos indicam que a presença da região N-terminal de 27 aa, denominada sinal de retenção citoplasmática (CRS) (Figura 3)

é capaz de manter a proteína NS5A no citoplasma, mostrando uma atividade dominante sobre a NLS. O fato da deleção da região CRS resultar na hiperfosforilação e na localização nuclear suporta o potencial de compartimentarização da NS5A p58. Entretanto, uma validação experimental é necessária (Reyes, 2002).

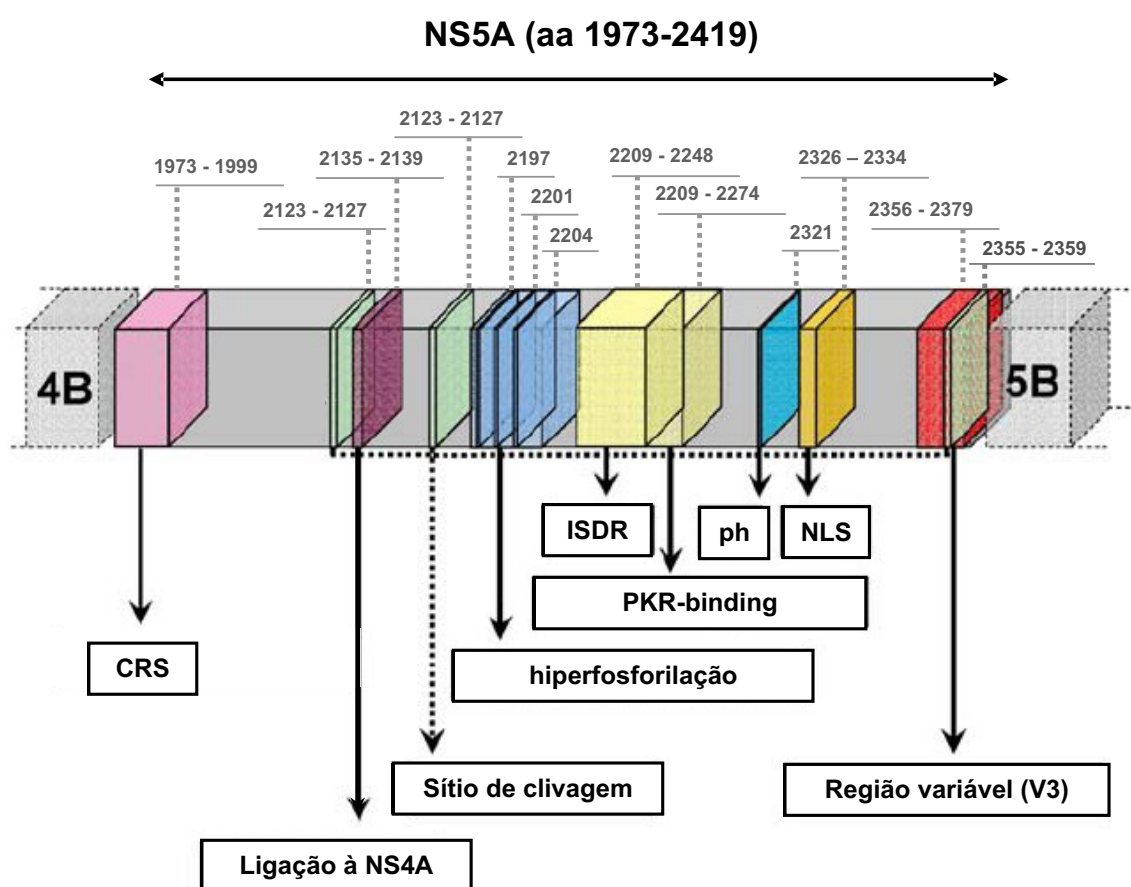


Figura 3. Proteína NS5A (aa 1973-2419) com supostas funções, regiões *CRS*, *ISDR*, *PKR-binding*, *NLS* e *V3*. Estão representados sítios de fosforilação (ph), hiperfosforilação, sítios de clivagem e sítio de ligação à NS4A. Regiões pontilhadas representam os sítios de clivagem por caspases celulares e a forma N-terminal da NS5A de 31kDa. Fonte: adaptada de Hofmann, Zeuzem & Sarrazin, 2005.

Seqüências genômicas completas do HCV de pacientes respondedores e não-respondedores ao IFN- α (Interferon- α) foram analisadas, e foi possível a identificação de uma região heterogênea na NS5A descrita como região determinante de sensibilidade ao Interferon (ISDR) (Figura 3). O aumento do número de mutações nesta região foi correlacionado ao aumento da taxa de Resposta virológica sustentada, sugerindo uma possível relação da NS5A em conferir sensibilidade ou resistência à terapia com IFN- α (Enomoto et al., 1995; Enomoto et al., 1996; Tan & Katze, 2001). Entretanto, o fator preditivo das mutações na ISDR na resposta ao tratamento com IFN foi questionado por outros estudos, que observaram resultados contrastantes (Chayama et al., 1997; Komatsu et al., 1997; Kurosaki et al., 1997). Posteriormente, dois estudos baseados na análise de 675 e 1230 seqüências ISDR publicadas individualmente em banco de dados demonstraram uma forte correlação da NS5A ISDR com a resposta ao IFN (Witherell & Beineke, 2001; Pascu et al., 2004).

A capacidade de se ligar diretamente e inibir a atividade proteína quinase R celular (PKR) foi atribuída à proteína NS5A. A PKR é um produto gênico induzido pelo interferon, ativado pela ligação à dupla fita de RNA, que é comumente produzida durante a replicação do genoma de vírus de RNA (Gale et al., 1997; Macdonald & Harris, 2004). Uma vez ativada pelo IFN- α , a PKR fosforila o fator de iniciação de tradução 2 celular, resultando na inibição não específica e generalizada da síntese protéica (Reyes, 2002). A interação da NS5A com a PKR é dependente da presença da ISDR e 26 resíduos de aminoácido C-terminal à ISDR, denominada região de interação com a PKR

(PKR-binding – aa 2209 – 2274) (Figura 3). Esta interação inibe a atividade da PKR, permitindo a expressão das proteínas virais pelo HCV (Feld & Hoofnagle 2005). Consistente com a idéia de que a NS5A inibe a PKR em um mecanismo dependente da ISDR, a introdução de mutações específicas na ISDR pode abolir a habilidade da NS5A se ligar e inibir a função da PKR celular (Tan & Katze, 2001).

Estudos focados na importância das mutações na NS5A encontraram uma associação do número de mutações da parte C-terminal da proteína NS5A, região V3 (Figura 3), com a resposta à terapia com IFN- α (Nousbaum et al., 2000; Hofmann, Zeuzem & Sarrazin, 2005). Além disso, uma região *upstream* a V3 foi identificada como uma região de acúmulo de mutações em correlação com resposta ao tratamento. Desta forma, a região V3 e seqüências adjacentes podem estar envolvidas na resistência ao IFN- α (Sarrazin et al., 2002).

Outras funções têm sido atribuídas à NS5A, como a interação com moléculas envolvidas na sinalização celular, ativação da maquinaria da transcrição, bloqueio da apoptose celular e atenuação da resposta ao IFN- α pela indução de interleucina 8. Evidências suportam a importância da NS5A em promover a persistência viral e a hepatocarcinogênese. Entretanto, o papel da NS5A na patogênese da hepatite C não está completamente esclarecido (Reyes, 2002).

A RNA polimerase RNA dependente (RdRp) responsável pela replicação viral é a NS5B. Como observado em todos os vírus de RNA, a polimerase do HCV não tem função de atividade revisora. Desta forma, no curso

da infecção persistente, erros são gerados durante a replicação e estão diretamente relacionados com a diversidade genética do HCV (Pawlotsky, 2003; Simmonds, 2004; Gale & Foy, 2005).

1.3.2. Replicação

A estratégia replicação do HCV é parecida com outros vírus de RNA de polaridade positiva. A entrada do vírus na célula hospedeira é possivelmente mediada por um ou mais receptores de superfície celular. Após a entrada do vírus e liberação do material genético, o IRES promove a iniciação da tradução da poliproteína que segue a produção das proteínas virais. As proteínas estruturais associam-se (core) ou integram-se (E1, E2 e p7) com a membrana do retículo endoplasmático (RE) (Figura 4) e formam oligômeros funcionais que promoverão a montagem da nova partícula viral, e as proteínas não estruturais se associam do lado citoplasmático da membrana do RE (Figura 4) onde interagem entre si e com as proteínas hospedeiras para formar a maquinaria de replicação viral. Essa maquinaria usa seu próprio genoma como molde para transcrição de fita complementar negativa de RNA. Essa fita negativa ou dupla fita, por sua vez, serve como uma molécula replicativa intermediária na síntese de uma nova molécula de RNA de polaridade positiva que pode ser usada para tradução, replicação ou então ser empacotada para constituir novos vírus (De Francesco et al., 2003).

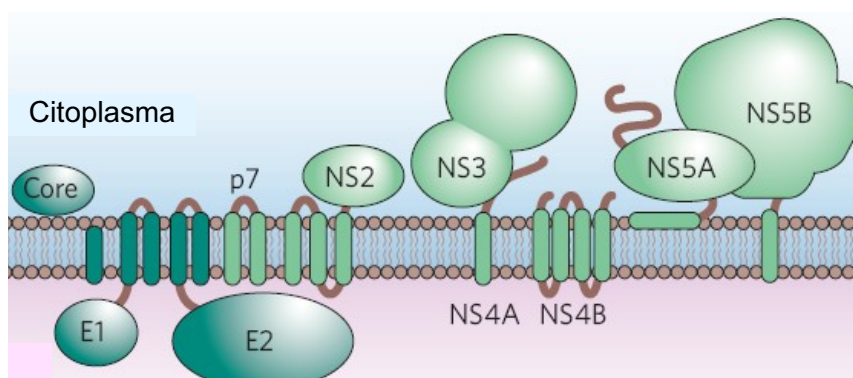


Figura 4. Topologia das proteínas do HCV com relação à membrana celular. Fonte: adaptada de Lindenbach & Rice, 2005.

1.3.3. Diversidade genética do genoma viral

A variabilidade genética do HCV existe em diferentes níveis. A comparação de seqüências nucleotídicas de variantes de HCV obtidas de diferentes indivíduos, em regiões geográficas diversas, demonstrou a existência de pelo menos 6 grupos geneticamente distintos (genótipos 1 a 6). Considerando o genoma completo, os 6 grupos diferem entre 30 - 35% de sítios de nucleotídeos, com maior variabilidade em algumas regiões, como E1, E2 e V3, e seqüências mais conservadas como da região do Core e regiões que codificam algumas proteínas não estruturais, como a NS3. A região de menor variabilidade no genoma do HCV entre os genótipos é encontrada na 5'UTR (Figura 5). Cada um dos seis genótipos possui vários subtipos, identificados por letras minúsculas (a, b, c etc), que diferem entre si entre 20 - 25% na seqüência de nucleotídeos (Pawlotsky, 2003; Simmonds, 2004).

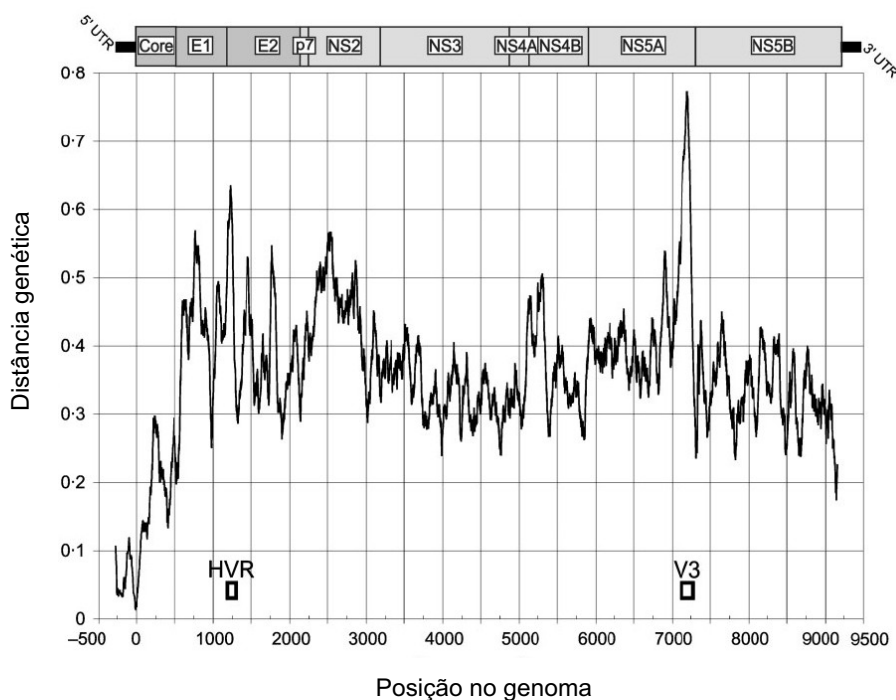


Figura 5. Variabilidade genética nas diferentes regiões do genoma do HCV. Representação do genoma do HCV (parte superior da figura), mostrando a posição das proteínas estruturais e não estruturais. As seqüências mais conservadas (5'UTR e região do core) e seqüências com alta diversidade viral (genes do envelope e NS5A) entre os diferentes genótipos podem ser visualizadas no painel inferior. Fonte: adaptada de Simmonds, 2004.

A distribuição geográfica dos genótipos é heterogênea. Embora os genótipos 1, 2 e 3 apresentem distribuição universal, a prevalência de cada um destes genótipos varia de acordo com a área geográfica. O genótipo 1 é o mais prevalente mundialmente, sendo que a sua frequência varia de 40 a 80%, dependendo da região. O genótipo 4 é endêmico no Egito e encontrado em outros países da África e Oriente Médio. Genótipos 5 e 6 são encontrados na África do Sul e Hong Kong, respectivamente (Simmonds et al., 1994; Simmonds, 2004; Martins et al., 2006). No Brasil, o padrão de distribuição dos genótipos segue o

padrão mundial, sendo, o genótipo 1 o mais prevalente (65%), seguido do genótipo 3 (30%), genótipo 2 (4%), e outros genótipos (1%) (Campiotto et al., 2005; Martins et al., 2006).

Pressões seletivas distintas definem a evolução do HCV, e estão associadas com eventos subjacentes à adaptação do vírus ao hospedeiro humano, e à capacidade de gerar muito rapidamente mudanças adaptativas associadas com a infecção de cada indivíduo em resposta à pressão seletiva imunológica (Simmonds, 2004).

Como outros vírus de RNA, o HCV existe em um hospedeiro como um conjunto de variantes distintas geneticamente, mas altamente relacionadas, que são referidas como *quasispecies* (Martell et al., 1992; Domingo et al., 2006). As *quasispecies* diferem em sítios nucleotídicos no genoma viral em menos de 10 %, comparado aos 20 -25 % nos subtipos, e 20 - 35% de diferença entre os genótipos (Zhou et al., 2007).

Múltiplas variantes genômicas presentes simultaneamente e a alta taxa em que novas variantes são geradas, estão relacionadas à falta de atividade corretiva da NS5B RdRp durante a replicação do genoma viral e a abundância de vírions que são produzidos diariamente. A frequência média de substituições aleatórias introduzidas no genoma de HCV pela NS5B RdRp é de aproximadamente 10^{-4} a 10^{-5} por nucleotídeo copiado, e a produção de vírions nos indivíduos infectados é na ordem de 10^{12} vírions por dia. Estes dados indicam que a taxa de mutação no HCV é de $1.5 - 2.0 \times 10^{-3}$ substituições de bases, por sítio do genoma, por ano (Pawlotsky, 2003; Bowen & Wlaker, 2005).

Como consequência das substituições incorporadas no genoma do HCV, uma proporção substancial de *quasispecies* serão defectivas devido a potencial deletério de determinadas mutações. Em contraste, mutações não deletérias que são acumuladas durante os ciclos de replicação, são transmitidas para a progênie viral e poderão conferir vantagens ou desvantagens para cada *quasispecies*, de acordo com o ambiente replicativo (Pawlotsky, 2003). A variação nas *quasispecies* representa um grande problema para os indivíduos infectados, devido às implicações do potencial adaptativo do HCV na evasão e controle da resposta do hospedeiro à infecção, e na sensibilidade diferencial à terapia baseada em IFN (Gale Jr & Foy, 2005).

A análise por meio do seqüenciamento direto de qualquer região genômicas do HCV resulta somente na observação da seqüência viral dominante ou consenso (*quasispecies* mais freqüente). Desta forma, o seqüenciamento direto de regiões virais, como a NS5A, não é uma metodologia viável para a análise de seqüências associadas à sensibilidade ou resistência à infecção crônica ou a terapia antiviral, sendo necessária à utilização de outras técnicas para a análise da distribuição das *quasispecies* no indivíduo infectado (Pawlotsky et al., 1998).

1.4. Tratamento

O Interferon α (IFN- α) foi o primeiro tratamento que mostrou ter um efeito benéfico nos pacientes com hepatite C crônica (Pawlotsky, 2006). Porém, a administração de IFN- α como monoterapia apresentou uma taxa de resposta virológica sustentada (RVS) de 6 – 12% quando o período de

administração foi de 6 meses, e 16 – 20% com 12 meses de tratamento (Feld & Hoofnagle, 2005).

Um maior avanço no tratamento da hepatite C foi observado com a introdução da Ribavirina ao tratamento com IFN- α , e tornou-se o tratamento recomendado em 1997, após a realização da primeira Conferência no desenvolvimento de um consenso no tratamento da hepatite C (NIH, 1997). A terapia combinada de IFN- α e ribavirina produziu uma RVS em 35 - 40% dos pacientes com Hepatite C crônica (Feld & Hoofnagle, 2005; Pawlotsky, 2006).

Posteriormente, terapias baseadas na administração de interferons modificados pela adição de uma molécula de polietileno glicol demonstraram ser mais eficientes, em tratamentos combinados ou em monoterapias, que as terapias que envolvem a utilização do interferon convencional. O maior efeito benéfico do PEG-IFN é o retardamento na eliminação da droga, possibilitando a manutenção de uma concentração estável no sangue com a administração da droga uma vez por semana. Em contraste, a administração dos IFN convencionais requerem a dosagem em intervalos de 1 ou 2 dias para a manutenção da concentração sanguínea. Existem hoje dois tipos de PEG-IFN no mercado, que são denominados peginterferons α -2b 12-kDa e α -2a 40-kDa. Acredita-se que os dois tipos de PEG-IFN apresentem eficiência similar (Moreno-Otero, 2005; Hayashi & Takehara, 2006).

Atualmente, a combinação de PEG-IFN e ribavirina é a melhor terapia para o tratamento da hepatite C crônica (NIH, 2002). Em estudos com pacientes infectados cronicamente, que não apresentavam cirrose hepática, a taxa

de resposta virológica sustentada foi de 76 – 84% em pacientes com infecção pelo genótipo 2 ou 3 do HCV, e de 42 – 52% em pacientes infectados com HCV do genótipo 1 (Pawlotsky, 2006; Wohnsland, Hofmann & Sarrazin, 2007).

A resposta virológica sustentada (RVS) é definida pela ausência de detecção de RNA do HCV por no mínimo 6 meses depois do término da terapia, com limite de detecção de 50 unidades internacionais/mL (Lindsay, 1997). Outros dois grupos são considerados quanto à resposta a terapia antiviral: Resposta ao final do tratamento (RFT) e Não respondedor (NR). A resposta transiente apresentada apresentara pelo grupo RFT ocorre em 10 - 25 % dos pacientes, e é determinada pela ausência de RNA de HCV, com posterior detecção no período pós-tratamento. A não resposta ao tratamento ocorre em aproximadamente um terço dos pacientes infectados, e é determinada pela detecção contínua do RNA de HCV durante o tratamento (Feld & Hoofnagle, 2005; Hayashi & Takehara, 2006). O perfil de resposta virológica durante a após o tratamento com PEG-IFN e ribavirina para os diferentes grupos está representado na figura 6.

Alguns fatores estão relacionados com a resposta à terapia baseada em IFN. Estes fatores compreendem características do hospedeiro, tais como sexo, idade, peso corporal, raça, co-infecção com vírus da hepatite B, duração da infecção e doença avançada do fígado, bem como características virais, tais como genótipo, carga viral e *quasispecies* (Feld & Hoofnagle, 2005; Moreno-Otero, 2005; Salmeron et al., 2006; Wohnsland, Hofmann & Sarrazin, 2007).

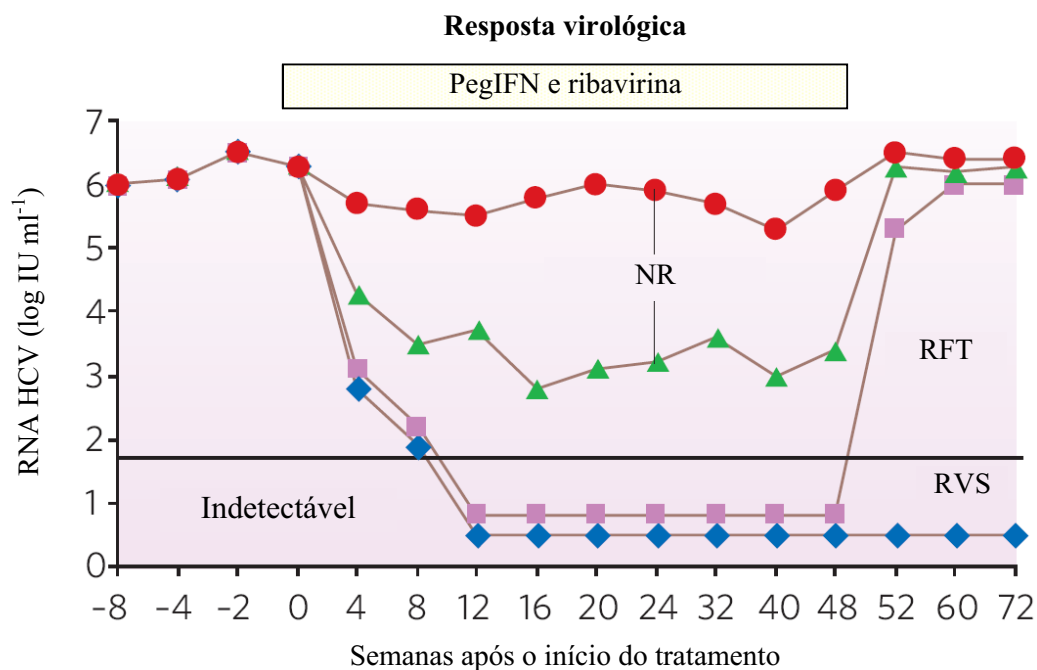


Figura 6. Resposta virológica à terapia de peginterferon e ribavirina. RVS: resposta virológica sustentada, NS: não-responder, RFT: Resposta ao final do tratamento. Fonte: adaptada de Feld & Hoofnagle, 2005.

As terapias baseadas em IFN utilizadas atualmente para o tratamento da Hepatite C são efetivas somente para uma fração dos pacientes tratados, e são acompanhadas de efeitos adversos. Novos tratamentos que apresentem maior eficácia e maior tolerância para todos os pacientes são necessários, e o sucesso destas novas terapias será influenciado pela habilidade das novas drogas em inibir todas as variantes virais e prevenir a emergência de novos mutantes pelos mecanismos de escape viral (De Francesco & Migliaccio, 2005).

Objetivos

2. OBJETIVO

O conhecimento adquirido sobre a cinética de infecção das *quasiespecies* até o momento demonstra que o genoma de HCV em um hospedeiro é observado como uma população dinâmica, e que sua composição pode sofrer variações durante o curso da infecção ou durante a administração de drogas antivirais no tratamento dos pacientes infectados. Além disso, alguns estudos também reportaram que mutações na região não estrutural 5A podem estar intimamente relacionadas com a eficiência da resposta à terapia baseada em Interferon devido à composição de *quasiespecies* desta região em diferentes momentos da infecção crônica ou da administração de terapias. Baseado nestas informações, o objetivo deste trabalho foi comparar o perfil de *quasiespecies* da região genômica NS5A do vírus da Hepatite C genótipo 1 em amostras pré-tratamento de pacientes tratados com Peginterferon e ribavirina que apresentaram diferentes tipos de resposta à terapia.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificar, clonar e seqüenciar a região codificante da proteína NS5A do HCV genótipo 1, a fim de avaliar a composição das *quasiespecies* das amostras pré tratamento de pacientes Respondedores, Não Respondedores e Respondedores ao final do tratamento.
- Analisar o perfil de mutações nas *quasiespecies* para a NS5A completa, e em regiões específicas como a *CRS*, *PKR-binding*, *ISDR*, *NLS* e *V3*.
- Investigar a presença de sítios específicos de mutações na seqüência de aminoácidos da NS5A que possam estar relacionados com os tipos de resposta ao tratamento.
- Avaliar as relações filogenéticas entre as *quasiespecies* correspondentes a cada indivíduo, e a cada grupo de resposta ao tratamento.

Material e Métodos

2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2. População e amostra

A população estudada foi composta por pacientes infectados com HCV do genótipo 1, vinculados a um projeto denominado *Estudo epidemiológico das vias de transmissão do vírus da hepatite C, associado à genotipagem e evolução da carga viral durante e após tratamento*. Estes pacientes foram submetidos ao tratamento por 48 semanas com peginterferon e ribavirina, e foram acompanhados no ambulatório de hepatologia do Hospital de Base – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, onde realizaram coletas de amostras antes, durante e após o tratamento por um período de 6 meses.

Os pacientes foram selecionados para este estudo de acordo com o tipo de resposta ao tratamento, sendo agrupados em pacientes Respondedores, Não-respondedores e Respondedores ao final do tratamento. O indivíduo foi considerado Respondedor (R) se nas amostras coletadas durante o tratamento não foi detectado RNA de HCV e se as amostras permaneceram ausentes de RNA viral no período de 6 meses após o tratamento, Não Respondedor (NR) se o RNA de HCV foi detectado nas amostras no decorrer e após o término do tratamento, e Respondedor ao final do Tratamento (RTF) se o RNA viral não foi detectado nas amostras coletadas durante o tratamento com posterior detecção de RNA de HCV nas amostras coletadas no acompanhamento pós-tratamento.

Este estudo está vinculado ao projeto citado anteriormente, do qual foram utilizadas as amostras de soro pré-tratamento. Desta forma, novas coletas de amostras não foram necessárias.

3.2.1. Critérios de Inclusão e exclusão

Os indivíduos incluídos no projeto apresentaram infecção crônica pelo HCV definida pela positividade na pesquisa de anticorpos contra HCV por ELISA e RNA de HCV detectável por PCR, durante pelo menos 6 meses. Somente pacientes com infecção pelo genótipo 1 do HCV foram selecionados, atestado por genotipagem.

Foram considerados como critérios de exclusão a co-infecção com o vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e/ou com o vírus da Hepatite B (HBV), e o abuso de álcool (quantidades maiores que 40 g de álcool por dia).

3.2.2. Aspectos Éticos

Para que todos os direitos e liberdades dos indivíduos que participaram deste estudo fossem respeitados, o projeto foi submetido ao comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP e está de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde sendo aprovado com parecer nº 087/2004, demonstrando respeito às regras éticas (ANEXO 1).

Os indivíduos que por livre escolha e em pleno conhecimento de causa participaram deste projeto, representaram a decisão consciente de participação do estudo por meio do Termo de consentimento (ANEXO 2). A escolha de participação dos indivíduos e o anonimato das informações foram respeitados.

3.2. Métodos

As amostras utilizadas neste projeto foram processadas para amplificação e seqüenciamento da região viral não traduzida 5'UTR no projeto *Estudo epidemiológico das vias de transmissão do vírus da hepatite C, associado à genotipagem e evolução da carga viral durante e após tratamento*, afim de se obter a genotipagem do HCV infectante em cada paciente, e para observação da evolução na resposta ao tratamento nos pacientes submetidos à terapia de peginterferon e ribavirina.

3.2.1. Extração de RNA

O RNA foi extraído a partir de 140µl de soro com a utilização do QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) e foi estocado a -80°C até o momento de realização da transcrição reversa.

3.2.2. Síntese do DNA complementar (cDNA)

Para a obtenção do cDNA foi utilizado o kit High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems). A síntese de 100µl de cDNA foi realizada a partir de 50µl RNA extraído ao qual foi adicionado 10µl de 10X RT Buffer, 10µl de 10X *Random Primers*, 4µl de 25X dNTP mixture, 5µl de enzima Multiscribe e 21µl de água tratada com DEPEC. Esta reação foi levada ao termociclador e submetida a ciclos de variação de temperatura de 25° C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 10°C ao final. O cDNA foi estocado a -20°C.

3.2.3. Amplificação da região genômica viral NS5A

Para a amplificação da região viral NS5A do HCV foram desenhados *primers* degenerados a partir do alinhamento de seqüências completas do HCV obtidas no *Genbank*, banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Tabela 1.A). Estes *primers* foram utilizados nas reações de amplificação das amostras de ambos os subtipos. Para as amostras do subtipo b que não foram amplificadas com os *primers* degenerados, foram construídos *primers* específicos para este subtipo utilizando-se os mesmos critérios para construção (Tabela 1.B).

Tabela 1.A. Seqüência dos *primers* degenerados utilizados nas reações de amplificação da região NS5A do HCV 1a e 1b.

Primers	Etapa	Seqüência (5' → 3')	Posição genoma	Referência
NS4B_514abS	PCR	CT <u>S</u> CC <u>Y</u> GCC ATC CTC TC	5988 - 6004 ^a 5976 - 5992 ^b	Deste estudo
NS5B_215abA	PCR	TT <u>M</u> A <u>Y</u> C TCC TTG AGC ACG	7816-7799 ^a 7801-7784 ^b	Deste estudo
NS4B_604abS	NESTED	GTG CAG TGG ATG AAC CG	6078 - 6094 ^a 6066 - 6082 ^b	Deste estudo
NS5B_160abA	NESTED	A <u>K</u> G TGA C <u>Y</u> T TCT TCT GCC	7761-7744 ^a 7746-7729 ^b	Deste estudo

Tabela 1.B. Seqüência dos *primers* específicos utilizados nas reações de amplificação da região NS5A do HCV 1b.

Primers	Etapa	Seqüência (5' → 3')	Posição genoma	Referência
NS4B_514bS	PCR	CTC CCT GCC ATC CTC CT	5976 - 5992 ^b	Deste estudo
NS5B_215bA	PCR	TTC ATC TCC TTG AGC ACG	7801 - 7784 ^b	Deste estudo
NS5B_160bA	NESTED	AGG TGA CCT TCT TCT GCC	7746 - 7729 ^b	Deste estudo

S = C ou G ; Y = C ou T; M = A ou C; K = T ou G

^anumeração baseada na seqüência completa de HCV 1a (número de acesso no *GenBank* NC_004102.1)

^bnumeração baseada na seqüência completa de HCV 1b (número de acesso no *GenBank* D50481.1)

A NS5A foi amplificada por meio de duas etapas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): PCR e NESTED-PCR que resultaram na obtenção de fragmentos de DNA de 1829 pares de bases e 1684 pares de bases respectivamente para o subtipo a e 1826 pares de bases e 1681 pares de bases respectivamente para o subtipo b (Figura 7). As reações de PCR foram realizadas utilizando-se 10 μ l de cDNA adicionado de 10 μ l de Tampão contendo 2mM de MgSO₄, 1 μ l de dNTP 10mM, 1 μ l dos *primers* 30pmol/ μ l desenhados para PCR, 2 μ l de Elongase® Enzyme Mix (Invitrogen™ Life Technologies) e 25 μ l de água milli-Q autoclavada. As reações de NESTED-PCR foram realizadas utilizando-se 5 μ l do produto de PCR adicionado de 10 μ l de Tampão contendo 1.5mM de MgSO₄, 1 μ l de dNTP 10mM, 1 μ l dos *primers* 30pmol/ μ l desenhados para NESTED-PCR, 2 μ l de Elongase® Enzyme Mix (Invitrogen™ Life Technologies) e 30 μ l de água milli-Q autoclavada. As reações foram feitas em fluxo Laminar utilizado apenas para preparação de reações de PCR. Uma alíquota adicional para cada reação de PCR e NESTED-PCR foi feita, no qual o DNA não era adicionado, servindo como controle para possíveis contaminações (controle negativo). A ciclagem usada em ambas as reações foi a desnaturação inicial de 30 segundos a 94°C, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento dos *primers* a 50°C por 30 segundos, Extensão do fragmento de DNA a 72°C por 2 minutos, uma extensão final de 7 minutos a 72°C, e 10°C ao final.

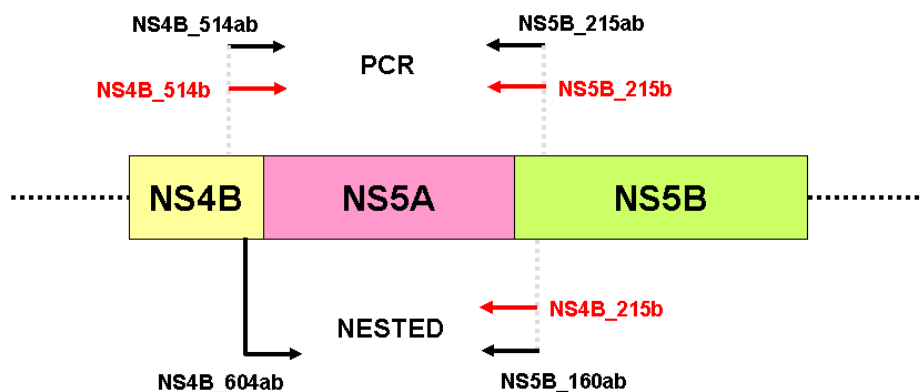


Figura 7. Sítio de anelamento dos *primers* degenerados (preto) e específicos para o genótipo 1b (vermelho) utilizados para amplificação da região NS5A completa do HCV.

3.2.4. Detecção do produto amplificado

A detecção do produto amplificado foi feita por meio de gel de agarose 1% (Gibco BRL) em tampão TBE 1x (90 mM de Tris-Borato e 2mM de EDTA pH 8,0) com adição de Brometo de etídeo numa concentração final de 0,5 µg/ml, onde foram aplicados 5µl de produto amplificado e 2µl de Loading Buffer (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol e 30% glicerol) e submetidos à corrida eletroforética por aproximadamente 45 min em 100V. A análise do gel mediante visualização em transluminador com luz UV mostrou em todas as amostras amplificadas uma banda correspondente à parte da região NS4B, à região da NS5A completa e à parte da região NS5B do vírus da Hepatite C, correspondendo a um fragmento de DNA de aproximadamente 1700 pares de bases. Um marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen) era aplicado no gel junto às demais amostras e controle negativo, para a verificação do tamanho do fragmento amplificado.

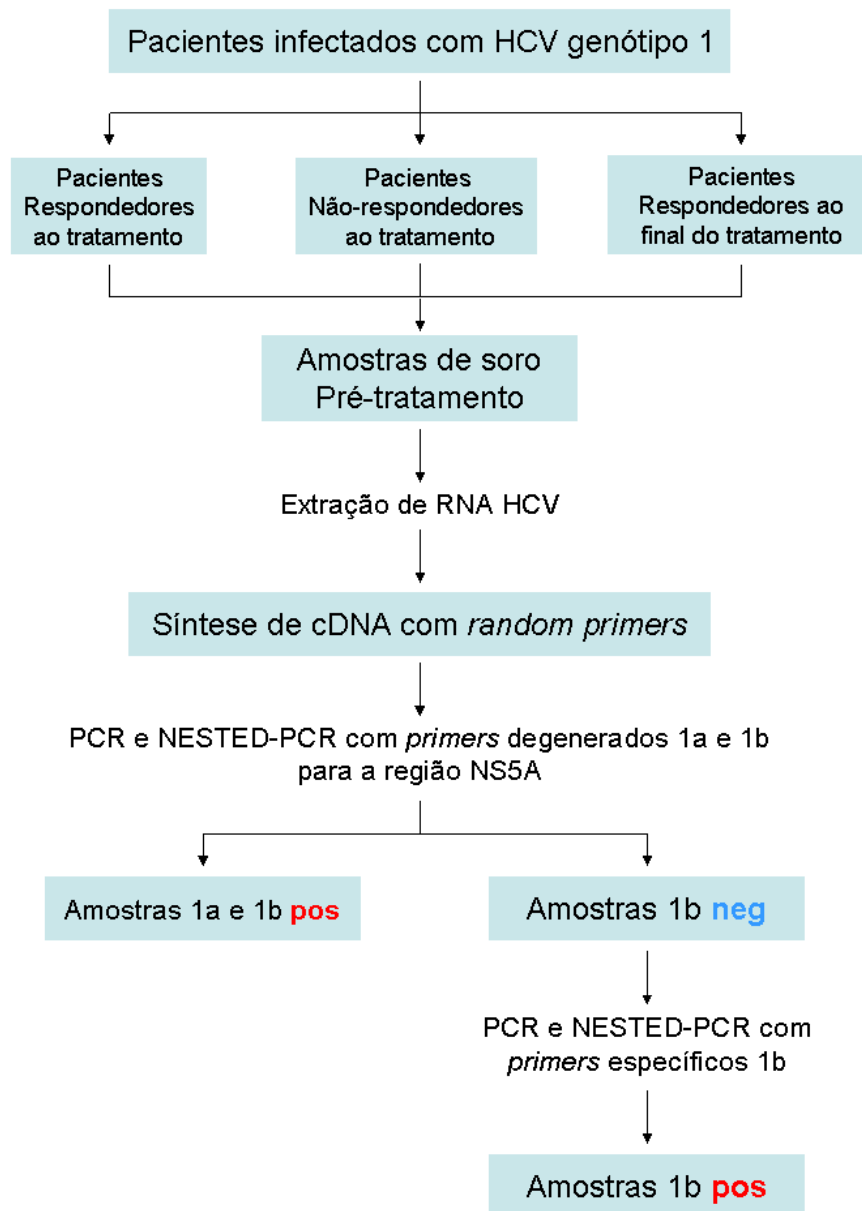


Figura 8. Fluxograma metodológico I: população, amostra e métodos utilizados para amplificação da região genômica viral NS5A.

3.2.5. Purificação dos fragmentos amplificados

Os fragmentos de DNA obtidos da amplificação da NS5A foram purificados por meio de reagentes e protocolos de purificação fornecidos pelo TOPO XL PCR cloning Kit (Invitrogen). A purificação dos produtos de PCR visou aumentar a eficiência da clonagem, utilizando-se reagentes que purificaram e preservam o DNA. Os 45µl de reação obtido do NESTED-PCR foram misturados a 8µl de 6X Crystal Violet Loading Buffer (30% Glicerol, 20mM EDTA, 100µg/ml Cristal Violeta) e aplicados em gel de agarose 0,8% em TAE 1X (50mM Tris-acetato, pH 8.0, 1mM EDTA), adicionado de 30µl de Cristal Violeta 2mg/ml. A eletroforese foi realizada a 80 volts pelo período correspondente a migração do Cristal Violeta em um quarto do gel (o Cristal Violeta migra em direção ao pólo negativo), onde o produto de PCR pode ser visto por toda a corrida eletroforética como uma Banda Azul migrando pelo gel. O fragmento de DNA foi cortado do gel em um painel de luz branca por meio de lâmina de bisturi e o volume do fragmento de agarose contendo o DNA de interesse foi estimado (considerando 1mg ~ 1ul) e adicionado de 2.5 vezes deste volume de Solução de Iodeto de Sódio (6.6 M de iodeto de sódio, 16mM de Sulfito de Sódio), misturado vigorosamente e incubado a 50°C até a dissolução completa da agarose. Esta solução em 1.5 vezes o volume de Tampão de ligação (7M Guanidina HCL) foi passada em coluna de purificação, lavada com 1X Final Wash Buffer (400mM NaCl, Etanol 100%) e eluída em 40µl de TE Buffer (10mM Tris-HCL, 1mM EDTA, pH8). A confirmação da presença do DNA purificado foi

realizada por meio de eletroforese em gel de agarose com brometo de etídeo, como descrita previamente.

3.2.6. Clonagem dos produtos purificados

A ligação do fragmento de interesse ao plasmídeo bacteriano foi realizada pela adição de 4µl do produto de PCR purificado a 1µl de pCR-XL-TOPO-vector por incubação a temperatura ambiente por 5 minutos, sendo mantida no gelo quando seguida a etapa de transformação ou mantida a -20°C por no máximo uma semana. Dois microlitros da reação de ligação foram incubados por 30 minutos em uma alíquota de *E. coli* competentes e posteriormente foram submetidas a choque térmico por 30 segundos a 42°C e a 2 minutos no gelo, seguida da adição de 250µl de meio SOC (2% Triptona, 0.5% extrato de Levedo, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20mM glucose) à alíquota e de incubação a 37°C por 1 hora. O produto da transformação foi plaqueado em meio LB sólido (1% Triptona, 1% NaCl, 0.5% extrato de Levedo, 1,5% Agar) com 50µg/ml de Kanamicina, a 37°C por 16 horas. Noventa e seis colônias resultantes da transformação foram repicadas para 150µl de meio LB líquido (1% Triptona, 1% NaCl, 0.5% extrato de Levedo) com 50µg/ml de Kanamicina em placa de 96 wells e mantidas a 37°C por 16 horas. Sessenta microlitros dos 150µl de meio LB líquido contendo a colônia, de 15 colônias correspondente a cada indivíduo foram inoculadas em 3 ml de meio LB líquido com 50µg/ml de Kanamicina em tubos de 15 ml a 37°C por 20 horas com agitação de 46 rpm.

Os plasmídeos contendo os fragmentos de interesse foram extraídos das culturas de bactérias por meio do PureLink™ QuicK Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante, eluídos em 75µl de TE Buffer e estocados a -20°C. As placas de 96 wells contendo as colônias obtidas de cada paciente foram estocadas em freezer -80°C.

3.2.7. Seqüenciamento

O seqüenciamento foi realizado segundo a técnica de Sanger e colaboradores, 1977, de didesoxirribonucleotídeos por meio do Kit *Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems). Inicialmente, uma reação de Seqüenciamento contendo 4µl dos produtos dos minipreps, 4µl do reagente *Terminator Ready Reaction Mix* e 2µl dos *primers* M13 *Foward* ou M13 *Reverse* 3.2 pmol/µ (Invitrogen) foram submetidas ao termociclador em uma desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 20 segundos, pareamento dos *primers* a 50°C por 10 segundos, extensão dos fragmentos de DNA a 60°C por 4 minutos, e 10°C ao final. A realização do seqüenciamento com os *primers* M13F e M13R (Tabela 2) possibilitou a confirmação da clonagem da região NS5A completa por meio da detecção de parte da região viral NS4B e NS5A resultante do seqüenciamento com o *primer* M13F e parte da região viral NS5B e NS5A resultante do seqüenciamento com o *primer* M13R (Figura 9). Foram construídos oito *primers* adicionais para que o seqüenciamento da região NS5A completa fosse possível, sendo quatro específicos para 1a e quatro específicos para 1b (Tabela 3). Estes

primers apresentaram sítios de anelamento nas regiões internas da NS5A (Figura 10). As amostras seqüenciadas com M13F e M13R foram submetidas a reações de seqüenciamento contendo 4µl dos produtos dos minipreps, 4µl do reagente *Terminator Ready Reaction Mix*, 4µl do reagente *BigDye Sequencing Buffer* e 3µl de *primer* adicional.

Tabela 2. Seqüência dos *primers* M13 utilizados nas reações de seqüenciamento.

Primers	Seqüência (5' → 3') ^a	Posição no vetor ^a
M13 Forward	GTA AAA CGA CGG CCA G	433-448
M13 Reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC	205-221

^aseqüência dos *primers* e posição no vetor baseadas nas informações técnicas fornecidas pelo fabricante.

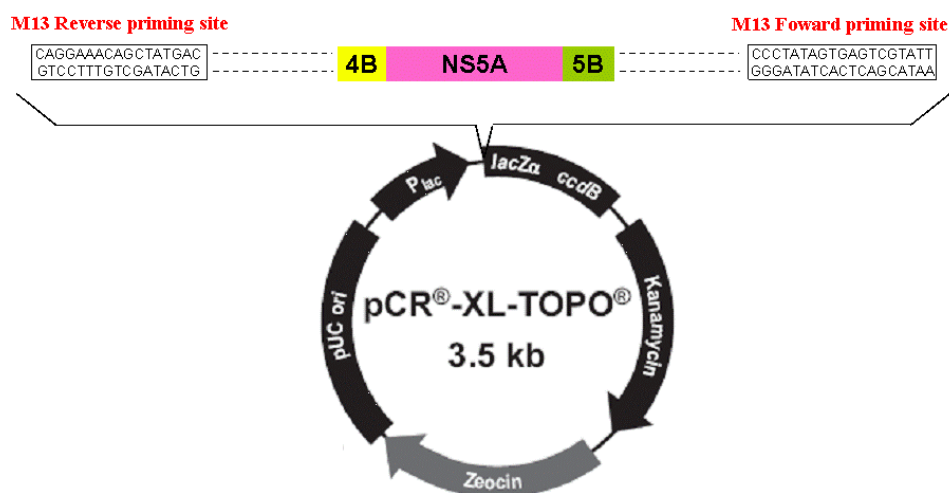


Figura 9. Seqüência de DNA compreendendo parte da seqüência do plasmídeo, parte da região NS4B ou NS5B e parte da NS5A resultante do seqüenciamento das amostras com os *primers* M13F e M13R. Sítio de ligação do fragmento de interesse 336-337. Adaptado das informações técnicas de TOPO XL PCR cloning Kit (Invitrogen).

Tabela 3. Sequência dos *primers* utilizados nas reações de sequenciamento da região NS5A do HCV.

Primers	Subtipo HCV	Seqüência (5' → 3')	Posição genoma	Referência
NS5A1a_267	a	CAT TAA CGC CTA CAC CAC	6524 - 6541 ^a	Deste estudo
NS5A1a_618	a	CTC CCA TAT AAC AGC AGA G	6875 - 6893 ^a	Deste estudo
NS5A1a_823	a	GAG AAC AAA GTG GTG ATT C	7080 - 7098 ^a	Deste estudo
NS5A1a_1094	a	AAT CAA CCG TAT CTA CTG C	7351 - 7369 ^a	Deste estudo
NS5A1b_267	b	CAT CAA CGC ATA CAC CAC	6512 - 6529 ^b	Deste estudo
NS5A1b_622	b	CAC ATT ACA GCA GAG ACG	6867 - 6884 ^b	Deste estudo
NS5A1b_872	b	AGG ATG AGA GGG AAG TAT C	7117 - 7135 ^b	Deste estudo
NS5A1b_1232	b	AGT CGT ACT CCT CCA TGC	7477 - 7494 ^b	Deste estudo

^anumeração baseada na seqüência completa de HCV 1a (número de acesso no *GenBank* NC_004102.1)

^bnumeração baseada na seqüência completa de HCV 1b (número de acesso no *GenBank* D50481.1)

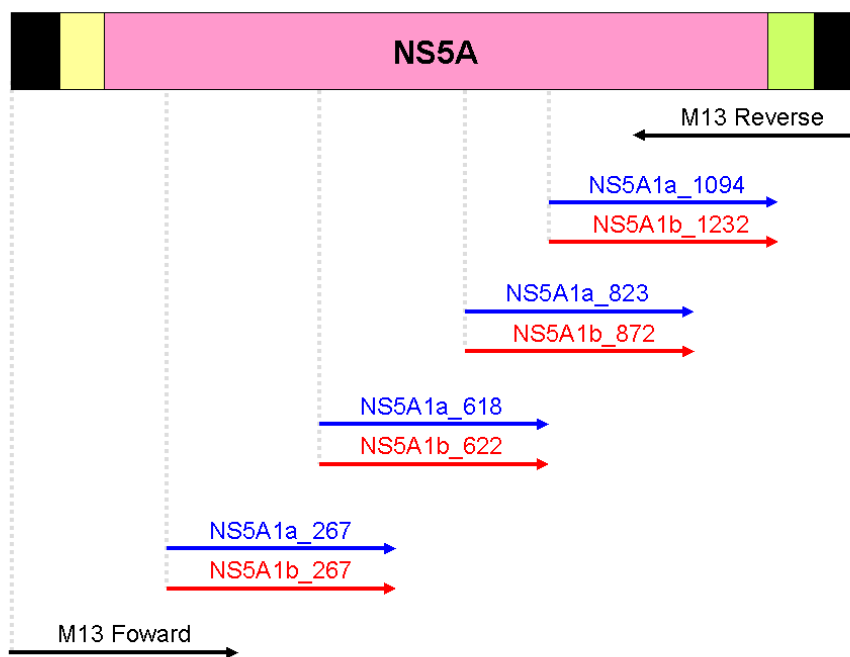


Figura 10. Esquema do sítio de anelamento dos *primers* utilizados para o sequenciamento da região NS5A completa do HCV 1a (azul) e 1b (vermelho).

As reações de Sequenciamento foram precipitadas em duas etapas de centrifugação a 4°C e 4000rpm, sendo a primeira por 25 minutos e utilizando-se 80µl isopropanol 75% (Merck) em cada amostra, e a segunda por 10 minutos com 150µl etanol 70% (Merck). Os tubos ou placa foram colocados no termociclador com a tampa aberta a 90⁰ C por 2 minutos. Após a precipitação as amostras foram ressuspensas em 1,5µl de Loading Buffer (500 mL de EDTA 0,5M pH8.0, 0,5g de Blue Dextran, 9,5 mL de água estéril) e foram mantidas em termociclador a 95⁰ C por 2 minutos para a denaturação das fitas de DNA, sendo posteriormente mantidas no gelo até o momento da aplicação no gel de sequenciamento. As amostras foram submetidas à eletroforese por 7 horas em gel de poliacrilamida e bisacrilamida preparado com Long Ranger® 50% Gel Solution (Cambrex Bio Science) acrescido de 6M de uréia, tampão TBE 1X, 250µl de persulfato de amônio e 25µl de TEMED (Sigma®) e mantido por 2 horas em incubação para a total polimerização.

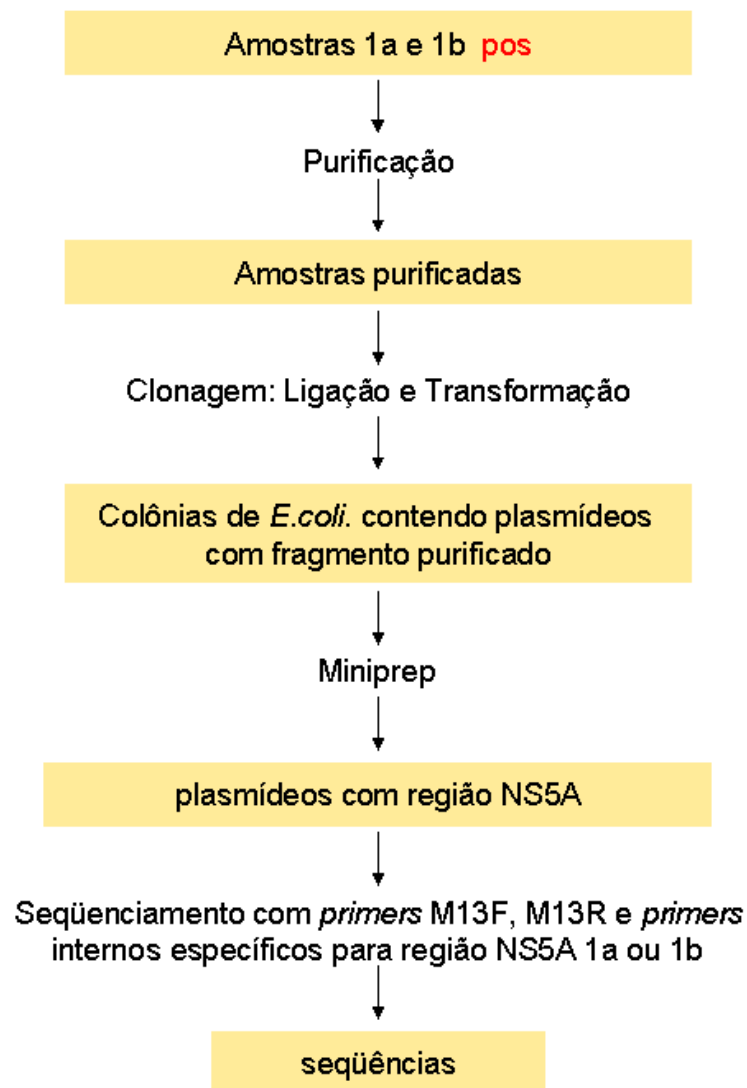


Figura 11. Fluxograma metodológico II: purificação, clonagem e seqüenciamento das amostras amplificadas.

3.2.8. Análise das seqüências

Validação, Montagem da seqüência consenso e alinhamento.

Os cromatogramas resultantes do seqüenciamento das amostras foram analisados quanto à similaridade com o vírus da hepatite C e com a região NS5A por meio dos programas SNAP (Synonymous/Non-synonymous Analysis Program) (<http://hcv.lanl.gov/content/hcv-db/SNAP/SNAP.html>) e BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) do NCBI (National Center of Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Posteriormente, as seqüências foram submetidas aos programas *Phred-Phrap-Consed* (Ewing & Green, 1998; Ewing et al., 1998; Gordon, Abajian & Green, 1998) onde o programa *Phred* mensurou a qualidade dos dados e atribui um score de 0 a 50 para cada base do cromatograma, e o programa *Phrap* montou uma seqüência consenso a partir do alinhamento das várias seqüências sobrepostas e validadas pelo *Phred*, sendo que as bases utilizadas para construção apresentaram um score > 20. As seqüências consenso foram visualizadas e analisadas no programa *Consed*.

As seqüências consenso que correspondiam aos clones obtidos das amostras do subtipo a do HCV foram alinhadas no programa *Clustal X* (Thompson et al., 1997) e comparadas a uma seqüência referência do genótipo 1a (número de acesso no *GeneBank* NC_004102.1). De mesma forma, as seqüências consenso que correspondiam aos clones obtidos das amostras do subtipo b foram alinhadas e comparadas a uma seqüência referência do genótipo 1b (número de acesso no *GeneBank* D50481.1). Em seguida, as seqüências 1a e 1b foram

editadas no programa *Bioedit* (Hall, 1999) onde as seqüências de nucleotídeos correspondentes ao vetor de clonagem e às regiões NS4B e NS5B do HCV foram retiradas e as seqüências referentes à NS5A completa de cada subtipo puderam ser submetidas às análises.

Análise das seqüências de nucleotídeos e aminoácidos

Os alinhamentos contendo as seqüências de nucleotídeos editadas 1a e 1b foram visualizados e analisados no programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versão 3.1 (Kumar, Tamura & Nei, 2004) e as seqüências de aminoácidos foram deduzidas.

Por meio das ferramentas do programa MEGA foi obtido o número de substituições de nucleotídeos e aminoácidos observadas nas seqüências correspondentes a cada clone comparadas à seqüência referência. Estas análises foram realizadas par a par pelo método do número de diferenças em nucleotídeos ou aminoácidos. A freqüência de substituições sinônimas por sítio sinônimo (K_s), a freqüência de substituições não-sinônimas por sítio não-sinônimos (K_a) foram calculadas par a par utilizando o método Kumar com cálculo de desvio padrão e bootstrap de 500 réplicas. As substituições sinônimas por sítio sinônimo ocorrem quando a substituição na seqüência de nucleotídeos não altera a seqüência de aminoácidos e as substituições não-sinônimas por sítio não-sinônimos ocorre quando a substituição na seqüência de nucleotídeos altera a seqüência de aminoácidos. A média da distância genética entre os pares de seqüências

referentes aos clones de cada paciente foi calculada pelo método Tamura-Nei com parâmetro Gamma 1.0 e cálculo de desvio padrão com bootstrap de 500 réplicas.

O número de substituições de nucleotídeos e aminoácidos, o K_s , o K_a e distância genética foram avaliados para a NS5A completa e para as regiões internas específicas da NS5A: *CRS*, *ISDR*, *PKR-binding*, *NLS* e *V3*.

3.2.9. Construção da topologia da árvore filogenética

Para a análise filogenética das seqüências obtidas do processamento das amostras dos pacientes e seqüências referência obtidas do *GenBank* foi montado um banco de dados da região a ser analisada (NS5A). O número de acesso das seqüências do *GenBank* utilizadas como referência nestas análises está descrito na tabela 4 .

Tabela 4. Número de acesso das seqüências do *GenBank* utilizadas como referência para a análise filogenética.

Seqüência do <i>GenBank</i> utilizada como referência nº de acesso
NC_004102 .1 (HCV 1a)
D50481.1 (HCV 1b)

Após alinhamento e edição das seqüências com os programas *Clustal X* e *Bioedit* respectivamente, foi utilizado o programa *PAUP** (Swofford, 2002) para a realização da análise filogenética, utilizando o método de distância. Para tal o modelo de substituição foi estimado pelo teste de razão de verossimilhança com o auxílio do programa *Modeltest versão 3.06* (Posada &

Crandall, 1998). O modelo de substituição estimado para a região NS5A foi o HKY com proporção de sítios invariantes (I) e distribuição gama para variação da taxa de substituição entre os sítios (G) (HKY+I+G). Para a reconstrução da topologia foi utilizado o algoritmo de agrupamento de vizinhos (*neighbor-joining*, NJ); (Saitou & Nei, 1987).

Foram calculados os valores de *bootstrap*, com 1000 réplicas para a verificação da sustentação de ramos na topologia da árvore obtida (Felsenstein, 1985; Zharkikh & Li, 1995). Os valores de *bootstrap* acima de 70 foram considerados significativos (McCormack & Clewley, 2002).

3.2.10. Análise estatística

Na comparação das diferenças entre os grupos de pacientes respondedores, não-respondedores e respondedores ao final do tratamento foi utilizado o teste exato de Fisher para avaliação das variáveis qualitativas e a análise da variância, teste Mood para mediana e teste da soma dos postos de Wilcoxon para as análises quantitativas.

As variáveis avaliadas pelo teste de Fisher foram sexo e subtipo de HCV. A análise da variância foi utilizada para avaliar a variável idade e a variável número de substituições na seqüência de nucleotídeos. O número de substituições de aminoácidos, Ks, Ka e distância genética foram avaliados pelo teste Mood para mediana. A diferença entre os grupos para as variáveis substituições sinônimas e não-sinônimas de uma mesma amostra foi analisada pelo teste da soma dos postos de Wilcoxon.

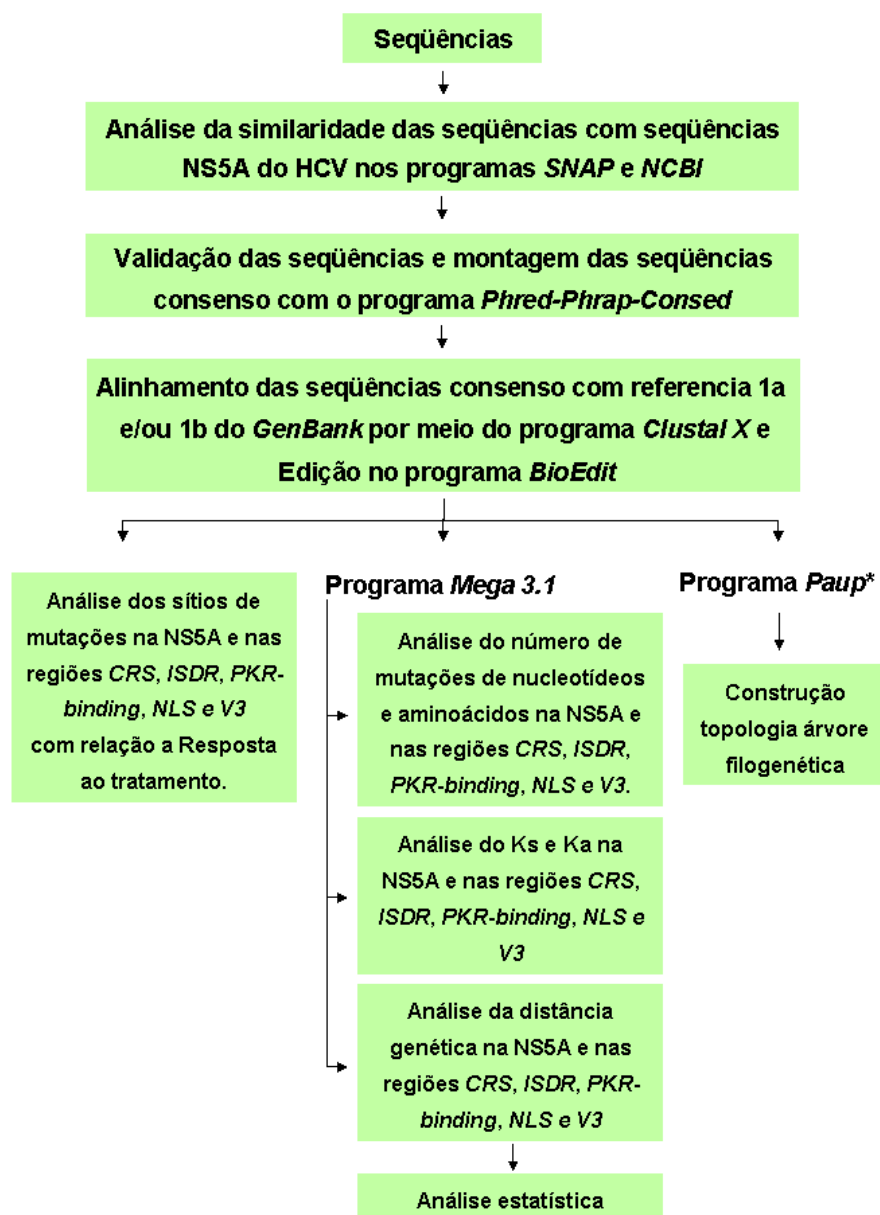


Figura 12. Fluxograma metodológico III: análise das seqüências, construção da topologia da árvore filogenética e análise estatística.

Resultados

3. RESULTADOS

3.1. População e amostra

O estudo foi composto por 12 pacientes, sendo 4 Respondedores, 4 Não-Respondedores e 4 Respondedores ao final do tratamento com Peginterferon e Ribavirina. Do total de pacientes do estudo, 10 são do sexo masculino (83,3%) e 2 do sexo feminino (16,7%). A média da idade dos pacientes foi 38.8 ± 10.9 . Todos os pacientes eram portadores do HCV genótipo 1 sendo sete portadores do subtipo a e cinco do subtipo b. (Tabela 5)

Tabela 5. Características dos pacientes que constituem o estudo.

Paciente	sexo	idade	Genótipo HCV ^a	Genótipo/subtipo HCV ^b	Resposta ao tratamento
1	M	36	1	1a	Respondedor
2	F	44	1	1b	Respondedor
3	M	40	1	1a	Respondedor
4	M	35	1	1a	Respondedor
5	M	41	1	1a	Não-Respondedor
6	M	27	1	1b	Não-Respondedor
7	M	52	1	1b	Não-Respondedor
8	M	51	1	1b	Não-Respondedor
9	M	39	1	1a	Respondedor ao final do tratamento
10	M	27	1	1a	Respondedor ao final do tratamento
11	M	56	1	1b	Respondedor ao final do tratamento
12	F	25	1	1a	Respondedor ao final do tratamento

^agenotipagem baseada no seqüenciamento da região 5'UTR

^bgenotipagem e subtipagem baseada no seqüenciamento da região NS5A

3.2. Amplificação da região genômica viral NS5A

A região NS5A foi amplificada nas amostras pré-tratamento dos 12 pacientes que compõem o estudo, dando origem a um produto de PCR com fragmentos de aproximadamente 1700 pares de base.

Inicialmente, todas as reações de PCR e NESTED-PCR foram realizadas com a utilização dos *primers* degenerados, os quais foram construídos para a amplificação das amostras contendo HCV 1a ou 1b. Foram amplificadas nove das doze amostras processadas, sendo 7 do subtipo a e 2 do subtipo b. Para as amostras do subtipo b que não foi possível a amplificação do fragmento de interesse com as condições iniciais, foram feitas reações de PCR e NESTED-PCR com os *primers* desenhados especificamente para este subtipo, que possibilitou a obtenção dos fragmentos de DNA da região NS5A das demais amostras.

3.3. Clonagem dos produtos amplificados

Todos os produtos amplificados e purificados das amostras dos 12 pacientes foram ligados ao vetor PUC do Kit TOPO XL e transformados em *E. coli* competentes. Foram produzidas colônias suficientes para a estocagem de 96 clones em placas de 96 *wells*, sendo 15 clones selecionados aleatoriamente e submetidos à extração e purificação dos plasmídeos. Os plasmídeos purificados contendo o fragmento da NS5A amplificado e clonado das amostras dos pacientes respondedores, não respondedores e respondedores ao final do tratamento apresentaram o mesmo padrão de bandas quando realizada a eletroforese em gel de agarose, com exceção dos plasmídeos extraídos de 3 colônias (colônias 8, 10 e

12) da amostra do paciente 8 (Não Respondedor) que apresentaram um padrão de corrida eletroforética diferenciado (Figura 13). Com isso, foram extraídos e purificados plasmídeos de 3 colônias adicionais do estoque de clones da amostra do paciente 8.

A clonagem das 12 amostras amplificadas resultou em plasmídeos purificados de 15 colônias correspondente às amostras de 11 pacientes e 18 colônias correspondente ao paciente 8, totalizando 183 clones encaminhados para a realização de reações de seqüenciamento.

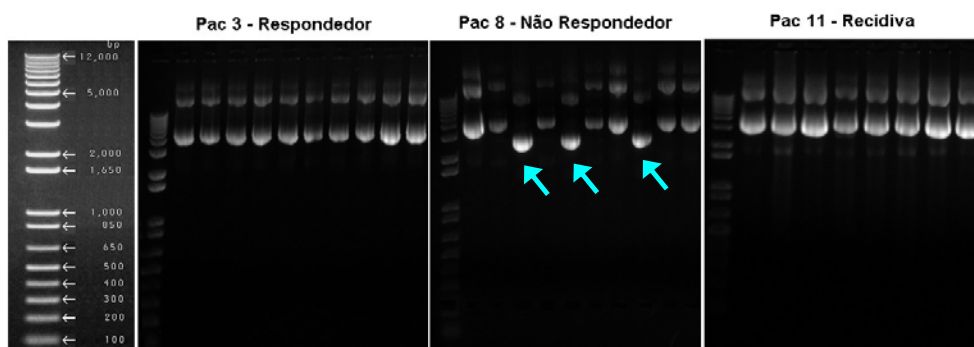


Figura 13. Perfil de corrida eletroforética dos plasmídeos extraídos das colônias referentes às amostras de pacientes respondedores, não respondedores e respondedores ao final do tratamento. À esquerda, padrão de marcador molecular utilizado. Setas azuis representam plasmídeos das colônias 8, 10 e 12, que apresentaram perfil de corrida eletroforética diferenciado.

3.4. Seqüenciamento

Foram obtidas 1065 seqüências como resultado das reações de seqüenciamento com 180 clones do estudo. Os plasmídeos dos 15 clones de cada amostra foram submetidos ao seqüenciamento com 6 *primers*. Foi possível obter 5 seqüências de cada clone da amostra de 11 pacientes (Pacientes 2 a 12). Quatro

seqüências corresponderam ao seqüenciamento com os *primers* M13*Foward*, M13*Reverse*, NS5A1a_267 e NS5A1a_618 para clones contendo NS5A 1a e com os *primers* M13*Foward*, M13*Reverse*, NS5A1b_267 e NS5A1b_622 para clones contendo NS5A 1b. A 5^a seqüência foi obtida do seqüenciamento com o *primer* NS5A1a_823 ou NS5A1a_1094 para 1a e NS5A1b_872 ou NS5A1b_1232 para 1b. Não foram obtidas seqüências das reações de seqüenciamento com o *primer* NS5A1a_267 para os clones referentes ao paciente 1. Todos os clones de cada amostra apresentaram amplificação para os mesmos *primers*. (Quadro 1)

Quadro 1. Seqüências obtidas das reações de seqüenciamento com os primers utilizados no estudo. Cada paciente representa os 15 clones submetidos ao seqüenciamento.

<i>primers</i> seqüenciamento	Pacientes infectados HCV 1a							Pacientes infectados HCV 1b					
	1	3	4	5	9	10	12	2	6	7	8	11	
M13 <i>Foward</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
M13 <i>Reverse</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NS5A1a_267		x	x	x	x	x	x						
NS5A1a_618	x	x	x	x	x	x	x						
NS5A1a_823													x
NS5A1a_1094	x	x	x	x	x	x							
NS5A1b_267								x	x	x	x		x
NS5A1b_622								x	x	x	x		x
NS5A1b_872											x		x
NS5A1b_1232								x	x	x			

O seqüenciamento dos plasmídeos extraídos das colônias 8, 10 e 12 da amostra do paciente 8 apresentou um padrão de seqüências que divergiu em tamanho e seqüência de nucleotídeos das seqüências dos plasmídeos das demais colônias. As seqüências resultantes do seqüenciamento destes clones com o *primer* M13F foram complementares às seqüências obtidas com o *primer* M13R (Figura 14) e não houve amplificação como resultado das reações de seqüenciamento com os primers internos NS5A1a_267, NS5A1a_618, NS5A1a_823 e NS5A1a_1094.

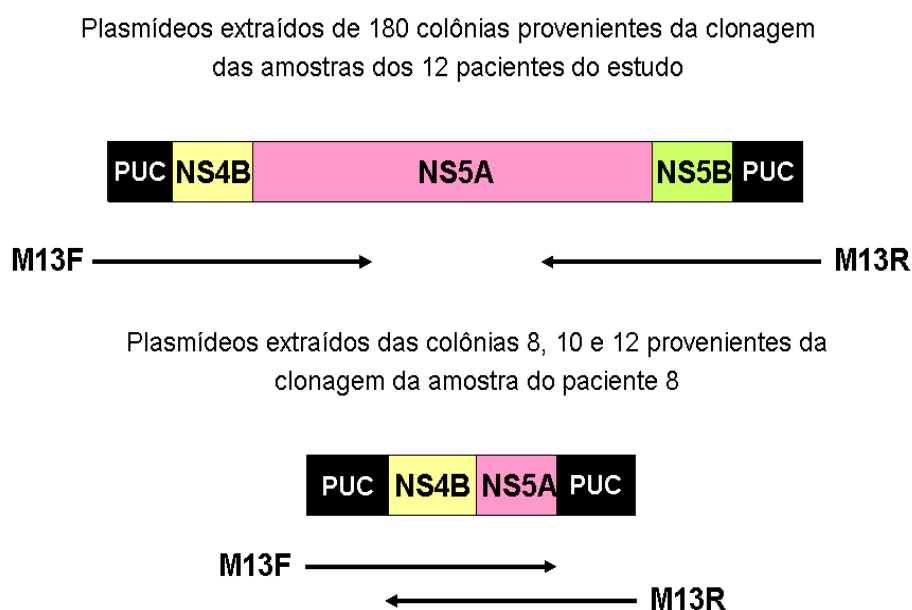


Figura 14. Resultado do seqüenciamento das 183 colônias do estudo com os *primers* M13F e M13R.

3.5. Análise das seqüências

3.5.1. Validação, Montagem da seqüência consenso e alinhamento.

As 1065 seqüências obtidas apresentaram similaridade com as regiões esperadas do HCV. A submissão das seqüências contendo a região NS5A para análise nos programas *SNAP* e *BLAST* possibilitou a confirmação da genotipagem do HCV e a realização da subtipagem. Todas as amostras analisadas com seqüências contendo NS5A apresentaram o mesmo genótipo de HCV apresentado pela análise das seqüências 5'UTR (Tabela 5).

Foi possível a montagem de 165 seqüências consenso com a NS5A completa (com 1344 nucleotídeos para HCV 1a e 1341 nucleotídeos para HCV 1b) referente às seqüências de 11 pacientes (2 a 12), anteriormente validadas de acordo com os critérios de qualidade estabelecidos. A posição das seqüências da NS5A completa no genoma do HCV, de acordo com as seqüências HCV 1a e HCV 1b do *GenBank* utilizadas como referência, pode ser observadas na Tabela 5. A seqüência contendo a NS5A completa não foi obtida para a amostra do paciente 1 devido a não amplificação com o *primer* NS5A1a_267 nas reações de seqüenciamento. Para este paciente, foi possível a montagem de seqüências consenso com 633 nucleotídeos (Tabela 6).

Tabela 6. Número de nucleotídeos obtidos na montagem da seqüência consenso e posição no genoma referente aos clones das amostras dos pacientes infectados com HCV 1a e HCV 1b.

Pacientes	Seqüência consenso	Posição no genoma completo
3, 4, 5, 9, 10 e 12	1344 nucleotídeos	6258 a 7601 ^a
2, 6, 7, 8 e 11	1341 nucleotídeos	6246 a 7586 ^b
1	633 nucleotídeos	6969 a 7601 ^a

^anumeração baseada na seqüência completa de HCV 1a (número de acesso no *GenBank* NC_004102.1).

^bnumeração baseada na seqüência completa de HCV 1b (número de acesso no *GenBank* D50481.1).

A complementaridade das seqüências obtidas dos plasmídeos das colônias 8, 10 e 12 da amostra do paciente 8 foi confirmada na montagem da seqüência consenso, a qual demonstrou que ocorreu nestes clones a perda de uma seqüência de nucleotídeos que compreende a *ISDR*, *PKR-binding*, *NLS* e domínio *V3* da região NS5A e à parte correspondente a região NS5B. As seqüências resultantes destas 3 colônias não prosseguiram nas análises.

O alinhamento das seqüências foi realizado em etapas. Primeiramente, as seqüências consenso de cada clone das amostras dos pacientes 3, 4, 5, 9, 10 e 12 foram alinhadas com a referencia do genótipo 1a (número de acesso no *GeneBank* NC_004102.1) e as seqüências consenso de cada clone das amostras dos pacientes 2, 6, 7, 8 e 11 foram alinhadas com a referencia do genótipo 1b (número de acesso no *GeneBank* D50481.1). Estes alinhamentos foram editados e somente a região NS5A completa (1344 nucleotídeos em HCV 1a e 1341 nucleotídeos em HCV 1b) de todas as seqüências foi mantida. Posteriormente, as seqüências consenso de cada clone das amostras dos pacientes 1, 3, 4, 5, 9, 10 e 12 foram alinhadas com a mesma referencia do genótipo 1a

(número de acesso no *GeneBank* NC_004102.1) e foram editadas para manter a seqüência de nucleotídeos 633 nucleotídeos que corresponderam à NS5A parcial.

Foram excluídas do estudo 2 seqüência consenso. A seqüência consenso do clone 10 da amostra do paciente 5 foi eliminada por apresentar uma deleção de 60 nucleotídeos na região NS5A, e a seqüência consenso do clone 8 da amostra do paciente 3 não foi incluída devido a rejeição na validação pelo programa *Phred-phrap-consed* de uma das seqüências necessária para a formação da seqüência consenso.

3.5.2. Análise das Seqüências de aminoácidos.

A análise das seqüências consenso da NS5A 1a completa (1344 nucleotídeos) possibilitou a observação da localização de diferenças de aminoácidos nas seqüências obtidas, quando comparadas à seqüência referência 1a (número de acesso no *GeneBank* NC_004102.1) (Figura 15). A figura 15 também apresenta a localização das substituições de aminoácidos nas seqüências consenso da NS5A parcial (633 nucleotídeos) referentes aos clones obtidos da amostra do paciente 1. De mesma forma, as diferenças de aminoácidos nas seqüências consenso da NS5A 1b completa (1341 nucleotídeos) puderam ser observadas quanto alinhadas e comparadas com a seqüência referência 1b (número de acesso no *GeneBank* D50481.1) (Figura 16). Apenas as substituições não sinônimas por sítio não sinônimo estão representadas nas figuras 15 e 16.

As seqüências consenso da NS5A 1a completa, NS5A 1b completa e NS5A 1a parcial foram novamente editadas, resultando em arquivos

contendo seqüências das regiões *CRS*, *PKR-binding*, *ISDR*, *NLS* e *V3* separadamente. Nestes arquivos foram observadas as substituições de aminoácidos para cada região e a freqüência de cada seqüência consenso pode ser analisada (Figura 17 a e b). A região *CRS* apresentou *Stop códon* no aminoácido da posição 9 para duas seqüências consenso, sendo uma correspondente a um clone obtido da amostra do paciente 4 (Respondedor ao tratamento) e a outra de um clone obtido da amostra do paciente 9 (Respondedor ao final do tratamento). (Figura 15 e 17a)

As seqüências obtidas das amostras de pacientes Respondedores, Não-respondedores e Respondedores ao final do tratamento não apresentaram nenhum *motif* relacionado a um tipo particular de resposta. Nenhuma substituição de aminoácidos foi específica para todos os pacientes de um mesmo grupo de resposta ao tratamento. A maioria das mutações esta concentrada na região *downstream* da *ISDR*, principalmente na região *V3*. (Figuras 15, 16 , 17a e 17b)

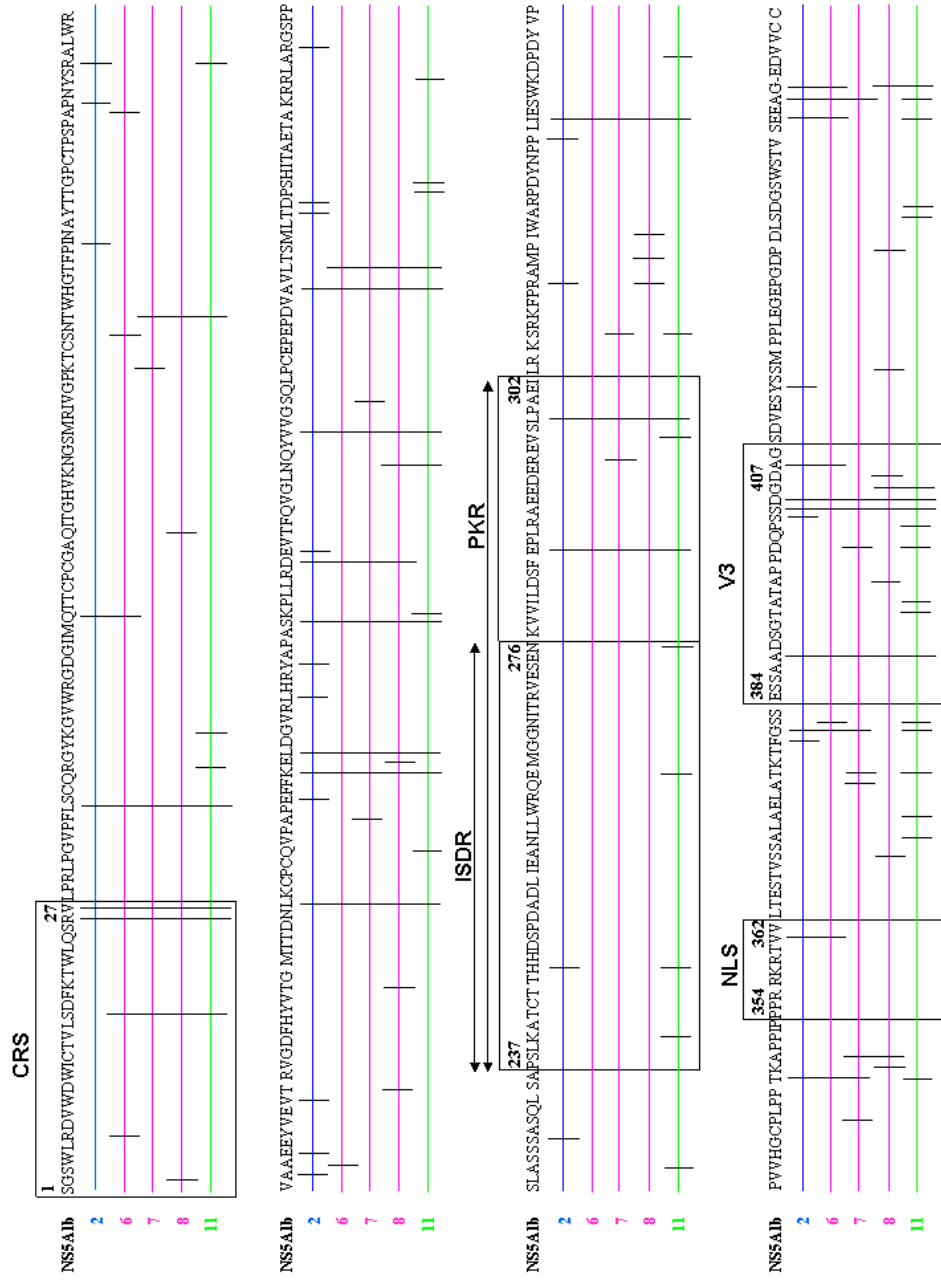


Figura 16. Esquema representativo da localização das substituições nas seqüências de aminoácidos deduzidas do alinhamento das seqüências consenso NS5A 1b com relação à seqüência referência 1b (*GeneBank* D50481.1). As linhas horizontais representam o conjunto de seqüências de aminoácidos referentes aos clones obtidos, e os números à esquerda representam os pacientes aos quais as seqüências se referem. As linhas verticais representam os sítios de substituições observados. Pacientes Responderes estão representados em azul, Não-responderes em cor-de-rosa e Responderes ao Final do tratamento em verde. As regiões *CRS*, *PKR-binding*, *ISDR*, *NLS* e *V3* estão destacadas e suas posições na região NS5A indicadas.

CRS 1a			
NS5A1a	SGSWLRDIWD	WICEVLSDFK	TWLKAKL
03V.. (14)
04 (14)
04* (01)
05 (14)
09 (14)
09*R (01)
10 (14)
10R.. (01)
12 (15)

CRS 1b			
NS5A1b	SGSWLRDVWD	WICTVLSDFK	TWLQSRV
02KL (15)
06T..KL (14)
06K....T....KL (01)
07T..KL (15)
08A..KL (12)
08	.D.....A....KL (02)
08	.S.....A....KL (01)
11T..KL (01)

PKR-binding 1a							
NS5A1a	PSLKATCTAN	HDSPDAELIE	ANLLWRQEMG	GNITRVESEN	KVVILDSFDP	LVAEEDEREV	SVPAEI
03	...G...I (11)
03	...G...TI (02)
03	...G...A...I (01)
04	...G...V...	...V... (15)
05	...G...I (06)
05	...G...V...I (04)
05	...G...	D.....I (01)
05	...G...E..I (01)
05	...G... (01)
09	...G...V...I (13)
09	...G...T...	...V...I (01)
09	...G...V...	...L...I (01)
10	...G...V...I (12)
10	...G...I (02)
10	...G...V...SI (01)
10	...G...E..I (01)
12	...G...V...I (15)

PKR-binding 1b							
NS5A1b	PSLKATCTTH	HDSPDADLIE	ANLLWRQEMG	GNITRVESEN	KVVILDSFEP	LRAEEDEREV	SLPAEI
02RD.V.... (15)
06D.V.... (15)
07D.G.. (15)
08RDD.V.... (14)
08RD.V.... (01)
11D.V.... (12)
11G..D.V.... (01)
11	...N....D.V.... (01)
11D.I.V.... (01)

Figura 17 a. Diferenças de aminoácidos nas regiões *CRS* e *PKR-binding* comparadas às referências 1a (*GeneBank* NC_004102.1) e 1b (*GeneBank* D50481.1). Pacientes Respondedores estão representados em azul, Não-respondedores em cor-de-rosa e Respondedores ao Final do tratamento em verde. Os números à esquerda das seqüências representam os pacientes deste estudo, e à direita o número de clones observados para cada seqüência.

<p>ISDR 1a</p> <p>NS5A1a PSLKATCTAN HDSPDAELIE ANLLWRQEMG GNITRVESEN</p> <p>03 ...G..... (11)</p> <p>03 ...G...T..... (02)</p> <p>03 ...G.....A..... (01)</p> <p>04 ...G.....V..... (15)</p> <p>05 ...G..... (13)</p> <p>05 ...G.....D..... (01)</p> <p>09 ...G..... (14)</p> <p>09 ...G.....T..... (01)</p> <p>10 ...G..... (15)</p> <p>12 ...G..... (15)</p> <p>ISDR 1b</p> <p>NS5A1b PSLKATCTTH HDSPDADLIE ANLLWRQEMG GNITRVESEN</p> <p>02R..... (15)</p> <p>06 (15)</p> <p>07 (15)</p> <p>08R..... (14)</p> <p>08R.....D (01)</p> <p>11 (14)</p> <p>11G..... (01)</p> <p>11 ...N..... (01)</p>		<p>NLS 1a</p> <p>NS5A1a PPRKKRTVV</p> <p>01 ...R..... (12)</p> <p>01 ..QR..... (01)</p> <p>01 ..KR..... (01)</p> <p>01 ..PR..... (01)</p> <p>03 (13)</p> <p>03A.. (01)</p> <p>04 (14)</p> <p>04E.... (01)</p> <p>05 (01)</p> <p>09 (14)</p> <p>09A.. (01)</p> <p>10 (15)</p> <p>12 (14)</p> <p>12A.. (01)</p> <p>NLS 1b</p> <p>NS5A1b PPRKKRTVV</p> <p>02I.. (15)</p> <p>06I.. (15)</p> <p>07 (15)</p> <p>08 (15)</p> <p>11 (15)</p>	
<p>V3 1a</p> <p>NS5A1a STSGITGDNT TTSSEPAPSG CPPD</p> <p>01 ...V.S...P...S... (09)</p> <p>01 ...V.S...P...S...S... (04)</p> <p>01 ...V.S...P...S.D... (01)</p> <p>03S...AV...T..D... (14)</p> <p>04 ...V.S...P..TS..RSR. (14)</p> <p>04 ...V.S...A.P..TS..RSR. (01)</p> <p>05S...A..P..TS..S... (09)</p> <p>05S...A..PG.TS..S... (03)</p> <p>05S...A..P..TS... (02)</p> <p>09S...A..P.....S... (13)</p> <p>09S...P.....S... (02)</p> <p>10S...P..TS..SLQ. (14)</p> <p>10S..A...P..TS..SLH. (01)</p> <p>12S...A.P..VS.D... (08)</p> <p>12S...A.P..VS... (05)</p> <p>12S...A.P..VSP... (01)</p> <p>12S...A.P..VSP...T. (01)</p>		<p>V3 1b</p> <p>NS5A1b ESSAADSGTA TAPPDQPSSD GDAG</p> <p>02 ...V.....PDS..T. (14)</p> <p>02 ...V.....PDN..T. (01)</p> <p>06 ...V.....DG..T. (15)</p> <p>07 ...V.....T...DS... (15)</p> <p>08 ...V.....D..DN.. (08)</p> <p>08 ...V.....DG D... (03)</p> <p>08 ...V.....G.....DG D... (02)</p> <p>08 ...V.....G.....DG DN.. (02)</p> <p>11 ...V...M...T.A.DS... (10)</p> <p>11 ...V...MT...T.A.DS... (02)</p> <p>11 ...V...M...T.A.DS E... (02)</p> <p>11 ...V.....T.A.DS... (01)</p>	

Figura 17 b. Diferenças de aminoácidos nas regiões *ISDR*, *NLS* e *PKR-binding* comparadas às referências 1a (*GeneBank* NC_004102.1) e 1b (*GeneBank* D50481.1). Pacientes Respondedores estão representados em azul, Não-respondedores em cor-de-rosa e Respondedores ao Final do tratamento em verde. Os números à esquerda das seqüências representam os pacientes deste estudo, e à direita o número de clones observados para cada seqüência.

3.5.3. Análise das substituições de nucleotídeos e aminoácidos

O número de substituições de nucleotídeos e aminoácidos foi calculado para as seqüências consenso NS5A completa e para as regiões *CRS*, *ISDR*, *PKR-binding*, *NLS* e *V3* correspondente a cada clone deste estudo. Para as seqüências obtidas da amostra do paciente 1 não foi possível calcular o número de substituições de nucleotídeos e aminoácidos para NS5A completa e para as regiões *CRS*, *ISDR* e *PKR-binding*. A média do número de substituições encontradas nos clones da amostra de cada paciente pode ser visualizadas nos Quadros 2 e 3. Os valores foram obtidos utilizando como referencias as seqüências HCV 1a e HCV 1b (número de acesso no *GeneBank* NC_004102.1 e D50481.1).

A média e o desvio padrão da freqüência de substituições sinônimas por sítios sinônimos (K_s), substituições não sinônimas por sítios não sinônimos (k_a) e a distância genética das seqüências consenso NS5A completa e regiões *CRS*, *ISDR*, *PKR-binding*, *NLS* e *V3*, obtidos para cada paciente estão representadas nos quadros 4, 5 e 6 respectivamente.

Quadro 2. Média do número de substituições de nucleotídeos observadas nas seqüências correspondentes aos clones obtidos da amostra de cada paciente.

Pacientes	NS5A	CRS	PKR	ISDR	NLS	V3
R						
1					4,3	9,6
2	121,4	11,1	12,2	6,1	2,9	12,0
3	104,9	2,0	13,2	7,1	2,2	10,1
4	107,3	3,1	16,1	8,1	2,5	14,1
NR						
5	92,2	2,1	9,1	4,2	2,2	10,1
6	116,9	12,1	16,1	9,1	2,0	10,0
7	112,7	9,0	12,0	7,0	2,0	12,1
8	110,4	10,3	12,7	7,7	1,1	9,5
RFT						
9	92,1	2,2	13,5	5,1	2,1	8,8
10	105,2	4,1	16,3	7,5	3,1	10,0
11	118,3	8,2	10,8	6,1	2,1	12,3
12	91,5	2,0	10,7	4,5	4,0	9,3

R: respondedores, NR: não-respondedores e RFT: respondedores ao final do tratamento.

Quadro 3. Média do número de substituições de aminoácidos observadas nas seqüências correspondentes aos clones obtidos da amostra de cada paciente.

Pacientes	NS5A	CRS	PKR	ISDR	NLS	V3
R						
1					1,2	4,4
2	33,3	2,0	3,0	1,0	1,0	5,0
3	28,9	1,0	2,2	1,2	0,1	4,9
4	30,5	0,0	3,0	2,0	0,1	8,1
NR						
5	27,0	0,0	2,4	1,1	0,0	6,0
6	27,3	3,1	2,0	0,0	1,0	4,0
7	30,2	3,0	3,0	0,0	0,0	4,0
8	25,9	3,2	3,1	1,1	0,0	4,4
RFT						
9	24,8	0,1	3,1	1,1	0,1	3,9
10	27,3	0,1	2,9	1,0	0,0	7,1
11	32,2	3,0	2,2	0,1	0,0	6,2
12	27,9	0,0	3,0	1,0	0,1	5,7

R: respondedores, NR: não-respondedores e RFT: respondedores ao final do tratamento.

Quadro 4. Média das frequências de Ks e desvio padrão obtidos da análise par a par entre as seqüências consenso correspondente a cada paciente.

Paciente	NS5A	SE	CRS	SE	PKR	SE	ISDR	SE	NLS	SE	V3	SE
R												
1									0,0032	0,0035	0,0178	0,0109
2	0,0138	0,0030	0,0056	0,0070	0,0056	0,0046	0,0064	0,0069	0,0295	0,0229	0,0088	0,0098
3	0,0111	0,0022	0,0000	0,0000	0,0082	0,0054	0,0067	0,0072	0,0000	0,0000	0,0251	0,0176
4	0,0103	0,0027	0,0000	0,0000	0,0040	0,0031	0,0034	0,0041	0,0571	0,0820	0,0056	0,0061
NR												
5	0,0369	0,0049	0,0233	0,0139	0,0458	0,0145	0,0484	0,0206	0,0476	0,0568	0,0132	0,0188
6	0,0014	0,0011	0,0000	0,0000	0,0020	0,0020	0,0034	0,0040	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
7	0,0022	0,0009	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0065	0,0092
8	0,0410	0,0052	0,0111	0,0142	0,0308	0,0135	0,0426	0,0210	0,0165	0,0212	0,0290	0,0207
RFT												
9	0,0249	0,0038	0,0056	0,0078	0,0132	0,0067	0,0069	0,0054	0,0143	0,0194	0,0265	0,0218
10	0,0294	0,0039	0,0539	0,0272	0,0349	0,0144	0,0207	0,0165	0,0143	0,0203	0,0199	0,0140
11	0,0336	0,0042	0,0230	0,0225	0,0214	0,0074	0,0078	0,0062	0,1040	0,0465	0,0260	0,0189
12	0,0365	0,0052	0,0457	0,0266	0,0317	0,0146	0,0203	0,0171	0,0143	0,0180	0,0552	0,0324

R: respondedores, NR: não-respondedores, RFT: respondedores ao final do tratamento, SE: desvio padrão.

Quadro 5. Média das frequências de Ka e desvio padrão obtidos da análise par a par entre as seqüências consenso correspondente a cada paciente.

Paciente	NS5A	SE	CRS	SE	PKR	SE	ISDR	SE	NLS	SE	V3	SE
R												
1									0,0260	0,0276	0,0130	0,0108
2	0,0026	0,0007	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0028	0,0029
3	0,0021	0,0006	0,0000	0,0000	0,0027	0,0020	0,0044	0,0032	0,0084	0,0091	0,0000	0,0000
4	0,0010	0,0004	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0079	0,0084	0,0028	0,0030
NR												
5	0,0078	0,0020	0,0000	0,0000	0,0062	0,0034	0,0017	0,0017	0,0000	0,0000	0,0162	0,0105
6	0,0008	0,0004	0,0024	0,0024	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
7	0,0004	0,0003	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8	0,0045	0,0013	0,0068	0,0070	0,0011	0,0010	0,0019	0,0018	0,0000	0,0000	0,0296	0,0167
RFT												
9	0,0037	0,0010	0,0025	0,0026	0,0016	0,0011	0,0013	0,0014	0,0079	0,0088	0,0052	0,0051
10	0,0038	0,0008	0,0024	0,0025	0,0043	0,0028	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0055	0,0045
11	0,0045	0,0009	0,0000	0,0000	0,0029	0,0016	0,0030	0,0022	0,0000	0,0000	0,0132	0,0080
12	0,0047	0,0014	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0079	0,0089	0,0190	0,0131

R: respondedores, NR: não-respondedores, RFT: respondedores ao final do tratamento, SE: desvio padrão.

Quadro 6. Média das distância genética calculadas par a par entre as seqüências consenso correspondente a cada paciente.

Paciente	NS5A	CRS	PKR	ISDR	NLS	V3
R						
1					0,0207	0,0152
2	0,0065	0,0017	0,0020	0,0021	0,0115	0,0039
3	0,0053	0,0000	0,0049	0,0057	0,0063	0,0081
4	0,0043	0,0017	0,0014	0,0012	0,0308	0,0039
NR						
5	0,0180	0,0078	0,0202	0,0172	0,0143	0,0156
6	0,0011	0,0017	0,0007	0,0012	0,0000	0,0000
7	0,0010	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0020
8	0,0168	0,0067	0,0110	0,0151	0,0053	0,0299
RFT						
9	0,0111	0,0054	0,0059	0,0034	0,0117	0,0129
10	0,0129	0,0197	0,0150	0,0069	0,0057	0,0102
11	0,0145	0,0073	0,0096	0,0046	0,0410	0,0178
12	0,0156	0,0147	0,0108	0,0068	0,0139	0,0325

R: respondedores, NR: não-respondedores e RFT: respondedores ao final do tratamento.

Os resultados da análise da complexidade e diversidade de quasiespécies com relação às substituições de nucleotídeos e aminoácidos, relacionados com o tipo de resposta ao tratamento estão representados no Quadro 7. O número de mutações de nucleotídeos que representa os grupos respondedores, não-respondedores e respondedores ao final do tratamento foi obtido do cálculo da média dos valores apresentados por cada pacientes. Para obtenção do valor do número de mutações de aminoácidos, Ks, Ka e distância genética que representassem cada grupo de resposta foi calculada a mediana dos valores apresentados por cada pacientes.

Quadro 7. Características das quasispécies de HCV na NS5A completa e regiões internas em amostras pré-tratamento de pacientes avaliados de acordo com o tipo de resposta ao tratamento.

Região e tipo de paciente	nº mutações nucleotídeos	nº mutações aminoácidos	Distância genética	Ks	Ka
NS5A					
Respondedor	111,2	30,5	0,0053	0,0111	0,00210
Não-Respondedor	108,1	27,2	0,0090	0,0022	0,00265
Respondedor ao final do tratamento	101,8	27,6	0,0137	0,0293	0,00415
CRS					
Respondedor	5,4	1,0	0,0017	0,0000	0,00000
Não-Respondedor	8,4	3,0	0,0042	0,0000	0,00120
Respondedor ao final do tratamento	4,1	0,1	0,0110	0,0344	0,00120
PKR-binding					
Respondedor	13,8	3,00	0,0020	0,0056	0,00000
Não-Respondedor	12,5	2,68	0,0058	0,0020	0,00055
Respondedor ao final do tratamento	12,8	2,97	0,0102	0,0266	0,00225
ISDR					
Respondedor	7,1	1,2	0,0021	0,0064	0,00000
Não-Respondedor	7,0	0,5	0,0082	0,0034	0,00085
Respondedor ao final do tratamento	5,8	1,0	0,0057	0,0141	0,00065
NLS					
Respondedor	3,0	0,6	0,0161	0,0160	0,00820
Não-Respondedor	1,8	0,0	0,0027	0,0000	0,00000
Respondedor ao final do tratamento	2,8	0,0	0,0128	0,0140	0,00400
V3					
Respondedor	11,5	5,0	0,0060	0,0133	0,00280
Não-Respondedor	10,4	4,2	0,0088	0,0065	0,00810
Respondedor ao final do tratamento	10,1	6,0	0,0154	0,0263	0,00940

Ks: frequência de substituições sinônimas por sítios sinônimos;

Ka: frequência de substituições não sinônimas por sítios não sinônimos.

Como mostrado no quadro 7, quando comparado com as seqüências referencia, o número de mutações de nucleotídeos foi maior nos isolados dos pacientes respondedores do que não-respondedores e respondedores ao final do tratamento para as regiões NS5A (111,2 versus 108,1 e 101,8 respectivamente), *PKR-binding* (13,8 versus 12,5 e 12,8 respectivamente), *ISDR* (7,1 versus 7,0 e 5,8 respectivamente), *NLS* (3,0 versus 1,8 e 2,8 respectivamente) e *V3* (11,5 versus 10,4 e 10,1 respectivamente). (Figura 18)

A Mediana do número de mutações de aminoácidos foi maior nos isolados de respondedores, seguida dos isolados de não-respondedores e respondedores ao final do tratamento para a NS5A completa (30,5 versus 27,2 e 27,6 respectivamente) e regiões *PKR-binding* (3,00 versus 2,68 e 2,97) e *ISDR* (1,2 versus 0,5 e 1,0) e *NLS* (0,6 versus 0,0 e 0,0). Na região *V3* a mediana foi maior nos pacientes respondedores ao final do tratamento, seguido de respondedores e não-respondedores (6,0 versus 5,0 e 4,2 respectivamente). (Figura 18)

Diferente de todas as regiões, a *CRS* apresentou maior valor nos isolados de não-respondedores, seguido dos respondedores e respondedores ao final do tratamento para a média de mutações em nucleotídeos (8,4 versus 5,4 e 4,1 respectivamente) e mediana de mutações em aminoácidos (3,0 versus 1,0 e 0,1 respectivamente) (Figura 18).

A distância genética apresentou maior valor para grupo de pacientes respondedores ao final do tratamento, em seguida os pacientes não-respondedores e menor valor para pacientes respondedores quando avaliadas

regiões *CRS*, *PKR-binding*, *V3* e *NS5A* completa. Para as regiões *ISDR* e *NLS* os valores das medianas foram contrastantes. (Figura 19)

Na análise da frequência de substituições sinônimas por sítios sinônimos (K_s), a mediana obtida dos valores referentes aos pacientes respondedores ao final foi maior do que os valores encontrados para os outros grupos quando analisada a *NS5A* completa e todas as regiões avaliadas. Com exceção da região *CRS*, no qual a K_s foi nula, os valores do grupo de pacientes respondedores foi maior do que os valores obtidos dos isolados de pacientes não-respondedores nas outras regiões analisadas. Em contraste, a mediana calculada para o K_a dos diferentes grupos resultou em valores maiores para os pacientes não-respondedores e respondedores ao final do tratamento e menores para os pacientes respondedores em todas as regiões analisadas, com exceção da região *NLS*. (Figura 19)

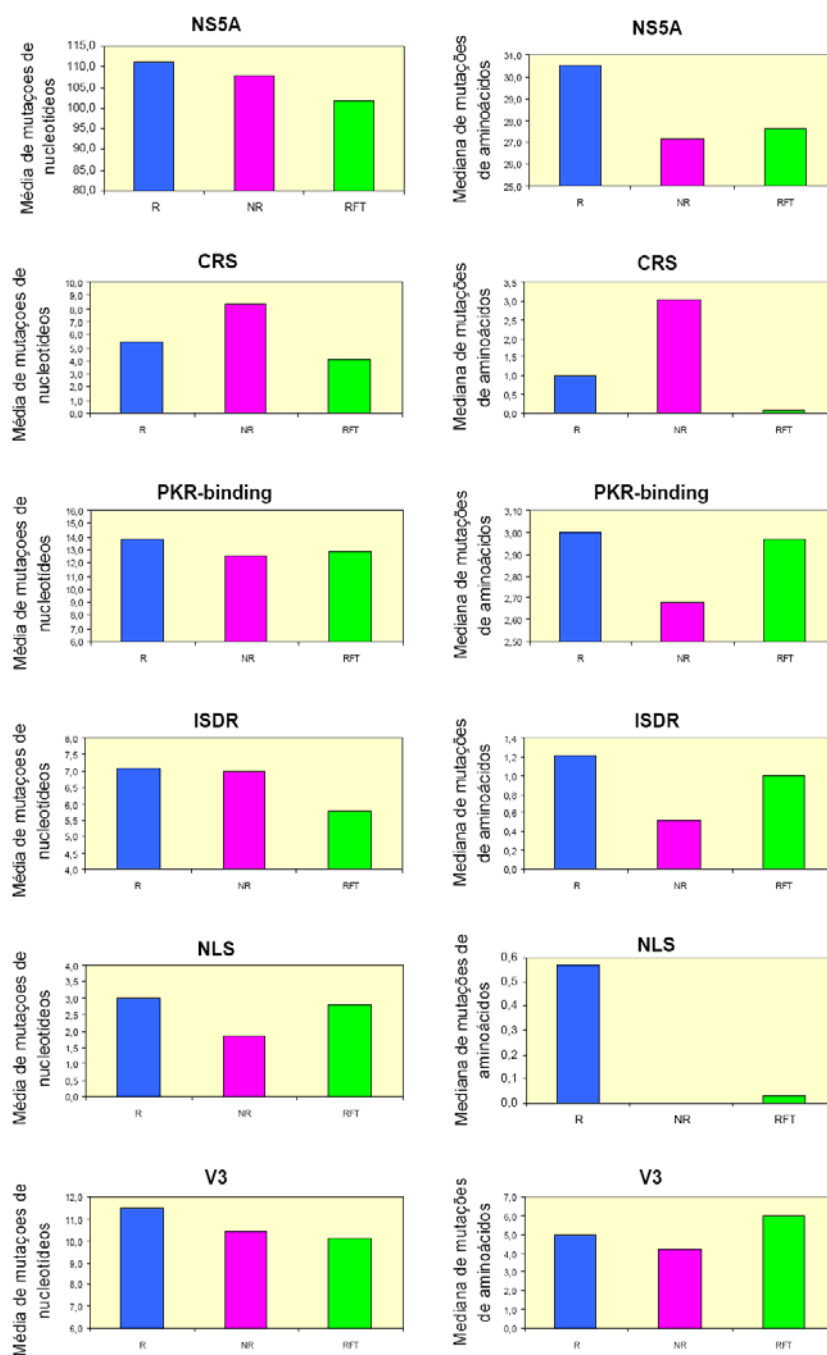


Figura 18. Comparação da média do número de mutações em nucleotídeos e da mediana do número de mutações em aminoácidos na NS5A completa e nas regiões *CRS*, *PKR-binding*, *ISDR*, *NLS* e *V3* entre pacientes respondedores (R), não respondedores (NR) e respondedores ao final do tratamento (RFT).

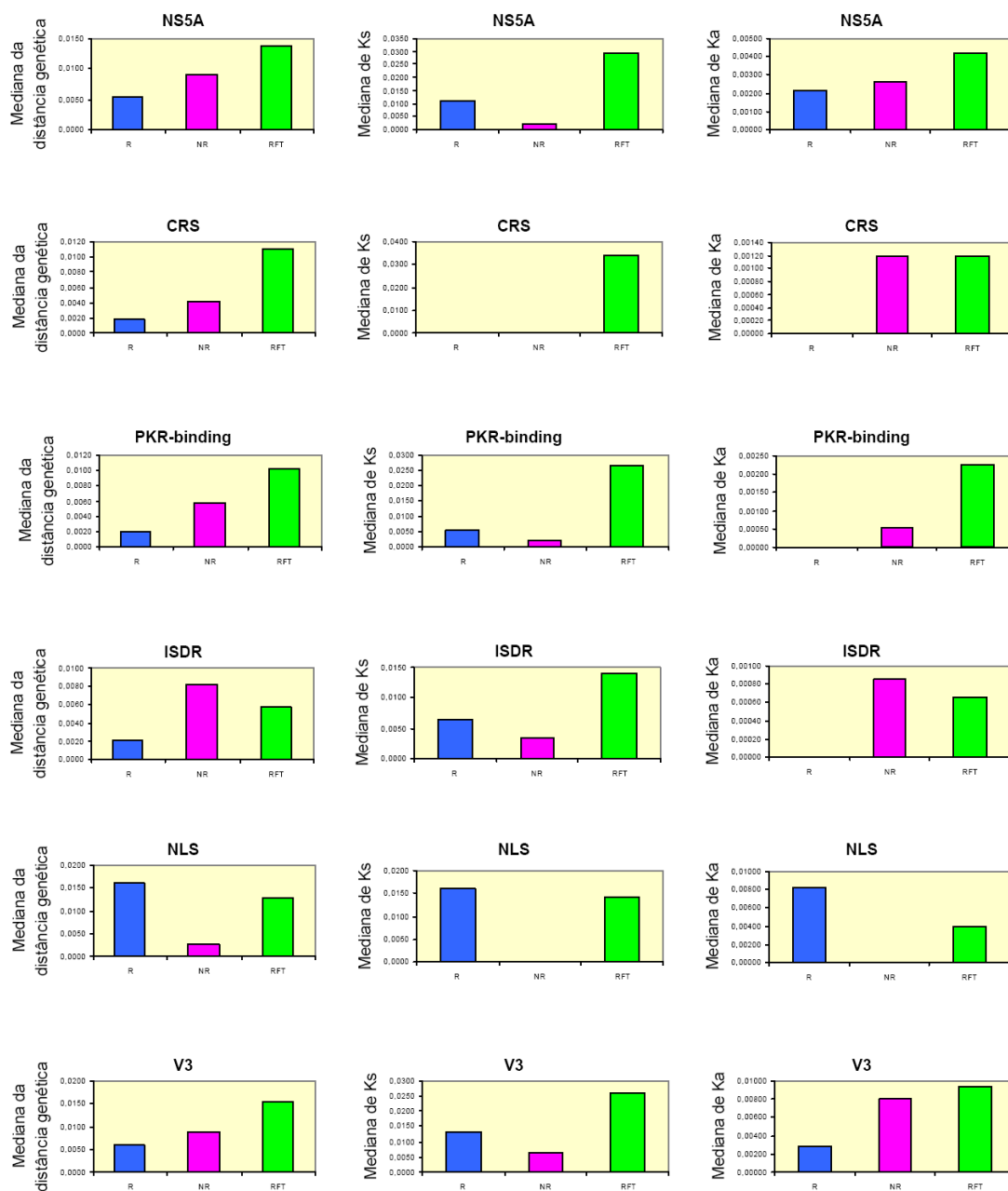


Figura 19. Comparação da mediana da distância genética, frequência de substituições sinônimas por sítios sinônimos (Ks) e frequência de substituições não sinônimas por sítios não sinônimos (Ka) na NS5A completa e nas regiões *CRS*, *PKR-binding*, *ISDR*, *NLS* e *V3* entre pacientes respondedores (R), não respondedores (NR) e respondedores ao final do tratamento (RFT).

3.6. Construção da topologia da árvore filogenética

Foi realizado um alinhamento com 163 seqüências consenso contendo a NS5A completa, correspondentes aos 15 clones extraídos da amostra dos pacientes 02, 06, 11, 07, 08, 12, 09, 04, e 10, e aos 14 clones extraídos da amostra dos pacientes 05 e 03. Neste alinhamento, foram incluídas 2 seqüências do *Genbank* utilizadas como referência para o genótipo 1a (*GeneBank* NC_004102.1) e 1b (*GeneBank* D50481.1). O alinhamento final, após edição, foi utilizado para a realização da análise filogenética pelo programa Paup*, utilizando-se o método de distância com o modelo HKY85 +I+G e algoritmo de Neighbor-joining para reconstrução de topologia.

A análise da árvore filogenética demonstrou que os clones resultantes da amostra pré-tratamento de cada paciente apresentaram-se como um grupo monofilético. Os grupos monofiléticos correspondentes aos clones da amostra de pacientes do subtipo a foram agrupados com a referência NC_004102 do HCV 1a e os grupos monofiléticos correspondente aos clones da amostra de pacientes do genótipo 1b foram agrupados com a referência NC50481.1 do HCV 1b. Estes resultados foram suportados pelo teste de *bootstrap* com valores acima de 70 obtidos pela análise com 1000 réplicas. (Figura 20)

Não observamos evidências de diferenças na evolução das populações de *quasispecies* entre pacientes respondedores, não respondedores e respondedores ao final do tratamento. Não foi visualizado agrupamento característico dos clones de acordo com o tipo de resposta ao tratamento apresentado pelos pacientes. (Figura 20)

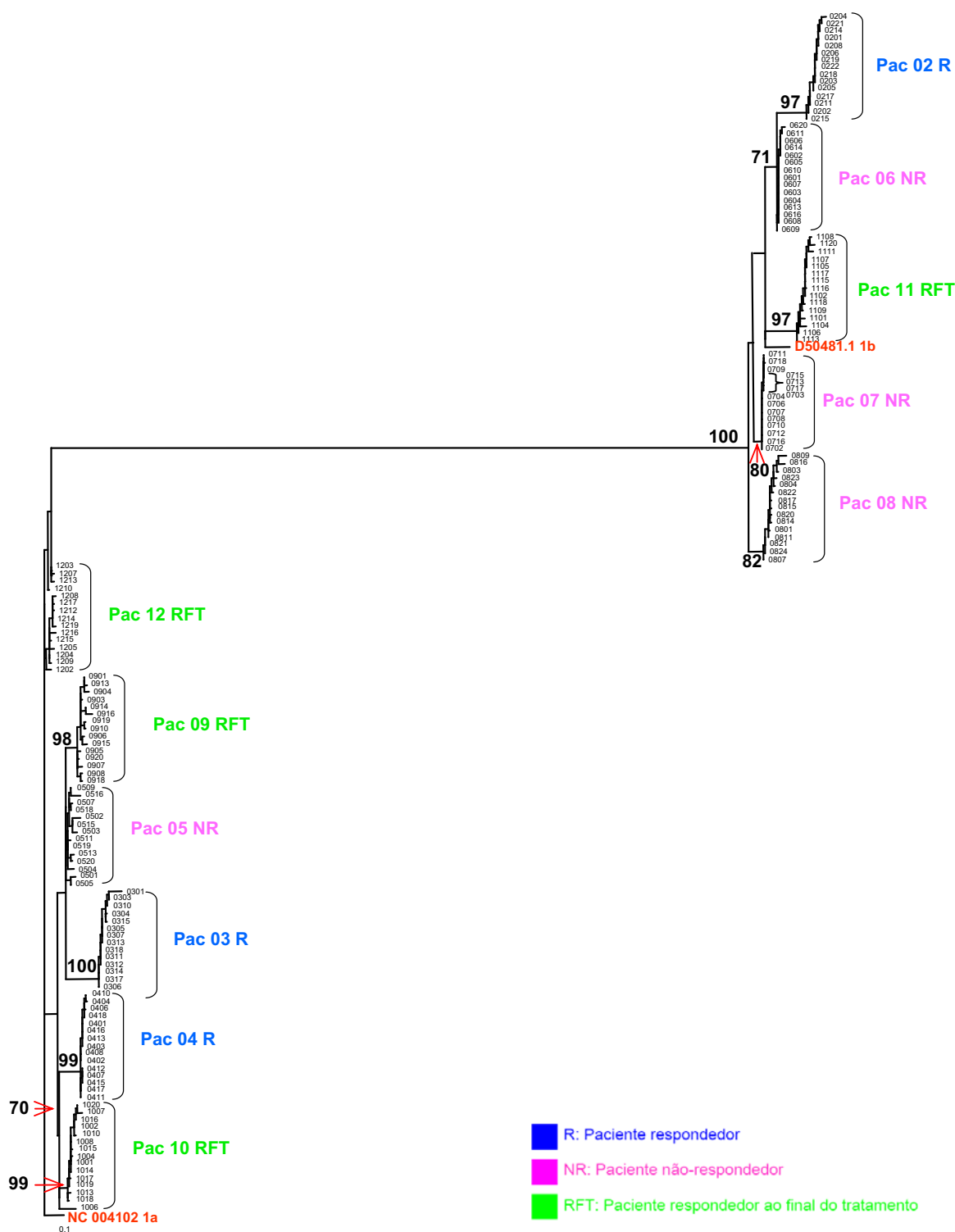


Figura 20. Árvore filogenética, não enraizada, de 165 seqüências da região NS5A com 1344 (HCV1a) e 1341 (HCV1b) nucleotídeos (15 clones dos pacientes 02, 06, 11, 07, 08, 12, 09, 04, e 10, 14 clones dos pacientes 05 e 03 e 2 seqüências do *Genbank* sendo uma genótipo 1a e outra 1b, destacadas em vermelho) gerada pelo programa *PAUP* * utilizando-se o método de distância com o modelo HKY85 +I+G e algoritmo de Neighbor-joining para reconstrução de topologia. Valores de *bootstrap* obtidos com 1000 réplicas. Na figura estão representados os *bootstrap* com valores acima de 70. R: respondedores, NR: não respondedores e RFT: respondedor ao final do tratamento.

3.7. Análise estatística

Para avaliar estatisticamente as variáveis analisadas neste estudo, os pacientes foram organizados, de acordo com a resposta ao tratamento, nos grupos: Respondedores, Não-respondedores e Respondedores ao final do tratamento.

O resultado da análise dos 3 grupos não mostrou diferença significativa quando foram avaliados sexo dos pacientes ($p=1,0$), subtipo do HCV infectante ($p=0,454$) e idade dos indivíduos ($p=0,368$).

A diferença entre os grupos com relação ao número de substituições na sequência de nucleotídeos, número de substituições na sequência de aminoácidos, Ks, Ka e distância genética foi analisada estatisticamente para a região NS5A completa, e regiões *CRS*, *PKR-binding*, *ISDR*, *NLS* e *V3*. Os grupos Respondedores, Não-respondedores e Respondedores ao final do tratamento foram representados pelos valores correspondentes aos pacientes que constituíam cada grupo, quanto às variáveis mencionadas. O valor que representou cada paciente foi proveniente da média dos valores obtidos na análise dos clones das amostras destes pacientes (Quadros 2, 3, 4, 5 e 6). Um valor que representasse cada grupo de resposta, para cada variável analisada, foi obtido da média ou mediana que foi calculada a partir dos valores apresentados pelos pacientes que constituíam cada grupo (Quadro 7).

Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos com relação às variantes:

- Número de substituições na seqüência de nucleotídeos: NS5A ($p=0,542$), CRS ($p=0,363$), PKR-binding ($p=0,784$), ISDR ($p=0,476$), NLS ($p=0,144$) e V3 ($p=0,497$).
- Número de substituições na seqüência de aminoácidos : NS5A ($p=0,084$), CRS ($0,323$), PKR-binding ($p=0,885$), ISDR ($p=0,535$), NLS ($p=0,072$) e V3 ($p=0,368$).
- Ks: CRS ($0,129$) e NLS ($p=0,757$).
- Ka: NS5A ($p=0,139$), CRS ($0,308$), PKR-binding ($p=0,323$), ISDR ($p=0,885$), NLS ($p=0,091$) e V3 ($p=0,368$).
- distância genética: NS5A ($p=0,139$), CRS ($0,139$), PKR-binding ($p=0,139$), ISDR ($p=0,885$), NLS ($p=0,368$) e V3 ($p=0,368$).

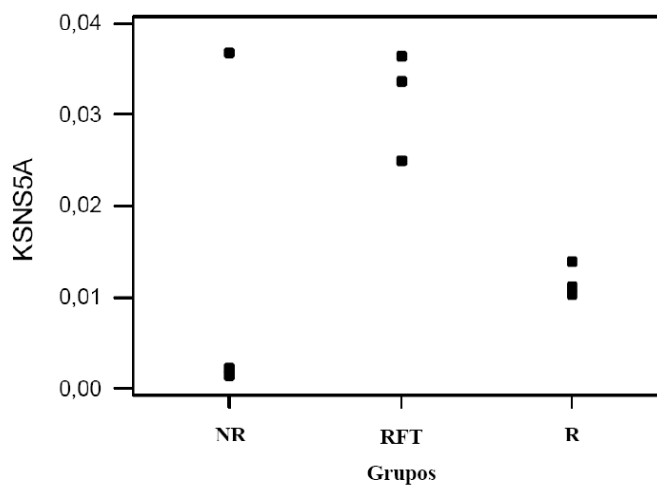
Diferença significativa entre os grupos Respondedores e Responder ao final do tratamento foi observada para KS da NS5A completa ($p=0,026$) (Gráfico 1), e para as regiões PKR-binding ($p=0,026$) (Gráfico 2) e ISDR ($p=0,026$) (Gráfico 3). Para região V3, os grupos que apresentaram diferença significativa foram Não-responder e Responder ao final do tratamento ($p=0,019$) (Gráfico 4). Estas análises foram realizadas pelo Teste Mood para Mediana. Os valores de mediana e diferença interquartilica obtidos para NS5A, PKR-binding, ISDR e V3 estão representados na Tabela 7.

Tabela 7. Mediana e diferença interquartílica da taxa de substituições sinônimas por sítios sinônimos, calculadas para NS5A completa e nas regiões *PKR-binding*, *ISDR* e *V3* para cada grupo.

Paciente	NS5A	Q3 – Q1	<i>PKR</i>	Q3 – Q1	<i>ISDR</i>	Q3 – Q1	<i>V3</i>	Q3 – Q1
R	0,0111	0,0035	0,0056	0,0042	0,0064	0,0033	0,0133	0,0169
NR	0,0022	0,0355	0,0020	0,0458	0,0034	0,0484	0,0065	0,0132
RFT	0,0293	0,0109	0,0266	0,0189	0,0141	0,0135	0,0263	0,0266

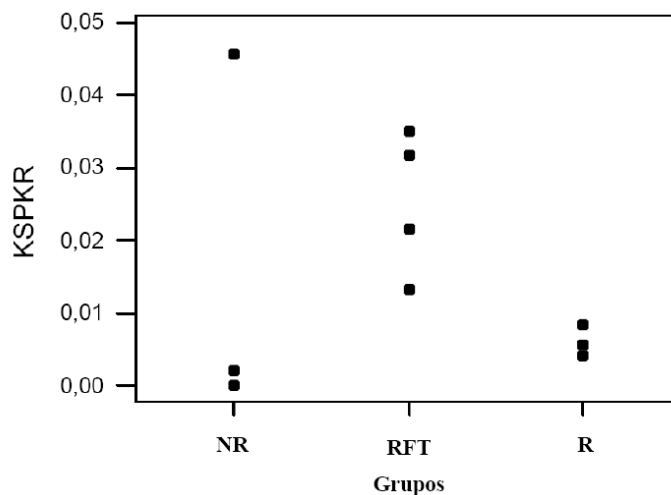
R: respondedor, NR: não-respondedor, RFT: respondedor ao final do tratamento, Q3-Q1: diferença interquartílica.

Gráfico 1. Mediana e diferença interquartílica, calculadas pelo Test Mood para Mediana, para Ks da NS5A. Diferença significativa observada entre os grupos: Respondedor e Respondedor ao final do tratamento ($p=0,026$).



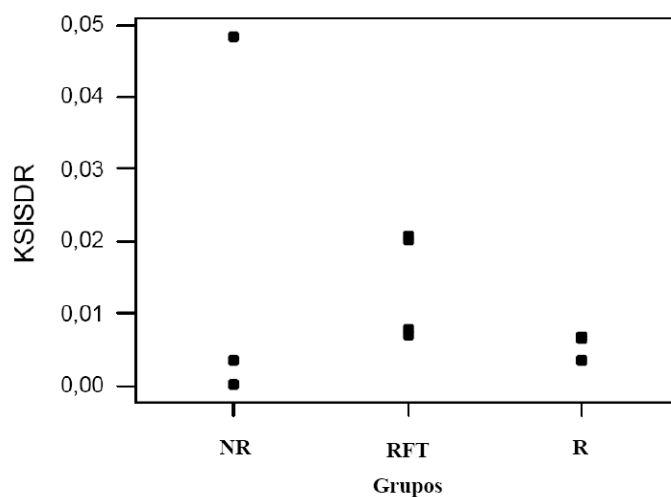
Ks: taxa de substituições sinônimas por sítios sinônimos, R: respondedor, NR: não-respondedor, RFT: respondedor ao final do tratamento.

Gráfico 2. Mediana e diferença interquartílica, calculadas pelo Test Mood para Mediana, para Ks da *PKR-binding*. Diferença significativa observada entre os grupos: Respondedor e Respondedor ao final do tratamento ($p=0,026$).



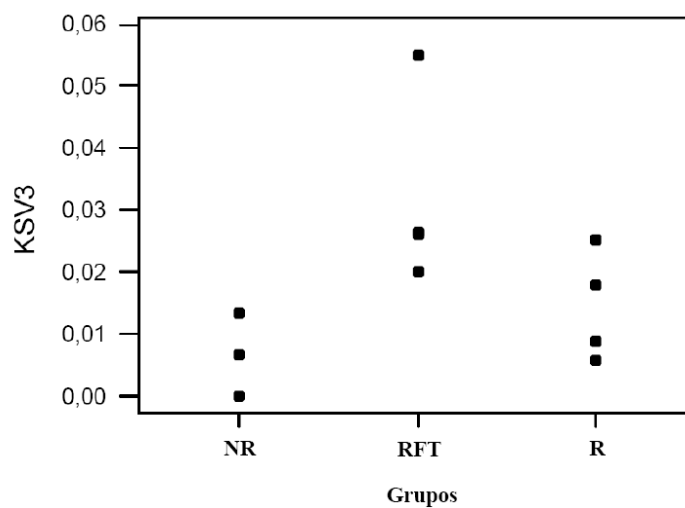
Ks: taxa de substituições sinônimas por sítios sinônimos, R: respondedor, NR: não-respondedor, RFT: respondedor ao final do tratamento.

Gráfico 3. Mediana e diferença interquartílica, calculadas pelo Test Mood para Mediana, para Ks da *ISDR*. Diferença significativa observada entre os grupos: Respondedor e Respondedor ao final do tratamento ($p=0,026$).



Ks: taxa de substituições sinônimas por sítios sinônimos, R: respondedor, NR: não-respondedor, RFT: respondedor ao final do tratamento.

Gráfico 4. Mediana e diferença interquartílica, calculadas pelo Test Mood para Mediana, para Ks da V3. Diferença significativa observada entre os grupos: Não-responder e Responder ao final do tratamento ($p=0,019$).



Ks: taxa de substituições sinônimas por sítios sinônimos, R: responder, NR: não-responder, RFT: responder ao final do tratamento.

Discussão

4. DISCUSSÃO

O vírus da hepatite C (HCV) tem sido identificado como uma das maiores causas de doença do fígado, sendo estimado que 170 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HCV no mundo. Uma proporção considerável dos indivíduos infectados desenvolve doença crônica, progressiva, que pode levar à cirrose hepática e ao carcinoma hepatocelular (Hadziyannis & Koskinas, 2004).

Atualmente, a terapia que demonstrou uma maior eficiência no combate à infecção por HCV é baseada na administração de Peginterferon e ribavirina. Porém, este tratamento apresenta alto custo, produz significantes efeitos colaterais e somente 50 – 60% das pessoas infectadas adquirem resposta virológica sustentada (Salmeron et al., 2006; Bonkovsky et al., 2007).

Vários fatores virais e do hospedeiro estão relacionados com a resposta virológica, como idade, peso corporal, sexo, raça, co-infecção com vírus da hepatite B ou HIV, duração da infecção, doença avançada do fígado, genótipo do HCV, carga viral e *quasispecies* (Moreno-Otero, 2005; Salmeron et al., 2006; Wohnsland, Hofmann & Sarrazin, 2007).

Os fatores do hospedeiro analisados neste estudo foram idade e sexo. A média de idade dos pacientes não respondedores ao tratamento (42,75) foi maior do que a média dos pacientes respondedores (38,75) e respondedores ao final do tratamento (36,75). Com relação ao sexo dos pacientes, o grupo não respondedor foi constituído apenas por indivíduos do sexo masculino, ao passo que os outros dois grupos apresentaram 75% de indivíduos do sexo masculino e 25% do sexo feminino. Estes resultados estão de acordo com a literatura, que

apresenta a idade maior do que 40 anos e sexo masculino como fator predito de baixa resposta ao tratamento (Mchutchison, 2004; Moreno-Otero, 2005; Wong & Lee, 2006). Entretanto, os valores analisados não apresentaram diferença significativa entre os grupos avaliados.

Considerando fatores virais, a taxa de resposta à terapia de Peginterferon e Ribavirina é influenciada principalmente pelo genótipo do HCV. Pacientes infectados com HCV do genótipo 1 apresentam menores taxas de resposta virológica sustentada. Embora os genótipos 1a e 1b sejam preditivos de uma baixa resposta ao tratamento, nenhuma diferença significativa nas taxas de resposta virológica entre os subtipos do HCV foi reportada (Wohnsland, Hofmann & Sarrazin, 2007).

A população selecionada para este estudo foi composta por pacientes infectados com os genótipos 1a e 1b. Nós observamos uma maior prevalência do subtipo b em pacientes não respondedores (75% 1b versus 25% 1a), e uma maior prevalência do subtipo a em pacientes respondedores e respondedores ao final do tratamento (25% 1b versus 75% 1a). Porém, na análise estatística o subtipo do HCV não apresentou diferença significativa com relação à resposta ao tratamento, concordando com as observações citadas por Wohnsland, Hofmann e Sarrazin, 2007.

Os níveis de heterogeneidade diferem consideravelmente entre as regiões do genoma viral do HCV, variando de 10% para a região 5'UTR a 50% encontrada em seqüências internas à região do Envelope. A 5'UTR é a região mais conservada através dos isolados de HCV, fornecendo um método rápido e

fácil para a determinação do genótipo, mas limitado para a diferenciação entre os vários subtipos, devido à relativa falta de heterogeneidade (Chen & Weck, 2002; Simmonds, 2004).

Durante a realização do projeto “Estudo epidemiológico das vias de transmissão do vírus da hepatite C, associado à genotipagem e evolução da carga viral durante e após tratamento”, as amostras que constituem este projeto foram genotipadas por meio do seqüenciamento e análise da região 5’UTR. Entretanto, devido às limitações da região 5’UTR na subtipagem do HCV, as amostras do genótipo 1 selecionadas para este estudo foram novamente analisadas, utilizando a região NS5A completa para a confirmação da genotipagem obtida no projeto prévio e a subtipagem do HCV infectante.

O mecanismo de resistência ao tratamento baseado com IFN demonstrou tipos de resposta variáveis em pacientes com mesmo genótipo e similar carga viral, sugerindo a importância da complexidade de *quasispecies* como fator viral relacionado à resposta virológica (Salmeron et al., 2006). As *quasispecies* são definidas como um conjunto de variantes distintas geneticamente, mas altamente relacionadas, que são geradas como resultado do acúmulo de mutações durante a replicação do HCV, devido à falta de atividade revisora na NS5B. Cada *quasispecies* fornece flexibilidade para uma rápida adaptação do HCV a ambientes adversos, como a resposta imune do hospedeiro ou o efeito de drogas antivirais (Ueda et al., 2004).

Diferenças na seqüência genômica do HCV podem gerar diferenças na estrutura e função das proteínas virais. Considerando que proteínas

virais podem inibir, mesmo que parcialmente, a ação de efetores antivirais induzidos pelo Interferon, as diferenças nas seqüências genômicas podem estar associadas com a diferença na sensibilidade ao IFN- α devido a presença simultânea de várias *quasispecies* (Pawlotsky, 2003).

Durante a última década, vários trabalhos publicados analisaram o possível envolvimento das proteínas do HCV, em particular da proteína não estrutural 5A, nos mecanismos de resistência à terapia baseada em Interferon. Embora a relevância da NS5A tenha apresentado dados conflitantes, estudos baseados em meta-análises publicados recentemente, confirmaram a correlação entre a seqüência da NS5A e a resposta ao Interferon (Pascu et al., 2004; Schinkel, Spaan & Kroes, 2004; Aus Dem Siepen et al., 2005).

Neste projeto, a complexidade das *quasispecies* foi analisada por meio da região genômica viral NS5A, com o objetivo de avaliar uma possível relação da variabilidade desta região com os diferentes tipos de resposta ao tratamento. Os grupos avaliados quanto à resposta foram: Respondedores (R), Não respondedores (NR) e Respondedores ao final do tratamento (RFT). Embora a maioria dos trabalhos que visam elucidar as relações entre *quasispecies* e resposta ao tratamento considera dois grupos de resposta, está estabelecido que os pacientes respondedores ao final do tratamento constituem um outro grupo de resposta ao tratamento. Desta forma, estes pacientes devem ser analisados separadamente, não devendo ser agrupados ao grupo dos pacientes R ou NR. A escolha da região NS5A para as análises foi devido ao grande número de trabalhos publicados, sugerindo várias relações desta proteína em interferir com

funções celulares e com mecanismos envolvidos no bloqueio da atividade antiviral pelo hospedeiro e pelas terapias atualmente utilizadas.

A NS5A foi relacionada, pela primeira vez, à resposta ao IFN em estudos de epidemiologia molecular (Enomoto et al., 1995; Enomoto et al., 1996), que identificaram uma região denominada Região determinante de sensibilidade ao IFN (*ISDR*), conservada em isolados de HCV obtidos de pacientes IFN-resistentes. Desde então, alguns estudos sugeriram que variantes de HCV que apresentaram mutações dentro desta região eram mais sensíveis à terapia baseada em IFN (Macdonald & Harris, 2004; Yoshioka et al., 2005). O papel biológico da *ISDR* não é claro. Entretanto, consistente com a idéia de que a NS5A inibe a PKR celular em um mecanismo dependente da *ISDR*, a introdução de mutações específicas na *ISDR* ou na região *PKR-binding* pode interferir na habilidade da NS5A se ligar e inibir a função da PKR (Tan & Katze, 2001; Feld & Hoofnagle, 2005; Yoshioka et al., 2005).

Estudos tem relacionado a presença substituições de aminoácidos na NS5A completa e nas regiões *ISDR*, *PKR-binding* e *V3* com a resposta à terapia baseada em IFN (Nousbaum et al., 2000; Sarrazin et al., 2002; Puig-Basagoiti et al., 2005; Kmiecik et al., 2006).

Em nossas análises, um maior número de substituições de nucleotídeos e aminoácidos nestas regiões foi observado em pacientes que apresentaram resposta virológica sustentada. Contrariamente, a média da distância genética e a taxa de substituições não sinônimas por sítios não sinônimos (K_a) foram menores em pacientes respondedores quando comparados com pacientes

não respondedores e respondedores ao final do tratamento. A média da distância genética foi utilizada para avaliar o grau de diversidade entre as *quasispecies* de cada amostra, indicando um menor grau de diversidade genética para os pacientes com resposta virológica sustentada.

Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos por Puig-Basagoiti e colaboradores, em um estudo de diversidade e complexidade de *quasispecies* para as regiões *ISDR*, *PKR-binding* e *V3* em amostras de pacientes com RVS, pacientes NR e pacientes não tratados (NT). Os resultados concordantes são referentes aos grupos RVS e NR (Puig-Basagoiti et al., 2005).

Considerando o número de mutações de aminoácidos, nossos resultados também estão de acordo com outros estudos que avaliaram a diversidade de *quasispecies* para estas regiões da NS5A. Entretanto, estes estudos também classificaram como respondedores, os pacientes RFT. Desta forma, os pacientes que apresentaram RVS e os pacientes RFT não foram analisados separadamente. (Nousbaum et al., 2000; Sarrazin et al., 2002; Kmiecik et al., 2006). Nosbaum e colaboradores observaram em seus estudos que o valor de K_a para as regiões *ISDR* e *PKR-binding* foi nulo para o grupo de pacientes respondedores (Nousbaum et al., 2000). Nós encontramos resultados similares, uma vez que o valor de K_a para *ISDR* e *PKR-binding* em nosso estudo foi nulo para os pacientes que obtiveram RVS.

Apesar dos resultados obtidos estarem de acordo com outros trabalhos publicados, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos RVS, NR e RFT para o número de substituições de nucleotídeos, número

de substituições de aminoácidos, K_a e média da distância genética para as regiões NS5A completa, *PKR-binding*, *ISDR* e *V3*.

Com relação ao K_s , o maior valor foi obtido para o grupo dos pacientes RFT, seguido dos pacientes com RVS e o menor valor para os pacientes NR. A análise estatística demonstrou diferença significativa para o K_s das regiões NS5A, *PKR-binding* e *ISDR* entre grupos RFT e RVS. Para região *V3* a diferença significativa foi observada entre os grupos RFT e NR. Porém, estes resultados não concordam com os estudos citados anteriormente.

Nós também analisamos a relação entre K_s e K_a para cada grupo de resposta, na tentativa de observar qual taxa de substituições era mais alta para RVS, NR e RFT. Como resultado, nós observamos que o valor de K_s foram maiores para os grupos RVS e RFT, enquanto o valor de K_a foi maior para o grupo NR, para as regiões NS5A, *PKR-binding* e *ISDR*. Estes dados podem ser comparados, em parte, com os resultados obtidos no trabalho de Nousbaum e colaboradores, onde foi observado que a razão K_s/K_a foi maior para os pacientes respondedores (Nousbaum et al., 2000). Entretanto, a relação entre K_s e K_a dos grupos avaliados em nosso estudo não apresentou diferença significativa.

Uma relação pode ser estabelecida em nosso estudo para os dados obtidos para K_a e média da distância genética. O maior valor de K_a apresentado por pacientes NR pode significar uma maior taxa de alterações de aminoácido nos sítios mutados. Isto implicaria em uma maior variabilidade genética, observada nos valores obtidos na média da distância genética em NR, e conseqüente uma maior diversidade de *quasispecies*. Como citado anteriormente,

esta diversidade pode gerar flexibilidade do HCV para uma rápida adaptação ao ambiente, produzido pelo efeito da terapia com IFN, favorecendo a não resposta ao tratamento.

Pouco é conhecido sobre mutações em outras regiões da NS5A, já que a maioria dos trabalhos que visam encontrar uma possível relação entre mutações na NS5A com a resposta ao tratamento, foi focada nas regiões *PKR-binding*, *ISDR* e *V3*. Outros trabalhos avaliaram mutações em códons específicos na NS5A. Em contraste, publicações que analisaram mutações nas regiões *CRS* e *NLS* são quase inexistentes. Neste estudo, nós também avaliamos o perfil de mutações nestas regiões e tentamos correlacionar a presença de mutações nas diferentes classes de resposta com as supostas funções das *CRS* e *NLS* na proteína NS5A. Entretanto, os dados obtidos não apresentaram diferença significativa na análise estatística.

Considerando o número de mutações de nucleotídeos e aminoácidos, a *NLS* concordou com as demais regiões, apresentando um maior valor para os pacientes com RVS. De forma contrária, o valor observado para a região *CRS* foi maior para o grupo de pacientes NR. Estes resultados podem ser condizentes com a suposição que a deleção da região *CRS* pode resultar na localização nuclear da forma p58 da NS5A, mediada pelo processamento proteolítico da proteína NS5A e ativação da *NLS* (Reyes, 2002).

Uma vez que estas duas regiões podem ter funções antagônicas, parece viável que apresentem um perfil de mutações diferenciado quando comparado à resposta. O maior número de mutações na *CRS* foi observado em

pacientes NR, de forma que a NS5A p58 pode estar sendo transportada para núcleo e atuar como ativador transcricional, interferindo em vias celulares que atuam nos efeitos antivirais, favorecendo a persistência da infecção. Entretanto, a *CRS* parece ter uma atividade de retenção citoplasmática importante para processo de replicação, que pode ser influenciada por substituições nos aminoácidos desta região (Macdonald & Harris, 2004; Penin et al., 2004).

Apesar dos supostos efeitos antagônicos entre as regiões *CRS* e *NLS*, alguns estudos sugerem que as duas formas da proteína NS5A têm diferentes papéis no ciclo de vida do HCV (Macdonald & Harris, 2004). Desta forma, ambas as regiões devem ser funcionais para a persistência da infecção pelo HCV. Esta observação pode ser explicada pela compartimentarização celular das *quasispecies*, demonstrada por Pellerin e colaboradores em seus estudos. Este mecanismo de compartimentarização é sustentado pela observação que cada célula apresenta proteínas com propriedades biológicas únicas devido à composição específica de *quasispecies* em cada célula infectada (Pellerin et al., 2004).

Quando avaliamos todas as *quasispecies* da NS5A completa, nenhum sítio específico de substituição foi relacionado a um tipo particular de resposta ao tratamento, e uma maior quantidade de mutações foi observada na região *downstream* à *ISDR*, principalmente na região *V3*. Além disso, a análise da árvore filogenética não apresentou evidência de agrupamento das *quasispecies* de acordo com a resposta ao tratamento. As *quasispecies* referentes a cada paciente apresentaram-se como um grupo monofilético e se agruparam corretamente com o

genótipo correspondente, 1a ou 1b. Desta forma, a possibilidade de contaminação entre as amostras foi excluída.

Estes resultados concordam com vários estudos que analisaram substituições na NS5A e resposta ao tratamento (Nousbaum et al., 2000; Sarrazin et al., 2002; Pellerin et al., 2004; Hofmann, Zeuzem & Sarrazin, 2005; Puig-Basagoiti et al., 2005; Kmiecik et al., 2006). O perfil de mutações encontrado ao longo da seqüência de aminoácidos da NS5A foi condizente com as características desta proteína, sendo relativamente conservada, tolerando a mudança de aminoácidos em algumas posições (Pawlotsky, 2003).

Recentemente, Kohashi e colaboradores avaliaram o potencial das mutações na *ISDR* em modular a replicação viral em HCV. Neste estudo, foi observado que múltiplas mutações na *ISDR* aumentaram a capacidade de replicação do HCV *in vitro*. Em contraste, a deleção da região *ISDR* aboliu completamente a capacidade de replicação viral (Kohashi et al., 2006).

Estas observações refletem a inviabilidade dos três clones obtidos no nosso estudo, que apresentaram uma deleção substancial da NS5A, incluindo a região *ISDR*. Outros fatores que justificam esta inviabilidade são representados pelas diversas funções que têm sido atribuídas à NS5A, como a interação com moléculas envolvidas na sinalização celular, ativação da maquinaria da transcrição, bloqueio da apoptose celular e atenuação da resposta ao IFN- α .

Uma explicação plausível para o aparecimento destas seqüências truncadas pode ser baseada no fato da análise das *quasispecies* ser realizada por

meio da obtenção do genoma viral das amostras dos pacientes infectados. Isto implica que as seqüências analisadas são resultantes do conjunto de genomas virais que estão emergindo do processo de replicação viral nas células, e a capacidade de infectar novas células não é garantida.

Esta hipótese também pode ser aplicada aos *stop codons* encontradas na região *CRS* de duas seqüências deste estudo. Outros trabalhos reportaram o aparecimento de *stop codons* nas seqüências analisadas (Nousbaum et al., 2000; Fan et al., 2005).

Considerando que este projeto visou avaliar as mutações nas *quasispecies* da NS5A e uma possível relação com a resposta ao tratamento, um número considerável de clones foi selecionado e seqüenciado, gerando um banco com 165 seqüências da NS5A completa. Entretanto, para a análise estatística, os grupos foram avaliados considerando os pacientes constituintes de cada grupo, do qual foram atribuídos valores que representassem todas as *quasispecies* para cada variável analisada. Consequentemente, cada grupo apresentou um pequeno número de pacientes, o que influenciou na obtenção de dados significantes.

Por outro lado, este estudo produziu uma fonte de informações relevantes, já que poucos estudos analisam a variabilidade de *quasispecies* na região NS5A completa, e em regiões internas da NS5A, além das convencionalmente estudadas *ISDR*, *PKR-binding* e *V3*. Estes resultados poderão ser utilizados em futuras análises para avaliar não apenas o número de mutações e sítios específicos de mutações relacionados à resposta a terapia, mas também avaliar qualitativamente a influência de cada mutação na estrutura e função da

proteína. Nós analisamos as substituições a nível genômico e na proteína, e se as substituições alteraram ou não os aminoácidos, mas não avaliamos se estas mutações conservaram ou não as propriedades químicas dos aminoácidos.

Embora sejam feitas muitas proposições, o papel da NS5A na patogênese viral é desconhecido. Estudos focados na determinação da estrutura desta proteína e nas interações realizadas pela NS5A com outras proteínas virais e com estruturas celulares são necessários. Uma vez que função da NS5A e das regiões desta proteína for evidente, a influência das mutações será mais bem compreendida e de fundamental importância na análise da variabilidade viral e relação com a resposta ao tratamento. Além disso, este conhecimento possibilitará a formulação de estratégias na introdução de novas terapias para o tratamento da hepatite C e, e conseqüente combate a este agente etiológico.

É importante salientar neste projeto, que priorizamos elucidar um fator viral que pode contribuir para a resposta virológica sustentada. Entretanto, a resposta ao tratamento baseado em Interferon tem uma influência multifatorial, que compreende outras características virais e várias características do hospedeiro, que devem ser consideradas em estudos futuros.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

- O número de substituições na seqüência de nucleotídeos e aminoácidos na NS5A completa e nas regiões específicas como a *CRS*, *PKR-binding*, *ISDR*, *NLS* e *V3* não são suficientes para prever sensibilidade ou resistência ao tratamento baseado em Interferon e ribavirina;
- Nenhum sítio específico de substituição foi relacionado a um tipo particular de resposta ao tratamento;
- Um maior número de mutações foi observado na região *downstream* à *ISDR*, principalmente na região *V3*, sugerindo que este seja o local de acúmulo de mutações na NS5A.
- Pacientes dos diferentes grupos de resposta ao tratamento não apresentaram divergência no grau de variabilidade genética, considerando a composição das *quasiespecies* avaliadas para estes pacientes;
- *Quasiespecies* não apresentaram um padrão de similaridade para os diferentes grupos de resposta ao tratamento;
- Pacientes RFT apresentaram maior taxa de substituições sinônimas por sítios sinônimos na NS5A completa, *PKR-binding* e *ISDR* em relação a

pacientes que apresentaram RVS, e na região V3 em relação aos pacientes NR;

- ☀ Pacientes RFT devem ser analisados separadamente, não sendo incluídos nos grupos de pacientes com RVS ou NR.

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMAN, Z. et al. Hepatitis C virus in various human body fluids: a systematic review. Hepatology Research, v. 11, p. 26-40, 1998.

ALTER, M. J. Prevention of spread of hepatitis C. Hepatology, v. 36, n. 5 suppl 1, p. S93-S98, 2002.

AUS DEM SIEPEN, M. et al. Nonstructural protein 5A does not contribute to the resistance of hepatitis C virus replication to interferon alpha in cell culture. Virology, v. 336, n. 2, p. 131-136, 2005.

BARTOSCH, B.; DUBUISSON, J.; COSSET, F. L. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. The Journal of Experimental Medicine, v. 197, n. 5, p. 633-642, 2003.

BONKOVSKY, H. L. et al. Health-related quality of life in patients with chronic hepatitis C and advanced fibrosis. Journal of Hepatology, v. 46, n. 3, p. 420-431, 2007.

BOWEN, D. G.; WALKER, C. M. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. Nature, v. 436, n. 7053, p. 946-952, 2005.

BROWN, R. S. Hepatitis C and liver transplantation. Nature, v. 436, n. 7053, p. 973-978, 2005.

CAMPIOTTO, S. et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 38, n. 1, p. 41-49, 2005.

CARRILHO, F. J.; CORRÊA, M. C. J. M. Magnitude of hepatitis B and C in Latin America. International Medical Press. Atlanta, GA, USA., 1998.

CHAYAMA, K. et al. Pretreatment virus load and multiple amino acid substitutions in the interferon sensitivity-determining region predict the outcome

of interferon treatment in patients with chronic genotype 1b hepatitis C virus infection. Hepatology, v. 25, n. 3, p. 745-749, 1997.

CHEN, Z.; WECK, K. E. Hepatitis C virus genotyping: interrogation of the 5' untranslated region cannot accurately distinguish genotypes 1a and 1b. Journal of Clinical Microbiology, v. 40, n. 9, p. 3127-3134, 2002.

CHISARI, F. V. Unscrambling hepatitis C virus-host interactions. Nature, v. 436, n. 7053, p. 930-932, 2005.

CHOO, Q. L. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science, v. 244, n. 4902, p. 359-362, 1989.

CHOO, Q. L. et al. Hepatitis C virus: the major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. British Medical Bulletin, v. 46, n. 2, p. 423-441, 1990.

DE FRANCESCO, R.; MIGLIACCIO, G. Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. Nature, v. 436, n. 7053, p. 953-960, 2005.

DE FRANCESCO, R. et al. Approaching a new era for hepatitis C virus therapy: inhibitors of the NS3-4A serine protease and the NS5B RNA-dependent RNA polymerase. Antiviral Research, v. 58, n. 1, p. 1-16, 2003.

DIMITROVA, M. et al. Protein-protein interactions between hepatitis C virus nonstructural proteins. Journal of Virology, v. 77, n. 9, p. 5401-5414, 2003.

DOMINGO, E. et al. Viruses as quasispecies: biological implications. Current topics in Microbiology and Immunology, v. 299, p. 51-82, 2006.

EGGER, D. et al. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. Journal of Virology, v. 76, n. 12, p. 5974-5984, 2002.

ENOMOTO, N. et al. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino

acid substitutions in the NS5A region. The Journal of Clinical Investigation, v. 96, n. 1, p. 224-230, 1995.

ENOMOTO, N. et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. The New England Journal of Medicine, v. 334, n. 2, p. 77-81, 1996.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. Genome Research, v. 8, n. 3, p. 186-194, 1998.

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

FAN, W. et al. Nonstructural 5A gene variability of hepatitis C virus (HCV) during a 10-year follow up. Journal of Gastroenterology, v. 40, n. 1, p. 43-51, 2005.

FELD, J. J.; HOOFNAGLE, J. H. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. Nature, v. 436, n. 7053, p. 967-972, 2005.

FELSENSTEIN, J. Confidence Limits on Phylogenies: an Approach Using the Bootstrap. Evolution, v. 39, n., p. 783-791, 1985.

FRANCKI, R. I. B. et al. Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Archives of Virology, 1991. 320 p.

GALE JUNIOR, M.; FOY, E. M. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. Nature, v. 436, n. 7053, p. 939-945, 2005.

GALE JUNIOR, M. et al. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. Virology, v. 230, n. 2, p. 217-227, 1997.

GIANNINI, C.; BRECHOT, C. Hepatitis C virus biology. Cell Death and Differentiation, v. 10 Suppl 1, p. S27-38, 2003.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. Genome Research, v. 8, n. 3, p. 195-202, 1998.

HADZIYANNIS, S. J.; KOSKINAS, J. S. Differences in epidemiology, liver disease and treatment response among HCV genotypes. Hepatology Research, v. 29, n. 3, p. 129-135, 2004.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAYASHI, N.; TAKEHARA, T. Antiviral therapy for chronic hepatitis C: past, present, and future. Journal of Gastroenterology, v. 41, n. 1, p. 17-27, 2006.

HOFMANN, W. P.; ZEUZEM, S.; SARRAZIN, C. Hepatitis C virus-related resistance mechanisms to interferon alpha-based antiviral therapy. Journal of Clinical Virology, v. 32, n.2, p. 86-91, 2005.

JAMES, A. Ilustração do vírus da Hepatite C. Disponível em: <<http://www.rit.edu/~japfaa/hcv.jpg>>. Acesso em: outubro, 2001

KAITO, M. et al. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. The Journal of general virology, v. 75 (Pt 7), p. 1755-1760, 1994.

KATO, N. Molecular virology of hepatitis C virus. Acta Medica Okayama, v. 55, n. 3, p. 133-159, 2001.

KEW, M. et al. Prevention of hepatitis C virus infection. Journal of Viral Hepatitis, v. 11, n. 3, p. 198-205, 2004.

KMIECIAK, D. et al. Mutations within protein kinase R-binding domain of NS5A protein of hepatitis C virus (HCV) and specificity of HCV antibodies in pretreatment sera of HCV-chronically infected patients and their effect on the result of treatment. Japanese Journal of Infectious Diseases, v. 59, n. 2, p. 92-99, 2006.

KOHASHI, T. et al. Site-specific mutation of the interferon sensitivity-determining region (ISDR) modulates hepatitis C virus replication. Journal of Viral Hepatitis, v. 13, n. 9, p. 582-590, 2006.

KOMATSU, H. et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon therapy in young patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. Journal of Medical Virology, v. 53, n. 4, p. 361-365, 1997.

KUMAR, S.; TUMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics, v. 5, n., p. 150-163, 2004.

KUROSAKI, M. et al. Analysis of genotypes and amino acid residues 2209 to 2248 of the NS5A region of hepatitis C virus in relation to the response to interferon-beta therapy. Hepatology, v. 25, n. 3, p. 750-753, 1997.

LEVRERO, M. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. Oncogene, v. 25, n. 27, p. 3834-3847, 2006.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. Nature, v. 436, n. 7053, p. 933-938, 2005.

LINDSAY, K. L. Therapy of hepatitis C: overview. Hepatology, v. 26, n. 3 Suppl 1, p. 71S-77S, 1997.

LYRA, A. C.; FAN, X.; DI BISCEGLIE, A. M. Molecular biology and clinical implication of hepatitis C virus. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 37, n. 5, p. 691-695, 2004.

MACDONALD, A.; HARRIS, M. Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. The Journal of General Virology, v. 85, n. Pt 9, p. 2485-2502, 2004.

MARTELL, M. et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. Journal of Virology, v. 66, n. 5, p. 3225-3229, 1992.

MARTINS, R. M. et al. Distribution of hepatitis C virus genotypes among blood donors from mid-west region of Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 48, n. 1, p. 53-55, 2006.

MCCORMACK, G. P.; CLEWLEY, J. P. The application of molecular phylogenetics to the analysis of viral genome diversity and evolution. Reviews in Medical Virology, v. 12, n. 4, p. 221-238, 2002.

MCHUTCHISON, J. G. Understanding hepatitis C. The American Journal of Managed Care, v. 10, n. 2 Suppl, p. S21-29, 2004.

MORENO-OTERO, R. Therapeutic modalities in hepatitis C: challenges and development. Journal of Viral Hepatitis, v. 12, n. 1, p. 10-19, 2005.

MOTTOLA, G. et al. Hepatitis C virus nonstructural proteins are localized in a modified endoplasmic reticulum of cells expressing viral subgenomic replicons. Virology, v. 293, n. 1, p. 31-43, 2002.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. Consensus Development Conference Statement on Management of hepatitis C. NIH Consensus and State-of-the-Science Statements. 24-26 Mar, 1997. 1-41 p.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. Consensus Development Conference Statement on Management of hepatitis C. NIH Consensus and State-of-the-Science Statements. 10-12 Jun, 2002. 3-20 p.

NOUSBAUM, J. et al. Prospective characterization of full-length hepatitis C virus NS5A quasispecies during induction and combination antiviral therapy. Journal of Virology, v. 74, n. 19, p. 9028-9038, 2000.

PASCU, M. et al. Sustained virological response in hepatitis C virus type 1b infected patients is predicted by the number of mutations within the NS5A-ISDR: a meta-analysis focused on geographical differences. Gut, v. 53, n. 9, p. 1345-1351, 2004.

PAWLOTSKY, J. M. Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. Clinics in Liver Disease, v. 7, n. 1, p. 45-66, 2003.

PAWLOTSKY, J. M. Therapy of hepatitis C: from empiricism to eradication. Hepatology, v. 43, n. 2 Suppl 1, p. S207-220, 2006.

PAWLOTSKY, J. M.; GERMANIDIS, G. The non-structural 5A protein of hepatitis C virus. Journal of Viral Hepatitis, v. 6, n. 5, p. 343-356, 1999.

PAWLOTSKY, J. M. et al. Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. Journal of Virology, v. 72, n. 4, p. 2795-2805, 1998.

PELLERIN, M. et al. Hepatitis C virus quasispecies variability modulates nonstructural protein 5A transcriptional activation, pointing to cellular compartmentalization of virus-host interactions. Journal of Virology, v. 78, n. 9, p. 4617-4627, 2004.

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

PERZ, J. F. et al. Estimated global prevalence of hepatitis C virus infection. 42nd Annual Meeting of the Infection Diseases Society of America. Boston, MA, USA. 30 Set - 3 Out, 2004. p.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics, v. 14, n. 9, p. 817-818, 1998.

PUIG-BASAGOITI, F. et al. Dynamics of hepatitis C virus NS5A quasispecies during interferon and ribavirin therapy in responder and non-responder patients with genotype 1b chronic hepatitis C. The Journal of General Virology, v. 86, n. Pt 4, p. 1067-1075, 2005.

REYES, G. R. The nonstructural NS5A protein of hepatitis C virus: an expanding, multifunctional role in enhancing hepatitis C virus pathogenesis. Journal of Biomedical Science, v. 9, n. 3, p. 187-197, 2002.

ROSENBERG, S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. Journal of Molecular Biology, v. 313, n. 3, p. 451-464, 2001.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SAKAI, A. et al. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 100, n. 20, p. 11646-11651, 2003.

SALMERON, J. et al. Quasispecies as predictive response factors for antiviral treatment in patients with chronic hepatitis C. Digestive Diseases and Sciences, v. 51, n. 5, p. 960-967, 2006.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SARRAZIN, C. et al. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein and interferon resistance: a new model for testing the reliability of mutational analyses. Journal of Virology, v. 76, n. 21, p. 11079-11090, 2002.

SCHINKEL, J.; SPAAN, W. J.; KROES, A. C. Meta-analysis of mutations in the NS5A gene and hepatitis C virus resistance to interferon therapy: uniting discordant conclusions. Antiviral Therapy, v. 9, n. 2, p. 275-286, 2004.

SHEPARD, C. W.; FINELLI, L.; ALTER, M. J. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. The Lancet Infectious Diseases, v. 5, n. 9, p. 558-567, 2005.

SIMMONDS, P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. The Journal of General Virology, v. 85, n. Pt 11, p. 3173-3188, 2004.

SIMMONDS, P. et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. Hepatology, v. 19, n. 5, p. 1321-1324, 1994.

SWOFFORD, D. L. PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Sunderland, Massachusetts, 2002

TAN, S. L.; KATZE, M. G. How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. Virology, v. 284, n. 1, p. 1-12, 2001.

TAYLOR, D. R. et al. Hepatitis C virus envelope protein E2 does not inhibit PKR by simple competition with autophosphorylation sites in the RNA-binding domain. Journal of Virology, v. 75, n. 3, p. 1265-1273, 2001.

THOMPSON, J. D. et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.

UEDA, E. et al. Changes of HCV quasispecies during combination therapy with interferon and ribavirin. Hepatology Research, v. 29, n. 2, p. 89-96, 2004.

WITHERELL, G. W.; BEINEKE, P. Statistical analysis of combined substitutions in nonstructural 5A region of hepatitis C virus and interferon response. Journal of Medical Virology, v. 63, n. 1, p. 8-16, 2001.

WOHNSLAND, A.; HOFMANN, W. P.; SARRAZIN, C. Viral determinants of resistance to treatment in patients with hepatitis C. Clinical Microbiology Reviews, v. 20, n. 1, p. 23-38, 2007.

WONG, T.; LEE, S. S. Hepatitis C: a review for primary care physicians. Canadian Medical Association Journal, v. 174, n. 5, p. 649-659, 2006.

YOSHIOKA, K. et al. Interferon sensitivity-determining region of nonstructural region 5A of hepatitis C virus genotype 1b correlates with serum alanine aminotransferase levels in chronic infection. Journal of Viral Hepatitis, v. 12, n. 2, p. 139-145, 2005.

ZHARKIKH, A.; LI, W. H. Estimation of confidence in phylogeny: the complete-and-partial bootstrap technique. Molecular Phylogenetics and Evolution, v. 4, n. 1, p. 44-63, 1995.

ZHOU, D. et al. Separation of near full-length hepatitis C virus quasispecies variants from a complex population. Journal of Virological Methods, 2007. In Press.

Anexos



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
AUTARQUIA ESTADUAL - LEI Nº 8899 ,de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal nº 74.179, de 14/06/74)


Parecer n.º 087/2004

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo n.º 2025/2004 sob a responsabilidade de Roberta Maria Fachini com o título "Estudo epidemiológico das principais vias de transmissão do vírus da hepatite C, em uma população fechada e descrição da evolução da carga viral com o tratamento segundo a genotipagem" está de acordo com a Resolução CNS 196/96 e foi aprovado por esse CEP.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.

São José do Rio Preto, 10 de maio de 2004.


Prof.ª Dr.ª Patrícia Maluf Cury
Coordenadora do CEP/FAMERP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

Nome: _____

Prontuário: _____ R.G: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Sexo: M F

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

CEP: _____ - _____ Telefone de contato: (____) _____

II – DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

Título : Estudo Epidemiológico das Principais Vias de Transmissão do Vírus da Hepatite C, em uma População Fechada, e Descrição da Evolução da Carga Viral com o Tratamento, Segundo a Genotipagem ao Diagnóstico

Pesquisadores Responsáveis:

Dra. Roberta Maria Fachini
Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto - SP

Dra. Dirce Maria Trevisan Zanetta
Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto - SP

Aprovação do estudo pela Comissão de Ética em Pesquisa em 12 de abril de 2004.

III - Explicações ao Paciente:

Durante a leitura deste termo de consentimento, o sr(a) poderá interromper o investigador (a pessoa que está lendo) para esclarecer eventuais dúvidas.

A Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto está desenvolvendo este projeto, cujos objetivos principais são:

1. Identificar vias de transmissão do vírus da hepatite C e descrever a distribuição dos “sub-tipos” ou “sub-classes” deste vírus na nossa população de pacientes (genótipos HCV).
2. Para os pacientes com diagnóstico de Hepatite C, descrever a evolução da carga viral (quantidade de vírus no sangue do paciente) após início da medicação, com seguimento por até 24 semanas após o término do tratamento, relacionando esta evolução com o “sub-tipo” do vírus da hepatite C (genótipo) identificado ao diagnóstico.

Este projeto será conduzido sob a responsabilidade da Dra. Roberta Maria Fachini e da Dra. Dirce Maria Trevisan Zanetta.

Sua participação no estudo:

Como paciente, sua participação constará de uma entrevista abordando questões sobre as prováveis vias de transmissão do vírus da hepatite C, no levantamento de alguns dados de seu prontuário referentes a exames laboratoriais e a medicações utilizadas no seu tratamento e, caso o(a) Sr(a) ainda não tenha iniciado o tratamento, na coleta de amostra de sangue para a determinação do seu “sub-tipo” (genótipo) do vírus da hepatite C e sua carga viral. Além desta primeira amostra, coletada antes do início do tratamento, novas amostras de sangue para a determinação da carga viral serão coletadas após 12, 24 e 48 semanas. Dentro do objetivo do estudo, o intervalo de seguimento será de até 24 semanas após o término do seu tratamento, com uma ou mais coletas podendo ser solicitadas a você neste período, mas a autorização a essa(s) coleta(s) atual não o obriga a aceitar a(s) coleta(s) posterior(es).

A coleta será feita com agulhas descartáveis e por profissional capacitado, de modo a minimizar os riscos inerentes a este procedimento, tais como: dor pela punção, hematoma e flebite (inflamação no local onde foi feita a picada para a coleta de sangue). A soroteca (material coletado dos pacientes e que será estocado) será utilizada apenas para as finalidades acima descritas. Para qualquer outro uso será apresentado novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O estudo não implica em riscos do ponto de vista clínico, e sua participação é voluntária, podendo seu consentimento ser retirado a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo ao seu atendimento ou à continuação de seu tratamento.

Resultados e sigilo dos dados:

O estudo garante a confidencialidade dos dados obtidos. Em nenhum momento serão tornados públicos dados relacionados à sua identidade. Estes dados serão

sempre abordados em grupo para a descrição dos resultados da pesquisa, a nível de publicações e apresentações científicas.

IV – Consentimento Pós Esclarecido

Declaro que, após a leitura do texto acima e após ter sido convenientemente esclarecido, consinto em participar, na qualidade de paciente, deste projeto de pesquisa.

Local e data: _____, ____/____/_____.

Assinatura do paciente: _____

Pesquisador que obteve o consentimento:

(nome) _____

(assinatura) _____

Qualquer dúvida favor entrar em contato com Dra. Roberta Maria Fachini, no telefone (017) 210-5076, ou com algum membro da Comissão de Ética em Pesquisa (CEP), no telefone (017) 227-5733.