

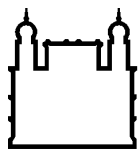
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Parasitária

**MUTAÇÕES NOS GENES NÃO ESTRUTURAIS DO VÍRUS DA HEPATITE
C ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA AOS NOVOS ANTIVIRAIS**

ALLAN PERES DA SILVA

Rio de Janeiro
2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz

ALLAN PERES DA SILVA

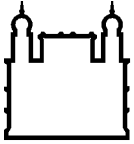
MUTAÇÕES NOS GENES NÃO ESTRUTURAIS DO VÍRUS DA HEPATITE C ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA AOS NOVOS ANTIVIRAIS

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Parasitária.

Orientadora: Dr^a. Elisabeth Lampe

Rio de Janeiro

2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ALLAN PERES DA SILVA

MUTAÇÕES NOS GENES NÃO ESTRUTURAIS DO VÍRUS DA HEPATITE
C ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA AOS NOVOS ANTIVIRAIS

ORIENTADOR: Prof. Dr. Elisabeth Lampe

Aprovada em: 29/09/2014

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Regina Maria Bringel Martins - Presidente

Prof. Dra. Luciane Almeida Amado Leon

Prof. Dra. Vanessa de Paula

Prof. Dr. Marcelo Alves Pinto

Prof. Dr. Fernando Couto Motta

Rio de Janeiro, 29 de Setembro de 2014

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Carmen Lucia Peres, e aos meus irmãos Thiago Peres da Silva e Pérola Cris de Oliveira. Obrigado por tudo que tenho, pelo amor, dedicação e pela confiança depositada em mim. Amo vocês;

Às minhas tias Mara e Vera Lucia e ao meus primos Bruno e Priscilla Peres. Pelo amor e carinho;

À minha orientadora, Dra. Elisabeth Lampe, pelos ensinamentos, dedicação, compreensão e apoio. Obrigado por permitir que esse trabalho fosse realizado;

Ao Dr. Adilson José de Almeida, um amigo que empreendeu esforços para que esse trabalho fosse concluído;

À Dra. Clara Yoshida, uma pessoa querida. Obrigado pela atenção e por abrir as portas do Laboratório de Hepatites Virais;

À Dra. Jaqueline Mendes de Oliveira, por me iniciar na atividade científica;

À Lucy Dalva, Ilton Carlos, Letícia Scalioni, Lúcia Pires, Maristella Matos, Moyra Portilho, Nailma Rosário, Nathália Motta, Vanessa Alves, Dr^a Márcia Paschoal, Dr^a Livia Villar e Dr^a Márcia Leite, pela amizade mais do que especial. Obrigado pelo carinho;

Obrigado especial a pós-graduação em Biologia Parasitária do IOC;

A todos os meus amigos, em especial ao Fabiano Luiz, e aos novos amigos conquistados durante a realização do doutorado;

A todos que torceram pelo sucesso deste trabalho.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1. Prevalência global da infecção pelo vírus da hepatite C	16
Figura 1.2. Prevalência de anti-HCV nas diferentes regiões do Brasil	17
Figura 1.3. Modelo da estrutura da partícula do HCV	20
Figura 1.4. Organização genômica e proteica do HCV	21
Figura 5.1. Representação esquemática do gene NS4B no genoma do HCV	81
Figura 5.2. Sequências de aminoácidos da proteína NS4B do HCV-1a	86
Figura 5.3. Sequências de aminoácidos da proteína NS4B do HCV-1b	88
Figura 5.4. Representação esquemática do gene NS5B no genoma do HCV	93
Figura 5.5. Sequências de aminoácidos da proteína NS5B do HCV-1a	98
Figura 5.6. Sequências de aminoácidos da proteína NS5B do HCV-1b	105

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1.1. Variações na proteína NS3 associadas à resistência aos inibidores de protease	41
Quadro 1.2. Variações na proteína NS4B associadas à resistência aos inibidores da NS4B	42
Quadro 1.3. Posições de aminoácidos na proteína NS5A associadas à resistência aos inibidores da NS5A	43
Quadro 1.4. Posições de aminoácidos na proteína NS5B associadas à resistência aos inibidores da NS5B	44
Quadro 4.1. Oligonucleotídeos empregados para o estudo dos genes não estruturais	51
Quadro 4.2. Reagentes da RT-PCR (<i>One-Step</i>)	53
Quadro 4.3. Reagentes da <i>nested</i> -PCR	54
Quadro 4.4. Mistura da reação para sequenciamento nucleotídico	57
Tabela 5.1. Comparação dos sítios da proteína NS4B de isolados do HCV-1a que apresentam diferenças significativas nas frequências dos aminoácidos em relação as de outras regiões geográficas	90
Tabela 5.2. Frequência de cada aminoácido da região C-terminal da NS4B das três regiões geográficas estudadas, com identificação de padrões característicos de aminoácidos	91
Tabela 5.3. Comparação dos sítios da NS5B polimerase (N-terminal) de isolados do GT 1a que apresentam diferenças nas frequências dos aminoácidos em relação as de outras regiões geográficas	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

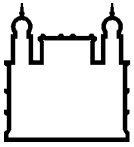
G	Glicina
A	Alanina
L	Leucina
V	Valina
I	Isoleucina
P	Prolina
F	Fenilalanina
S	Serina
T	Treonina
C	Cisteina
Y	Tirosina
N	Asparagina
Q	Glutamina
D	Aspartato ou Ácido Aspártico
E	Glutamato ou Ácido Glutâmico
R	Arginina
K	Lisina
H	Histidina
W	Triptofano
M	Metionina
aa	Aminoácido
anti-HCV	anticorpo contra o vírus da hepatite C
ARF	<i>Alternate Reading Frame</i> ou fase de leitura alternativa
Cauda X	Região situada na extremidade 3' do genoma do HCV (3'X)

CD81	<i>Cluster of Differentiation</i> 81 ou grupo de diferenciação 81
c-DNA	DNA complementar
C-terminal	Extremidade carboxi-terminal da proteína (COOH)
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
E1	Glicoproteína do envelope 1
E2	Glicoproteína do envelope 2
EUA	Estados Unidos da América
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HVR1	Região hipervariável 1
HVR2	Região hipervariável 2
IFN	Interferon
IRES	Sítio interno de entrada ribossomal
ISDR	Região determinante de sensibilidade ao interferon
IL28B	Gene interleucina 28 B humana
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LIPA	<i>Line Probe Assay</i>
3' NC	Região 3' não-codificante
5' NC	Região 5' não-codificante
NS2	Proteína não-estrutural 2
NS3	Proteína não-estrutural 3
NS4A	Proteína não-estrutural 4A
NS4B	Proteína não-estrutural 4B
NS5A	Proteína não-estrutural 5A

NS5B	Proteína não-estrutural 5B
N-terminal	Extremidade amino-terminal (NH ₂) da proteína
NTPase	Nucleotídeo-trifosfatase
ORF	Fase de leitura aberta
P7	Proteína P7
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Peguilado
Poli-U	Trato de polipirimidina
RBV	Ribavirina
RVS	Resposta virológica sustentada
RFLP	Polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase após síntese de DNA complementar por transcrição reversa
SR-BI	<i>Scavenger receptor class B type I</i>
TBE	Tampão Tris- Borato - EDTA
TMA	Amplificação mediada pela transcrição

LISTA DE SINAIS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDAS

%	Percentual
I	UM (algarismo romano)
II	Dois (algarismo romano)
III	Três (algarismo romano)
KDa	Kilo Dáltons
°C	Graus Celcius
n ^o	Número
=	Igual
>	Maior
X	Multiplicação
α	Letra alfa
UI/mL	Unidades Internacionais por mililitro
nm	Nanômetro
μ L	Microlitro
mM	Milimolar
Pmol	picomol (10^{-12})



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mutações nos genes não estruturais do vírus da hepatite C associadas à resistência aos novos antivirais

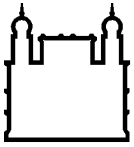
RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

ALLAN PERES DA SILVA

Introdução e objetivos: Polimorfismos naturais de resistência aos agentes antivirais de atuação direta (DAAs) no vírus da hepatite C (HCV) podem representar um fator limitante para a eficácia dessa terapia. A análise de sequências virais de regiões geográficas distintas pode apresentar diferenças significativas nas frequências de mutações de resistência aos DAAs. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar as mutações associadas à resistência aos DAAs nos genes não-estruturais (NS) do HCV em isolados virais que circulam no Brasil. **Métodos:** Foram estudados um total de 390 sequências do genótipo 1 do HCV de pacientes brasileiros virgens de tratamento cronicamente infectados. O RNA viral foi extraído, e as regiões abrangendo os genes NS3, NS4 e NS5 foram amplificadas por RT-PCR e sequenciadas. **Resultados:** No domínio NS3/4A protease, a variação V36L foi encontrada em 5,60% dos isolados do subtipo 1b, e a substituição T54S em 4,16% das sequências do subtipo 1a; na posição 55, 4,16% dos isolados continham a variação V55A, responsável por causar constrição no sítio de ligação do inibidor de protease boceprevir. Em relação à proteína NS4B, um isolado do subtipo 1b apresentou a substituição F98L, responsável por conferir resistência aos inibidores AP80978, PTC725 e silibina. Na proteína NS5A, 3,84% das sequências do subtipo 1a mostraram as mutações de resistência M28T ou Y93H, e 13,46%, as mutações secundárias H58P e E62D. Dentre os isolados do subtipo 1b, 3,70% continham a mutação Y93H, e 14,8%, as mutações secundárias R30Q, L31M, P58S e I280V. Em NS5B, 25% das sequências do subtipo 1b brasileiras apresentaram a variação L159F na população viral dominante, mas nenhuma sequência do subtipo 1a exibiu tal substituição. Além disso, em 15 isolados do subtipo 1b (29%), foi observado o variante C316N, responsável por conferir resistência a inibidores não-nucleosídeos, enquanto que apenas 2,12% das sequências do isolado do subtipo 1a mostraram a substituição C316Y. A caracterização do subtipo 1a em clados 1 e 2 revelou que as sequências brasileiras das regiões NS3 e NS5A formaram um grupo distinto dentro do clado 1. Adicionalmente em NS3, esse clado apresentou uma característica fenotípica incomum em relação à presença de mutações de resistência aos inibidores macrocíclicos; em particular, a mutação Q80K foi encontrada na maioria das sequências de clado 1, mas não nas amostras brasileiras. **Conclusões:** Estes dados demonstram que as substituições de resistência a diferentes DAAs podem ser encontradas em isolados circulando no Brasil em pacientes virgens de tratamento antiviral. Além disso, os isolados brasileiros do HCV apresentam um padrão distinto de diversidade genética, reforçando a importância destas informações em futuras abordagens terapêuticas.

Palavras-chave: HCV; vírus da hepatitis C; terapia antiviral; DAAs; genes não estruturais



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mutations in the nonstructural genes of the hepatitis C virus associated with resistance to new antiviral drugs

ABSTRACT

PHD THESIS IN PARASITE BIOLOGY

ALLAN PERES DA SILVA

Background and aims: Natural resistance polymorphisms to direct antiviral agents (DAAs) in hepatitis C virus (HCV) may represent a limiting factor for therapy efficacy. Analysis of viral sequences from distinct geographical regions may show significant differences in the frequencies of resistance mutations to DAAs. In this context, the aim of this study was to investigate mutations associated with resistance to DAAs of HCV non-structural genes (NS) in viral isolates circulating in Brazil. **Methods:** A total of 390 HCV genotype 1 sequences from therapy-naïve Brazilian patients chronically infected. Viral RNA was extracted, and the region encompassing the non-structural genes NS3, NS4, and NS5 was RT-PCR amplified and sequenced. **Results:** In the NS3/4A protease domain, a V36L variation was found in 5,60% of subtype 1b isolates and a T54S substitution in 4,16% of subtype 1a sequences; at position 55, 4,16% of strains contained the V55A variation which is responsible to cause constriction in the binding site of the protease inhibitor boceprevir. Concerning the NS4B protein, one subtype 1b isolate showed the F98L substitution, responsible for conferring resistance to inhibitors AP80978, PTC725 and Silybin. In the NS5A protein, 3,84% of subtype 1a sequences showed the resistance mutations M28T and Y93H, while 13,46%, the secondary mutations H58P and E62D. Among subtype 1b isolates, 3,70% of patients showed the Y93H mutation, while 14,8% the secondary mutations R30Q, L31M, P58S and I280V. For NS5B, 25% of Brazilian subtype 1b sequences presented the L159F variation in the dominant viral population, but none of subtype 1a sequence showed such substitution. Moreover, 15 subtype 1b isolates (29%), were observed the C316N variant, responsible to confer resistance to non-nucleoside inhibitors, while only 2,12% of subtype 1a isolates showed the C316Y substitution. Characterization of subtype 1a in clades 1 and 2 revealed that Brazilian sequences of NS3 and NS5A regions formed a distinct group inside clade 1. Additionally to NS3, this clade presented an unusual phenotypic characteristic in relation to the presence of resistance mutations to macrocyclic inhibitors; in particular, the mutation Q80K was found in the majority of clade 1 sequences, but not in the Brazilian isolates. **Conclusions:** These data demonstrate that substitutions conferring resistance to different DAAs can be found in isolates circulating in Brazil in treatment-naïve patients. Moreover, Brazilian HCV isolates display a distinct pattern of genetic diversity, reinforcing the importance of this informations in future therapeutic approaches.

Key words: HCV; Hepatitis C virus; Antiviral therapy; DAAs; Non-Structural genes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 HISTÓRICO	15
1.2 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO HCV	16
1.2.1 Transmissão	17
1.3 ASPECTOS CLÍNICOS	19
1.4 ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO HCV	19
1.4.1 Proteínas Estruturais	21
1.4.2 Proteínas Não-Estruturais	22
1.5 CICLO BIOLÓGICO DO HCV	23
1.5.1 Adsorção e entrada viral	23
1.5.2 Tradução e processamento da poliproteína	25
1.5.3 Replicação viral	24
1.5.4 Montagem e Liberação da partícula	24
1.6 ABORDAGEM DIAGNÓSTICA	27
1.6.1 Diagnóstico Sorológico	27
1.6.2 Diagnóstico Molecular	28
1.6.2.1 Métodos de Genotipagem	29
1.7 ABORDAGEM TERAPÊUTICA	29
1.7.1 Fatores preditivos para a resposta ao tratamento	30
1.7.1.1 Fatores do Hospedeiro	30
1.7.1.2 Fatores Virais	31
1.8 NOVOS ANTIVIRAIS	32
1.8.1 NS3-4A protease	32
1.8.1.1 Inibidores da NS3-4A protease	32
1.8.1.2 Inibidores da NS3-4A protease de 2a e 3a geração	33
1.8.2 Inibidores da NS4A	35
1.8.3 Inibidores da NS4B	35
1.8.4 Inibidores da NS5A	36
1.8.5 Inibidores da NS5B polimerase	37
1.8.5.1 Inibidores análogos nucleosídeos	37
1.8.5.2 Inibidores análogos não nucleosídeos	38
1.8.6 Fatores de Hospedeiro como alvo para o tratamento	39
1.8.6.1 Inibidores da Ciclofilina	39
1.8.6.2 Silibina	39
1.8.6.3 Miravirsen	40
1.9 RESISTÊNCIA AOS INIBIDORES DAAs	40
1.10 NOVAS COMBINAÇÕES TERAPÊUTICAS	45
1.10.1 Terapia Quádrupla	45
1.10.2 Terapia oral	45
2 JUSTIFICATIVA	47
3 OBJETIVOS	49
3.1 OBJETIVO GERAL	49
3.2 OBJETOS ESPECÍFICOS	49
4 MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO	50
4.2 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL	50
4.3 TRANSCRIÇÃO REVERSA E AMPLIFICAÇÃO DO ÁCIDO NUCLÉICO	51
4.4 PROCEDIMENTOS PARA RT-PCR	52
4.4.1 Ciclo de temperatura para a RT-PCR	53
4.5 PROCEDIMENTOS PARA NESTED-PCR (PCR2)	53
4.5.1 Ciclos de temperatura para a Nested-PCR	54
4.6 ANÁLISE DOS PRODUTOS OBTIDOS PELA REAÇÃO DE PCR	55
4.7 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DA PCR	55

4.8 QUANTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR	56
4.9 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO	56
4.9.1 Ciclos de temperatura para a reação de sequenciamento	57
4.10 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS E ANÁLISE FILOGENÉTICA	57
4.11 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS EM LOGO	58
4.12 IDENTIFICAÇÃO DE PADRÕES CARACTERÍSTICOS DE AMINOÁCIDOS EM AMOSTRAS BRASILEIRAS/ FREQUÊNCIA DE CADA AMINOÁCIDO EM CADA POSIÇÃO	58
5 RESULTADOS	59
5.1 ARTIGO 1	60
5.2 ARTIGO 2	66
5.3 ARTIGO 3	75
5.4 REGIÃO NÃO ESTRUTURAL NS4B	81
5.4.1 Amplificação do gene NS4B e sequenciamento nucleotídico	81
5.4.2 Análise das sequências de aminoácidos da proteína NS4B	81
5.4.3 Identificação de padrões característicos de aminoácidos em amostras brasileiras/ Frequência de cada aminoácido em cada posição na região NS4B	89
5.5 REGIÃO NÃO ESTRUTURAL NS5B	93
5.5.1 Amplificação do gene NS5B e sequenciamento nucleotídico	93
5.5.2 Análise das sequências de aminoácidos da proteína NS5B	93
5.5.3 Identificação de padrões característicos de aminoácidos em amostras brasileiras/ Frequência de cada aminoácido em cada posição na região NS5B	106
6 DISCUSSÃO	108
7 CONCLUSÕES	117
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
9 ARTIGO 4 (ANEXO)	145

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

Até o final da década de 80 do século XX, muitos casos de hepatites pós-transfusional não eram atribuídos aos até então identificados vírus da hepatite A (HAV) ou vírus da hepatite B (HBV). Mesmo com a adoção de critérios para a doação de sangue, como a exclusão de indivíduos portadores do antígeno de superfície do HBV (HBsAg) e a doação remunerada, inúmeros casos de hepatites pós-transfusional não estavam relacionados às infecções pelo HAV ou HBV (Alter et al., 1975); assim, esses casos foram descritas como hepatite não A-não B (HNANB) (Feinstone et al., 1975).

Em 1989, com a utilização de métodos moleculares como a clonagem e o sequenciamento nucleotídico, foi possível identificar o agente etiológico da HNANB no plasma de um chimpanzé cronicamente infectado (Choo et al., 1989). Denominado de vírus da hepatite C (HCV), constatou-se que era o principal agente etiológico dessa hepatite. Apesar dos avanços inegáveis ocorridos nos campos do diagnóstico, da prevenção e do tratamento dos indivíduos infectados, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que entre 130 e 170 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HCV (Alter et al., 2007; Lavanchy et al., 2009).

A evolução clínica costuma ser assintomática, principalmente na fase inicial da doença hepática, o que dificulta os estudos relacionados à infecção aguda. Assim, a infecção pelo HCV é geralmente descoberta em fase de infecção crônica. O HCV causa infecção crônica em cerca de 50 a 80% dos indivíduos infectados, onde o vírus replica-se persistentemente, sendo possível detectar o RNA viral no soro ou tecido hepático, na presença de resposta imune (Blackard et al., 2008). A resolução espontânea da infecção ocorre em aproximadamente 20% dos casos, sendo a maioria em indivíduos jovens, do sexo feminino, caucasianos e com baixa viremia (Blackard et al., 2008). Aproximadamente 4 a 20% desses indivíduos apresentam complicações hepáticas como a cirrose e o carcinoma hepatocelular em um período de 10 a 20 anos. Por outro lado, cerca de 30% dos casos têm uma evolução lenta e não desenvolvem cirrose por pelo menos 50 anos (Poynard et al., 1997). A alta taxa de cronificação da doença, seu potencial evolutivo para cirrose e hepatocarcinoma, assim como o fato de ser a mais frequente etiologia em casos de transplante hepático, tornam a hepatite C um grave problema de saúde pública (Papatheodoridis e Hatzakis, 2012).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO HCV

O conhecimento epidemiológico sobre a infecção pelo HCV, em grande parte, se pauta em pesquisas de prevalência da infecção baseadas na análise de resultados da frequência do marcador sérico anti-HCV, principalmente em candidatos a doadores de sangue, ou de maior risco de contágio (Oliveira-Filho et al., 2010).

A OMS estima que entre 2-3% da população mundial esteja infectada pelo HCV (Perz et al., 2004). A incidência é maior em comunidades de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, chegando a 6% na região central do continente africano (Madhava et al., 2002) e de 15-20% no Egito (Frank et al., 2000). Nos Estados Unidos, na Europa Ocidental e no Japão, a prevalência atinge médias entre 1 e 1,9% da população geral (Perz et al., 2004) (Figura 1.1). É difícil determinar o número de novas infecções, pois os casos agudos não são clinicamente notificados.

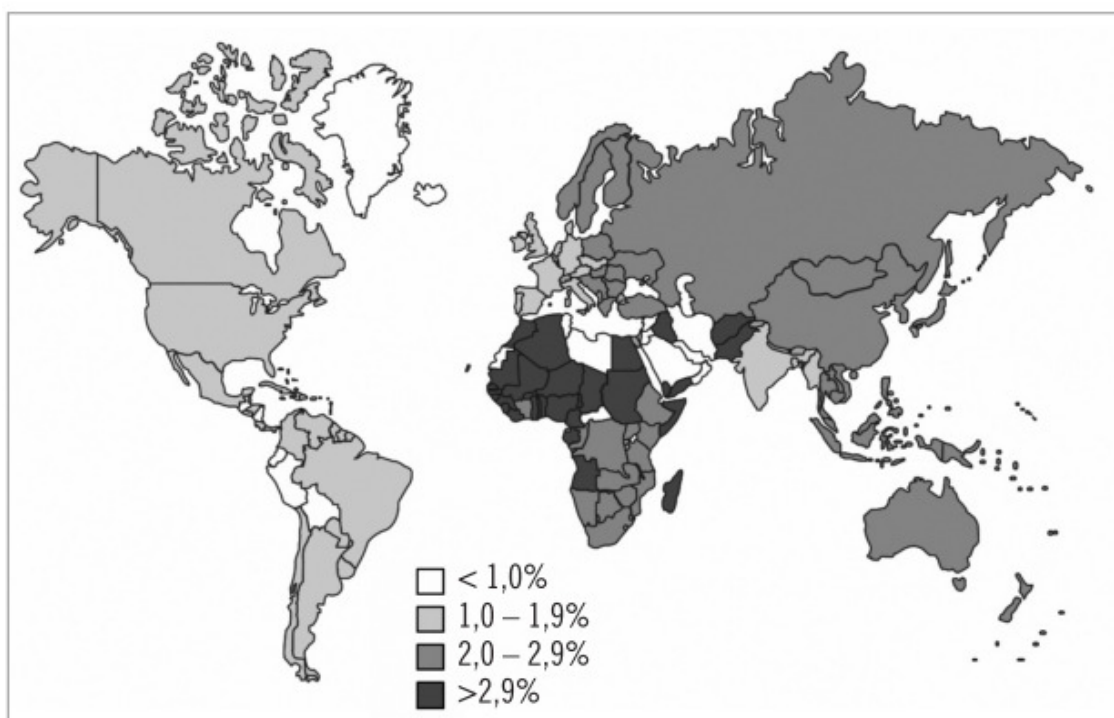


Figura 1.1. Prevalência global da infecção pelo vírus da hepatite C (adaptado de Perz et al., 2004)

Padrões epidemiológicos da infecção pelo HCV podem ser traçados de acordo com fatores geográficos e temporais. Nos países industrializados, a maior parte dos infectados encontra-se na população adulta, considerando-se a transmissão recente pelo uso de drogas ilícitas; países com predominância de infecção em pessoas idosas, com provável transmissão em passado distante, como no caso do Japão e países com taxas mais elevadas onde a infecção está presente em todas as faixas etárias (Wasley e Alter 2000; Yen et al., 2003). Nos países menos desenvolvidos, a incidência

da infecção é alta, devido a fatores culturais, desconhecimento e cuidados de prevenção. É frequente a utilização e compartilhamento de materiais cortantes ou perfurantes não devidamente esterilizados (Thursz e Fontanet, 2014).

No Brasil, de acordo com o estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais dos estados brasileiros, no ano de 2010, a Região Norte apresentou taxa mais elevada de prevalência de anti-HCV na população adulta (20-69 anos) (3,2%), enquanto que as Regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul apresentaram valores intermediários (1,6%, 1,6% e 1,7%, respectivamente), e a Região Nordeste mostrou prevalência mais baixa de anti-HCV (1,0%) (Figura 1.2) (Ministério da Saúde, 2010).

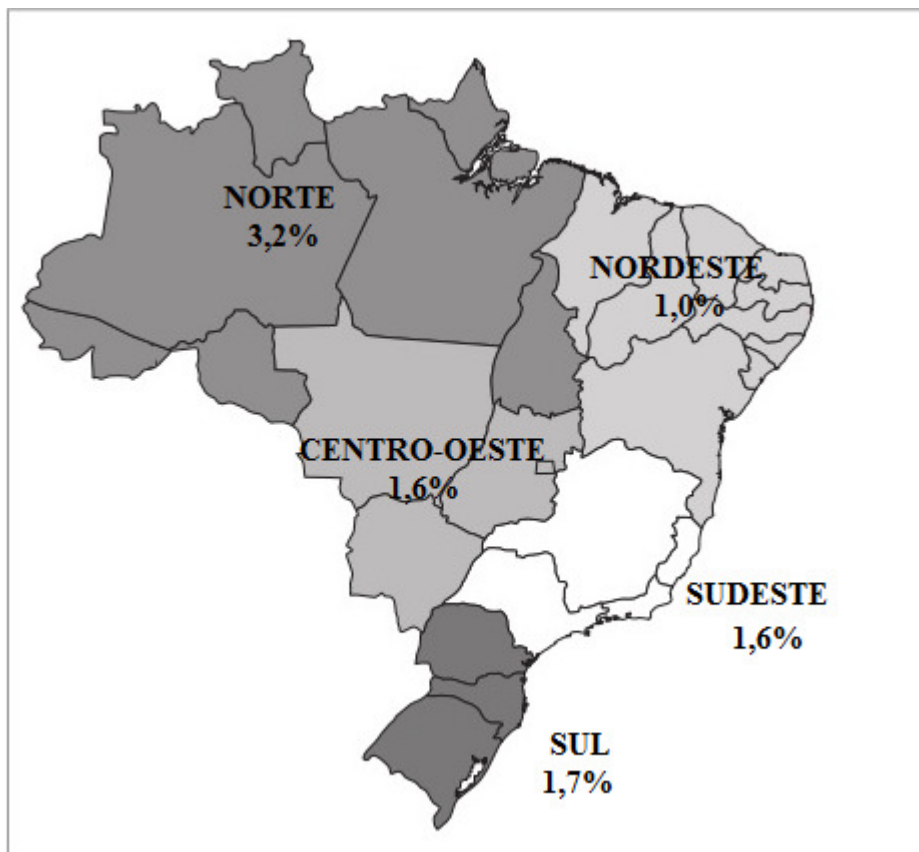


Figura 1.2. Prevalência de anti-HCV nas diferentes regiões do Brasil (Ministério da Saúde, 2010)

1.2.1 Transmissão

A principal via de transmissão do HCV é a parenteral e, com muito menor risco de contágio, por secreções orgânicas, como saliva, leite materno e sêmen (Abou-Setta, 2004; Pastore et al., 2006; Indolfi e Resti, 2009). A maior parte das infecções ocorre durante o uso de drogas endovenosas e/ou intranasais ilícitas (Shepard et al., 2005), sendo uma das principais formas de transmissão em países

industrializados (Thursz e Fontanet, 2014). De acordo com estudos epidemiológicos, a prevalência mundial da infecção entre usuários de drogas é muito elevada, podendo chegar a taxas de até 90%, conforme a duração da exposição ao uso das drogas e da localização geográfica destes usuários (Gerberding, 1994; Hagan et al., 2008).

A transmissão ocupacional, perinatal e sexual ocorrem de forma menos frequente se comparadas àquelas ocasionadas por exposição percutânea (Puro et al., 1995; Kiyosawa et al., 1991; Ferrero et al., 2003; Terrault, 2002; Vandelli et al., 2004). Em relação à transmissão ocupacional, profissionais da área de saúde são os mais atingidos. O risco de infecção pode variar de acordo com o tipo de exposição e fatores que englobam, por exemplo, a carga viral no hospedeiro e o tempo de exposição dos profissionais (Riddell & Sherrard, 2000; Marconi et al., 2010). Estima-se que ano de 2000, dezesseis mil infecções pelo HCV tenham ocorrido em profissionais da área de saúde em decorrência de acidentes com objetos perfurocortantes (Prüss-Ustün et al., 2005).

Em relação à transmissão perinatal do HCV, antes da implantação da triagem sorológica nos bancos de sangue, a forma de transmissão mais frequente do HCV em crianças era através de transfusões de sangue (Bortolutti et al., 2007). Atualmente, alguns estudos indicam que formas distintas de transmissão de mãe para filho podem ocorrer, sendo as mais comuns a intrauterina e a que ocorre durante o parto (Resti et al., 1998; Mok et al., 2005). A coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) constitui importante fator coadjuvante de transmissão do HCV de mães soropositivas para seus conceptos, apresentando taxas que variam entre 0 e 20%, com média de 5% (Martins et al., 2011).

A transmissão sexual é considerada menos eficiente, sendo uma via rara quando comparada com o HBV e o HIV. As taxas de transmissão são baixas ou nulas, e as porcentagens oscilam entre 0 e 3% (Cavalheiro, 2007).

Estima-se que cerca de 10% dos indivíduos infectados pelo HCV não apresenta qualquer fator de risco parenteral conhecido, configurando os casos esporádicos dessa infecção. Provavelmente, formas de transmissão que envolvam o compartilhamento de material perfurocortante contaminado são as principais causas de transmissão do HCV (Oliveira-Filho et al., 2010). Em países subdesenvolvidos, há reutilização de materiais perfurocortantes, ou falta de cuidados na esterilização dos mesmos, além de realização de terapias por profissionais não qualificados (Hauri et al., 2004).

1.3 ASPECTOS CLÍNICOS

É estabelecido que a forma aguda equivale à presença de sinais clínicos, alterações enzimáticas ou sintomas da hepatite C até um período de 6 meses após o a exposição ao HCV (Blackard et al., 2008). Clinicamente, os sintomas da hepatite C são semelhantes aqueles observados nos outros casos de hepatites virais, onde o paciente pode apresentar icterícia, fadiga, anorexia, náusea e outros sintomas inespecíficos (Kohara, 2000). Nos demais indivíduos infectados a infecção é subclínica ou assintomática sendo este um dos maiores problemas de saúde pública pois, podem transmitir o vírus sem conhecimento (Blackard et al., 2008).

Nos indivíduos com infecção aguda não resolvida, 70-80%, evoluem para a forma crônica, onde o vírus replica-se persistentemente e é possível detectar o RNA viral no soro ou tecido hepático, na presença de resposta imune (Blackard et al., 2008). Com o estabelecimento da infecção crônica, não ocorrerá resolução espontânea da viremia (Lemon et al., 2007).

Dos indivíduos cronicamente infectados, os sinais clínicos da infecção incluem mal-estar, náusea e dor no quadrante superior direito que duram tipicamente de 2-12 semanas (Hoofnagle, 1997). Aproximadamente 15 a 20% desenvolvem cirrose num período de 10 a 30 anos e, por ano, 1-5% destes doentes desenvolve hepatocarcinoma (HCC) (de Bruijne et al., 2009).

1.4 ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO HCV

O HCV está classificado como membro do gênero *Hepacivirus*, dentro da família *Flaviviridae* (Thiel et al., 2005). Suas partículas são envelopadas, e a estrutura genômica é composta por uma fita simples de RNA, de polaridade positiva, com aproximadamente 9.400 nucleotídeos (Figura 1.3). É um vírus de aproximadamente 50 a 60 nm de diâmetro (He et al., 1987), simetria icosaédrica, com espículas de 6-8 nm em sua superfície (Prince et al., 1996). As partículas virais apresentam elevada heterogeneidade bioquímica pela sua associação com anticorpos ou lipoproteínas (Roingard et al., 2004). Os vírions podem circular na corrente sanguínea complexados às lipoproteínas de baixa densidade ou às imunoglobulinas, ou como partículas livres. O HCV possui uma relação estrita de hospedeiros, sendo apenas o homem e o chimpanzé susceptíveis à infecção natural (Brass et al, 2007).

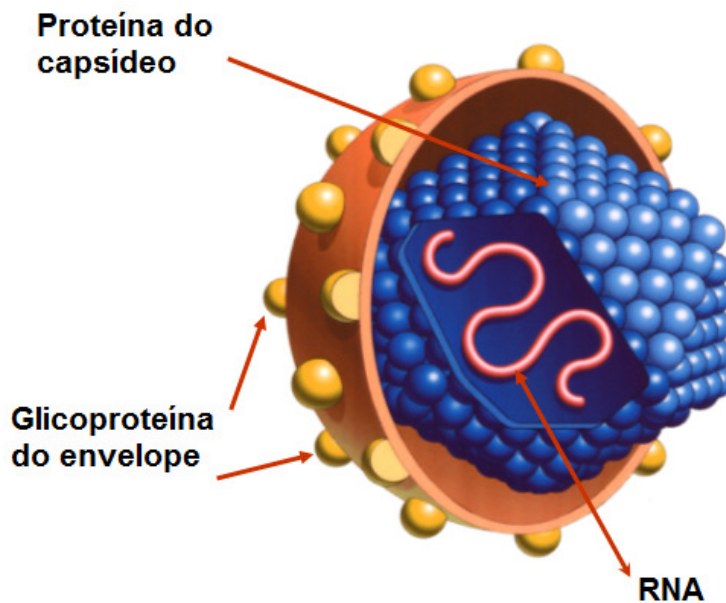


Figura 1.3. Modelo da estrutura da partícula do HCV

Disponível em URL: <http://images.the-scientist.com/content/images/articles/24827/69-1.jpg> [Acesso em: 06 maio, 2014]. (Figura adaptada para o português).

O genoma viral pode ser dividido em três regiões: uma região não-codificante na extremidade 5' (5' NC), uma fase de leitura aberta (*Open Reading Frame* ou ORF), que codifica uma poliproteína precursora de cerca de 3.000 aminoácidos (aa), e uma outra região não-codificante na extremidade 3' (3' NC) (Choo et al., 1989; Houghton et al., 1991).

A região 5' NC é altamente conservada entre os diferentes isolados e contém um sítio de entrada para o ribossomos denominado IRES (*Internal ribosomal entry site*), que é essencial para a tradução cap-independente da ORF. Sua estrutura é composta de quatro domínios (I-IV) altamente conservados. O domínio I não é requerido para a atividade da IRES, mas é fundamental para a replicação do RNA do HCV (Friebe et al., 2001).

A região 3' NC é composta de uma pequena região variável, uma cauda poli-U de 80 nucleotídeos e uma região altamente conservada composta de 98 nucleotídeos, denominada cauda X (Kolykhalov et al., 1996; Tanaka et al., 1996). Essa região inclui uma pequena porção de 25 bases da cauda poli-U, sendo essencial para a replicação do HCV em cultura de células (Friebe et al., 2002) e *in vivo* (Yanagi et al., 1999; Kolykhalov et al., 2000).

A poliproteína viral de 3000 aa sofre clivagem por proteases virais e celulares, dando origem às proteínas estruturais e não-estruturais do vírus. As proteínas estruturais compreendem o nucleocapsídeo (*core*), as glicoproteínas do envelope 1 (E1) e 2 (E2) e p7, enquanto que as proteínas não-estruturais são representadas por seis proteínas: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B (Grakoui et al., 1993) (Fig. 1.4).

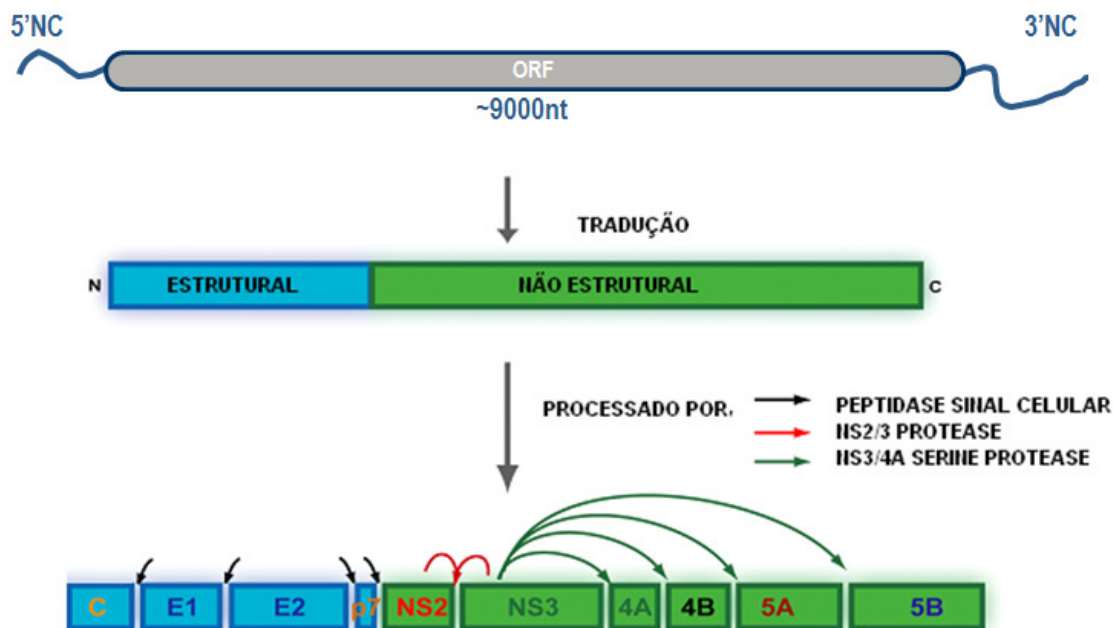


Figura 1.4. Organização genômica e proteica do HCV (Adaptado de Lindenbach & Rice, 2005).

1.4.1 Proteínas Estruturais

a) Core

A proteína conservada do *core* é composta de 191 aminoácidos, sendo liberada da poliproteína precursora pela ação de peptidases celulares. Considera-se que a proteína *core* madura seja capaz de se agrupar espontaneamente para encapsidar o RNA viral e de interagir com glicoproteínas do envelope E1 e E2. O RNA viral pode ligar-se de maneira inespecífica ao domínio aminoterminal da proteína provavelmente devido ao alto conteúdo de resíduos básicos dessa região (Forns e Bukh, 1999).

Posteriormente, foi descrita uma nova proteína, de 17 kDa, codificada por uma fase de leitura alternativa denominada ARF (*Alternative Reading Frame*), com fase de leitura +1 em relação à proteína *core*, que foi denominada proteína F ou ARFP (*Alternative Reading Frame Protein*) (Branch et al, 2005). Essa proteína de 160 aminoácidos não apresenta a sequência C-terminal do *core* maduro (Xu et al., 2001) e parece estar envolvida no processo de replicação do HCV.

b) Envelope (E1 e E2) e p7

As proteínas do envelope E1 e E2 também são liberadas da poliproteína precursora pela ação de peptidases celulares. E1 e E2 possuem pesos moleculares de aproximadamente 35 kDa e 70 kDa, respectivamente (Drummer et al., 2003). Por sua vez, a proteína de membrana p7, de 63

aminoácidos, apresenta propriedades funcionais indicativas de canais de cátions, sendo, portanto, identificada como pertencente à família das viroporinas (Steinmann e Pietschmann, 2010). A função exata da p7 no ciclo replicativo do HCV permanece incerta, porém evidências indicam sua participação na montagem e/ou liberação das partículas infecciosas desse vírus. Uma hipótese seria que a p7 previne a acidificação prematura das vesículas que transportam o HCV, processo necessário às mudanças conformacionais nas proteínas do envelope para a entrada viral nas células do hospedeiro (Wozniak et al., 2010).

A glicoproteína E2 contém, na sua extremidade N-terminal, uma região de 34 aminoácidos que apresenta grande variabilidade, tanto na sequência de nucleotídeos, como na de aminoácidos, conhecida como região hipervariável 1 (*Hypervariable region* ou HVR1). Essa região é resultante do aparecimento de variantes por mutações aleatórias e seleção dos mutantes que são capazes de escapar dos anticorpos neutralizantes (Penin et al., 2004). A HVR1 desempenha papel importante na evolução da infecção pelo HCV. Os casos de resolução na fase aguda apresentam menor variação nucleotídica em relação àqueles que evoluem para hepatite crônica (Chen e Wang 2007). A proteína E2 contém ainda o sítio de ligação para a molécula CD81, que é uma proteína de membrana, de aproximadamente 26 kDa e parece participar do processo de adsorção/penetração do HCV. Existem evidências da interação de E2 com CD81, e sabe-se que as partículas virais utilizam também o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL) para penetrar nas células. A molécula CD81 não é a única candidata a receptor para o HCV nessas células, pois outras proteínas como o SR-BI (*Scavenger receptor class B type I*) e a claudina-1, além de fatores adicionais como as glicosaminoglicanas e lipoproteínas de baixa densidade, parecem ser necessários para a entrada do HCV nas células. A proteína do hospedeiro ocludina também foi identificada como essencial para a entrada do HCV na célula (Ploss et al., 2009).

Em termos antigênicos, as proteínas E1 e E2 são os principais componentes das vacinas em desenvolvimento. A proteína E1 isolada também tem sido proposta como um possível antígeno a ser utilizado em vacinas terapêuticas para a hepatite C, tendo em vista os estudos realizados sobre a variabilidade de E1 na fase aguda da infecção. Essa proteína apresenta o maior grau de diversidade entre os subtipos 1b e 2a, os quais apresentam comportamento biológico bem diverso (Chen e Wang, 2007).

1.4.2 Proteínas Não-Estruturais

As proteínas não-estruturais estão envolvidas no processamento da poliproteína e na replicação do RNA viral.

a) NS2

A proteína NS2 apresenta sua extremidade N-terminal dirigida para o lúmen do retículo endoplasmático (RE) e está intimamente associada às proteínas estruturais. A proteína NS2 é uma protease zinco-dependente com atividade autocatalítica na junção NS2/NS3 da poliproteína, levando a liberação da proteína NS3. (Forns e Bukh, 1999; Suzuki et al., 2007).

b) NS3/4A

A NS3 é uma proteína multifuncional que possui atividade serina protease na porção aminoterminal e helicase/NTPase na porção carboxiterminal (Lindenbach e Rice 2005), sendo que o domínio N-terminal forma, junto com a proteína cofator NS4A, uma serina protease heterodimérica que cliva a porção não-estrutural da poliproteína do HCV nas junções da poliproteína NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A e NS5A/NS5B. Além do seu papel essencial no processamento da poliproteína, a extremidade C-terminal da proteína NS3 exerce atividade nucleotidase (NTPase)/helicase, desenrolando duplas fitas de RNA durante o processo replicativo do HCV (Pang et al., 2002).

Na proteína NS3, também foram identificados importantes epítomos associados com a resposta humoral e celular para a resolução da infecção, tornando-se um constituinte atrativo para o desenvolvimento futuro de vacina contra a hepatite C. Além disso, acredita-se que possa estar envolvida direta ou indiretamente na carcinogênese viral, afetando funções celulares normais, tais como: proliferação e morte celular. A proteína NS3 pode também estar envolvida em outros aspectos da infecção pelo HCV. Nesse sentido, parece interagir com a proteína quinase A e quinase C, que participam da transdução de sinais intracelulares, e participar do mecanismo patogênico do HCV, principalmente no desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, ao interagir com a proteína p53 (Tellinghuisen et al., 2002).

c) NS4A

A NS4A, proteína de aproximadamente 8 kDa, é composta de 54 aminoácidos e forma um complexo heterodimérico com a NS3, agindo como cofator necessário para a ativação e estabilização da NS3, assim como na sua ancoragem na membrana do RE e permite que o processamento da poliproteína ocorra de maneira eficaz (Roingard et al., 2004).

d) NS4B

A proteína altamente hidrofóbica NS4B é o principal indutor da rede membranosa (Egger et al., 2002). É também responsável pela reunião de outras proteínas não-estruturais do HCV para o sítio de replicação do RNA viral. A proteína NS4B também parece contribuir diretamente no

processo de replicação por meio da ligação a região 3' NC de RNAs de polaridade negativa (Einav et al., 2008), além de, apresentar atividade NTPase, porém o seu papel na replicação do vírus ainda não foi determinado. A ligação da proteína NS4B com a região 3' não codificante da fita do RNA viral é um alvo recentemente identificado para intervenção com agentes terapêuticos. Além disso, também parece estar envolvida na montagem de partículas virais (Paul et al., 2011).

e) NS5A

A proteína não estrutural NS5A não possui nenhuma atividade enzimática intrínseca, mas é provável que exerça suas funções por meio de interações com componentes virais e celulares, desempenhando múltiplas funções no ciclo biológico do HCV, como na replicação, montagem e liberação da partícula viral (Moradpour et al. 2007), além de modular as vias de sinalização da célula hospedeira, o qual tem sido associado com resistência ao interferon. Está envolvida na formação do complexo replicativo pela interação com lipídios de membrana e inicia o processo de montagem da partícula viral junto com a proteína do core (Shi et al., 2002). A NS5A também pode servir como um canal que auxilia na proteção e no direcionamento do RNA dentro das membranas do complexo de replicação (Tellinghuisen et al., 2005), além de interagir com a NS5B polimerase, o que resulta em um aumento da atividade da polimerase viral. Além disso, foi demonstrado que a proteína celular ciclofilina A (CypA) interage com dois domínios diferentes (DII-DIII) na proteína NS5A, atuando como cofator essencial para a infecção do HCV (Hanouille et al, 2009; Verdegem et al 2011).

Mutações no gene NS5A foram associadas à resposta ao interferon-alfa (INF- α) em pacientes com infecção crônica pelo HCV do subtipo 1b, devido à presença de uma sequência de aminoácidos localizada na metade próxima à extremidade C-terminal da região NS5A (correspondentes às posições 2154-2383 da poliproteína), denominada região determinante de sensibilidade ao interferon (*IFN-sensitive determining region* ou ISDR) (Tan e Katze et al., 2001).

f) NS5B

A região NS5B possui uma sequência razoavelmente conservada, sendo responsável por codificar a RNA-polimerase dependente de RNA, enzima responsável por catalisar a síntese do RNA complementar de polaridade negativa e as fitas de RNA de polaridade positiva, que por sua vez servem como molde para replicação e tradução da poliproteína. Devido à falta de correção da NS5B polimerase e as altas taxas replicativas do vírus, o genoma viral está susceptível a inúmeras substituições de nucleotídeos. Os virions são constantemente gerados a cada dia e estima-se que variantes contendo uma ou mais mutações encontram-se presentes em um mesmo paciente, constituindo uma mistura complexa de variantes, conhecidas como *quasispecies* virais (Rong et al.,

2010).

Os sítios para a atividade da proteína NS5B possuem especial afinidade de ligação com segmentos de poli U da 3'NC, isto é, um elemento genômico na região NS5B, o domínio 5BSL3.2, forma uma estrutura terciária funcional com parte da 3' NC, requerida para replicação do HCV em cultivo celular (You e Rice, 2008). Também tem sido observadas interações com a proteína do *core*, provavelmente regulando processos de tradução e replicação (Uchida et al., 2002).

1.5 CICLO BIOLÓGICO DO HCV

O recente desenvolvimento de sistemas de replicação *in vitro* eficientes ofereceu a oportunidade em analisar as diferentes etapas da replicação viral.

1.5.1 Adsorção e Entrada Viral

Os vírions podem circular na corrente sanguínea, complexados a imunoglobulinas ou como unidades livres. Ainda assim, a característica predominante das partículas do HCV é a estreita associação com lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) e de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDLs) (Lindenbach, 2013). Essa associação se relaciona com a alta infecciosidade do vírus, indicando que componentes lipoproteicos contribuem para uma eficiente entrada do HCV nas células hospedeira (Lindenbach et al., 2006). O HCV também é detectado em sítios extra-hepáticos como as células mononucleares do sangue periférico e plaquetas. Essa hipótese sugere o possível papel dessas células no transporte e persistência do HCV no hospedeiro (de Almeida et al., 2004 e 2007; Zahn et al., 2006). Algumas moléculas de superfície celular têm sido identificadas como possíveis receptores para o HCV nos processos de adsorção e internalização da partícula viral na célula hospedeira. Dentre os candidatos a receptor do HCV, pelo menos quatro proteínas são essenciais para a infecção: moléculas CD81, encontradas na superfície de muitos tipos celulares, incluindo hepatócitos; SR-BI (*scavenger receptor class B type I*); proteínas de junção claudina-1 (CLDN1) e ocludina (OCLN) (Zeisel et al., 2013).

A entrada do HCV na célula se dá por endocitose, sendo mediada por vesículas recobertas por clatrina (Blanchard et al., 2006), compartimentalizada em vesículas de endossoma ácido (Koutsoudakis et al., 2006; Tscherne et al., 2006). Supõe-se que a liberação do nucleocapsídeo para o citossol ocorra após a fusão da proteína do envelope do HCV à membrana do endossoma (Moradpour et al., 2007). Além disso, a transmissão célula-célula pode ser a rota predominante da propagação viral *in vivo* (Zeisel et al., 2013).

1.5.2 Tradução e Processamento da Poliproteína

Após o desnudamento e liberação do RNA genômico no citoplasma, a tradução do RNA ocorre no RE. A tradução da proteína se inicia com a formação de um complexo estável entre o IRES na região 5' NC com a subunidade 40S ribossomal, fatores de iniciação da célula hospedeira e proteínas virais. A poliproteína viral sofre clivagem por proteases virais e celulares, dando origem às proteínas estruturais e não-estruturais (Moradpour et al., 2007). As proteínas estruturais, assim como a p7, são geradas pela ação de peptidases sinal do hospedeiro. A porção remanescente da poliproteína é processada pela cisteína protease NS2-3 e pela atividade serina protease do complexo viral NS3-4A. Essa serino-protease é responsável pela clivagem da poliproteína nas junções das proteínas NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A e NS5A/NS5B (Kolykhalov et al., 2000).

1.5.3 Replicação Viral

A replicação do HCV é iniciada pela formação do complexo replicativo, uma associação altamente estruturada do RNA do HCV com proteínas virais e proteínas celulares, cofatores e membranas lipídicas reorganizadas derivadas do RE (Moradpour et al., 2007). Proteínas não-estruturais do HCV, e provavelmente fatores celulares, induzem um intenso rearranjo intracelular de membranas, o que inclui a formação de vesículas com dupla membrana (Ferraris et al., 2010). Essas estruturas constituem a rede membranosa, local de replicação do RNA do HCV (Gosert et al., 2003). Na replicação, o RNA do HCV de polaridade positiva é utilizado como molde para a síntese de RNA de polaridade negativa (replicativo intermediário), o qual por sua vez serve de molde para a síntese do RNA genômico (Penin et al., 2004). A seguir, o RNA sintetizado atua como mRNA para a síntese de proteínas virais ou, então, interage com múltiplas cópias da proteína do *core*, formando o nucleocapsídeo, e o envelope é adquirido no interior do RE.

1.5.4 Montagem e Liberação da Partícula Viral.

Após as proteínas virais, glicoproteínas e o RNA genômico terem sido sintetizados, esses são rearranjados para produzir virions infecciosos. A montagem viral é um processo que envolve múltiplas etapas que incluindo, tanto componentes virais, quanto fatores da célula hospedeira. Estudos sugerem que a montagem da partícula ocorre no RE (Gastaminza et al., 2008), e que gotículas lipídicas estejam envolvidas na formação da partícula (Miyinari et al., 2007). A partícula viral montada é transportada, via complexo de golgi (CG), para ser exocitada da célula hospedeira.

1.6 ABORDAGEM DIAGNÓSTICA

Após a infecção pelo HCV, existe um período de incubação variável entre os indivíduos infectados, de duas a 26 semanas, com média de seis a sete semanas. Os níveis da enzima hepática alanina aminotransferase (ALT) se torna elevada em aproximadamente 6-12 semanas, após a exposição ao vírus, e tendem a ser de 10-30 vezes maiores do que os limites normais. O RNA do HCV é o marcador molecular que pode ser detectado no soro ou plasma a partir da 1ª semana após a exposição experimental ou transfusional ao HCV, constituindo-se na melhor ferramenta para diagnóstico precoce da infecção aguda (Houghton, 1991, Ozaras e Tahan 2009). Os anticorpos anti-HCV podem ser encontrados em média oito semanas após a exposição ao vírus, embora possam levar meses para serem detectados.

O diagnóstico virológico da infecção pelo HCV é baseado em duas categorias de exames laboratoriais: ensaios sorológicos, que detectam anticorpo específico para o HCV (anti-HCV) (testes indiretos), e ensaios que podem detectar, quantificar ou caracterizar componentes da partícula do HCV, tais como: o RNA e o antígeno do *core* (testes diretos). Esses testes desempenham papel chave no diagnóstico da infecção, na tomada de decisões terapêuticas e avaliação da resposta virológica à terapia (Gupta et al., 2014).

1.6.1 Diagnóstico Sorológico

a) Ensaios imunoenzimáticos

Com os ensaios imunoenzimáticos de 2ª geração, anticorpos anti-HCV puderam ser detectados em aproximadamente 10 semanas após a infecção (Pawlotsky, 2003). Visando diminuir o período de janela imunológica, da transmissão viral até os resultados sorológicos positivos, um ensaio imunoenzimático de 3ª geração, que inclui um antígeno da NS5 e/ou a substituição de um epítopo altamente imunogênico da NS3, permite a detecção de anticorpos anti-HCV aproximadamente de quatro a seis semanas após a infecção, com uma sensibilidade maior que 99% (Cossart, 1999). Testes de 4ª geração possibilitam a detecção do antígeno core e anticorpos anticore e anti-NS3 simultaneamente, apresentando especificidade de 99,86% e redução no período de janela imunológica em média de 37 dias (Lambert, 2007).

b) Técnica de *immunoblotting*

Como resultado do baixo valor preditivo positivo do ELISA em populações de baixo risco, testes suplementares foram desenvolvidos na tentativa de melhor discriminar eventuais resultados positivos nessas populações. Os testes de *immunoblotting* baseiam-se na

imobilização de antígenos específicos do HCV em fita de nitrocelulose, identificando-se contra qual antígeno do vírus se dá a reatividade do soro testado (Dubois et al., 1998). Os testes de *immunoblotting* mais recentemente desenvolvidos, utilizando antígenos da região do capsídio, NS3, NS4, NS5 e/ou E2/NS1 (testes de terceira geração), têm a vantagem de diminuir o número de resultados indeterminados (Lok e Gunaratnam, 1997).

c) Detecção e quantificação do antígeno do *core*

Os níveis do antígeno do core do HCV se correlaciona com os níveis do RNA do HCV em pacientes cronicamente infectados (Descamps et al., 2012). Vários estudos demonstraram que a quantificação do antígeno do *core* pode ser utilizada como alternativa à quantificação do RNA do HCV (Moscato et al., 2011).

1.6.2 Diagnóstico Molecular

A detecção do RNA viral é baseada na amplificação de regiões específicas do genoma do vírus, podendo ser qualitativa ou quantitativa. As técnicas mais empregadas para esta finalidade são baseadas em reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction* ou PCR), PCR em tempo real, DNA ramificado (bDNA) e amplificação mediada por transcrição (TMA) (Chevaliez e Pawlotsky, 2006).

A PCR consiste na amplificação exponencial de sequências nucleotídicas específicas, após síntese de DNA complementar por transcrição reversa. O limite inferior de detecção dos ensaios qualitativos, por essa técnica, situa-se em torno de 50 UI/mL (Chevaliez e Pawlotsky, 2006).

A PCR em tempo real é um método que apresenta alta sensibilidade e precisão, sendo aplicada no diagnóstico de grandes demandas. Nessa metodologia, a fluorescência emitida pela clivagem da sonda específica é detectada por um sensor anexado ao termociclador. A quantidade de fluorescência é proporcional do DNA (ou c-DNA) presente na amostra inicial. A sensibilidade desse teste é relatada como sendo de cerca de 10 UI/mL (Gelderblom et al., 2006).

No teste de amplificação de sinal (branched-DNA), ao contrário da PCR, não há reação enzimática para amplificação da molécula a ser detectada. O método utiliza sucessivos ciclos de hibridizações por sondas, sendo que o limite mínimo de detecção do HCV-RNA encontra-se na faixa de 615 UI/mL (Pawlotsky, 2003).

A transcrição mediada por amplificação (TMA) é um método isotérmico que se baseia em um ciclo contínuo de síntese de DNA a partir de RNA e da transcrição desse DNA para RNA. Ao final da reação, múltiplas cópias de RNA são produzidas. Trata-se de um método molecular que apresenta elevada sensibilidade (limite inferior de detecção de cerca de 5 a 10 UI/mL) (Sarrazin,

2002).

1.6.2.1 Métodos de Genotipagem

O sequenciamento nucleotídico de regiões específicas do genoma do HCV constitui o método mais acurado para a determinação dos genótipos, sendo as regiões do *core*, E1 e NS5B as mais estudadas e, após comparação com sequências de genótipos padrões, é determinado o genótipo e subtipo do HCV. A região 5'NC apresenta diferenças nucleotídicas suficientes para permitir a distinção entre os seis genótipos principais do vírus; contudo, não permite a determinação dos subtipos (Stuyver et al., 1994). Embora o método seja o mais preciso, é intensamente laborioso e economicamente caro, especialmente na utilização rotina de diagnóstico clínico. Outras técnicas de menor custo são: RFLP, na qual após a PCR da região 5' NC do HCV, o produto é submetido à digestão por enzimas de restrição, gerando fragmentos de tamanhos característicos para cada um dos genótipos virais (Davidson et al., 1995); RT-*nested* PCR, onde são utilizados oligonucleotídeos específicos para cada genótipo ou subtipo (Widell et al., 1994); e LiPA (*line immuno probe assay*), na qual sondas de oligonucleotídeos complementares a região 5' NC e do *core* do HCV encontram-se imobilizadas em fitas de nitrocelulose que hibridizam com o DNA biotilado gerado após reação de RT-PCR. Após a etapa de hibridização, adição de um conjugado e substrato cromógeno, intercalada por etapas de sucessivas lavagens, ocorre a formação de bandas características para os diferentes genótipos do vírus (Verbeeck et al., 2008).

1.7 ABORDAGEM TERAPÊUTICA

O tratamento das infecções pelo HCV, otimizado quanto ao tempo de administração e combinação dos fármacos, aumentou substancialmente as taxas de resposta virológica sustentada (RVS), definida como a ausência do HCV-RNA no soro ou plasma após 24 semanas do término do tratamento antiviral. Inicialmente, o IFN administrado em caráter monoterápico permitiu a obtenção de taxa de RVS de aproximadamente 20%. A Portaria do Ministério da Saúde no 221, de 13 de julho de 2011, preconiza a administração de IFN- α convencional em associação com RBV, um análogo de nucleosídeo da guanosina com boa absorção oral, para os pacientes infectados pelo genótipo 2 ou 3 e que não apresentam fatores preditivos de RVS baixa. A terapia com PEG-IFN α /RBV é utilizada para o tratamento de portadores do genótipo 1 ou 4, considerados os genótipos mais difíceis de se tratar, e para aqueles infectados pelo, genótipos 2 ou 3 que apresentam fatores preditivos de RVS baixa (Ministério da Saúde, 2011). A duração do tratamento para indivíduos é baseado no genótipo infectante, sendo de 24 semanas para os genótipos 2 e 3, e de 48

semanas para os genótipo 1 (Hadziyannis et al., 2004). O tratamento é eficaz em aproximadamente 80% dos pacientes infectados com o genótipo 2 ou 3, e em 50% dos pacientes com o genótipo 1 (Pawlotsky, 2009).

O Ministério da Saúde do Brasil, por meio da Portaria nº 25, de 12 de novembro de 2013, aprovou o Suplemento 1 do Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções nº 221, de 13 de julho de 2011 (Ministério da Saúde, 2013). Os inibidores telaprevir e boceprevir foram aprovados para o tratamento das infecções crônicas pelo genótipo 1 do HCV nos pacientes que não estejam coinfectados por qualquer outro genótipo do HCV; apresentem fibrose hepática avançada (metavir F3 ou F4) ou evidência menos invasiva da cirrose; doença hepática compensada, sem histórico de descompensação prévia e que não tenham sido tratados com inibidores de protease previamente. Entretanto, como causam a seleção de mutantes de resistência na NS3 protease, esses fármacos são administrados em conjunto com PEG-IFN α /RBV, visando reduzir o desenvolvimento de resistência (Sarrazin et al., 2007).

1.7.1. Fatores Preditivos para a Resposta ao Tratamento

1.7.1.1. Fatores do Hospedeiro

Os fatores preditivos associados à resposta terapêutica com PEG-IFN α /RBV são: o grau de fibrose hepática, esteatose, presença de resistência insulínica, idade avançada, sexo masculino e obesidade. No final do ano de 2009 e começo de 2010, quatro grupos de pesquisadores independentes demonstraram que variações na região gênica da IL28B são os principais preditores da resposta a terapia da hepatite C (Ge et al., 2009; Tanaka et al., 2009; Suppiah et al., 2009; Rauch et al., 2010) e da cinética viral durante a mesma (Rauch et al., 2010), além de representar um determinante importante para a resolução espontânea da infecção (Thomas et al., 2009). A presença do polimorfismo CC no gene da IL28B foi associada com taxas de resposta terapêutica mais elevadas, especialmente para os genótipos 1 e 4, quando comparadas com a presença dos polimorfismos CT ou TT. A mesma associação com resposta terapêutica foi reportada para os pacientes coinfectados pelo HIV (Medrano et al., 2010). Em indivíduos do grupo étnico afro-americano, são observadas respostas menos favoráveis ao tratamento, com taxas de RVS de 19 a 26% em estudos retrospectivos e prospectivos (Pearlman, 2006) Essa resposta terapêutica baixa pode ser explicada, pelo menos em parte, pelas diferenças nas frequências dos alelos entre as etnias. O polimorfismo CC é mais encontrado nos asiáticos, e menos na população afro-americana (Ge et al., 2009).

Durante a última década, a duração do tratamento e a dosagem apropriada do fármaco de

acordo com os fatores preditivos do paciente levaram a um aumento substancial nas taxas de RVS. Muitos desses fatores podem não desempenhar papel decisivo na terapia tripla baseada com inibidores de protease; por exemplo, a resistência insulínica não tem um efeito significativo sobre a eficácia terapêutica que inclui o telaprevir (Serfaty et al., 2012), enquanto que níveis altos de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) estiveram associados com taxas de RVS maiores, especialmente para os pacientes que responderam parcialmente e os que não responderam a terapia com PEG-IFN α /RBV (Ogawa et al., 2014).

1.7.1.2 Fatores Virais

O genótipo do HCV, a carga viral dos pacientes em pré-tratamento e a evolução das *quasispecies* virais representam importantes fatores de predição de RVS. Os genótipos do HCV representam o principal fator preditivo da resposta terapêutica, sendo que 1 e 4 mostram o pior prognóstico, estando associados a taxas mais baixas de RVS, quando comparados com os tipos 2 e 3 (Manns et al., 2001).

As taxas de RVS, após o tratamento com PEG-IFN α /RBV por 48 semanas, variaram de 41 a 52% em pacientes infectados pelo genótipo 1 do HCV (Hadziyannis et al., 2004). Entretanto, quando tratados com o mesmo esquema antiviral combinado por 24 ou 48 semanas, os pacientes infectados com o genótipo 2 ou 3 alcançaram RVS de 76 a 84%. Além disso, em pacientes portadores desses genótipos, o tratamento por um período mais curto (de 24 semanas), quando comparado com 48 semanas, apresentou taxas de RVS similares. Nesse grupo de pacientes, tratados com PEG-IFN α 2a ou 2b/RBV por 24 semanas, a taxa de RVS obtida foi de 81 a 84% *versus* 76 a 82% naqueles tratados por 48 semanas (Zeuzem et al., 2005).

Embora a carga viral basal não pareça influenciar a progressão da lesão hepática relacionada com o HCV, os pacientes que apresentam carga viral alta antes do início da terapia tendem a responder menos ao tratamento com PEG-IFN α /RBV (Mihm et al., 2006). Entretanto, a carga viral detém um menor valor preditivo de resposta para os genótipos 2 e 3, quando comparados com o genótipo 1 (Berg et al., 2003).

A ação de anticorpos neutralizantes submete a HVR1 de E2 a uma forte pressão seletiva, sendo a complexidade genética dessa região definida pelo número total de variantes dentro da população *quasispecies*. Uma maior heterogeneidade de sequências virais gera um reservatório de *quasispecies* mutantes que permite que o vírus escape da terapia antiviral. Alta complexidade de *quasispecies* virais foi observada em pacientes não-respondedores, quando comparados aos que alcançaram RVS (Pawlotsky et al., 1998).

Novos parâmetros parecem ser mais importantes para a terapia baseada em inibidores de

protease, como o subtipo do HCV. Pacientes infectados pelo subtipo 1a do HCV têm um risco maior de desenvolver resistência aos inibidores de protease durante a terapia tripla, quando comparados aos isolados do subtipo 1b. Isto se deve ao fato de que, para o subtipo 1a desenvolver a resistência R155K, apenas uma troca nucleotídica na posição 155 da protease é necessária, enquanto que, para os isolados do subtipo 1b, são necessárias duas trocas de nucleotídeos para produzir o mesmo efeito. O escape virológico durante a monoterapia com o inibidor de protease danoprevir (ITMN-191/RG7227) é dependente do subtipo do HCV que também é associado com a variação R155K (Lim et al., 2012).

1.8 NOVOS ANTIVIRAIS

A limitação de resposta terapêutica, o longo período de tratamento e os numerosos efeitos colaterais, assim como o crescente conhecimento da biologia molecular do HCV estimularam o desenvolvimento de novas terapias antiviral que atuam especificamente contra um alvo molecular viral. Em princípio, as proteínas estruturais e não-estruturais, o sítio de entrada ribossomal na região 5' NC (IRES), assim como os fatores do hospedeiro que interferem no ciclo biológico do HCV são alvos em potencial para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas. Vários inibidores específicos para a terapia antiviral da hepatite C foram desenvolvidos nestes últimos anos, inicialmente sob a denominação genérica de STAT-C (*Specifically Targeted Antiviral Therapy*), hoje são denominadas de DAAs (*Direct-Acting Antivirals*). Ao invés de estimular a resposta imune natural do organismo contra o vírus, os DAAs têm sua ação direcionada contra alvos moleculares do HCV.

1.8.1 NS3-4A protease

1.8.1.1 Inibidores da NS3-4A protease

O telaprevir é uma pequena molécula linear que se liga covalentemente com a serino protease NS3 (Lin et al., 2006), impedindo a atuação da mesma no processamento da poliproteína e, conseqüentemente, na replicação viral. Os aminoácidos Q41, T42, F43, H57, G58 e A59 da serino protease NS3 são os responsáveis pela formação da cavidade hidrofóbica da protease responsável pela acomodação do inibidor (Welsch et al., 2008). O boceprevir é um potente inibidor linear peptideomimético carboxiamida que teve a sua estrutura molecular modificada e otimizada quimicamente, de modo que a potência, disponibilidade, duração, segurança e as propriedades

farmacêuticas foram realçadas (Venkatraman et al., 2006). Ambos os inibidores são caracterizados pela notável atividade antiviral contra o genótipo 1 do HCV, se associando à protease viral de modo reversível, impedindo que clive a porção não-estrutural da poliproteína do HCV nas junções da poliproteína NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A e NS5A/NS5B. Contudo, o tratamento monoterápico resultou em uma rápida seleção de variantes de resistência, seguida por aumento na carga viral nesses pacientes. Estudos clínicos de fase II e III demonstraram que a adição de PEG-IFN α /RBV ocasionou a uma redução na seleção desses variantes e a um aumento substancial nas taxas de RVS quando comparados a terapia convencional com PEG-IFN α /RBV (Bacon et al., 2011; Jacobson et al., 2011; Poordad et al., 2011; Zeuzem et al., 2011).

1.8.1.2 Inibidores da NS3-4A protease de 2^a e 3^a geração

Outros 12 inibidores da NS3 protease encontram-se atualmente em diferentes fases de desenvolvimento clínico e irão aumentar significativamente as opções terapêuticas em um futuro próximo: ABT-450/r, faldaprevir, asunaprevir, GS-9256, vedroprevir (GS-9451), danoprevir (ITMN-191), MK-5172, vaniprevir (MK-7009), sonaprevir (ACH-1625), ACH-2684, narlaprevir (SCH900518) e simeprevir. Em geral, a atividade antiviral desses inibidores é comparável a do telaprevir, podendo apresentar vantagens terapêuticas em potencial, evidenciando uma melhor tolerabilidade ao tratamento, amplo espectro de atuação a diferentes genótipos do HCV, além de diferentes perfis de resistência (De Clercq, 2014).

ABT-450/r até agora tem sido utilizado em combinações terapêuticas com os inibidores ABT-267, ABT-072 e/ou ABT-333 com ou sem RBV (Asselah, 2013a; Poordad et al., 2013; Lawitz et al., 2013a).

Pacientes previamente tratados com faldaprevir e PEG-IFN α /RBV apresentaram maiores reduções na carga viral e menor frequência na detecção de variantes de resistência R155K e D168V quando comparados com monoterapia com faldaprevir (Berger et al., 2013). Os pacientes que tiveram aumento na carga viral durante a terapia combinada de faldaprevir e deleobuvir puderam ser ainda tratados com terapia tripla composta de faldaprevir e PEG-IFN α /RBV por 24 ou 48 semanas (Zeuzem et al., 2013a).

O inibidor asunaprevir apresenta atividade antiviral contra os genótipos 1 e 4, sendo especificamente captado pelos hepatócitos, o que evidencia a sua disposição hepatotrópica seletiva. (McPhee et al., 2012). Foi demonstrado uma resposta virológica mais elevada na dosagem de 200 mg quando combinado com PEG-IFN α /RBV (Bronowicki et al., 2013).

Os inibidores GS-9256 e vedroprevir (GS-9451) mostraram potente atividade antiviral contra os isolados do genótipo 1, atuando sinergicamente com PEG-IFN α /RBV (Sheng et al., 2012;

Yang et al., 2014).

O danoprevir (ITMN-191) foi selecionado como candidato para o desenvolvimento clínico por inúmeras razões: (I) apresenta atividade antiviral contra vários genótipos do HCV; (II) isolados mutantes a outros inibidores da NS3 são sensíveis a atuação do danoprevir; (III) atividade farmacológica em ensaios *in vitro*; (IV) disposição hepatotrópica em várias espécies animais (Jiang et al., 2014).

Com base nos resultados do estudo pré-clínico, o composto MK-5172 é amplamente ativo contra vários genótipos HCV e variantes de resistência clinicamente importantes, mostrando-se altamente adequado para incorporação em novos regimes livre de IFN (Summa et al., 2012). Diferentemente dos inibidores telaprevir, danoprevir e vaniprevir, o MK-5172 interage numa conformação única com a tríade catalítica da protease. Essa interação explica sua potência contra duas variantes-multi-resistentes aos fármacos, R155K e D168A, resultando em estratégias potenciais para projetar terapias robustas contra o HCV (Romano et al., 2012).

O tratamento combinado de vaniprevir/PEG-IFN α /RBV aumentou as taxas de RVS de pacientes do genótipo 1 previamente tratados PEG-IFN α /RBV. Os pacientes que falharam a terapia tripla apresentaram variantes de resistência nos sítios R155, A156 e D168 (Barnard et al., 2013).

O sofavprevir (ACH-1625) é um inibidor peptidomimético linear que se liga de forma não covalente a NS3 com alta especificidade. O tratamento monoterápico de curto prazo de indivíduos infectados pelo genótipo 1 resultou em redução $\geq 3,3$ log UI/ml da carga viral, além da demonstração de um declínio rápido e acentuado na carga viral nas primeiras 48 horas de tratamento (Agarwal et al., 2012). Além disso, foi associado a uma alta barreira genética a resistência (Fabrycki et al., 2013). O inibidor ACH-2684 promoveu uma potente supressão viral em pacientes infectados pelo genótipo 1 em pacientes com e sem cirrose (Lawitz et al., 2013b).

Pacientes tratados com narlaprevir (SCH900518) em combinação com PEG-IFN α /RBV apresentaram RVS por até 32 meses após o término do tratamento (Hotho et al., 2013)

Atualmente, o simeprevir é administrado em combinação com PEG-IFN α /RBV, o que promoveu um incremento substancial nas taxas de RVS, e permitiu que a maioria dos pacientes virgens de tratamento infectados pelo genótipo 1 fosse tratados por 24 semanas (Fried et al., 2013). Comparado aos inibidores telaprevir e boceprevir, o simeprevir provavelmente será um dos inibidores de protease de escolha para o tratamento das infecções pelo genótipo 1 do HCV com base na facilidade de uso, menor incidência de efeitos colaterais, incluindo *rash* cutâneo e anemia, e sem relatos de interações droga-droga. Efeitos colaterais inerentes aos regimes combinados com IFN podem ser problemáticos para os pacientes, especialmente aqueles considerados difíceis de tratar. Como as terapias anti-HCV tendem a evoluir para regimes de livres de IFN, o simeprevir potencialmente poderá ser combinado com outros agentes DAAs para o tratamento de infecção por

HCV (You et al., 2013).

1.8.2 Inibidores da NS4A

O inibidor ACH-806, antagonista da proteína NS4A, exerce a sua ação por alterar a composição e função do complexo da replicação viral. Os eventos iniciais da formação do complexo replicativo, a tradução e o processamento da poliproteína do HCV, não foram afetados pela atuação do inibidor. O ACH-806 provocou a formação de uma forma homodimérica da proteína NS4A de 14 kDa (p14), que reduziu a presença das proteínas NS3 e NS4A no complexo replicativo, devido a suas aceleradas degradações. Pequenas moléculas inibitórias, como o ACH-806, representam uma promessa para o desenvolvimento de novos fármacos que alteram a composição do complexo replicativo viral e auxiliam no esclarecimento das funções da proteína NS4A na replicação do HCV (Yang et al., 2013).

1.8.3 Inibidores da NS4B

A primeira classe de inibidores da proteína NS4B é exemplificada pelo fármaco clemizole, que inibe a interação entre a NS4B e o RNA do HCV. Os efeitos antivirais do inibidor clemizole foram altamente sinérgicos com os inibidores da NS3 protease boceprevir e telaprevir, sem apresentação de toxicidade. Além disso, a combinação de clemizole com o boceprevir diminuiu o aparecimento de mutantes de resistência, em comparação ao tratamento com apenas um desses fármacos, além de não ter sido detectada resistência cruzada entre os inibidores (Einav et al., 2010). Os compostos A2 e C4, segunda classe de inibidores da NS4B, afetam a interação entre a proteína NS4B e a rede membranosa, comprometendo a replicação do genoma do HCV associada à membrana (Cho et al., 2010).

O AP80978 apresentou atividade antiviral contra os subtipos 1a e 1b, porém não inibiu o subtipo 2a. Esse inibidor, com potencial para ser otimizado em um efetivo fármaco anti-HCV, não apresentou toxicidade quando testado em ensaios *in vitro* e mostrou potência similar aos inibidores telaprevir e ciclosporina A (Dufner-Beattie et al., 2014).

Por sua vez, o inibidor PTC725 se mostrou completamente ativo contra variantes de resistência aos inibidores da NS3 protease e da NS5B polimerase, além de apresentar efeitos sinérgicos com IFN α ; aditivos/sinérgicos com o inibidor de polimerase VX-222 e aditivos com o inibidor de protease boceprevir (Gu et al., 2013).

1.8.4 Inibidores da NS5A

Atualmente, vários fármacos inibidores da proteína NS5A estão sendo avaliados e se encontram em diferentes estágios de ensaios clínicos; fase III (daclastavir, ledipasvir, ABT-267), fase II (ACH-3102, samatasvir, MK-8742, AZD-7295, GSK2336805, PPI-668, GS-5816), fase I (ACH-2928, a EDP-239, PPI-461) (disponível em <http://www.clinicaltrials.gov>).

Dentre os inibidores que se encontram em fase III, o daclatasvir (DCV), denominado anteriormente de BMS-790052, é um dos inibidores da proteína NS5A mais promissores, demonstrando atividade antiviral, tanto na terapia tripla, como em terapias livres de IFN (Fontana et al, 2012; Suzuki et al, 2013). Embora a barreira genética para a resistência seja relativamente baixa, o tratamento monoterápico levou a uma queda inicial acentuada dos níveis de concentração do RNA do HCV (Gao et al., 2010). Seu mecanismo de atuação ainda é desconhecido, porém estudos recentes apontaram que o DCV se liga na região aminoterminal da NS5A e desregula sua fosforilação, bloqueia ambas as funções cis e trans da proteína (Fridell et al. 2011), além de promover acumulação da poliproteína do HCV (Qiu et al. 2011). De uma forma geral, o DCV é um inibidor promissor, tanto para a terapia tripla, quanto para futura combinação de DAAs na ausência de IFN.

A terapia monoterápica com o inibidor ABT-267 durante 3 dias demonstrou uma redução na carga viral de até 3.10 log IU/mL em indivíduos infectados pelo genótipo 1 (DeGoey et al., 2014), além de demonstrar atividade antiviral contra todos os genótipos do HCV. No tratamento com ledispavir por três dias foram observados reduções de 3 log IU/mL da carga viral em indivíduos infectados pelos subtipos 1a ou 1b (Wong et al., 2013), enquanto que 100% dos pacientes tratados com a combinação de ledispavir e o inibidor da NS5B polimerase sofosbuvir mantiveram a resposta virológica na 12^a semana após o término do tratamento (Link et al., 2014).

Dentre os inibidores em fase II, o PPI-668 e ACH-3102 apresentam atividade antiviral pan-genotípica. Foram observados após cinco dias de tratamento com o inibidor PPI-668 reduções de 3.54-3.75 log IU/mL na carga viral de indivíduos infectados pelo genótipo 1 (Lalezari et al., 2012). Entretanto, a terapia com o inibidor AZD-7295 levou a redução de 2 log IU/mL apenas nos indivíduos infectados pelo subtipo 1b, enquanto que nenhuma redução foi observada para o subtipo 1a ou genótipo 3 (Gane et al., 2010a). O inibidor MK-8742 mostrou-se ativo contra os genótipo 1-4 do HCV (Liu et al., 2012), além de ser eficaz contra mutantes de resistência ao inibidor DCV (Coburn et al., 2013).

O inibidor ACH-2928, que se encontra em fase I do desenvolvimento clínico, levou a uma redução de 3.68 log IU/mL na carga viral do HCV após três dias de tratamento (Vince et al., 2012).

1.8.5 Inibidores da NS5B polimerase

Duas classes de inibidores da NS5B estão em desenvolvimento: análogos nucleosídeos (NIs) e não-nucleosídeos (NNIs). Os inibidores análogos NIs como o sofosbuvir (GS7977), GS-938, mericitabine (RG7128), BCX-5191, VX-135, IDX184 e TMC649128 mimetizam substratos naturais da polimerase, causando término e/ou aumentam a frequência de erros à medida que são incorporados na cadeia de RNA viral nascente. Geralmente, demonstram eficácia similar contra todos os genótipos do HCV, uma vez que o sítio ativo da polimerase é conservado. Por sua vez, os inibidores NNIs atuam se ligando a diferentes alvos no domínio da polimerase, prevenindo a transição conformacional enzimática requerida para o início da síntese do RNA; os inibidores deleobuvir (BI-207127), BMS-791325 e TMC-647055 se ligam ao domínio *Thumb I* da polimerase, os inibidores VX-222, GS-9669, VCH-916, VCH-759 se ligam ao domínio *Thumb II* e, por sua vez, os inibidores ABT-072, ABT-333, tegobuvir (GS-9190) e setrobuvir (ANA598) se ligam ao domínio *Palm* (Membreno e Lawitz, 2011). Diferentemente dos inibidores análogos nucleosídeos, os não-nucleosídeos apresentam eficácia limitada entre os diferentes genótipos e subtipos do HCV (Glenn et al., 2006).

1.8.5.1 Inibidores análogos nucleosídeos

O sofosbuvir representa uma opção promissora para o tratamento das infecções pelo HCV. Vários estudos (Neutrino, Fission, Positron e Fusion) reportaram que a RVS foi de até 90-100% para pacientes infectados pelos genótipos 1-6 após uso da combinação terapêutica de sofosbuvir e PEG-IFN α /RBV por 12 semanas (Asselah, 2013b; Gane et al., 2013; Jacobson et al., 2013; Lawitz et al., 2013c). Além disso, pacientes infectados pelo genótipo 1, em diferentes estágios de fibrose hepática, apresentaram uma RVS de até 68% após terapia dupla com sofosbuvir e RBV por 24 semanas (Osinusi et al., 2013). Embora o sofosbuvir tenha efeitos antivirais pangenótipos, o fármaco pode ser menos eficiente para os isolados do genótipo 3, especialmente nos pacientes cirróticos (Asselah, 2013b).

Assim como o sofosbuvir, o inibidor GS-938 (previamente denominado PSI-352938) apresenta atividade antiviral contra vários subtipos do HCV e elevada barreira genética à resistência (Reddy et al., 2010; Lam et al., 2011a; Lam et al., 2011b). Ensaios *in vitro* demonstraram que variantes que conferem resistência a inibidores nucleosídeos, como as alterações S282T ou S96T/N142T, e a várias classes de inibidores não nucleosídeos, permaneceram sensíveis a inibição pelo GS-938 (Lam et al., 2011b), porém a combinação de três mudanças de aminoácidos (S15G/C223H/V321I) conferiu um elevado nível de resistência em células contendo o replicon

JFH-1 do genótipo 2 (Lam et al., 2011a). A administração dos inibidores GS-938 e sofosbuvir por 14 dias em terapia livre de IFN forneceu a primeira evidência da viabilidade da combinação de dois inibidores nucleosídeos para o tratamento das infecções pelo genótipo 1 do HCV sem efeitos colaterais graves e detecção de variantes de resistência (Lawitz et al., 2013d).

A mericitabina (RG7128) se mostrou efetiva contra todos os genótipos do HCV, tornando-se um dos principais inibidores em uma eventual terapia combinada livre de IFN (Guedj et al., 2012). Até o momento, os variantes de resistência S282T, identificados em ensaios *in vitro*, não foram detectados em pacientes antes e após terapia tripla com mericitabina/PEG-IFN α /RBV (Pawlotsky et al., 2012) e em regimes terapêuticos combinados com o inibidor de protease danoprevir (RG7227/ITMN191) por 14 dias (Gane et al., 2010b).

O VX-135 também possui atividade antiviral pangenotípica com nenhuma resistência cruzada a outros inibidores DAAs identificadas em ensaios *in vitro*. Respostas virológicas similares foram observadas nos pacientes tratados em regime monoterápico com o inibidor VX-135, em combinação dupla com RBV e até mesmo nos pacientes cirróticos do genótipo 1, onde após sete dias de tratamento, os pacientes cirróticos demonstraram uma redução média de 4,08 log IU/mL na carga viral (Marcellin et al., 2013)

O TMC 649128 é um inibidor nucleosídeo em estágios iniciais de desenvolvimento clínico, sendo que, na fase Ib, o fármaco deverá ser administrado em caráter monoterápico ou em combinação com PEG-IFN α /RBV em pacientes infectados pelo genótipo 1 (De Clercq., 2014).

1.8.5.2 Inibidores análogos não nucleosídeos

O VX-222 se liga ao domínio *thumb* II da NS5B polimerase do HCV, mostrando efeito inibitório na replicação do HCV, provavelmente devido a sua afinidade pela ligação alostérica a polimerase (Winqvist et al., 2013). Sua atividade inibitória é afetada moderadamente pela variante viral M423T, e substancialmente pela mutação I482L (Yi et al., 2012).

ABT-072 e ABT-333 são dois NNIs estruturalmente relacionados. Eles foram desenvolvidos para o tratamento combinado com outros fármacos anti-HCV, principalmente PEG-IFN α /RBV, mas também com outros DAAs (De Clercq., 2014).

Deleobuvir é um NNI que se liga não covalentemente ao domínio *thumb* I da polimerase de forma reversível. Demonstrou uma rápida e acentuada atividade antiviral, quando administrado em combinação com PEG-IFN α /RBV (Larrey et al., 2012), e potencial terapêutico em regimes livres de IFN, apresentando taxas de RVS após tratamento combinado com Faldaprevir e RBV de 52 a 69% nas infecções crônicas pelo genótipo 1 (Zeuzem et al., 2013b).

O tegobuvir (GS-9190) é um novo NNI que exerce atividade antiviral contra isolados do

genótipo 1. O fármaco não inibiu a atividade enzimática da NS5B em ensaios bioquímicos *in vitro*, sugerindo um mecanismo antiviral mais complexo que envolve componentes celulares. O tegobuvir requer ativações químicas para subsequente interação direta com a proteína NS5B. Essa ativação metabólica prévia o distingue de outras classes de NNIs (Hebner et al., 2012). Em um estudo clínico baseado na administração tripla do tegobuvir e PEG-IFN α /RBV, a maioria dos pacientes que não respondeu à terapia apresentou a variação de resistência Y488H (Hebner et al., 2011). Ainda assim, ensaio *in vitro* com o subtipo 1b identificou várias variantes (C316Y, Y448H, Y452H e C445F) que contribuíram para a resistência ao inibidor (Shih et al., 2011).

1.8.6 Fatores de Hospedeiro como Alvo para o Tratamento

1.8.6.1 Inibidores da Ciclofilina

O HCV depende de vários fatores do hospedeiro durante o seu ciclo de vida. Ciclofilinas são proteínas celulares que desempenham um papel importante na replicação do HCV. A ciclofilina B (CypB) tem um papel regulador na atividade da NS5B polimerase viral, estimulando a síntese de RNA (Heck et al., 2009), enquanto que a ciclofilina A (CypA) seria um cofator essencial para a infecção do HCV e um mediador principal da resistência da ciclosporina *in vitro* (Yang et al., 2008).

Ensaio clínico de fase II avaliaram o tratamento combinado de PEG-IFN α -2a/RBV com diferentes doses do inibidor de ciclofilina B alisporivir (Debio-025) por 29 dias em pacientes virgens de tratamento infectados pelo genótipo 1, 2, 3 ou 4. A redução média da carga viral no final da terapia foi de 4,75 log IU/mL com o uso de 1000 mg, 4,61 log IU/mL com dosagem de 600 mg e 1,8 log IU/mL na dose de 200 mg de alisporivir, comparada a redução no grupo monoterápico de 2,49 log IU/mL (PEG-IFN α -2a) e 2,2 log IU/mL (1000 mg de alisporivir). Nenhuma diferença na atividade antiviral foi observada entre os diferentes genótipos do HCV. A alta barreira genética para o desenvolvimento de resistência do alisporivir e sua ampla atividade antiviral entre os diferentes genótipos do HCV destacam o potencial de fármacos que tem como alvo proteínas do hospedeiro (Flisiak et al., 2009).

1.8.6.2 Silibina

Silimarina é um extrato da planta cardo de leite (*Silybum marianum*), planta espinhosa nativa do Mediterrâneo, com atividade antioxidante, é utilizada para tratar hepatite C crônica e outras doenças hepáticas. Silibina é uma dos seis maiores flavonoglicanos na silimarina. A silibina inibe o HCV em várias etapas do seu ciclo de replicação (Ahmed-Belkacem A, et al. 2010; Wagoner J, et al. 2010). Além disso, a silibina administrada por via intravenosa em pacientes não

respondedores resultou em um declínio do HCV RNA entre 0,55 e 3,02 log IU/mL em sete dias e a um decaimento adicional que variou entre 1,63 e 4,85 log IU/ml, após a administração de silibina com PEG-IFN α -2a/RBV, em igual período de tempo (Ferenci P, et al. 2008).

1.8.6.3 Miravirsen

Ensaio *in vitro* demonstrou que o microRNA-122 (miR-122) é essencial para a acumulação de RNA do HCV em cultivo de células hepáticas (Lanford et al., 2010), possuindo papel crítico para o ciclo replicativo viral uma vez que se liga a região 5'UTR. Miraservin é um oligonucleotídeo antisense que tem como alvo o miRNA-122 e, portanto, previne a sua ligação ao genoma do HCV. Em um estudo de fase IIa, injeções subcutâneas semanais de miravirsen reduziram a concentração sérica de HCV RNA em até 2,7 log IU/mL, indicando que a inibição do miRNA-122 pode ser uma promissora abordagem para a terapia antiviral.

1.9 RESISTÊNCIA AOS INIBIDORES DAAs

Os DAAs são considerados os principais agentes para o desenvolvimento de fármacos que atuam diretamente contra o HCV; contudo, o surgimento de isolados virais resistentes pode comprometer o sucesso terapêutico. As altas taxas de produção de genomas virais associadas à alta frequência de mutações que o genoma do HCV apresenta durante o prolongado período de infecção fazem com que, no indivíduo infectado, a população viral seja constituída de uma mistura complexa de variantes, conhecidas como *quasispecies* virais. Assim, novas variantes estão sendo constantemente gerados, sendo provável que alguns contendo duas ou mais mutações sejam produzidos a cada dia.

Os Quadros 1.1, 1.2, 1.3 e 1.4 relacionam os principais sítios nas proteínas NS3, NS4 e NS5, respectivamente, nos quais a ocorrência de mutações pode conferir resistência aos inibidores DAAs.

Quadro 1.1 Variações na proteína NS3 associadas à resistência aos inibidores de protease

	V36A/M	T54S/A	V55A/K	Q80R/K	R155K/T/Q	A156S/D/T/V	D168A/V/T/H	V170A/T
Telaprevir, GT 1a	M				K/T			
Telaprevir, GT 1b	A				Q			
Boceprevir, GT 1a					K/T			
Boceprevir, GT 1b								
Faldaprevir								
Danoprevir								
Vaniprevir								
Simeprevir								
Asunaprevir								
GS-9451/9256								
ABT-450								
MK-5172								
ACH-1625							*	

* mutação associada com resistência *in vitro*

Quadro 1.2 Variações na proteína NS4B associadas à resistência aos inibidores da NS4B

	W55R	H94R/N	F98V/L/C	V105M	Q203R	R214Q	D228N
Anguizole							
AP80978			V/L				
Clemizole							
PTC725			L/C				
Silibina			L				

Quadro 1.3 Posições de aminoácidos na proteína NS5A associadas à resistência aos inibidores da NS5A

	L23F	M28A/T/V	Q30E/H/ R/K	R30Q	L31M/V/F	P32L	H58D/P/N	P58S	E62D	Y93C/H/N /D	I280V
Daclatasvir GT 1a		A/T					P*/D		*	C/H/N	
Daclatasvir GT 1b	*			*						C/H/N	
Ledipasvir GT 1a			E		M						
Ledipasvir GT 1b										C/H	
Samatasvir GT 1a		V									
Samatasvir GT 1b					M					H	
GSK2336805 GT 1a					M						
GSK2336805 GT 1b											
PPI-668 GT 1a		V/T					D/N				
PPI-668 GT 1b					M						
ACH-3102		V/T			M					C/D/H	

* mutações secundárias

Quadro 1.4 Posições de aminoácidos na proteína NS5B associadas à resistência aos inibidores da NS5B

	S282T	L159F	C316Y /N	L320F	S368T	M414 T/I/V/ L	A421V	L419S	R422K	M423 T/I/V/ T	C445F	Y448C /H	I482L/ V/T	A486V /I/T/M	V494A	P495S/ Q/L/A/ T	V499A	G554D /S	S556G	D559G
Mericitabina																				
Sofosbuvir	*																			
IDX184	*																			
BMS986094	*																			
BI207127																				
BMS791325																				
VX-222										*			*							
GS-9669													*	*	*					
Setrobuvir					*	*												*	*	*
ABT-333			*	*	*	*						*						*	*	*
ABT-072			*	*	*	*						*							*	
Tegobuvir			*								*	*								

* mutação associada com resistência *in vitro*

1.10 NOVAS COMBINAÇÕES TERAPÊUTICAS

Numerosos ensaios clínicos investigam o potencial da combinação terapêutica com diferentes DAAs. Tal combinação com diferentes perfis de barreiras a resistência deve resultar em uma redução substancial do risco de detecção de variantes virais emergentes. A associação de inibidores análogos nucleosídeos e de ciclofilina mostram uma alta barreira genética ao desenvolvimento de resistência e podem, portanto, ser a chave para a combinação efetiva de DAAs. Por outro lado, os inibidores da NS3 protease e da NS5A apresentam uma baixa barreira genética, mas em vista de suas eficácias antivirais, podem vir a ser combinados com análogos nucleosídeos ou com inibidores da ciclofilina. Devido a pouca eficácia antiviral e baixa barreira genética à resistência, a participação dos inibidores não-nucleosídeos na terapia precisa ser elucidada, porém como esses inibidores se ligam a diferentes sítios alostéricos da polimerase, o uso simultâneo de vários inibidores não-nucleosídeos poderia representar uma vantagem em potencial.

1.10.1 Terapia Quádrupla

A abordagem terapêutica quádrupla é baseada na utilização do PEG-IFN α e ribavirina combinada com dois agentes DAAs de diferentes classes. Dados preliminares de resposta virológica sustentada de um pequeno, mas altamente informativo, ensaio clínico serviu de prova conceitual para o potencial da terapêutica quádrupla em pacientes que não responderam a terapia com PEG-IFN α /RBV. Nesse estudo de fase II, 11 pacientes não respondedores infectados pelos subtipos 1a ou 1b foram tratados com a combinação de BMS-790052 (inibidor da NS5A), BMS-650032 (inibidor de protease) e PEG-IFN α /RBV por 24 semanas. Embora o número de pacientes incluídos nesse ensaio clínico tenha sido limitado, todos alcançaram RVS, sendo substancialmente maior do que à observada (30%) após a terapia tripla baseada no uso do telaprevir em pacientes não-respondedores.

1.10.2 Terapia oral

O primeiro ensaio clínico livre de IFN (INFORM-1) avaliou a combinação de inibidores da NS5B polimerase (RG7128) e da NS3 protease (ITMN191). Os pacientes foram tratados por até duas semanas. A concentração do RNA HCV decaiu até 5,2 log IU/mL. O aumento na carga viral do vírus foi visto apenas para um paciente, e a detecção de variantes de resistência para esses inibidores não foi detectada. O HCV RNA tornou-se indetectável em até 63% dos pacientes virgens de tratamento. Contudo, a questão se a RVS poderia ser alcançada com a combinação terapêutica de diferentes agentes DAAs sem PEG-IFN α /RBV não foi respondida nesse estudo. Em um ensaio

clínico de fase II, que contou com o uso combinado de inibidores da proteína NS5A (daclatasvir) e da NS3 protease (BMS-650032) por 24 semanas, em 10 pacientes não respondedores a terapia com PEG-IFN α /RBV infectados pelo genótipo 1, a RVS foi alcançada 24 semanas após o término do tratamento em 36% dos pacientes. A recaída viral foi observada apenas nos indivíduos infectados pelo subtipo 1a, sendo detectados em todos eles variantes de resistência para ambos os agentes DAAs. Apesar do curto período de administração dos fármacos, esse ensaio clínico constituiu a prova conceitual de que a RVS pode ser alcançada em regimes terapêuticos livres de IFN.

Um ensaio clínico comparou os efeitos da combinação de um inibidor da NS5B polimerase não-nucleosídeo (tegobuvir) e da NS3 protease (GS-9256) com e sem RBV em pacientes virgens de tratamento infectados pelo genótipo 1. Após 28 dias de tratamento, a combinação tripla levou a um declínio mais acentuado da carga viral (5,1 log IU/mL) quando comparado ao tratamento que contou apenas com a combinação de tegobuvir e GS-9256 (4,1 log IU/mL) (Zeuzem et al., 2012).

2 JUSTIFICATIVA

O HCV apresenta distribuição mundial e, segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 130 milhões de pessoas encontram-se cronicamente infectadas pelo HCV (Lavanchy et al, 2009). Quase 85% dos indivíduos infectados falham em obter a eliminação espontânea do vírus e se tornam portadores crônicos (Wasley e Alter, 2000). A terapia tripla com a incorporação dos inibidores de protease telaprevir ou boceprevir à terapia vigente baseada no uso de PEG-IFN α /RBV resultou em um aumento substancial nas taxas de RVS em pacientes infectados pelo genótipo 1, representando um grande avanço no tratamento das infecções crônicas. Um dos fatores limitantes para a eficácia da terapia viral específica é o surgimento de resistência às drogas antivirais, que por sua vez, são causadas por mutações específicas nas proteínas do vírus. Além disso, a terapia tripla não é indicada para pacientes que apresentam contraindicações ao PEG-IFN α ou RBV. Torna-se evidente a necessidade do desenvolvimento e implementação de novos fármacos terapêuticos contra diferentes alvos moleculares do HCV, eficazes e que ocasionem menos efeitos colaterais.

A elucidação da variação genética de sequências alvo de novos agentes DAAs em isolados clínicos auxiliará no desenvolvimento mais eficaz de inibidores contra a infecção pelo HCV, visto que, a presença de variantes virais com perfis de resistência em um mesmo paciente pode representar um problema potencial para o sucesso terapêutico. Da mesma forma, na medida em que mais inibidores façam parte de ensaios clínicos, a relação entre a sequência de aminoácidos e sua eficácia *in vivo* poderá ser uma informação crucial no futuro, pois indicaria se um único agente antiviral, ou a combinação de dois ou mais seria necessária para alcançar o êxito terapêutico. Além disso, a prova conceitual que regimes terapêuticos “livres de IFN” possam eliminar a infecção pelo HCV foi recentemente descrita (McPhee et al., 2011). Entretanto, a combinação terapêutica de inibidores pode estar associada a efeitos colaterais, interações fármaco-fármaco e com o surgimento de variantes virais resistentes, estando, portanto, o regime “livre de IFN” ideal passível de definição.

Até o presente momento, há poucos relatos científicos sobre a variabilidade genômica das regiões do HCV envolvidas com resistências aos agentes DAAs no Brasil e na América Latina, o que mostra a necessidade de obtenção de dados mais detalhados sobre a magnitude da variabilidade genética do HCV em isolados circulantes em nosso meio. Nessa abordagem, pretende-se por sequenciamento dos genes não-estruturais NS3, NS4 e NS5A e NS5B do HCV obter informações destas regiões gênicas onde eventuais mutações de resistência possam ser identificadas e que também poderiam contribuir para o desenvolvimento de novos inibidores DAAs. Além disso,

futuramente, os dados obtidos também poderão ser utilizados para determinar os efeitos da diversidade genética na estrutura enzimática viral utilizando técnicas de modelagem e dinâmica molecular.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a variabilidade genética das regiões NS3, NS4B, NS5A e NS5B do genoma do HCV, por sequenciamento nucleotídico, em amostras de soro de indivíduos com hepatite crônica virgens de tratamento antiviral, visando identificar mutações potencialmente relacionadas com a resistência aos novos antivirais para a terapia da hepatite C.

3.2 OBJETOS ESPECÍFICOS

- Amplificar e sequenciar os genes NS3, NS4B, NS5A e NS5B do genoma do HCV dos subtipos 1a e 1b de amostras de pacientes com hepatite C crônica que não tenham sido submetidos anteriormente a qualquer terapia antiviral;
- Identificar, nas regiões sequenciadas, mutações de aminoácidos associadas à resistência aos novos antivirais específicos (DAAs) para o tratamento da hepatite C crônica;
- Analisar o grau de relacionamento genético entre as sequências dos isolados do subtipo 1a do HCV circulantes no Brasil e em outros países;
- Identificar os padrões característicos de aminoácidos nas sequências dos isolados brasileiros dos subtipos 1a e 1b do HCV em relação aos de outras regiões geográficas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

A população de estudo consistiu de pacientes com hepatite C crônica infectados pelo subtipo 1a ou 1b, selecionados antes do tratamento antiviral com IFN/RBV, atendidos no Ambulatório de Hematologia do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG) da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO). As amostras de soro destes pacientes fazem parte da soroteca do Laboratório de Hepatites Virais e estão acondicionadas a -20°C . Essas amostras foram previamente genotipadas utilizando-se o conjunto de reagentes LiPA (Bayer, Ghent, Bélgica) e fazem parte do projeto contemplado com a aprovação pela comissão de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, segundo resolução 196/96, sob nº 32/2004.

4.2 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL

As amostras de soro foram submetidas à extração do ácido nucleico viral utilizando-se o conjunto de reagentes comercial QIAamp Viral RNA minikit (QUIAGEN, Maryland, EUA), conforme as instruções do fabricante e descritas a seguir:

1. Em microtubos de 1,5 mL devidamente identificados para cada amostra, foram adicionados 560 μL da solução RNA carreador reconstituída com tampão AVL;
2. Para cada microtubo correspondente, foram aplicados 140 μL de soro;
3. Os microtubos foram agitados em vórtex por um tempo estimado de 10 segundos;
4. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente ($20\text{-}25^{\circ}\text{C}$) durante 10 minutos;
5. Para cada microtubo, foram aplicados 560 μL de etanol a 96%;
6. Os microtubos foram agitados em vórtex por um tempo estimado de 10 segundos;
7. Foram transferidos 630 μL da solução presente nos microtubos para as mini colunas com membrana de sílica gel;
8. As mini-colunas foram colocadas em tubos coletores de 2 mL e centrifugadas a 8000 rpm durante 1 minuto à temperatura ambiente;
9. Os tubos coletores foram descartados e outros limpos recolocados;
10. Para o processo de lavagem, foram aplicados nas respectivas colunas 500 μL do tampão AW1, com posterior centrifugação a 8000 rpm durante 1 minuto;
11. Os tubos coletores de 2 mL foram novamente descartados e outros limpos recolocados;

12. Um segundo processo de lavagem foi efetuado com a adição de 500 µL do tampão AW2, com posterior centrifugação a 14000 rpm durante 3 minutos;

13. Os tubos coletores foram mais uma vez descartados e outros limpos recolocados para uma nova centrifugação a 14000 rpm durante 1 minuto;

14. As mini colunas foram encaixadas em microtubos de 1,5 mL identificados;

15. Foram aplicados nas membranas das mini-colunas 60 µL de tampão AVE, com posterior centrifugação a 8000 rpm durante 1 minuto;

16. As mini colunas foram descartadas e o volume total de RNA viral contidos nos microtubos foi utilizado para a obtenção do DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa.

4.3 TRANSCRIÇÃO REVERSA E AMPLIFICAÇÃO DO ÁCIDO NUCLÉICO

O conjunto de reagentes Superscript™ III One Step RT-PCR system (Invitrogen, Califórnia, EUA), contendo as enzimas Superscript™ III RT e Platinum® taq DNA polimerase, foi utilizado para a transcrição reversa e subsequente amplificação por PCR (RT-PCR) do RNA viral extraído de amostras de soro. Oligonucleotídeos iniciadores de síntese para as regiões NS3, NS4B, NS5A e NS5B específicos para os subtipos 1a e 1b foram utilizados em reações distintas.

No Quadro 4.1, são apresentadas as características dos oligonucleotídeos utilizados para as reações de transcrição reversa, PCR e *nested*-PCR (PCR2).

Quadro 4.1 Oligonucleotídeos empregados para o estudo dos genes não estruturais

Iniciadores	Polaridade	PCR	Posição no genoma	Subtipo	Sequências (5' – 3')
Gene NS3 – Subtipo 1a e 1b					
P1aF1	<i>sense</i>	PCR1	3266 – 3286	1a	CTT YTC CCR RAT GGA GAC CAA
P1aR1	<i>antisense</i>	PCR1	4093 – 4074	1a	ACC TTA TAG CCC TGR GCY GC
P1aF2	<i>sense</i>	PCR2	3288 – 3307	1a	CTC ATC ACG TGG GGG GCR GA
P1aR2	<i>antisense</i>	PCR2	4057 – 4038	1a	TTG GTG CTC TTR CCG CTG CC
P1bF1	<i>sense</i>	PCR1	3257 – 3279	1b	GCC CGT CRT CTT CTC TGA CAT GG
P1bR1	<i>antisense</i>	PCR1	4090 – 4071	1b	TTG TAC CCT TGG GCT GCA TA
P1bF2	<i>sense</i>	PCR2	3289 – 3308	1b	TCA TCA CCT GGG GGG CAG AC
P1bR2	<i>antisense</i>	PCR2	4054 – 4035	1b	GTG CTC TTG CCG CTG CCA GT
Gene NS4B – Subtipo 1a e 1b					
NS4b1aF1	<i>sense</i>	PCR1	5304 → 5317	1a	GAG GTC GTC ACG AGY AC
NS4b1aR1	<i>antisense</i>	PCR1	6346 → 6333	1a	AGY TGY GGC ATG AGC TT
NS4b1aF2	<i>sense</i>	PCR2	5456 → 5475	1a	CGA TGA RAT GGA AGA GTG CT

NS4b1aR2	<i>antisense</i>	PCR2	6296 → 6277	1a	GCA TAT CCA GTC CCA GAT GT
NS4b1bF1	<i>sense</i>	PCR1	5302 → 5317	1b	AGG TCG TCA CGA GCA C
NS4b1bR1	<i>antisense</i>	PCR1	6327 → 6309	1b	GGA GCC AGG TCT TGA AAT C
NS4b1bF2	<i>sense</i>	PCR2	5456 → 5474	1b	CGA TGA RAT GGA RGA GTG Y
NS4b1bR2	<i>antisense</i>	PCR2	6296 → 6280	1b	GCA TAT CCA GTC CCA AA
Gene NS5A – Subtipo 1a e 1b					
NS5a1aF1	<i>sense</i>	PCR1	6015 → 6031	1a	CTY GTR GTC GGY GTR GT
NS5a1aR1	<i>antisense</i>	PCR1	7770 → 7747	1a	GTC TGT CAA ATG TGA CTT TCTTCT
NS5a1aF2	<i>sense</i>	PCR2	6076 → 6094	1a	CAG TGC ART GGA TGA ACC G
NS5a1aR2	<i>antisense</i>	PCR2	7612 → 7593	1a	TAR GAC ATY GAG CAR CAC AC
NS5a1bF1	<i>sense</i>	PCR1	6096 → 6108	1b	CGG CTG ATA GCG TTC G
NS5a1bR1	<i>antisense</i>	PCR1	7770 → 7756	1b	GCA GTC TGT CAA AGG TRA
NS5a1bF2	<i>sense</i>	PCR2	6188 → 6204	1b	YAR CCT YAC CAT CAC YC
NS5a1bR2	<i>antisense</i>	PCR2	7621 → 7602	1b	GTC CAY GTR TAG GAC ATY GA
Gene NS5B – Subtipo 1a e 1b					
NS5b1aF1	<i>sense</i>	PCR1	7539 → 7554	1a	CTY AGC GAC GGR TCR T
NS5b1aR1	<i>antisense</i>	PCR1	9362 → 9347	1a	GAG GTA GAT GCC TAC C
NS5b1aF2	<i>sense</i>	PCR2	7591 → 7607	1a	TCG TGT GYT GCT CRA TG
NS5b1aR2	<i>antisense</i>	PCR2	9335 → 9318	1a	CAG GAG TAG GCA RAA CCA
NS5b1bF1	<i>sense</i>	PCR1	7551 → 7567	1b	TCY TGG TCT ACY GTR AG
NS5b1bR1	<i>antisense</i>	PCR1	9358 → 9342	1b	TAG ATG CCT ACY CCY AC
NS5b1bF2	<i>sense</i>	PCR2	7596 → 7612	1b	TGC TGY TCR ATG TCC TA
NS5b1bR2	<i>antisense</i>	PCR2	9341 → 9324	1b	RGA RAG TAG GAG TAG GCA

R = A, G Y = C, T

4.4 PROCEDIMENTOS PARA RT-PCR

Para a transcrição reversa com subsequente amplificação da região-alvo por PCR, foram preparadas distintas reações de mistura (Quadro 4.2), contendo o conjunto de reagentes (2X Reaction Mix, SuperScript™ III RT / Platinum® Taq DNA Pol e Água Destilada DNase, RNase free) e combinações dos oligonucleotídeos iniciadores do PCR1 de acordo com o subtipo da amostra, para a amplificação dos genes NS3, NS4B, NS5A e NS5B.

Quadro 4.2 Reagentes da RT-PCR (*One-Step*)

Reagentes	Volume por reação (1X)
2X Reaction Mix	12,5 µL
Oligonucleotídeos <i>sense</i> (10 µM)	0,50 µL
Oligonucleotídeos <i>antisense</i> (10 µM)	0,50 µL
SuperScript™ III RT / Platinum® Taq DNA Pol (4U/µL)	1,0 µL
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor 40 U/µL	1,0 µL
Água Destilada DNase, RNase <i>free</i>	4,5 µL

Foram acrescentados 5 µL do RNA do HCV de cada amostra aos 20 µL da mistura da reação de RT-PCR correspondente. As amostras foram colocadas em termociclador (Perkin-Elmer 2400, Massachusetts, EUA) e submetidas a seguidos ciclos de temperatura, conforme descrito abaixo:

4.4.1 Ciclo de temperatura para a RT-PCR

Transcrição Reversa:	45°C durante 45 minutos
Desnaturação inicial:	94°C durante 2 minutos
30 Ciclos:	{ 94°C durante 15 segundos - desnaturação 53°C durante 30 segundos - hibridização* 68°C durante 70 segundos - extensão**
Extensão final:	68°C durante 5 minutos

* para a amplificação do gene NS5B de ambos os subtipos, a temperatura utilizada foi de 47°C e, para o gene NS5A do subtipo 1b, a temperatura foi de 50°C.

** O tempo de extensão para os genes NS5A e NS5B de ambos os subtipos foi de 120 segundos.

4.5 PROCEDIMENTOS PARA *NESTED*-PCR (PCR2)

Para esse ensaio, o DNA obtido após amplificação foi utilizado como molde para uma nova amplificação da região-alvo requerida, utilizando-se iniciadores de síntese internos. Foram preparadas distintas reações de mistura de reagentes de PCR (Quadro 4.3), representativos para cada subtipo, os quais continham os oligonucleotídeos iniciadores da PCR2 de acordo com o gene alvo a ser amplificado.

Quadro 4.3. Reagentes da *Nested-PCR*

Reagentes	Volume por reação (1X)
DNTP (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) 10mM	1 μ L
10X PCR Buffer	5 μ L
MgCl ₂ 50mM	1,5 μ L
Oligonucleotídeos <i>sense</i> (10 μ M)	2,5 μ L
Oligonucleotídeos <i>antisense</i> (10 μ M)	2,5 μ L
Platinum® Taq high fidelity 5 U/ μ L	0,2 μ L
Água Destilada DNase, RNase <i>free</i>	32,3 μ L

Foram adicionados 5 μ L de DNA obtido por RT-PCR em 45 μ L da mistura de reagentes da *nested-PCR* correspondente. As amostras foram colocadas em um termociclador (Perkin-Elmer 2400, Massachusetts, EUA) e submetidas a seguidos ciclos de temperatura, conforme descrito a seguir:

4.5.1 Ciclos de Temperatura para a *Nested-PCR*

Desnaturação inicial: 94°C durante 3 minutos

30 Ciclos: $\left\{ \begin{array}{l} 94^\circ\text{C durante 60 segundos - desnaturação} \\ 53^\circ\text{C durante 30 segundos - hibridização}^* \\ 72^\circ\text{C durante 70 segundos - extensão}^{**} \end{array} \right.$

Extensão final: 72°C durante 7 minutos

* para a amplificação dos genes do subtipo 1b, a temperatura utilizada foi de 49°C.

** O tempo de extensão para os genes NS5A e NS5B de ambos os subtipos foi de 120 segundos.

Após o término dos ciclos, os produtos da PCR foram mantidos em refrigeração (4°C – 8°C).

4.6 ANÁLISE DOS PRODUTOS OBTIDOS PELA REAÇÃO DE PCR

Os produtos amplificados foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5%, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio e recoberto com tampão TBE 1X, em cuba eletroforética.

Foram aplicados 5 µL do produto da *nested*-PCR homogeneizados com 2 µL de corante 10x Blue Juice Gel Loading Buffer (Invitrogen, Califórnia, EUA) nos orifícios do gel correspondentes a cada amostra. Para comparação do tamanho dos fragmentos amplificados na PCR, foi utilizado 1µL do padrão de peso molecular DNA ladder/100 pb (1 µg) diluído em 9 µL de tampão TBE 1X e 2 µL de tampão de amostra gel loading solution (Sigma, Missouri, EUA), os quais foram aplicados no primeiro orifício do gel de agarose.

Após corrida eletroforética em voltagem constante de 100V durante aproximadamente 1 hora, o gel foi examinado sob transiluminação ultravioleta UVP® Transilluminator (ClinX, Shanghai, China) para realização de leitura aproximada de fragmentos de DNA com os seguintes tamanhos: 770 bp (domínio protease da NS3), 840 bp (gene NS4B), 1500bp (gene NS5A) e 1745 bp (gene NS5B).

4.7 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DA PCR

Os produtos dessa *nested*-PCR foram submetidos a uma nova corrida eletroforética, utilizando-se agarose *low melting* (Sigma, Missouri, EUA) a 1,5%, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio e recoberto com tampão TBE 1X, para separação das bandas específicas dos produtos de PCR. As bandas de interesse foram cortadas e transferidas para microtubos tipo eppendorf de 1,5 mL devidamente identificados. As etapas para purificação do DNA foram seguidas de acordo com as instruções do fabricante do conjunto de reagentes QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) e descritas a seguir:

1. Foram adicionados três volumes de tampão QG para cada volume de gel cortado. Incubou-se a 50° C em banho-maria durante 10 minutos, ou até que o gel estivesse completamente dissolvido;
2. Foi adicionado um volume de isopropanol para cada amostra, seguida de homogeneização em vórtex;
3. Foram transferidos 750 µl da amostra para a mini coluna previamente identificada, e centrifugou-se em rotação máxima (de 14.000 rpm) durante 1 minuto;
4. Foram adicionados 500 µl do tampão QG na mini coluna, e centrifugou-se em rotação

máxima durante 1 minuto, a fim de remover todos os traços de agarose presentes na amostra. A seguir, foram adicionados 750 µl do tampão PE na coluna e após 2 minutos, as amostras foram centrifugadas (aproximadamente 14.000 rpm) durante 1 minuto;

5. Após o descarte dos resíduos, uma nova centrifugação (de 14.000 rpm) durante 1 minuto foi realizada, para remover resíduos de etanol do tampão PE nas amostras;

6. Para eluição do DNA, as mini colunas foram transferidas para microtubos tipo *epENDORF* de 1,5 mL, e adicionou-se 50 µl de tampão EB (Tris-Cl 10 mM, pH 8.5). Uma centrifugação a 14.000 rpm durante 1 minuto foi realizada e, em seguida, as mini colunas foram descartadas e os microtubos contendo o DNA purificado foram estocados a -20^o C.

4.8 QUANTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Para o cálculo da quantidade de DNA presente em cada amostra, 4 µl do produto de PCR foram adicionados a 2 µL de tampão de amostra gel loading solution (Sigma, Missouri, EUA) e aplicados em gel de agarose a 1,5%. Para comparar a intensidade das bandas das amostras com a do marcador com as bandas quantificadas, foram empregadas as mesmas quantidades do padrão de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen, Califórnia, EUA) no primeiro orifício do gel de agarose.

4.9 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

A reação de sequenciamento foi realizada para cada amostra em duas etapas distintas, cada qual contendo os oligonucleotídeos *sense* e *antisense* empregados na PCR2 de acordo com o subtipo das amostras, além de mais dois oligonucleotídeos internos para os amplicons NS5A e NS5B; a saber: 5'-TTCACAGAA~~Y~~TGGACGGGGT-3' e 5'-CCAC~~R~~TAYTCCTCYGCMGA-3' para sequenciamento interno do amplicon da NS5A do subtipo 1a; 5'-GCATGACCACTGACAAC-3' e 5'-GTTGTCAGTGGTCATGCC-3' para sequenciamento interno do amplicon NS5A do subtipo 1b. Para o gene da NS5B, os oligonucleotídeos utilizados foram: 5'-CC~~R~~ATGGGGTTYTCRT-3' e 5'-TACCTGGTCATAGCCTCC-3' para o subtipo 1a; 5'-CCGCTGYTTYGACTCAAC-3' e 5'-CCTAGTCATAGCCTCCGT-3' para o subtipo 1b.

Foram utilizados o conjunto de reagentes *BigDye Terminator* versão 3.1 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), apresentado no Quadro 4.4. O volume de DNA empregado na reação variou de acordo com a quantidade presente em cada amostra (1-4 µL).

Quadro 4.4 Mistura da reação para sequenciamento nucleotídico

Reagentes	Volume por reação (1X)
Molde de DNA	1-4 µL
Tampão MgCl ₂ 5X	1,5 µL
Oligonucleotídeos <i>sense</i> ou <i>antisense</i> (3,2 pMol)	1,0 µL
<i>Big Dye</i>	1,0 µL
Água Destilada DNase, RNase <i>free</i> (q.s.p)	10 µL

As amostras foram colocadas em termociclador (Perkin-Elmer 2400, Massachusetts, EUA), para o início dos ciclos de sequenciamento.

4.9.1 Ciclos de temperatura para a reação de sequenciamento

Desnaturação inicial: 96°C durante 2 minutos

40 Ciclos: $\left\{ \begin{array}{l} 96^\circ\text{C durante 10 segundos - desnaturação} \\ 50^\circ\text{C durante 5 segundos - hibridização} \\ 60^\circ\text{C durante 4 minutos - extensão} \end{array} \right.$

Após o término dos ciclos, os produtos da PCR foram mantidos em refrigeração (4°C) até serem encaminhadas para o sequenciador ABI-3730 (CD Genomics, Nova York, EUA) da plataforma de sequenciamento de DNA do PDTIS/FIOCRUZ.

4.10 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS E ANÁLISE FILOGENÉTICA

As sequências obtidas foram editadas e, para o alinhamento, foi utilizado o programa Clustal X versão 1.83 em conjunto com sequências de referência para cada genótipo obtidas do banco de dados do HCV (Los Alamos; <http://hcv.lanl.gov/content/hcv-db/index>). Para a tradução das sequências nucleotídicas e análise de aminoácidos associados a resistência aos novos fármacos, foi utilizado o programa Mega 5.0 (Tamura et al., 2011).

Com as sequências da NS3 protease e do gene NS5A, foi investigado o grau de relacionamento genético entre isolados do subtipo 1a que circulam no Brasil e em outros países. Como recentemente foi descrito que as amostras do subtipo 1a se subdividiam em dois clados distintos (Pickett et al., 2011), foram incluídas, na análise filogenética, as mesmas 120 sequências representativas de cada clado utilizados neste trabalho a fim de verificar em que clado as amostras do Brasil poderiam ser classificadas. Na região NS5A, para elucidar se variantes virais de

resistência poderiam ser agrupar em um determinado clado do subtipo 1a, 87 sequências da NS5A que contêm mutações de resistência (M28T, n=5; Q30R/H, n=12; L31M, n=8; H58D/P, n=25; E62D, n=17; Y93C/H/N, n=11; e sequências com a dupla mutação [M28T-E62D, n=1; M28V-Q30H, n=1; Q30H-L31M, n=1; H58P-E62D, n=4; Q30H-Y93H, n=1; and L31M-Y93C, n=1]) foram incluídas no estudo após analisar 1.659 sequências do banco de dados Los Alamos. Árvores filogenéticas de máxima verossimilhança (ML) e o modelo de substituição de nucleotídeos GTR + G + I foram inferidas no programa mega 5.0 com as sequências das regiões NS3 e NS5A. Foram empregadas 500 replicações para o teste de *Bootstrap*, para verificação da consistência dos ramos obtidos da árvore filogenética, e valores > 70 foram considerados significativos.

4.11 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS EM LOGO

Para avaliar a variabilidade natural nos sítios das proteínas não estruturais envolvidos na resistência aos inibidores DAAs, foram construídos gráficos em formato logo, utilizando-se a ferramenta WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>), a partir do alinhamento de aminoácidos correspondente de cada subtipo (Crooks et al., 2004).

4.12 IDENTIFICAÇÃO DE PADRÕES CARACTERÍSTICOS DE AMINOÁCIDOS EM AMOSTRAS BRASILEIRAS/FREQUÊNCIA DE CADA AMINOÁCIDO EM CADA POSIÇÃO

Todas as sequências de aminoácidos também analisadas no programa Vespa (<http://hiv-web.lanl.gov/P-vespa/vespa.html>). Nessa análise, buscou-se encontrar posições específicas, dentre os dois subtipos estudados, que fossem discrepantes das sequências virais de outros países. O programa Vespa calcula a frequência de cada aminoácido em cada posição de um alinhamento de um grupo de sequências, no caso o de estudo (*query*), em relação a um grupo de sequências de referência, no caso sequências de outros países (*background*), e seleciona uma posição em que o aminoácido mais frequente do grupo de estudo difere do de referência. O limiar de 1.0 foi escolhido para definir um padrão único para cada sítio residual.

5 RESULTADOS

Os resultados da variabilidade genética da região NS3 do HCV e a presença de mutações de resistência aos DAAs nas regiões NS3 e NS5A serão apresentados sob a forma de três artigos publicados. Os resultados das mutações de resistência das regiões NS4B e NS5B serão apresentados como dados preliminares para compor duas publicações referentes a cada uma destas regiões. Além disso, é apresentado em anexo um trabalho em colaboração, publicado na revista “Antiviral Therapy” no ano de 2013, sobre a diversidade genética do HCV no Brasil.

Os manuscritos publicados e submetidos são listados a seguir na ordem em que serão discutidos:

- 1) **Peres-da-Silva A**, de Almeida AJ, Lampe E. Mutations in hepatitis C virus NS3 protease domain associated with resistance to specific protease inhibitors in antiviral therapy naïve patients. Arch Virol. 2010 May;155(5):807-11.
- 2) **Peres-da-Silva A**, Almeida AJ, Lampe E. Genetic diversity of NS3 protease from Brazilian HCV isolates and possible implications for therapy with direct-acting antiviral drugs. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012 Mar;107(2):254-61.
- 3) **Peres-da-Silva A**, de Almeida AJ, Lampe E. “NS5A inhibitor resistance-associated polymorphisms in Brazilian treatment-naïve patients infected with genotype 1 hepatitis C vírus, submetido em 07 jul 2014 para Journal of Antimicrobial Chemotherapy,
- 4) Lampe E, Lewis-Ximenez L, Espírito-Santo MP, Delvaux NM, Pereira SA, **Peres-da-Silva A**, Martins RM, Soares MA, Santos AF, Vidal LL, Germano FN, de Martinez AM, Basso R, Pinho JR, Malta FM, Gomes-Gouvêa M, Moliterno RA, Bertolini DA, Fujishima MA, Bello G. Genetic diversity of HCV in Brazil. Antivir Ther.2013;18(3 Pt B):435-44.

5.1 ARTIGO 1

Breve contextualização:

O presente estudo foi iniciado com a identificação das variantes virais de resistência no domínio NS3 protease do HCV em amostras brasileiras e suas possíveis implicações para a terapia com novos antivirais de atuação direta, uma vez que a NS3 protease se tornou o principal alvo molecular para novas abordagens terapêuticas. Foi analisada a ocorrência natural de mutações dominantes no domínio serina protease da região NS3 do HCV, em 114 amostras de indivíduos cronicamente infectados, que poderiam potencialmente reduzir a atividade dos inibidores de protease. A mutação V36L foi detectada em 5,6% dos portadores do genótipo 1b, enquanto que a mutação T54S em 4,1% dos isolados do genótipo 1a do HCV. Os dados dessa abordagem foram reunidos em um artigo publicado na “Archives of Virology”, intitulado “Mutations in hepatitis C virus NS3 protease domain associated with resistance to specific protease inhibitors in antiviral therapy naïve patients”. Este artigo representou o primeiro relato sobre mutações de resistência no domínio serina protease NS3 em amostras do HCV na América Latina.

Mutations in hepatitis C virus NS3 protease domain associated with resistance to specific protease inhibitors in antiviral therapy naïve patients

Allan Peres-da-Silva · Adilson José de Almeida · Elisabeth Lampe

Received: 6 November 2009 / Accepted: 28 January 2010 / Published online: 20 April 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract The prevalence of naturally occurring mutations in hepatitis C virus associated with resistance to protease inhibitors in chronically infected patients has not been reported in Brazil. The NS3 serine protease domain was sequenced in 114 therapy-naïve patients infected with subtype 1a ($n = 48$), 1b ($n = 53$), or 3a ($n = 13$). A V36L mutation was observed in 5.6% patients infected with subtype 1b and in all isolates of the 3a subtype, and a T54S mutation was detected in 4.1% of isolates of subtype 1a. In conclusion, the presence of variants carrying mutations associated with resistance to protease inhibitors in therapy-naïve patients may be important for future therapeutic strategies.

Hepatitis C virus (HCV) infection is a major public health problem in Brazil, since more than two million individuals are estimated to be chronically infected with HCV in this country [9]. HCV is an enveloped virus belonging to the family *Flaviviridae* and is classified into six major genotypes and several subtypes. It has a single-stranded RNA genome, which is translated into a single polyprotein of about 3,000 amino acids [18]. To date, there is no vaccine to prevent HCV infection, and the combination of interferon (IFN) plus ribavirin (RBV), the only therapy available to patients infected with HCV, is not considered a broadly effective therapy [10]. This combination therapy exerts synergistic antiviral effects; however, it is efficient in terms of sustained virological response (SVR) in only

about 50% of patients with chronic HCV genotype 1 infection and is associated with a number of adverse effects [8]. Although pegylated interferon (PEG IFN) further improves the effectiveness of antiviral therapy, adverse reactions still exist, and the cost of antiviral therapy based on this drug is high [10]. Thus, more effective therapeutic drugs with fewer side effects and shorter treatment duration are needed for patients infected with HCV.

Recently, advances have been achieved in the development of novel compounds known as specifically targeted antiviral therapy for HCV (STAT-C) [1]. STAT-C was designed to inhibit the HCV NS3-4A serine protease and the RNA-dependent RNA polymerase [19]. The HCV NS3-4A serine protease domain plays an essential role in viral replication and represents a strong target for developing new drugs against HCV infection [19]. Several specific NS3-4A serine protease inhibitors, such as VX-950 (telaprevir), SCH6, SCH503034, ITMN-191, and TMC435350, have been developed and are currently being evaluated in clinical trials [13]. However, the high level of variability and diversity of HCV, resulting from the error-prone nature of RNA-dependent RNA polymerases of RNA viruses, is a current challenge for STAT-C. Thus, variants that are resistant to a number of protease inhibitors have been identified in *in vitro* studies, in clinical trials, and in treatment-naïve patients. Mutations associated with resistance include C16S, V36A/L/M, A39V, F43C/S, T54A/S, R109K, S138T, R155K/Q/T, A156S/T/V, D168A/V/E, and V170A [3, 6, 7, 11, 15, 23]. Due to the high degree of genetic variability of the HCV genome, NS3-4A serine protease inhibitors need to be effective against all HCV isolates in order to obtain the highest rate of SVR. In this context, an examination of the natural variability of the HCV NS3 protease region is extremely important for assessing the potential for emergence of drug-resistant mutants.

A. Peres-da-Silva · A. J. de Almeida · E. Lampe (✉)
Viral Hepatitis Laboratory, Oswaldo Cruz Foundation,
FIOCRUZ, Rua Leopoldo Bulhões 1480,
Rio de Janeiro CEP 21041-210, Brazil
e-mail: elampe@ioc.fiocruz.br

There is little information about the genetic variability of the NS3 protease gene of HCV isolates from Latin America. Data obtained from large clinical trials are needed to determine the natural genetic variability of HCV NS3 serine protease in infected individuals as well as to identify residue changes that could potentially reduce the activity of protease inhibitors. Thus, the aim of this study was to analyze the natural genetic variability of the HCV NS3 serine protease domain in order to identify variants carrying mutations associated with a decreased susceptibility to protease inhibitors in a cohort of therapy-naïve patients chronically infected with HCV living in Rio de Janeiro, Brazil.

Between March 2007 and August 2008, a total of 114 serum samples were collected from patients [46 males and 68 females, aged 53.1 ± 9.8 years (mean \pm standard deviation)] diagnosed at the Laboratory for Viral Hepatitis, Oswaldo Cruz Institute/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, as having chronic HCV infection. The study was approved by the local ethics committee and conforms to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from each patient before entering the study. The study included patients between 18 and 65 years, both male and female, and of any race. Patients were excluded from the study if they met one or more of the following exclusion criteria: (a) they had received or were currently undergoing antiviral therapy, (b) they were positive for hepatitis B surface antigen, or (c) they had antibodies to human immunodeficiency virus (HIV-1/2).

The entire NS3 protease domain of the HCV genome was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) followed by a second (“nested”) PCR, using the type-specific oligonucleotide primers listed in Table 1. For the RT-PCR step, SuperScriptTM III One-Step RT-PCR System PlatinumTM Taq (Life Technologies, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used. The conditions

for the RT-PCR step were as follows: 42°C for 45 min, 94°C for 2 min and 35 cycles of 94°C for 15 s, 56°C for 30 s, 68°C for 90 s, and 68°C for 5 min as the final extension step. The RT-PCR conditions were the same for all subtypes except for the use of an annealing temperature of 45°C for subtype 3a. For the nested PCR, 1 μ L of RT-PCR product was amplified using Platinum[®] Taq High Fidelity (5 U/ μ L) and 35 cycles at 94°C for 60 s, 60°C for 30 s, 72°C for 90 s, and a final extension at 72°C for 7 min.

The PCR products that were obtained were purified using a QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) and subjected to direct nucleotide sequencing in both directions using a Big Dye terminator kit (version 3.1, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer’s instructions and analyzed on an ABI 3730 DNA automated sequencer (Applied Biosystems). The sequences were aligned using Clustal X version 1.83 [24], and the deduced amino acid sequences were inferred using Mega 4.0 [21]. Amino acid (aa) sequences from the NS3 protease domain (aa 1–181 of the NS3 protein) were used for analysis. A logo graphical representation of amino acid sequences of the NS3 protease domain from HCV subtypes 1a, 1b and 3a was generated separately using the WebLogo program (<http://weblogo.berkeley.edu/>). The nucleotide sequence data from this study are available in the DDBJ/EMBL/GenBank databases under the accession numbers GU126553–GU126666.

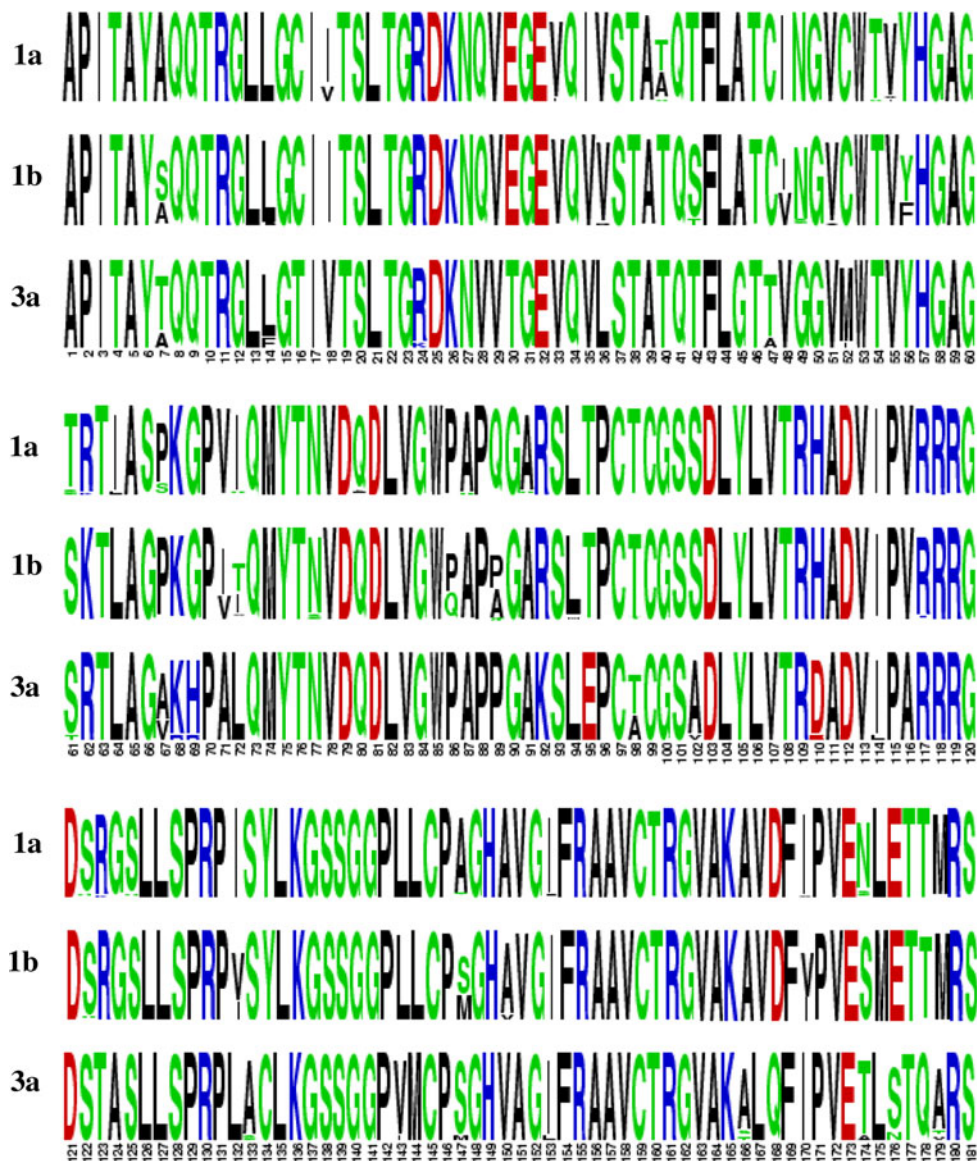
Figure 1 shows logo graphical representations produced with HCV amino acid sequences of 48, 53, and 13 isolates of subtypes 1a, 1b, and 3a, respectively. The prevalence of HCV subtypes in patients selected for our study was similar to that found in our geographical area. In this logo alignment, we can observe that the sites responsible for substrate binding (L135, F154, R161, and K165), the three catalytic triad residues (H57, D81, and S139), and the residues responsible for binding the metal zinc (C97, H149) were conserved in all isolates evaluated. The

Table 1 Primers used in the PCR assays and their position in the HCV genome

Primer	Sequence	Genome position
P1aF1	5'-CTT YTC CCR RAT GGA GAC CAA-3'	Sense (nt 3266–3286)
P1aR1	5'-ACC TTA TAG CCC TGR GCY GC-3'	Antisense (nt 4074–4093)
P1aF2	5'-CTC ATC ACG TGG GGG GCR GA-3'	Sense (nt 3288–3307)
P1aR2	5'-TTG GTG CTC TTR CCG CTG CC-3'	Antisense (nt 4038–4057)
P1bF1	5'-GCC CGT CRT CTT CTC TGA CAT GG-3'	Sense (nt 3257–3279)
P1bR1	5'-TTG TAC CCT TGG GCT GCA TA-3'	Antisense (nt 4071–4090)
P1bF2	5'-TCA TCA CCT GGG GGG CAG AC-3'	Sense (nt 3289–3308)
P1bR2	5'-GTG CTC TTG CCG CTG CCA GT-3'	Antisense (nt 4035–4054)
P3aF1	5'-TAA TAT TTA GTC CCA TGG AA-3'	Sense (nt 3272–3291)
P3aR1	5'-TAT ATC CTT GTG CTA CAT AA-3'	Antisense (nt 4070–4089)
P3aF2	5'-TCA TCA CCT GGG GTG CGR AT-3'	Sense (nt 3289–3308)
P3aR2	5'-GTG CTC TTA CCG CTG CCG GT-3'	Antisense (nt 4035–4054)

nt nucleotide

Fig. 1 Amino acid sequence alignment of the HCV serine protease presented as a logo graphical representation produced with 48, 53 and 13 HCV protease sequences of subtype 1a, 1b and 3a, respectively. The entire NS3 serine protease domain (amino acids 1–181) is shown, and the height of each amino acid letter at each position is proportional to its frequency in all of the sequences from the corresponding subtype



hydrophobic cavity-forming amino acids Q41, T42, F43, H57, G58, and A59 were also highly conserved in all isolates of subtypes 1a and 3a; however, a T42S mutation was found in 48 of 53 samples of subtype 1b.

In the search for variants previously associated with resistance to novel HCV protease inhibitors, the positions C16, V36, A39, Q41, F43, T54, D79, R109, S138, R155, A156, D168, and V170 of the NS3 amino acid sequences were screened for substitutions. In the study population, we observed a V36L change in three sequences of subtype 1b and in all subtype 3a sequences. Two patients infected with subtype 1a displayed a T54S substitution. The mutations R155K/T/Q/I/M/G/L/S, A156S/T/V/I, and D168A/V/E, associated with high to moderate levels of drug resistance to the main novel protease inhibitors, were not observed in

the three subtypes analyzed; the residues R155 and A156 were conserved in the three subtypes, the D168 was present in all patients infected with genotype 1a and 1b, and all subtype 3a isolates showed a conservative D168Q pattern. A V170I substitution was found in 46 of the 48 subtype 1a isolates and in 19 of the 53 subtype 1b isolates analyzed, whereas all 13 sequences of subtype 3a showed such variation.

In the present study, we have sequenced the entire NS3 serine protease region of 114 samples of treatment-naïve patients infected with HCV genotypes 1a, 1b, and 3a. Our results indicate that residues of the catalytic triad and those involved in substrate binding are highly conserved among the three HCV subtypes studied, in accordance with the results of Beyer et al. [4]. The hydrophobic cavity-forming

amino acids were also highly conserved in all isolates of subtypes 1a and 3a; however, a T42S mutation was found in 48 out of 53 samples of subtype 1b.

In relation to amino acid substitutions in the NS3 sequences associated with decrease in susceptibility to protease inhibitors, it is noteworthy that we did not observe in any of the study subjects substitutions at residues R155 and A156, which are located in the binding pocket of the NS3-4A serine protease [25] and have been described to confer high to moderate levels of drug resistance to linear and macrocyclic HCV protease inhibitors [3]. However, the mutation V36L was observed in 3 (5.6%) patients infected with subtype 1b and all (100%) isolates of 3a subtype, and the substitution T54S was detected in 2 (4.1%) patients infected with subtype 1a. Kuntzen et al. [11] also observed in treatment-naïve patients the V36L mutation in 1.7% of 362 patients infected with genotype 1a and the T54S mutation in 1.9% and 1.4% of patients infected with genotype 1a and 1b, respectively. Welsch et al. [25] reported that the mutations V36A/G/L/M and T54A/S are associated with low to medium levels of resistance to the HCV NS3-4A serine protease inhibitor telaprevir (VX-950). Mutations at sites V36 and T54 are expected to affect the conformation and the geometry of the hydrophobic cavity in the binding pocket of the NS3-4A serine protease. The inhibitor binding mode and the geometry of the cavity of NS3-4A protease appear to play an essential role in the development of drug resistance by mutants at positions V36 and T54. These two mutations lead to non-paired interaction between the residues of the protease and the cyclopropyl group of the inhibitor VX-950, which could explain the emergence of viral mutants. Furthermore, although these mutations are located within the viral protein and away from the inhibitor binding site, these two variants interfere with the catalytic triad of the protease, which is in a crevice in the surface between two sheets of the protease β -barrel [2, 26].

In our study, a conservative V170I substitution was detected in 46 (98%) subtype 1a isolates, in 19 (36%) subtype 1b isolates and in all 13 sequences of subtype 3a. Few data are available on the effects of V170I substitution on the efficacy of NS3-4A protease inhibitors. The conservative substitution at this site was detected in up to 45% of patients infected with HCV genotype 1 studied in the worldwide series of López-Labrador et al. [14]. In the phase 1b trial of Sarrazin et al. [17], patients infected with HCV genotype 1 were enrolled in a randomized, double-blind, placebo-controlled, 14-day, multiple dose trial with the NS3-4A protease inhibitor telaprevir (VX-950), and mutations were found with an increase in frequency of more than 5% from baseline to end of antiviral therapy at different positions, including site 170.

Mutations in viral isolates resistant to the novel macrocyclic inhibitors ITMN-191 and TMC435350 may emerge at the site D168 [12, 16]. In our work, none of the HCV isolates belonging to subtype 1a or 1b showed variation at this site. However, glutamine (Q) was observed at position 168 in all Brazilian subtype 3a sequences. Moreover, all HCV subtype 3a isolate contain the substitutions V36L and V170I. López-Labrador et al. [14] investigated the natural polymorphisms of HCV NS3/4A protease by performing an analysis of 380 HCV NS3 sequences, including 14 sequences of genotype 3, selected from public HCV databases (EuHCVdb and Los Alamos). In agreement with our results, the investigators found that 100% of the sequences of HCV genotype 3 carried the V36L mutation, a variation associated with resistance to protease inhibitors. However, we could not be sure that all HCV genotype 3 isolates have this mutation, due to the small sample size of this genotype ($n = 13$) analyzed in our study. Whether or not genotype 3 isolates carrying this mutation are resistant to novel protease inhibitors remains to be determined in appropriate clinical trials.

The occurrence of specific variations related to certain HCV subtypes represents a determinant factor for the effectiveness of protease inhibitors [4, 22]. HCV subtype 3a is the second-most prevalent genotype in the southern region of Brazil [5] and also accounts for a large proportion of infections worldwide. Therefore, the information obtained on the polymorphism of NS3-4A protease in all genotypes is important for the development of new protease inhibitors.

It is well known that HCV exists within each individual patient as a quasispecies—variants that are closely related but heterogeneous [20]. Accordingly, one could expect that our approach (RT-nested PCR followed by direct sequencing) underestimates the number of patients with relevant but less frequent mutations, as only mutations occurring in dominant variants could be identified. However, Kuntzen et al. [11] analyzed 153 clones from 11 patients, obtained by performing RT-PCR spanning the protease catalytic domain of the HCV NS3 genome, and demonstrated that the bulk sequence data were representative of 100% of the viral quasispecies population in 9 of 11 patients, confirming that the detected mutations were the predominant viral strain in each patient, and no additional combinations of mutations associated with drug resistance were detected on a subdominant level. In addition, Colson et al. [7] performed direct sequencing of the HCV NS3 region from a therapy-naïve patient chronically infected with HCV genotype 1a and found the R155K resistance mutation, which was further confirmed by clonal analysis in 100% of 15 clonal sequences obtained.

Our data reveal, for the first time, to our knowledge, the prevalence of dominant mutations in therapy-naïve patients

from South America infected with HCV, which is cause for concern regarding the future use of protease inhibitors in this population. Characterization of variants carrying mutations described to confer resistance to protease inhibitors and its association with the outcome of antiviral therapy could result in a further need for drug resistance screening before starting any therapy.

In conclusion, data on natural polymorphisms of the HCV NS3-4A protease region obtained in the present study have demonstrated that mutations conferring resistance to HCV NS3-4A protease inhibitors are present in isolates from Brazilian therapy-naïve patients with chronic HCV infection.

Acknowledgments The authors thank Plataforma Genômica-Sequenciamento de DNA/PDTIS-FIOCRUZ for DNA sequencing and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES and to Program Papes V from Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil for financial support.

References

- Asselah T, Benhamou Y, Marcellin P (2009) Protease and polymerase inhibitors for the treatment of hepatitis C. *Liver Int* 29:57–67. doi:10.1111/j.1478-3231.2008.01928.x
- Barbato G, Cicero DO, Nardi MC, Steinkühler C, Cortese R, De Francesco R et al (1999) The solution structure of the N-terminal proteinase domain of the hepatitis C virus (HCV) NS3 protein provides new insights into its activation and catalytic mechanism. *J Mol Biol* 289:371–384. doi:10.1006/jmbi.1999.2745
- Bartels DJ, Zhou Y, Zhang EZ, Marcial M, Byrn RA, Pfeiffer T et al (2008) Natural prevalence of hepatitis C virus variants with decreased sensitivity to NS3.4A protease inhibitors in treatment-naïve subjects. *J Infect Dis* 198:800–807. doi:10.1086/591141
- Beyer BM, Zhang R, Hong Z, Madison V, Malcolm BA (2001) Effect of naturally occurring active site mutations on hepatitis C virus NS3 protease specificity. *Proteins* 43:82–88. doi:10.1002/1097-0134(20010501)43:2<82::AID-PROT1020>3.0.CO;2-4
- Campiotto S, Pinho JR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJ, Spinelli V et al (2006) Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res* 39:41–49. doi:10.1590/S0100-879X2005000100007
- Chase R, Skelton A, Xia E, Curry S, Liu S, McMonagle P et al (2009) A novel HCV NS3 protease mutation selected by combination treatment of the protease inhibitor boceprevir and NS5B polymerase inhibitors. *Antiviral Res* 84:178–184. doi:10.1016/j.antiviral.2009.09.003
- Colson P, Brouk N, Lembo F, Castellani P, Tamalet C, Gérolami R (2008) Natural presence of substitution R155K within hepatitis C virus NS3 protease from a treatment-naïve chronically infected patient. *Hepatology* 47:766–767. doi:10.1002/hep.22122
- Flisiak R, Parfieniuk A (2010) Investigational drugs for hepatitis C. *Expert Opin Investig Drugs* 19:63–75. doi:10.1517/13543780903431034
- Fonseca JCF (1999) Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C no Brasil. Relatório do Grupo de Estudo da Sociedade Brasileira de Hepatologia. *GED Gastroenterol Endosc Dig* 18(Supl 1):S3–8
- Hadziyannis SJ, Sette H, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P et al (2004) Peginterferon alpha 2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 140:346–355
- Kuntzen T, Timm J, Berical A, Lennon N, Berlin AM, Young SK et al (2008) Naturally occurring dominant resistance mutations to hepatitis C virus protease and polymerase inhibitors in treatment-naïve patients. *Hepatology* 48:1769–1778. doi:10.1002/hep.22549
- Lin TI, Lenz O, Fanning G, Verbinnen T, Delouvroy F, Scholliers A et al (2009) In vitro activity and preclinical profile of TMC435350, a potent hepatitis C virus protease inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* 53:1377–1385. doi:10.1128/AAC.01058-08
- López-Labrador FX (2008) Hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitors. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 3:157–167. doi:10.2174/157489108786242369
- López-Labrador FX, Moya A, González-Candelas F (2008) Mapping natural polymorphisms of hepatitis C virus NS3/4A protease and antiviral resistance to inhibitors in worldwide isolates. *Antivir Ther* 13:481–494
- Lu L, Pilot-Matias TJ, Stewart KD, Randolph JT, Pithawalla R, He W et al (2004) Mutations conferring resistance to a potent hepatitis C virus serine protease inhibitor in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 48:2260–2266. doi:10.1128/AAC.48.6.2260-2266.2004
- Rajagopalan R, Misialek S, Stevens S, Myszkowski D, Brandhuber B, Ballard J et al (2009) Inhibition and binding kinetics of the hepatitis C virus NS3 protease inhibitor ITMN-191 reveals tight binding and slow dissociative behavior. *Biochemistry* 48:2559–2568. doi:10.1021/bi900038p
- Sarrazin C, Kieffer TL, Bartels D, Hanzelka B, Müh U, Welker M et al (2007) Dynamic hepatitis C virus genotypic and phenotypic changes in patients treated with the protease inhibitor telaprevir. *Gastroenterology* 132:1767–1777. doi:10.1053/j.gastro.2007.02.037
- Simmonds P (2004) Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus—15 years on. *J Gen Virol* 85:3173–3188. doi:10.1099/vir.0.80401-0
- Soriano V, Peters MG, Zeuzem S (2009) New therapies for hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* 48:313–320. doi:10.1086/595848
- Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, Wakita T (2007) Molecular biology of hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 42:411–423. doi:10.1007/s00535-007-2030-3
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596–1599. doi:10.1093/molbev/msm092
- Thibeault D, Bousquet C, Gingras R, Lagacé L, Maurice R, White PW et al (2004) Sensitivity of NS3 serine proteases from hepatitis C virus genotypes 2 and 3 to the inhibitor BILN 2061. *J Virol* 78:7352–7359. doi:10.1128/JVI.78.14.7352-7359.2004
- Thompson AJ, McHutchison JG (2009) Antiviral resistance and specifically targeted therapy for HCV (STAT-C). *J Viral Hepat* 16:377–387. doi:10.1111/j.1365-2893.2009.01124.x
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25:4876–4882
- Welsch C, Domingues FS, Susser S, Antes I, Hartmann C, Mayr G, Schlicker A et al (2008) Molecular basis of telaprevir resistance due to V36 and T54 mutations in the NS3-4A protease of the hepatitis C virus. *Genome Biol* 9:R16. doi:10.1186/gb-2008-9-1-r16
- Yan Y, Li Y, Munshi S, Sardana V, Cole JL, Sardana M et al (1998) Complex of NS3 protease and NS4A peptide of BK strain hepatitis C virus: a 2.2 Å resolution structure in a hexagonal crystal form. *Protein Sci* 7:837–847

5.2 ARTIGO 2

Breve contextualização:

No ano de 2012, foi investigada a diversidade genética da NS3 protease e suas possíveis implicações para a terapia antiviral de atuação direta, com as mesmas 114 sequências utilizadas no primeiro estudo. Essas sequências do domínio NS3 foram comparadas com outras de diferentes isolados do HCV disponíveis na base de dados do GenBank. Estudos anteriores apresentaram evidências que as sequências do HCV-1a se separam em dois clados distintos (formadas tanto por sequências americanas quanto européias) (Chevaliez et al. 2009, Pickett et al. 2011); então, foi construída uma árvore filogenética para determinar em qual clado as sequências brasileiras iriam se agrupar. O resultado mostrou que todas as sequências brasileiras, com exceção de duas, formavam um grupo distinto dentro do clado 1 e apresentavam características fenotípicas diferentes em relação a presença de mutações de resistência para inibidores macrocíclicos (MK-7009, ITMN-191 e TMC-435350). As sequências do clado 1 do HCV apresentaram, em 60% das suas sequências no sítio 80, o aminoácido lisina (K), que confere resistência aos inibidores macrocíclicos. Por sua vez, o aminoácido glutamina (Q) foi encontrado em 97,5% das sequências virais formadoras do clado 2 e em 93,8% das sequências brasileiras, apesar destas últimas pertencerem ao clado 1. Um ensaio clínico de fase IIb com o inibidor TMC435 encontrou taxas de resposta virológica significativamente maiores em pacientes infectados pelo HCV-1a contendo o aminoácido Q80 (Lenz et al., 2012).

A construção filogenética e cálculos de distanciamento genético revelaram um maior grau de heterogeneidade para os isolados brasileiros do HCV-1b, que formaram vários subgrupos na árvore filogenética. Em contrapartida, as sequências brasileiras dos isolados dos HCV-1a e 3a apresentaram menor distanciamento genético, formando ramos distintos e separados das sequências de referência de outras regiões geográficas. Em conclusão, uma notável heterogeneidade dos isolados brasileiros foi observada, que pode vir a ser considerada em futura abordagem terapêutica com fármacos inibidores da NS3 protease. Os dados desta análise foram apresentados no artigo intitulado “Genetic diversity of NS3 protease from Brazilian HCV isolates and possible implications for therapy with direct-acting antiviral drugs”, o qual foi publicado nas Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Genetic diversity of NS3 protease from Brazilian HCV isolates and possible implications for therapy with direct-acting antiviral drugs

Allan Peres-da-Silva¹, Adilson José de Almeida^{1, 2}, Elisabeth Lampe^{1/+}

¹Laboratório de Hepatites Virais, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Av. Brasil 4365, 21040-360 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

²Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

The hepatitis C virus (HCV) NS3 protease has been one of the molecular targets of new therapeutic approaches. Its genomic sequence variability in Brazilian HCV isolates is poorly documented. To obtain more information on the magnitude of its genetic diversity, 114 Brazilian HCV samples were sequenced and analysed together with global reference sequences. Genetic distance (d) analyses revealed that subtype 1b had a higher degree of heterogeneity (d = 0.098) than subtypes 1a (d = 0.060) and 3a (d = 0.062). Brazilian isolates of subtype 1b were distributed in the phylogenetic tree among sequences from other countries, whereas most subtype 1a and 3a sequences clustered into a single branch. Additional characterisation of subtype 1a in clades 1 and 2 revealed that all but two Brazilian subtype 1a sequences formed a distinct and strongly supported (approximate likelihood-ratio test = 93) group of sequences inside clade 1. Moreover, this subcluster inside clade 1 presented an unusual phenotypic characteristic in relation to the presence of resistance mutations for macrocyclic inhibitors. In particular, the mutation Q80K was found in the majority of clade 1 sequences, but not in the Brazilian isolates. These data demonstrate that Brazilian HCV subtypes display a distinct pattern of genetic diversity and reinforce the importance of sequence information in future therapeutic approaches.

Key words: genetic diversity - NS3 protease - hepatitis C virus - direct-acting antiviral agents

The hepatitis C virus (HCV) has a worldwide distribution, with an estimated 130 million people being infected (Alter 2007). Approximately 85% of affected individuals fail to achieve spontaneous clearance of the virus and become chronically infected (Lavanchy 2009). As a member of the Flaviviridae family (genus Hepacivirus), HCV is an enveloped virus with a positive, single-stranded RNA genome of approximately 9,400 nucleotides, which is translated into a single polyprotein of approximately 3,000 amino acids. This polyprotein is subsequently processed by viral and host proteases into structural and non-structural proteins. Based on a comparative analysis of the nucleotide sequences of the core, envelope and NS5B regions, HCV was classified into six major genotypes (1-6) and more than 100 subtypes (1a, 1b, 1c and so on) (Simmonds et al. 1994) and, recently, isolates of a new genotype were proposed to be classified as a seventh major genotype (Murphy et al. 2007).

To date, there is no vaccine against HCV and the only therapy available is based on the administration of interferon (IFN) in combination with ribavirin, which may induce a sustained virological response in approximately 50% of patients chronically infected with HCV genotype 1. This therapeutic approach has limited effectiveness and a number of side effects, including depression,

fatigue, alopecia, anorexia, haemolytic anaemia, leucopenia, thrombocytopenia and “flu-like” symptoms (Russo & Fried 2003). These drugs are indirect antiviral agents as they do not target a specific viral protein or the HCV nucleic acid. Considering the low rate of effectiveness of the current treatment and that most individuals infected with HCV will evolve towards chronic infection with the potential to progress to more serious complications, such as cirrhosis and hepatocellular carcinoma, new therapeutic options that can be used in usual clinical practice are urgently needed (Schinazi et al. 2010).

The increasing progress in understanding protein structure and developing HCV subgenomic systems and, more recently, cell culture systems (Nakamura et al. 2008, Triyatni et al. 2011) allowed for the characterization of the HCV life cycle and enabled the design of several specific inhibitors for use in anti-HCV therapy, known under the generic name of direct-acting antiviral agents (DAAs) (Asselah & Marcellin 2011). Instead of stimulating the host's natural immune response to viral infection, the DAAs are directed against HCV molecular targets. Among the HCV molecular inhibitors, enzymatic inhibitors of NS3 serine protease and NS5B polymerase are already being tested in the advanced phases of clinical trials (Vermehren & Sarrazin 2011). The HCV NS3 gene encodes for a bifunctional protein in which the amino-terminal domain forms, along with the NS4A protein, a heterodimeric S protease responsible for cleavage of the nonstructural portion of the polyprotein at the NS3-NS4A, NS4A-NS4B, NS4B-NS5A and NS5A-NS5B junctions, whereas its NS3 carboxy-terminal domain displays NTPase/helicase activity, which is essential for HCV RNA translation and genome replication. In addition to its importance in the viral life cycle,

Financial support: CNPq, CAPES, PAPES V/FIOCRUZ

+ Corresponding author: elampe@ioc.fiocruz.br

Received 12 July 2011

Accepted 8 November

the HCV NS3 protein was also shown to be involved in viral oncogenesis, which affects the normal cellular functions (Lai et al. 2008), efficiently blocking the retinoic-acid-inducible gen I and Toll-like receptor 3 signaling pathways and enabling the virus to escape from the IFN antiviral response, thus contributing to virus persistence (Foy et al. 2003, Meylan et al. 2005). Therefore, the HCV NS3 protein is at present considered to not only be an attractive constituent for the production of an anti-HCV vaccine (Zeng et al. 2009), but also an important target for the development of new therapeutic protease inhibitors (Enomoto et al. 2009). To date, several specific NS3-4A S protease inhibitors, such as VX-950, SCH6, SCH503034, ITMN-191 and TMC435350, have been designed and are currently being evaluated in clinical trials (López-Labrador 2008). However, given the high level of variability of HCV, which is a result of the error-prone nature of RNA-dependent RNA polymerase, variants resistant to a number of protease inhibitors have been identified (Peres-da-Silva et al. 2010, Vermehren & Sarrazin 2011) and represent a current challenge for therapy with DAAs.

Recently, reports based on the phylogenetic analysis of the complete genome and partial NS5B sequences have shown that HCV subtype 1a isolates can be separated into at least two distinct clades, designated 1 and 2 (Chevaliez et al. 2009, Pickett et al. 2011). Several informative sites for this distinction are located near or within codons associated with resistance to NS3-4A S protease inhibitors, such as the hydrophobic protease cavity-forming amino acid Q41, which confers higher resistance to the inhibitor SCH 503034 (Tong et al. 2008). Therefore, the detailed knowledge of the nucleotide sequence variability of the NS3 protease gene is necessary for the development of these antiviral compounds, which will help to achieve a greater therapeutic effectiveness against different HCV genotypes.

To date, there are few studies on the genomic variability of the HCV NS3 serine protease domain in Brazil and in Latin America (Mello et al. 2009), increasing the need for obtaining more detailed data on the magnitude of its genetic diversity. In this study, we analyse the variability of the HCV NS3 protease gene in Brazilian isolates and its possible implications for therapy with DAAs.

SUBJECTS, MATERIALS AND METHODS

Patients - Between March 2007-August 2008, a total of 114 serum samples were collected from patients [46 males and 68 females, aged 53.1 ± 9.8 years (mean \pm standard deviation)] diagnosed as having a chronic HCV infection (serum anti-HCV and HCV-RNA-positive for more than 6 months). The diagnosis of an HCV infection was made on the basis of the presence of anti-HCV antibodies (Ortho HCV 3.0 ELISA test system with Enhanced SAVE, Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ, USA) and HCV-RNA detectable by the Cobas Amplicor HCV Monitor test (Roche Molecular Systems, Branchburg, USA) in serum samples. The HCV genotypes were determined using the Versant HCV Genotype 2.0 Assay (LiPA 2.0, Innogenetics, Ghent, Belgium) (Verbeeck et al. 2008). The samples were selected from patients in-

fectured with genotype 1a, 1b or 3a who visited the Laboratory for Viral Hepatitis, Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, for diagnostic purposes. The study was approved by the local Ethical Committee (CEP 32/2004) and conforms to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from each patient before entering into the study. Patients eligible for the study were between 18-65 years of age, both male and female and of any race. Patients who had received or were currently undergoing antiviral therapy or who tested positive for hepatitis B surface antigen and/or antibodies to human immunodeficiency virus-1/2 were excluded from the study.

Extraction of viral RNA - HCV RNA was extracted from serum samples using a QIAamp Viral RNA kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Reverse-transcription (RT)-nested polymerase chain reaction (PCR) and amplification of viral RNA - One-step RT-PCR followed by a second round of PCR (RT-nested PCR) was used to amplify the NS3 protease region of HCV using specific oligonucleotide primers for each subtype, as previously described (Peres-da-Silva et al. 2010). For the RT-PCR reactions, the reagents from the Superscript™ III One-Step RT-PCR system (Life Technologies, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were used. The RT-PCR mixture contained 0.5 μ L of the corresponding type of specific sense and antisense primers (10 μ M), 12.5 μ L of 2 x reaction mix (a buffer containing 0.4 μ M of each dNTP and 3.2 μ M of $MgSO_4$), 1 μ L of SuperScript™ III RT/Platinum® Taq DNA Polymerase (4 U/ μ L), 5.5 μ L of DNase/RNase free distilled water and 5 μ L of viral RNA. The conditions for the RT-PCR step were as follows: 42°C for 45 min followed by inactivation of the reverse transcriptase and activation of the "hot start" DNA polymerase at 94°C for 4 min; then 35 cycles at 94°C for 15 sec, 56°C for 30 sec and 68°C for 90 sec and a final elongation at 68°C for 5 min. The RT-PCR conditions were the same for all subtypes, except for an annealing temperature of 45°C for subtype 3a. One microliter of the product was subjected to a second round of PCR in the presence of 2.5 μ L of each internal primer (10 μ M), 5 μ L of 10 x PCR buffer, 8 μ L of dNTPs (1.25 mM), 4 μ L of $MgSO_4$ (50 mM), 0.4 μ L of Platinum® Taq High Fidelity (5 U/ μ L) and 29.1 μ L of DNase/RNase-free distilled water. After an initial denaturation at 94°C for 3 min, the DNA was amplified for 30 cycles at 94°C for 30 sec, 60°C for 30 sec and 72°C for 90 sec and subjected to a final extension at 72°C for 7 min. PCR products of the expected length of 765 base pairs were fractionated by 1.5% agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide.

Nucleotide sequencing - The RT-nested PCR products were purified using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) and subjected to nucleotide sequencing reactions in both directions using the Big Dye Terminator kit (version 3.1, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions and analysed on an ABI 3730

DNA automated sequencer (Applied Biosystems). The nucleotide sequence data presented in this paper were submitted to the GenBank database under the accessions GU126553-GU126666.

Phylogenetic analysis - The sequences obtained were aligned using the CLUSTALX program, version 1.83 (Thompson et al. 1997). To investigate any possible epidemiological linkage of the Brazilian HCV 1a, 1b and 3a strains with other previously characterised isolates, we included in the phylogenetic analysis North American and European sequences sharing the same fragment that were available in a public HCV database [Los Alamos (hcv.lanl.gov/content/index)] (Kuiken et al. 2005). Maximum-likelihood phylogenetic trees were inferred using the PhyML program (Guindon & Gascuel 2003) with the approximate likelihood-ratio test (aLRT) (Anisimova & Gascuel 2006) based on a Shimodaira-Hasegawa-like procedure, using general time reversible as substitution model and an subtree pruning and regrafting-based tree search algorithm to estimate the tree topologies. The further characterisation of the HCV subtype 1a in clades 1 and 2 was also performed with the same 120 representative sequences of each clade used by Pickett et al. (2011).

Analysis of synonymous substitutions per synonymous site (dS), nonsynonymous substitutions per nonsynonymous site (dN), dN/dS ratio and genetic distance (d) - To calculate the frequencies of dS, dN, dN/dS - an analysis indicative of selective pressure - we used the synonymous/nonsynonymous analysis program (hiv.lanl.gov) (Korber 2000) according to the Nei and Gojori method (1986).

The analysis of the nucleotide genetic distances of Brazilian, North American and European HCV NS3 serine protease nucleotide sequences was performed using the Maximum Composite Likelihood model in the MEGA 4.0 program (Tamura et al. 2007). This analysis was conducted within and between each set of HCV subtypes.

Detection of signature patterns in Brazilian amino acid sequences - The entire Brazilian HCV NS3 protease domain (181 amino acids) was screened in comparison with NS3 protease alignment sequences from other geographical regions to find subtype-specific amino acid signature patterns at specific protease sites using the Vespa program (hcv.lanl.gov/content/sequence/VESPA/vespa.html) (Korber & Myers 1992). In the aligned sequences, the Vespa program calculates the frequencies of each amino acid at each position (query) and compares them with a set of reference sequences (background). The threshold of 1.0 was chosen to define a single standard for each residue site.

RESULTS

The entire NS3 protease domain of the HCV genome (nucleotides 3420-3963) was analysed among 114 patients infected with HCV subtypes 1a (n = 48; 42%), 1b (n = 53; 46%) or 3a (n = 13; 11%). The prevalence of HCV subtypes in patients selected for our study was similar to that identified in our geographical area (de Almeida et al. 2004).

Phylogenetic analysis - The entire HCV serine protease extension (nt 1-543) was used to reconstruct phylogenetic trees from 114 Brazilian HCV NS3 S protease sequences of HCV subtypes 1a, 1b and 3a, along with the corresponding subtype nucleotide sequences from different geographic regions, totalling 138 HCV subtype 1a sequences, 152 HCV subtype 1b sequences and 102 HCV subtype 3a sequences. The resulting phylogenetic trees representing the genetic relationships of HCV subtypes 1a, 1b and 3a are presented in Figs 1-3. As shown in Fig. 1, all but three Brazilian HCV subtype 1a sequences clustered together in a single distinct cluster (aLRT = 0.89) consisting of 45 isolates. The Brazilian 1b sequences revealed 10 independent lineages randomly distributed among sequences from other countries (Fig. 2). We also observed that, even though most of these lineages were composed of one-three sequences, four major Brazilian clusters were composed of five-22 sequences, with aLRT supports > 0.80. In contrast, all of the Brazilian HCV subtype 3a sequences segregated in one cluster, along with one sequence from Europe (Fig. 3).

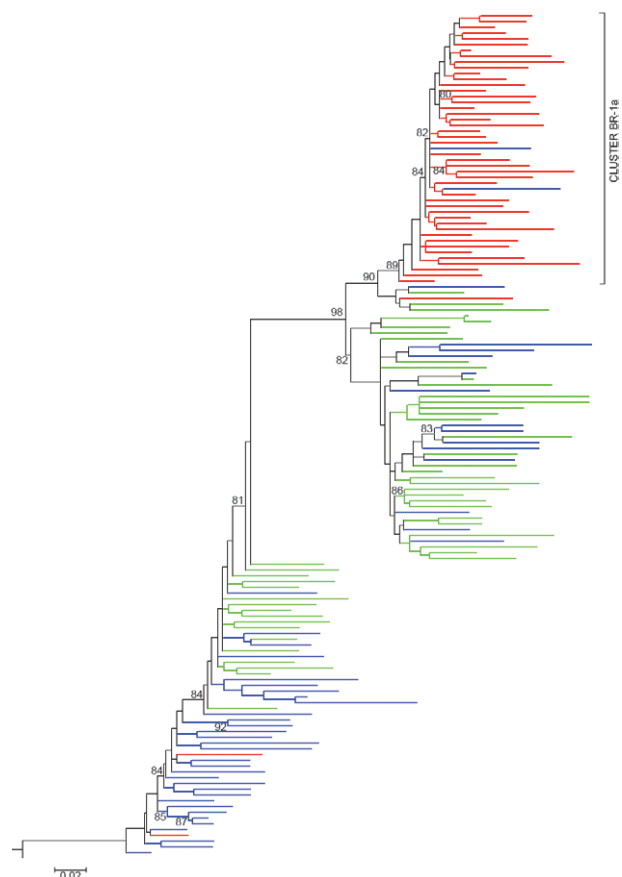


Fig. 1: maximum-likelihood phylogeny of hepatitis C virus subtype 1a from NS3 protease sequences showing evolutionary relationships between 48 Brazilian (red branches) and representative sequences from Europe (blue branches) (n = 48) and North America (green branches) (n = 42). The tree was rooted with subtype 1b strains (M58335). Approximate likelihood-ratio test supports values > 0.80 are shown above the nodes. Sequence names were removed for clarity.

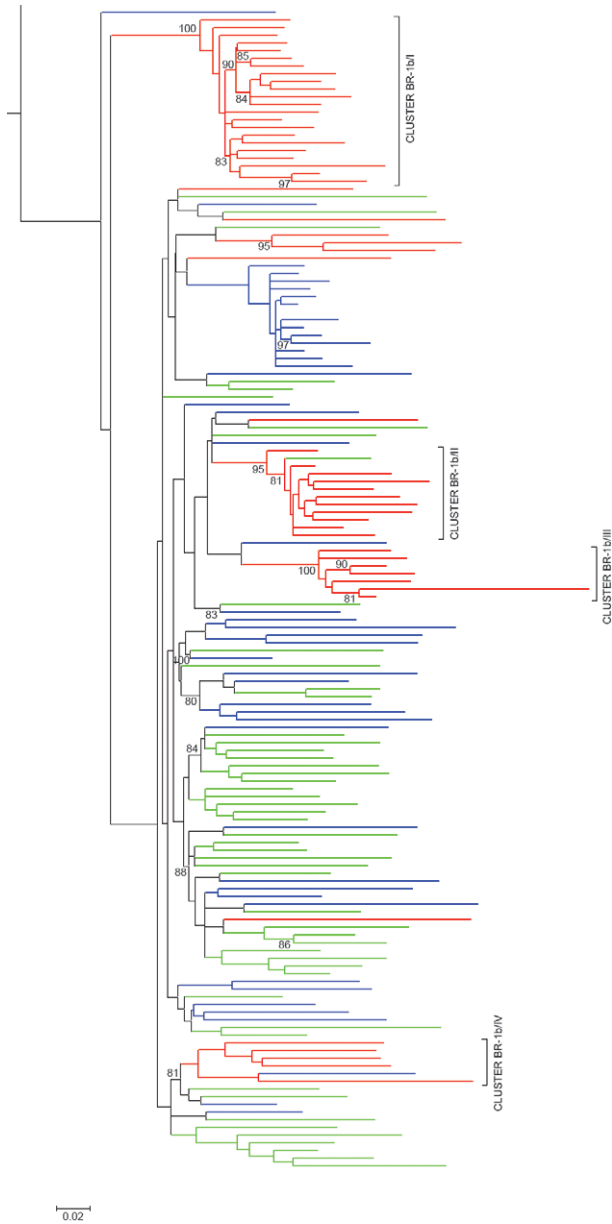


Fig. 2: maximum-likelihood phylogenetic tree of hepatitis C virus subtype 1b from NS3 protease sequences showing evolutionary relationships between 53 Brazilian (red branches) and representative sequences from Europe (blue branches) ($n = 49$) and North America (green branches) ($n = 50$). Approximate likelihood-ratio test supports values > 0.80 are shown above the nodes. The tree was rooted with subtype 1a strains (NC004102). Sequence names were removed for clarity.

Recently, Pickett et al. (2011) demonstrated that HCV subtype 1a could be separated into two distinct clades. Because almost all of the Brazilian HCV-1a sequences formed a large monophyletic group, we constructed a separate tree with the same sequences used by Pickett et al. (2011) to determine to which clade our sequences belonged. The phylogenetic tree reconstruction revealed that all but two Brazilian HCV subtype 1a sequences formed a distinct and strongly supported (aLRT = 0.93) group of sequences inside clade 1 (Fig. 4).

Analysis of dS, dN, dN/dS and d - The values of dS and dN and the dN/dS ratio are displayed in Table I. The substitution mutational analysis revealed that most of the nucleotide mutations were synonymous. Therefore, the dN/dS ratio was low, indicating the presence of purifying selection pressure, which is associated with conservation of regions, presumably to maintain protein functions.

Regarding the genetic distance analysis performed within each HCV subtype, we observed that Brazilian HCV subtype 1a NS3 protease sequences presented a lower value ($d = 0.060$) in comparison with that observed for European ($d = 0.092$) and North American ($d = 0.084$) sequences. The d of Brazilian HCV-1b sequences showed almost the same value ($d = 0.098$) as that observed for the European ($d = 0.092$) and North American sequences ($d = 0.090$). The Brazilian HCV subtype 3a sequences were also less variable ($d = 0.062$) than those from Europe ($d = 0.076$) or North America ($d = 0.074$). When comparing sequences from those geographical areas, the genetic distances of the Brazilian HCV subtype 1b NS3 protease sequences were very similar to those from both the North American ($d = 0.102$) and European ($d = 0.105$) sequences. The Brazilian HCV subtype 3a sequences also presented similar values when compared with North American ($d = 0.078$) and European ($d = 0.076$) sequences. In contrast, the Brazilian HCV subtype 1a NS3 protease sequences exhibited more similarity to isolates from North America ($d = 0.091$) than to European ($d = 0.101$) sequences.

Signatures in Brazilian amino acid sequences - The frequencies of the major amino acids in subtype-specific Brazilian HCV sequences of the NS3 protease domain that differ from the frequencies found in European and North American isolates are shown in Table II. In Brazilian HCV subtype 1a NS3 protease sequences, 50% of the amino acids located at position 40 were represented by the amino acid threonine (T), differing substantially from those found in North America and Europe, which possess alanine (A) as the predominant amino acid in 84% and 81.6% of their sequences, respectively. A similar amino acid profile was observed for Brazilian HCV subtype 3a NS3 protease sequences at sites 7 and 98. In addition, this subtype also had 69.2% of its sequences occupied by T instead of valine (V) at site 67, as was observed for the majority of North American sequences.

Table III presents the amino acid signature patterns observed in clades 1 and 2 of HCV subtype 1a. Brazilian sequences presented the amino acid T as the predominant residue at site 40, differing substantially from those found in clade 1 and 2, which have the amino acid A as the predominant amino acid. The subtype 1a clade 1 exhibited the amino acid lysine (K) at site 80, which is associated with resistance to macrocyclic inhibitors in 60% of its sequences, while the amino acid glutamine (Q) was found in 97.5% of clade 2 sequences and in 93.8% of subtype 1a Brazilian sequences. In contrast, clade 1 and Brazilian sequences presented the amino acid asparagine (N) in approximately 80% of their sequences at site 174, while 71.7% of clade 2 sequences presented the amino acid S.

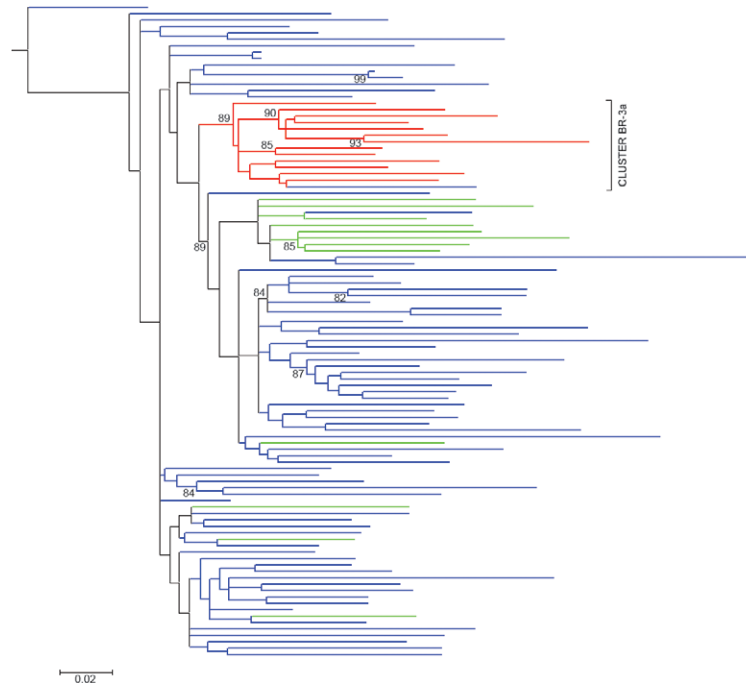


Fig. 3: maximum-likelihood phylogenetic tree of hepatitis C virus subtype 3a from NS3 protease sequences showing evolutionary relationships between 13 Brazilian (red branches) and representative sequences from Europe (blue branches) (n = 77) and North America (green branches) (n = 12). Approximate likelihood-ratio test supports values > 0.80 are shown above the nodes. The tree was rooted with subtype 3b strains (D49374). Sequence names were removed for clarity.

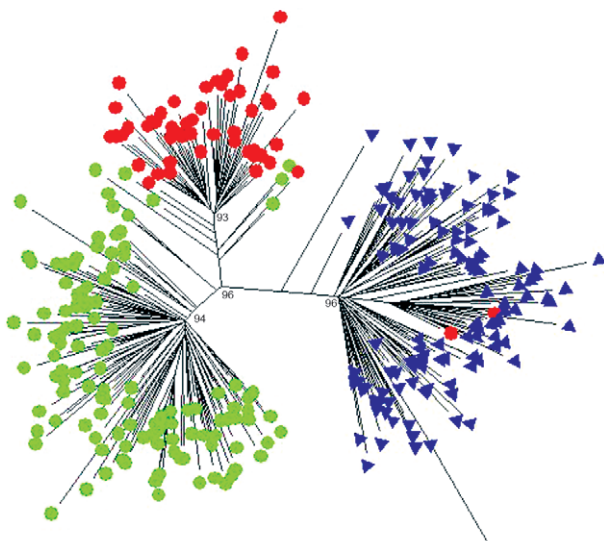


Fig. 4: maximum-likelihood phylogenetic tree of hepatitis C virus (HCV) subtype 1a sequences for clade characterization estimated from NS3 protease sequences showing evolutionary relationships between 48 Brazilian (red circles) HCV subtype 1a strains and 120 representative subtype 1a sequences of clade 1 (green circles) and clade 2 (blue triangles). Both clades are formed by isolates from Europe and North America. The star-like topology tree shows all, except two, Brazilian sequences forming a distinct group within clade 1. The tree was rooted with subtype 1b strains (M58335). Approximate likelihood-ratio test supports values > 0.90 are shown above the nodes. Sequence names were removed for clarity.

DISCUSSION

There is little information on the extent of the natural genetic variability of the HCV NS3 protease region from different viral subtypes isolated in Latin America. The NS3-4A S protease of HCV is essential for viral replication and, therefore, has been one of the most attractive targets for developing specific antiviral agents. However, because the HCV genotypes diverge in their nucleotide composition by more than 30%, the successful development of these inhibitors depends on a wide knowledge of NS3 protease variability to be effective against different HCV genotypes. Recently, in an analysis of 380 HCV NS3 serine protease sequences from public HCV databases, López-Labrador et al. (2008) mapped natural polymorphisms among proteases from worldwide HCV isolates. However, sequences from Latin America were not included in that analysis due to the paucity of NS3 sequences available in that database. In Brazil, there is only one study on the evolution of the NS3 amino acid sequences, which used viral isolates from six patients following liver transplantation: three infected with subtype 1b and three with subtype 3a. The authors observed that several differences in the N-terminal NS3 amino acid sequences were observed in genotype 1b isolates, compared with the NS3 GenBank reference sequences (Mello et al. 2009). Because the number of sequences analysed in that study was very small, the genetic variability of HCV proteases among different viral HCV genotypes circulating in Brazil is practically unknown. The data presented

in our study will contribute to a better knowledge of the magnitude of the natural variation in the HCV NS3 serine protease by characterising its heterogeneity in a diverse population of individuals infected with the three most prevalent HCV subtypes in Brazil.

The analysis of subtype-specific amino acid signature patterns at specific sites in the HCV NS3 protease of Brazilian samples demonstrated heterogeneity among the three subtypes studied. In our analysis, we reported that the three Brazilian HCV subtypes studied had amino acid variations at specific locations in the protease domain. Possible changes in the structure of the NS3 protease could be caused by different amino acid frequencies. In Brazilian HCV subtype 1a and 3a sequences, we observed

TABLE I

Values of dN, dS and dN/dS ratio for the NS3 serine protease domain of hepatitis C virus (HCV) subtypes 1a, 1b and 3a in relation to geographical regions

Regions and HCV subtypes	dN	dS	Ratio dN/dS
Brazil			
1a	0.0109	0.2166	0.0394
1b	0.0217	0.3556	0.0527
3a	0.0124	0.2183	0.0426
Europe			
1a	0.0147	0.3633	0.0326
1b	0.0174	0.3451	0.0406
3a	0.0122	0.2868	0.0352
North America			
1a	0.0120	0.3287	0.0250
1b	0.0169	0.3347	0.0425
3a	0.0122	0.2747	0.0396

dn: synonymous substitutions per substitutions site; dS: non-synonymous substitutions per non-substitutions site.

the amino acid T as a signature at several protease *loci*. Variations from A or V to T or S do not affect the charge because these amino acids possess a neutral charge, but T and S show a lateral chain with a hydroxyl group that may be a putative phosphorylation site or form distinct hydrogen bonds. In addition, the majority of Brazilian HCV subtype 1a sequences at site 67 and more than half of HCV subtype 1b sequences at site 86 presented the amino acid proline (P) as the amino acid signature. The amino acid P may cause changes in the enzyme's backbone structure, due to structural rearrangements.

The overall values for comparisons between dN and dS using the dN/dS ratio were less than 1.0 for all analyses, suggesting the presence of purifying selection across the NS3 serine protease region. Purifying selection is associated with the conservation of the sequence, which maintains protein function. An overall dN/dS ratio < 1 indicates that most positions in the NS3 region were subject to purifying selection, but the presence of a few positions that are subject to positive selection cannot be ignored. Even synonymous codons in the NS3 protease region may influence the rates at which a particular phe-

TABLE III

Amino acids signature patterns in Brazilian hepatitis C virus (HCV) sequences and subtype 1a clades

Amino acid position	HCV subtype 1a		
	Brazil	Clade 1	Clade 2
40	0.5 T	0.825 A	0.875 A
80	0.938 Q	0.60 K	0.975 Q
174	0.854 N	0.808 N	0.717 S

A: alanine; K: lysine; N: asparagine; Q: glutamine; S: serine; T: threonine.

TABLE II

Amino acid signatures of the different hepatitis C virus (HCV) subtypes in the NS3/4A protease domain in relation to geographical regions

Amino acid position	HCV subtype								
	1a			1b			3a		
	Brazil	North America	Europe	Brazil	North America	Europe	Brazil	North America	Europe
7	-	-	-	-	-	-	0.692T	1.0A	0.803A
40	0.5 T	0.840A	0.816A	-	-	-	-	-	-
67	0.792P	-	0.551S	-	-	-	0.692T	0.6 V	-
86	-	-	-	0.585P	0.900Q	0.878Q	-	-	-
98	-	-	-	-	-	-	0.615T	-	0.545A
174	0.854N	0.5S	-	-	-	-	-	-	-

A: alanine; N: asparagine; P: proline; Q: glutamine; S: serine; T: threonine; V: valine.

notype can emerge. Indeed, in codon 155 of the protease, a single point mutation is required to convert the arginine codon to a protease-resistant K (AAR) in HCV subtype 1a isolates from both clades, including the Brazilian sub-clade 1 isolates, whereas two nucleotide mutations are needed to change the NS3 155 codon from CGN to K (AAR) in HCV subtype 1b (Chevaliez et al. 2009). Thus, it can be suggested that a particular HCV subtype or even a clade of HCV subtype 1a may be more prone to developing resistant variants (Pickett et al. 2011). In the amino acid signature analyses, we observed that most sequences in subtype 1a clade 1 contained the mutation Q80K, which had been reported to exhibit reduced susceptibility to macrocyclic inhibitors (MK-7009, ITMN-191 and TMC-435350) (Bae et al. 2010). Nevertheless, the majority of Brazilian HCV subtype 1a sequences, as well as the sequences of clade 2, did not contain this mutation (93.8% of Brazilian sequences had the amino acid Q at position 80). These results reinforce the importance of considering the genomic heterogeneity of HCV subtype 1a in the context of antiviral agents directed to the NS3 serine protease domain.

In accordance with the higher genetic variability observed for the HCV subtype 1b NS3 protease sequences from North America and Europe, the Brazilian sequences also revealed greater nucleotide variability, while our HCV subtype 1a protease sequences presented less genetic variation in comparison with that observed for European and North American sequences. The comparison of ds among different geographical regions showed that Brazilian HCV-1a sequences are related more closely to those from North America, while HCV-1b and 3a sequences presented almost the same d to those from North America or Europe.

The phylogenetic tree analysis revealed different relationships patterns for the three Brazilian HCV subtypes analysed. Although Brazilian HCV subtype 1a and 3a sequences cluster into a single branch in the phylogenetic tree, the subtype 1b sequences form different groups of related sequences that are distributed randomly in the phylogenetic tree among sequences from other geographical regions. These results are very similar to those observed in our previous study with HCV NS5B sequences (Lampe et al. 2010), in which we observed that the majority of HCV subtype 1a sequences were clustered into a single clade, whereas Brazilian subtype 1b segregated into various independent clusters. In accordance with previous observations from an NS5B analysis, the epidemic of subtype 1a is mostly a consequence of a dissemination of a single HCV strain, while the HCV-1b epidemic is characterised more by the concurrent dissemination of multiple HCV strains.

Furthermore, we were able to demonstrate that Brazilian HCV subtype 1a sequences clustered within clade 1 as a separated group of related sequences with a high support value. This finding is interesting because, in the phylogenetic tree reconstruction of Pickett et al. (2011), no correlation was found between either location or time of isolation and the clade in which the sequences were placed: both clades contained isolates from different localities in the United States and Europe taken at dif-

ferent times. Moreover, we also observed that the Brazilian subcluster inside clade 1 had different phenotypic characteristics in relation to the presence of resistance mutations for macrocyclic inhibitors (MK-7009, ITMN-191 and TMC-435350). In our previous study, we had demonstrated a V36L mutation in 5.6% of patients infected with subtype 1b and in all isolates of the 3a subtype and a T54S mutation in 4.1% of isolates of subtype 1a. The presence of variants carrying mutations associated with resistance to protease inhibitors in therapy-naïve patients may be important for future therapeutic strategies (Peres-da-Silva et al. 2010). Until recently, the identification of subtypes had no great clinical relevance in terms of treatment because HCV 1a and 1b infection are presently treated with the same therapeutic protocol. However, this situation may change once a greater number of new, specific HCV enzyme inhibitors become available for anti-HCV therapy. In this context, information regarding sequence variations among HCV subtypes and even subclades may be important for the therapeutic approach with new DAAs.

In conclusion, we believe that the results described in this paper provide useful information on the genetic profile of a large and diverse set of HCV NS3 protease sequences, which are crucial for defining its natural polymorphisms and are important in the context of the development of new protease inhibitors. The effects of the observed amino acid polymorphisms found here are presently unknown. We propose further investigations to determine the effects of genetic diversity on the enzyme structure, including molecular modelling, to better understand the relationship between sequence variation and structural changes within the NS3 protease enzyme.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the Plataforma Genômica-Sequenciamento de DNA/PDTIS-FIOCRUZ, for DNA sequencing.

REFERENCES

- Alter MJ 2007. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 13: 2436-2441.
- Anisimova M, Gascuel O 2006. Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate and powerful alternative. *Syst Biol* 55: 539-552.
- Asselah T, Marcellin P 2011. New direct-acting antivirals' combination for the treatment of chronic hepatitis C. *Liver Int* 31: 68-77.
- Bae A, Sun SC, Qi X, Chen X, Ku K, Worth A, Wong KA, Harris J, Miller MD, Mo H 2010. Susceptibility of treatment-naïve hepatitis C virus (HCV) clinical isolates to HCV protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 5288-5297.
- Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Brillet R, Pawlotsky JM 2009. Hepatitis C virus (HCV) genotype 1 subtype identification in new HCV drug development and future clinical practice. *PLoS ONE* 4: e8209.
- Enomoto M, Tamori A, Kawada N 2009. Emerging antiviral drugs for hepatitis C virus. *Rev Recent Clin Trials* 4: 179-184.
- de Almeida AJ, Campos-de-Magalhães M, de Melo Marçal OP, Brandão-Mello CE, Okawa MY, de Oliveira RV, do Espírito-Santo MP, Yoshida CF, Lampe E 2004. Hepatitis C virus-associated thrombocytopenia: a controlled prospective, virological study. *Ann Hematol* 83: 434-440.
- Foy E, Li K, Wang C, Sumpter R Jr, Ikeda M, Lemon SM, Gale M Jr

2003. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* 300: 1145-1148.
- Guindon S, Gascuel O 2003. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52: 696-704.
- Korber B 2000. HIV signature and sequence variation analysis. In AG Rodrigo, GH Learn, *Computational analysis of HIV molecular sequences*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p. 55-72.
- Korber B, Myers G 1992. Signature pattern analysis: a method for assessing viral sequence relatedness. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8: 1549-1560.
- Kuiken C, Yusim K, Boykin L, Richardson R 2005. The Los Alamos hepatitis C sequence database. *Bioinformatics* 21: 379-384.
- Lai CK, Jeng KS, Machida K, Cheng YS, Lai MM 2008. Hepatitis C virus NS3/4A protein interacts with ATM, impairs DNA repair and enhances sensitivity to ionizing radiation. *Virology* 370: 295-309.
- Lampe E, Espirito-Santo MP, Martins RM, Bello G 2010. Epidemic history of hepatitis C virus in Brazil. *Infect Genet Evol* 10: 886-895.
- Lavanchy D 2009. The global burden of hepatitis C. *Liver Int* 29: 74-81.
- López-Labrador FX 2008. Hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitors. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 3: 157-167.
- López-Labrador FX, Moya A, González-Candelas F 2008. Mapping natural polymorphisms of hepatitis C virus NS3/4A protease and antiviral resistance to inhibitors in worldwide isolates. *Antivir Ther* 13: 481-494.
- Mello IM, Thumann C, Schvoerer E, Soulier E, Pinho JR, Silvestre DA, Queiroz AT, Wolf P, Baumert TF, Keller FS, Pereira CA 2009. Conservation of hepatitis C virus nonstructural protein 3 amino acid sequence in viral isolates during liver transplantation. *J Viral Hepat* 16: 732-737.
- Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, Tschopp J 2005. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 437: 1167-1172.
- Murphy D, Chamberland J, Dandavino R, Sablon E 2007. A new genotype of hepatitis C virus originating from Central Africa. *Hepatology* 46: 623A.
- Nakamura M, Saito H, Hibi T 2008. Advances in genomic research on hepatitis C virus with a useful tool replicon system. *Keio J Med* 57: 75-83.
- Nei M, Gojobori T 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol* 3: 418-426.
- Peres-da-Silva A, de Almeida AJ, Lampe E 2010. Mutations in hepatitis C virus NS3 protease domain associated with resistance to specific protease inhibitors in antiviral therapy naïve patients. *Arch Virol* 155: 807-811.
- Pickett BE, Striker R, Lefkowitz EJ 2011. Evidence for separation of HCV subtype 1a into two distinct clades. *J Viral Hepat* 18: 608-618.
- Russo MW, Fried MW 2003. Side effects of therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 124: 1711-1719.
- Schinazi RF, Bassit L, Gavegnano C 2010. HCV drug discovery aimed at viral eradication. *J Viral Hepat* 17: 77-90.
- Simmonds P, Smith DB, McOmish F, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS, Holmes EC 1994. Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. *J Gen Virol* 75: 1053-1061.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG 1997. The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882.
- Tong X, Bogen S, Chase R, Girijavallabhan V, Guo Z, Njoroge FG, Prongay A, Saksena A, Skelton A, Xia E, Ralston R 2008. Characterization of resistance mutations against HCV ketoamide protease inhibitors. *Antiviral Res* 77: 177-185.
- Triyatni M, Berger EA, Saunier B 2011. A new model to produce infectious hepatitis C virus without the replication requirement. *PLoS Pathog* 7: e1001333.
- Verbeeck J, Stanley MJ, Shieh J, Celis L, Huyck E, Wollants E, Morimoto J, Fariori A, Sablon E, Jankowski-Hennig M, Schaper C, Johnson P, Van Ranst M, Van Brussel M 2008. Evaluation of variant hepatitis C virus genotype assay (LiPA) 2.0. *J Clin Microbiol* 46: 1901-1906.
- Vermehren J, Sarrazin C 2011. New HCV therapies on the horizon. *Clin Microbiol Infect* 17: 122-134.
- Zeng R, Li G, Ling S, Zhang H, Yao Z, Xiu B, He F, Huang R, Wei L 2009. A novel combined vaccine candidate containing epitopes of HCV NS3, core and E1 proteins induces multi-specific immune responses in BALB/c mice. *Antiviral Res* 84: 23-30.

5.3 ARTIGO 3

Breve contextualização:

O terceiro artigo publicado no ano de 2014 representa o primeiro relato sobre mutações dominantes de resistência na proteína NS5A do HCV na América do Sul. Inibidores para essa proteína representam excelentes opções terapêuticas, podendo estar presentes em uma eventual terapia combinada livre de interferon- α . Entretanto, variantes virais de resistência preexistentes em NS5A podem comprometer a utilização desses inibidores na terapia. Ensaios *in vivo* e *in vitro* identificaram mutações de resistência no domínio I da proteína NS5A, como as variações M28A/T, Q30E/H/R/K, L31M/V, P32L, H58D e Y93C/H/N para os isolados do HCV-1a, e L31F/V, P32L e Y93H/N para os isolados do HCV-1b (Fridell et al., 2011; Gao, 2013). No presente estudo, foi relatada a ocorrência de mutações primárias ou secundárias em nove isolados brasileiros do subtipo 1a, contrastando com dados de uma investigação europeia que não encontrou variantes de resistência nos isolados do HCV-1a (Plaza et al., 2012). Em relação aos isolados do subtipo 1b, essa mesma investigação detectou mutações de resistência em 7% das sequências, já outra realizada no Japão detectou em 11,2% dos isolados virais (Suzuki et al., 2012), enquanto que este estudo evidenciou mutações de resistência primária em apenas 3,70% das sequências brasileiras. Esses dados sugerem diferenças nas frequências dos polimorfismos naturais entre os isolados do HCV de diferentes regiões geográficas.

Os resultados da presença de mutações de resistência aos DAAs da região NS5A do HCV foram publicados na revista “Journal of Antimicrobial Chemotherapy”, com o título: “NS5A inhibitor resistance-associated polymorphisms in Brazilian treatment-naive patients infected with genotype 1 hepatitis C virus”.

NS5A inhibitor resistance-associated polymorphisms in Brazilian treatment-naive patients infected with genotype 1 hepatitis C virus

Allan Peres-da-Silva¹, Adilson José de Almeida^{1,2} and Elisabeth Lampe^{1*}

¹Laboratório de Hepatites Virais, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; ²Hospital Universitário Gaffrée e Guinle/UNIRIO, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

*Corresponding author. Tel: +55-21-2562-1751; E-mail: elampe@ioc.fiocruz.br

Received 7 July 2014; returned 24 August 2014; revised 15 October 2014; accepted 21 October 2014

Objectives: Several promising NS5A protein inhibitors for hepatitis C virus (HCV) treatment, showing good antiviral activity, are currently being evaluated in clinical trials. However, viral breakthroughs associated with resistant variants have been observed, especially in patients infected with HCV-1a. We aimed to evaluate the occurrence of potential resistance mutations in the NS5A gene of HCV among Brazilian treatment-naive patients.

Methods: Direct sequencing of the HCV NS5A gene was performed in serum samples of 106 treatment-naive patients infected with subtypes 1a ($n=52$) and 1b ($n=54$). The sequence variability, signature patterns in amino acid sequences and variants associated with NS5A inhibitors were evaluated.

Results: The M28T and Y93H mutations were found in the subtype 1a sequences of two (3.85%) patients, and seven (13.46%) other patients presented the secondary mutation(s) H58P, E62D or H58P-E62D. For subtype 1b, the Y93H mutation was found in two (3.70%) patients and the substitutions R30Q, L31M, P58S and I280V were found in eight (14.81%) patients. Two distinct HCV-1a clades were distinguished by a phylogenetic analysis performed along with representative HCV-1a sequences and sequences containing HCV NS5A inhibitor resistance mutations retrieved from the Los Alamos database. All Brazilian sequences formed a large group of related sequences inside clade 1. It is noteworthy that 65.85% of sequences with substitution at sites 28, 30, 31 and 93 were found in clade 1.

Conclusion: Brazilian HCV-1a sequences presented a peculiar pattern of amino acid composition, mutations and frequencies, which is distinct from other previously characterized sequences from other locations. The association of these findings with the outcome of treatment with NS5A inhibitors awaits further analysis.

Keywords: HCV, NS5A gene, DAAs

Introduction

Hepatitis C virus (HCV) is a global public health concern due to its high rate of evolution to chronic infection. In Brazil, in a nationwide HCV infection survey, 1.38% of the population was found to have positivity for anti-HCV,¹ which could represent over 2.6 million individuals. HCV infections within Brazil are predominantly caused by genotype 1 (64%–72%). Treatment of HCV infection is changing rapidly with the advent of new drugs, particularly those directed against molecular targets of the virus. Known under the generic name of direct-acting antivirals (DAAs), a large number of new inhibitors have been developed.² NS5A protein is a very attractive target for therapeutic intervention. Currently, several potent drugs directed against NS5A protein are being assessed in different phases of clinical trials: daclatasvir, ledipasvir and ABT-267 (Phase III); ACH-3102, samatasvir, MK-8742, AZD-7295, GSK2336805, PPI-668 and GS-5816

(Phase II); and ACH-2928, EDP-239 and PPI-461 (Phase I) (available at <http://www.clinicaltrials.gov>).

Daclatasvir is the most promising NS5A protein inhibitor, showing great antiviral activity both in IFN-based regimens³ and in DAA IFN-free therapies.⁴ Robust HCV RNA declines were reported for HCV-infected patients in clinical trials with combination therapies involving daclatasvir.^{5,6} However, primary resistance mutations have been identified in both *in vivo* and *in vitro* studies.⁷ Residues that confer resistance to daclatasvir, ledipasvir, samatasvir, PPI-668, GSK2336805 and ACH-3102 inhibitors are located in the first 100 amino acids of the NS5A protein. However, a recent report associated the I280V polymorphism in HCV-1b isolates with resistance to the GSK2336805 inhibitor, possibly impacting the resistance behaviour of other variants.⁸

Analysis of viral sequences from different geographical regions may provide evidence for differences in frequencies of naturally occurring polymorphisms of HCV, which could affect DAA

response rates.⁹ In this context, the aim of this study was to assess the prevalence of variants associated with resistance to HCV NS5A inhibitors in Brazilian genotype 1 isolates, and to identify possible cluster segregation of HCV-1a NS5A-resistant sequences from treatment-naïve patients.

Methods

Serum samples were taken from 106 patients with chronic HCV infection, infected with genotype 1a ($n=52$) or 1b ($n=54$). HCV genotypes were determined using the Abbott Real Time HCV genotype II assay. The study was approved by the local ethics committee and conforms to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from each patient before entry to the study.

DNA fragments spanning nucleotide positions 6018–7767 relative to the H77 sequence (NC_004102) were amplified by RT-nested PCR and submitted to nucleotide sequencing reactions. The nucleotide sequence data were submitted to the GenBank database under accession numbers KJ747848–KJ747953. To identify amino acid substitutions in the NS5A region, sequences from each subtype were compared with the correspondent reference sequences: H77 (NC_004102) for HCV-1a and Con-1 (AJ238799) for HCV-1b. Amino acid substitutions associated with resistance to NS5A inhibitors were scored according to the list of the International Antiviral Society USA and to previously reported data:^{7,8,10–13} M28A/T, Q30E/H/R/K, L31M/V/F, P32L, H58D/P/N, E62D and Y93C/H/N for genotype 1a; and L23F, R30Q, L31M/V/F/W, P32L, P58S, Y93C/H/N and I280V for genotype 1b.

The phylogenetic tree of HCV-1a sequences of the NS5A region (nt 6258–7602) was constructed with 52 sequences from this study, 10 other Brazilian HCV-1a sequences¹⁴ and 240 representative sequences of genotype 1a clades 1 and 2.¹⁵ In order to elucidate whether resistant variants of HCV-1a sequences could be grouped into a particular subclade, 41 variants sequences were retrieved from the Los Alamos database after analysing 1659 sequences from the database [M28T, $n=5$; Q30R/H, $n=12$; L31M, $n=8$; Y93C/H/N, $n=11$; and sequences presenting double mutations (M28T-E62D, $n=1$; M28V-Q30H, $n=1$; Q30H-L31M, $n=1$; Q30H-Y93H, $n=1$; and L31M-Y93C, $n=1$]. Maximum-likelihood phylogenetic trees and the best substitution model, GTR+G+I, were deduced using the Mega 5.0 program. To verify the robustness of the branches on the phylogenetic tree obtained, 500 replicates were used for a bootstrap test.

HCV subtype 1a amino acid alignment sequences were screened to find signature patterns at specific protein clade sites using the Vespa program.¹⁶ A threshold of 1.0 was chosen to define a single standard for each residual site.

Results and discussion

The presence of mutations conferring resistance to NS5A inhibitors has been detected at baseline in therapy-naïve patients, as well as after therapy relapse in patients from Europe, the USA and Japan. However, baseline polymorphisms of HCV genotype 1 NS5A sequences from Latin America are poorly studied. In the present study, a total of 106 HCV NS5A genotype 1 sequences (52 HCV-1a and 54 HCV-1b) obtained from Brazilian treatment-naïve patients were analysed.

Table 1 summarizes the observed frequencies of amino acid variants associated with resistance to daclatasvir, ledipasvir, samatasvir, GSK2336805, PPI-668 and ACH-3102. In subtype 1a sequences, two (3.85%) patients displayed the primary M28T and Y93H substitutions, and seven (13.46%) patients carried the H58P, E62D or H58P-E62D secondary substitution(s). In subtype 1b isolates, two (3.70%) patients presented the Y93H mutation and the

substitution R30Q, L31M, P58S or I280V was found in eight (14.81%) patients.

In contrast to these results, Plaza *et al.*¹⁷ reported that none of the 36 European therapy-naïve, HIV/HCV-coinfected patient samples, as well as none of the 153 additional HCV-1a NS5A sequences available from the Los Alamos database, presented variants resistant to the daclatasvir inhibitor. The authors concluded that primary resistance mutations were not seen as natural polymorphisms in HCV-1a viral populations. Nevertheless, the double amino acid substitution L31M+Y93H was found in 7% of analysed subtype 1b sequences. Moreover, in HCV-1b Japanese patients, Suzuki *et al.*¹⁸ showed that 11.2% of their analysed sequences presented resistance mutations to daclatasvir (L31M and/or Y93H), while in our study these primary resistance mutations were observed in 5.56% of HCV-1b Brazilian NS5A sequences and none of them displayed any double amino acid substitutions. These differences will be better measured as more Latin American HCV NS5A sequences become available in public nucleotide databases.

Resistance selection studies identified that M28T amino acid substitutions are located very near the NS5A N-terminal domain, suggesting that this domain could be directly harmed by inhibitor binding. The Y93H mutation, associated with higher-resistance phenotypes and impaired viral replication levels in HCV-1a isolates, was detected as baseline polymorphism in one Brazilian HCV-1a isolate, while in HCV-1b isolates two sequences presented the Y93H mutation, which for this subtype causes modest levels of resistance to daclatasvir.¹²

Amino acid substitutions at residues H58 and E62 were detected in seven Brazilian HCV-1a isolates: three presented the H58P substitution, one harboured the E62D substitution and three carried the double mutation H58P+E62D. A recent study showed that secondary variants enhance primary resistances and could influence the emergence of resistant variants with possible consequences for clinical outcome.¹⁹

Two distinct genotype 1a clades could be distinguished after sequencing analysis of the NS5A gene (Figure 1). All Brazilian sequences (marked as circles) formed a large group of related sequences inside clade 1. Interestingly, in the phylogenetic analysis, 65.85% (27/41) of sequences with primary mutations at positions 28, 30, 31 and 93 were positioned in clade 1 (marked as triangles). Even though the clinical relevance of different clades in response to DAAs is still unknown, it is noteworthy that, in the NS3 gene, 93.8% of Brazilian clade-1 sequences carry the variant Q80, while in sequences from USA or Europe the variant K80 was observed in about half of the samples of clade 1 and was absent in clade 2 sequences.^{9,20} The increasing number of observations of distinct phenotypes of HCV genotypes and intrasubtype clades reinforces the importance of sequence variations for therapeutic approaches with new DAAs.

The signature patterns of HCV-1a NS5A amino acid sequences showed that Brazilian sequences present 11 specific amino acid positions that differ from those found in non-Brazilian isolates classified into clades 1 and 2. In particular, the amino acids L36, K107, T213, K215, G241, S367, S390, P397 and S401 were observed in more than 65.0% of Brazilian sequences, whereas in clades 1 or 2 these amino acids were absent or present in a small proportion (<17.0%). The most striking difference found in Brazilian sequences was the detection of the positively charged amino acid lysine (K) at site 215 and the polar amino acid serine

Table 1. Amino acid substitutions in the NS5A protein in Brazilian HCV subtype 1a and 1b isolates

DAA		Site									
		23	28	30	31	32	58	62	58-62	93	280
Daclatasvir	HCV-1a		A/T, <i>n</i> =1 (M28T)	E/H/R/K, <i>n</i> =0	M/V/F, <i>n</i> =0	L, <i>n</i> =0	D/P ^a , <i>n</i> =3 (H58P)	D ^a , <i>n</i> =1 (E62D)	<i>n</i> =3 (H58P-E62D) ^a	C/H/N, <i>n</i> =1 (Y93H)	
	HCV-1b	F ^a , <i>n</i> =0		Q ^a , <i>n</i> =1 (R30Q)	M/V/F, <i>n</i> =1 (L31M)	L, <i>n</i> =0	S ^a , <i>n</i> =2 (P58S)			C/H/N, <i>n</i> =2 (Y93H)	
Ledipasvir	HCV-1a			E, <i>n</i> =0	M, <i>n</i> =0					C/H, <i>n</i> =2 (Y93H)	
	HCV-1b										
Samatasvir	HCV-1a		V, <i>n</i> =0								
	HCV-1b			Q, <i>n</i> =1 (R30Q)	M, <i>n</i> =1 (L31M)					H, <i>n</i> =2 (Y93H)	
GSK2336805	HCV-1a			H, <i>n</i> =0	M, <i>n</i> =0						
	HCV-1b				W/V, <i>n</i> =0						V, <i>n</i> =4 (I280V)
PPI-668	HCV-1a		V/T, <i>n</i> =1 (M28T)				D/N, <i>n</i> =0				
	HCV-1b			Q, <i>n</i> =1 (R30Q)	M, <i>n</i> =1 (L31M)		S, <i>n</i> =2 (P58S)				
ACH-3102	HCV-1a		V/T, <i>n</i> =1 (M28T)		M, <i>n</i> =1 (L31M)					C/D/H, <i>n</i> =1 (Y93H)	

^aSecondary mutations.

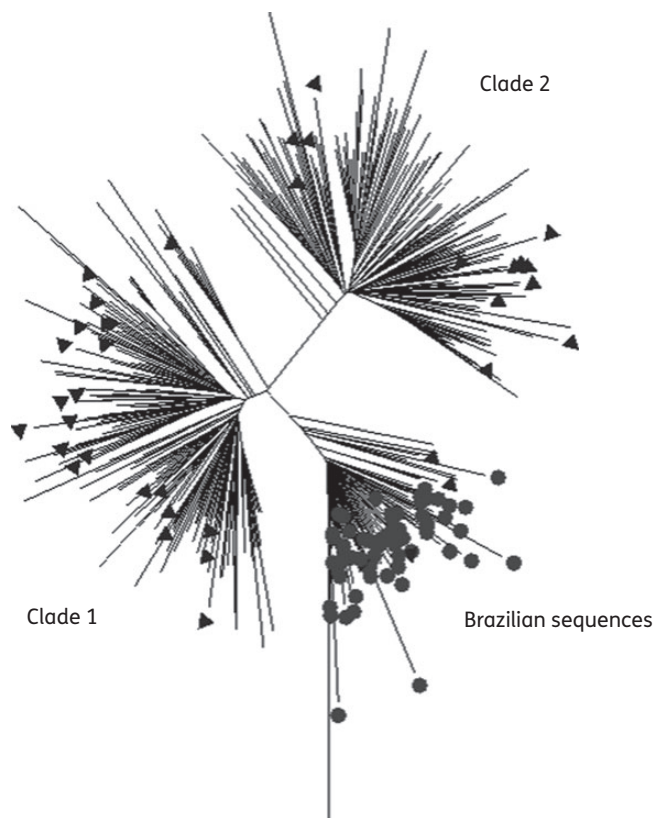


Figure 1. Maximum-likelihood phylogenetic tree of HCV-1a sequences from the NS5A region showing evolutionary relationships between 62 Brazilian HCV-1a isolates and 281 non-Brazilian sequences. The star-like topology tree shows two distinct clades of HCV-1a sequences. The Brazilian sequences form a distinct group inside clade 1 (marked as circles). Sequences with resistance mutations at sites 28, 30, 31 and 93 are marked as triangles. Sequence names have been removed for clarity. The tree was rooted with subtype 1b strain (AJ238799).

(S) at site 390, while both clades presented the hydrophobic amino acid glycine (G) at major frequencies. These findings reinforce the differences between subtype 1a amino acid sequences around the world.

To the best of our knowledge, the present study reveals for the first time the prevalence of dominant mutations in the NS5A protein in treatment-naïve patients infected with genotype 1 HCV from South America. In conclusion, similar frequencies of variants resistant to NS5A inhibitors were found for HCV-1a and HCV-1b strains. Phylogenetic analysis revealed that Brazilian HCV-1a sequences segregated in a separated cluster inside clade 1. Analysis of the subtype-specific amino acid signature pattern revealed several specific amino acid positions that differ from HCV clades 1 and 2. These results suggest that Brazilian HCV-1a sequences have a peculiar pattern of amino acid composition, mutations and frequencies. However, it is important to consider that *in vivo* data have demonstrated that NS5A inhibitors, when used together with other DAAs, do not appear to have reduced activity. The clinical implication of these data will become more apparent in the future when inhibitors of NS5A become available for clinical use for the treatment of chronic hepatitis C.

Acknowledgements

We wish to thank Plataforma Genômica–Sequenciamento de DNA/PDTIS-FIOCRUZ for DNA sequencing and Dr Lia Laura Lewis-Ximenez for scientific considerations.

Funding

This work was supported by grants from the ‘Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico’ (CNPq), the ‘Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior’ (CAPES) and ‘Programa de Excelência em Pesquisa—PROEP/FIOCRUZ’.

Transparency declarations

None to declare.

References

- Pereira LM, Martelli CM, Moreira RC et al. Prevalence and risk factors of hepatitis C virus infection in Brazil, 2005 through 2009: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis* 2013; **13**: 60.
- Shah N, Pierce T, Kowdley KV. Review of direct-acting antiviral agents for the treatment of chronic hepatitis C. *Expert Opin Investig Drugs* 2013; **22**: 1107–21.
- Fontana RJ, Hughes EA, Appelman H et al. Case report of successful peginterferon, ribavirin, and daclatasvir therapy for recurrent cholestatic hepatitis C after liver retransplantation. *Liver Transpl* 2012; **18**: 1053–9.
- Suzuki Y, Ikeda K, Suzuki F et al. Dual oral therapy with daclatasvir and asunaprevir for patients with HCV genotype 1b infection and limited treatment options. *J Hepatol* 2013; **58**: 655–62.
- Gao M, Nettles RE, Belema M et al. Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature* 2010; **465**: 96–100.
- Gao M. Antiviral activity and resistance of HCV NS5A replication complex inhibitors. *Curr Opin Virol* 2013; **3**: 514–20.
- Fridell RA, Wang C, Sun JH et al. Genotypic and phenotypic analysis of variants resistant to hepatitis C virus nonstructural protein 5A replication complex inhibitor BMS-790052 in humans: in vitro and in vivo correlations. *Hepatology* 2011; **54**: 1924–35.
- Walker J, Crosby R, Wang A et al. Preclinical characterization of GSK2336805, a novel inhibitor of hepatitis C virus replication that selects for resistance in NS5A. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 38–47.
- Peres-da-Silva A, Almeida AJ, Lampe E. Genetic diversity of NS3 protease from Brazilian HCV isolates and possible implications for therapy with direct-acting antiviral drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; **107**: 254–61.
- Soriano V, Vispo E, Poveda E et al. Directly acting antivirals against hepatitis C virus. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 1673–86.
- Pawlotsky JM. NS5A inhibitors in the treatment of hepatitis C. *J Hepatol* 2013; **59**: 375–82.
- Fridell RA, Qiu D, Wang C et al. Resistance analysis of the hepatitis C virus NS5A inhibitor BMS-790052 in an in vitro replicon system. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 3641–50.
- Murakami E, Imamura M, Hayes CN et al. Ultradeep sequencing study of chronic hepatitis C virus genotype 1 infection in patients treated with daclatasvir, peginterferon, and ribavirin. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 2105–12.

- 14** Jardim AC, Bittar C, Matos RP *et al.* Analysis of HCV quasispecies dynamic under selective pressure of combined therapy. *BMC Infect Dis* 2013; **13**: 61.
- 15** Pickett BE, Striker R, Lefkowitz EJ. Evidence for separation of HCV subtype 1a into two distinct clades. *J Viral Hepat* 2011; **18**: 608–18.
- 16** Korber B, Myers G. Signature pattern analysis: a method for assessing viral sequence relatedness. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992; **8**: 1549–60.
- 17** Plaza Z, Soriano V, Vispo E *et al.* Prevalence of natural polymorphisms at the HCV NS5A gene associated with resistance to daclatasvir, an NS5A inhibitor. *Antivir Ther* 2012; **17**: 921–6.
- 18** Suzuki F, Sezaki H, Akuta N *et al.* Prevalence of hepatitis C virus variants resistant to NS3 protease inhibitors or the NS5A inhibitor (BMS-790052) in hepatitis patients with genotype 1b. *J Clin Virol* 2012; **54**: 352–4.
- 19** Sun JH, O'Boyle Ii DR, Zhang Y *et al.* Impact of a baseline polymorphism on the emergence of resistance to the hepatitis C virus nonstructural protein 5A replication complex inhibitor, BMS-790052. *Hepatology* 2012; **55**: 1692–9.
- 20** De Luca A, Di Giambenedetto S, Prosperi M *et al.* Two distinct HCV genotype 1a clades: geographical distribution and association with natural resistance mutations to HCVNS3/4A inhibitors. *Antiviral Ther* 2013; **18**: Suppl 1: A47.

5.4 REGIÃO NÃO ESTRUTURAL NS4B

5.4.1 Amplificação do Gene NS4B e Sequenciamento Nucleotídico

Após a reação de RT-*nested*-PCR, foi obtido um produto de 841 pb, de 65 amostras pertencentes ao subtipo 1a e seis do subtipo 1b. Os fragmentos amplificados abrangem todo o gene NS4B (desde o primeiro nucleotídeo até o 783).

As sequências nucleotídicas obtidas (senso e antisenso) de cada amostra foram comparadas por alinhamento com sequências de referência representativas de cada subtipo do HCV e editadas com o programa Mega 5.0, excluindo-se a região correspondente aos oligonucleotídeos iniciadores e as sequências dos cromatogramas que apresentaram baixa qualidade (nove sequências). Sequências finais abrangendo todo o gene NS4B (nt 5475-6257) foram obtidas em 54 amostras do subtipo 1a e seis do subtipo 1b. A indicação gráfica do gene NS4B foi determinada pelo programa *Sequence Locator* (<http://www.hcv.lanl.gov>), e encontra-se marcada por uma tarja vermelha na figura 5.1. Ainda foram analisadas mais 28 sequências do GT-1b (nt 6108-6257) que codificam a porção C-terminal da proteína NS4B (aa 212-261).

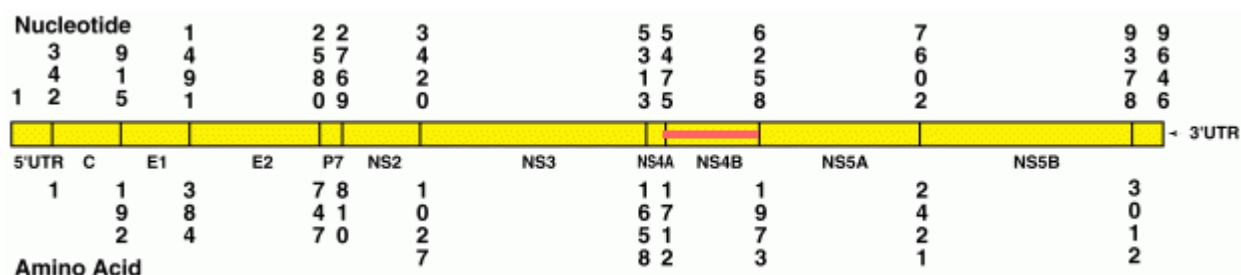


Figura 5.1 - Representação esquemática do gene NS4B no genoma do HCV

5.4.2 Análise das Sequências de Aminoácidos da Proteína NS4B

Os alinhamentos das sequências dos aminoácidos da NS4B dos HCV-1a e HCV-1b em relação às respectivas sequências-padrão são apresentados nas Figuras 5.2 e 5.3, respectivamente. As sequências de referência utilizadas foram: HCV-1a= NC_004102; HCV-1b= HCV-J D90208.

Não foram encontrados os polimorfismos nos sítios responsáveis por conferir resistência aos inibidores da NS4B, como clemizole (W55R e R214Q), anguizole (H94R/N), AP80978 (F98V/C), PTC725 (F98C e V105M) e silibina (Q203R e D228N) em ambos os subtipos estudados. Por sua vez, o variante F98L, que confere resistência aos inibidores PTC725, AP80978 e silibina, foi detectado em um isolado do HCV-1b (BR3849), não sendo observado nos isolados do HCV-1a.

NC_004102 SQHLPYIEQGMMLAEQFKQKALGLLQOTASRQAEVITPAVQTNWQKLEVFWAKHMWNFISGIQYLAGLSTLPGNPAIASLMAFTA AVT SPL [90]
5H.....A.....T..... [90]
7A.....E.....A..... [90]
16H.....D.A.V..... [90]
59H.A.....A.....A.....F [90]
82H.....A.....A..... [90]
92V.....A.....A.....?.....?..... [90]
93A.....A.S.....A..... [90]
106 ?.....H.A.....A.T.....A..... [90]
113H.A.....A.....I.AL..... [90]
114H.....A.....E.....A.....?..... [90]
120A.....H.....A.....A..... [90]
120LH.A.....A.....E.....A..... [90]
121H.A.....A.T.....T..... [90]
131H.....A.....A..... [90]
137H.A.....?..H.....A.....A?.....?.....?..... [90]
145 ??.....H.A.....V?.I.....?..?.....?.....???.?..... [90]
148H.A.....A.....E.....A..... [90]
155H.A.?......A.....E.....T..... [90]
157A.....A.T.....A..... [90]
162H.....A.....A..... [90]
166H.A.....A..... [90]
171H.A.....A.....A..... [90]
175 .R.....A.....AVA.A.SG.....A..... [90]
551H.....S..... [90]
553H.A.....?..?.....?..... [90]
213 .L.....H.A.....VA.TIE.....A..... [90]
631R.A..... [90]
634A.....A..... [90]
695A.....A.....E.....A.....?.....?..... [90]
692A.....A..... [90]
704H.A.....I.....A..... [90]
812 C.....H.A.....H.....A.....A..... [90]
813H.A.....S.V.....A..... [90]
826H.A.....D.A.....A.....?..... [90]
1560T.A.....A.....M..... [90]
2816H?.....A.....R.T..... [90]
2830H.A.....A.AH.?......A.....?..... [90]
2983H.A.....A.....?.....A..... [90]
3145V.....A.....A..... [90]
3207L.....A.....A.....?..... [90]
3209A.....H.....A.....A..... [90]
3228A.....H.....A.T.....A..... [90]
3540H.A.....A.....A.....T.....?..... [90]

W55

```

3542 ..... H . AI . . . . . N . . . . . A . . . . . A . . . . . [90]
3543 ..... H . AI . . . . . N . . . . . A . . . . . A . . . . . [90]
3551 ..... H . A . . . . . S . . . . . [90]
3917 ..... V . . . . . A . VA . S . . . . . A . . . . . [90]
3925 ..... H . A . . . . . A . T . . . . . T . . . . . [90]
4000 ..... A . . . . . VG . . . . . A . . . . . [90]
6377 ..... H . . . . . A . . E . . . . . A . . . . . [90]
6557 ..... A . . . . ? . . . . ? . ? ? . . . . A . . E . . . . A . . ? . . [90]
52 ----- A . . . . . A . . . . . A . . . . . A . . . . . ? . . . . . [90]
77 ----- A . . . . . A . . . . . [90]
4501 ----- A . . . . . A . . . . . A . . . . . [90]
24 ----- . . . . . H . . A . . . . . ? . . . . . [90]
193 ----- - ? . . . . S . . . . T . A . . . . . [90]
108 ----- . . . . . ? . . . . . ? . . . . . [90]
79 ----- . . . . . [90]
20 ----- . . . . . [90]
58 ----- . . . . . [90]
34 ----- . . . . . ? . . . . . [90]
136 ----- . . . . . [90]
694 ----- . . . . . [90]
818 ----- . . . . . [90]
2884 ----- . . . . . [90]

```

H94 F98 V105

```

NC_004102 TTGQILLFNILGGWVAQLAAPGAATAFVGAGLAGAAIGSVGLGKVLVDILAGYGAGVAGALVAFKIMSGEVPSTEDLVNLLPAILSPGA [180]
5 ..... [180]
7 ..... S ..... [180]
16 ..... S ..... [180]
59 ..... ? . . . . . ? . . . . ? . . . . [180]
82 ..... S ..... M . . . . . [180]
92 ..... S ..... [180]
93 ..... S ..... ? . ? . . . . ? . G . . . . . [180]
106 ..... S ..... P . . . . . I . . . . . [180]
113 ..... S ..... D . . . . . [180]
114 ..... S ..... ? . ? . . . . ? . . . . ? . . . . [180]
120 ..... S ..... [180]
120L ..... S ..... [180]
121 ..... S ..... [180]
131 ..... S ..... S . . . . . [180]
137 ..... S ..... ? . . . . ? . . . . D . ? . . . ? ? . . . . [180]
145 ..... ? S . . . ? . ? . ? . . . . . [180]
148 ..... S ..... ? . ? . . . . [180]
155 ..... S ..... [180]
157 ..... S ..... G . . . I . . . . . [180]
162 ..... S ..... [180]

```

	H94	F98	V105		
166	S	F	V	DA	[180]
171	S	F	V	? M	[180]
175	S	F	V	V I T	[180]
551	S	F	V		[180]
553	S	F	V	?	[180]
213	S	F	V	T	[180]
631	S	F	V		[180]
634	S	F	V		[180]
695	S	F	V	S P	[180]
692	S	F	V	D	[180]
704	S	F	V		[180]
812	S	F	V		[180]
813	S	F	V	? ?	[180]
826	S	F	V	V	[180]
1560	S	F	V	?	[180]
2816	S	F	V	D	[180]
2830	S	F	V		[180]
2983	S	F	V	? ? ? D	[180]
3145	S	F	V	D	[180]
3207	S	F	V	T	[180]
3209	S	F	V		[180]
3228	S	F	V		[180]
3540	S	F	V	? ?	[180]
3542	S	F	V		[180]
3543	S	F	V		[180]
3551	S	F	V		[180]
3917	S	F	V		[180]
3925	S	F	V	S	[180]
4000	S	F	V		[180]
6377	S	F	V		[180]
6557	S	F	V	S	[180]
52	S	F	V	? ? ? ? ? ?	[180]
77	S	F	V	D	[180]
4501	S	F	V		[180]
24	S	F	V	? ? ?	[180]
193	S	F	V	R T G I	[180]
108	S	F	V	S T ?	[180]
79	S	F	V		[180]
20	S	F	V	I M	[180]
58	S	F	V	? ? M	[180]
34	S	F	V	? ? ?	[180]
136	-----				[180]
694	-----				[180]
818	-----				[180]
2884	-----				[180]

		Q203	R214	D228													
NC_004102	LVVGVC	AAILRR	HVGP	GEGAVQ	WNR	LIAFA	SRGNH	VSP	THYVPE	SDAAAR	VTAIL	SSLT	VTQ	LLRRL	HQWISSE	CTPC	[261]
5T....																[261]
7S....																[261]
16T....																[261]
59	??														[261]	
82V....																[261]
92?																[261]
93??																[261]
106																[261]
113S.....T.....S....																[261]
114T.....T....																[261]
120S....																[261]
120L	?T....														[261]	
121																[261]
131T.....S....																[261]
137?																[261]
145	?														[261]	
148S....																[261]
155S....																[261]
157T.....																[261]
162S.....S....																[261]
166G.....T.....S....																[261]
171V.....S....																[261]
175S....																[261]
551N....																[261]
553	?S....														[261]	
213S....																[261]
631D....																[261]
634																[261]
695?																[261]
692D....																[261]
692S....																[261]
704S....																[261]
812V.....?---																[261]
813S....																[261]
826S....																[261]
1560S....																[261]
2816S....																[261]
2830?																[261]
2983V.....S....																[261]
3145?																[261]

D90208 ASHLPYIEQGMQLAEQFKQKALGLLQTATKQAEAAAPVVESKWRALEVFWAKHWNFISGIQYLAGLSTL [70]
 2828T..... [70]
 3049A...QG..A..... [70]
 3208T..... [70]
 3547T..... [70]
 3761H.....S...NV..... [70]
 3849A.S...Q..S..... [70]

W55

D90208 PGNPAIASLMAFTASITSPLTTQNTLLFNILGGWVAAQLAPPSAASAFVVGAGIAGAAVGSIGLGKVLVDI [140]
 2828V.....P.....S..... [140]
 3049S.....S..... [140]
 3208H.....D [140]
 3547V.....L.....R..... [140]
 3761V.....T..... [140]
 3849V.....T..... [140]

H94 F98 V105

D90208 LAGYGAGVAGALVAFKVMGEMPSTEDLVNLLPAILSPGALVVGVVCAAILRRHVGPGEGAVQIMNRLIAF [211]
 2828 [211]
 3049V..... [211]
 3208 [211]
 3547 [211]
 3761A..... [211]
 3849T..A..... [211]

Q203

D90208 ASRGNHVSPHTHYVPESDAAARVTQILSSLTITQLLKRHLQWINE DCSTPC [261]
 167 [261]
 570H..N..... [261]
 895?..?H..... [261]
 2820 [261]
 2828?----- [261]
 2889 [261]
 2984T..... [261]
 2985?..V..... [261]
 3011M..... [261]
 3049 [261]
 3134?..H.....T..... [261]

R214 D228

	R214		D228		
3140	· ·	·	T... [261]
3208	· ·	·	[261]
3225	· ·	·	T.....	?..?..?.. [261]
3536	· ·	·	[261]
3541	· ·	·	[261]
3544	· ·	·	T..H.	[261]
3546	· ·	·	V.....V.	[261]
3547	· ·	·	[261]
3550	· ·	·	G.....	[261]
3556	· ·	·	[261]
3761	· ·	·	S..... [261]
3848	· ·	·	[261]
3849	· ·	·	N.....	[261]
3859	· ·	·	R..... [261]
3918	· ·	·	[261]
3926	· ·	·	?	[261]
3933	· ·	·	[261]
5108	· ·	·	[261]
7872	· ·	·	?..... [261]
8038	· ·	·	?..D... [261]
8039	· ·	·	?..... [261]
8076	· ·	·	S..H.	[261]
2884	-----	-----	·	T.....V...R.....SSEST...	[261]

Figura 5.3 Sequências de aminoácidos da proteína NS4B do HCV-1b. Sequência padrão: HCV-J D90208

5.4.3 Identificação de Padrões Característicos de Aminoácidos em Amostras Brasileiras/Frequência de cada Aminoácido em cada Posição na Região NS4B

As sequências de cada subtipo foram submetidas à análise no programa Vespa com o objetivo de encontrar sítios específicos que, em relação a isolados virais de outras regiões geográficas, apresentam discrepância nas frequências dos aminoácidos. Os dados obtidos permitem visualizar, com base em valores estatísticos, o quanto as sequências podem ser conservadas em uma determinada região, bem como detectar a ocorrência de variações em posições específicas, identificando padrões característicos de aminoácidos em uma determinada população.

A Tabela 5.1 compara as frequências dos aminoácidos em 68 sequências brasileiras do HCV-1a (65 provenientes deste estudo e das únicas três sequências brasileiras disponíveis em banco de dados público, com os números de acesso EF032886, EF032887 e EF032896) com 635 sequências dos Estados Unidos (EUA) e 82 sequências da Europa obtidas do banco de dados do HCV (Los Alamos; <http://hcv.lanl.gov/content/hcv-db/index>). Essa análise permitiu a identificação de padrões característicos de aminoácidos em três sítios da proteína NS4B do HCV. O sítio 9 apresentou o aminoácido polar positivo histidina (H) em 66,7% das sequências brasileiras, em apenas 3,5% das americanas e 7,3% das européias, que apresentaram o aminoácido polar não carregado glutamina (Q) na maioria das suas sequências. Ainda assim, 70,1% das sequências brasileiras apresentam o aminoácido apolar alanina (A) no sítio 12 e o aminoácido polar não carregado serina (S) em 61,2% das sequências no sítio 257, que são ocupados majoritariamente pelos aminoácidos apolares metionina (M) e cisteína (C) nas sequências estrangeiras.

Tabela 5.1 Comparação dos sítios da proteína NS4B de isolados do HCV-1a que apresentam diferenças nas frequências dos aminoácidos em relação as de outras regiões geográficas (em negrito).

GT 1a (n)	Sítios na proteína NS4B		
	9	12	257
EUA (635)	Q (96,2)	M (83,3)	C (65,8)
	H (3,5)	A (8,0)	S (32,4)
EUROPA (82)	Q (92,7)	M (80,5)	C (69,5)
	H (7,3)	A (15,9)	S (23,2)
BRASIL (68)	H (66,7)	A (70,1)	S (61,2)
	Q (33,3)	M (22,8)	C (28,4)

valores ao lado dos aminoácidos estão em porcentagem

Por sua vez, a Tabela 5.2 compara as frequências dos 50 aminoácidos na extremidade C-terminal da proteína NS4B em 36 sequências brasileiras do HCV-1b (34 provenientes deste estudo e das únicas duas sequências brasileiras disponíveis em banco de dados público, com os números de acesso EF032891 e EF032895) com 201 sequências dos EUA e 143 sequências da Europa obtidas do banco de dados do HCV (Los Alamos; <http://hcv.lanl.gov/content/hcv-db/index>). Não houve identificação de padrões característicos de aminoácidos nos sítios analisados entre as regiões geográficas analisadas.

Tabela 5.2. Frequência de cada aminoácido da região C-terminal da NS4B das três regiões geográficas estudadas, com identificação de padrões característicos de aminoácidos

Sítio	Brasil (n=36)	Europa (n=143)	EUA (n=201)
212	0.941 A	1.000 A	1.000 A
213	0.971 S	0.993 S	1.000 S
214	0.971 R	0.993 R	1.000 R
215	0.971 G	1.000 G	1.000 G
216	0.971 N	1.000 N	1.000 N
217	0.971 H	1.000 H	1.000 H
218	0.971 V	1.000 V	1.000 V
219	0.971 S	1.000 S	1.000 S
220	0.971 P	1.000 P	1.000 P
221	0.971 T	1.000 T	1.000 T
222	0.971 H	0.993 H	1.000 H
223	0.971 Y	1.000 Y	1.000 Y
224	0.971 V	1.000 V	1.000 V
225	0.971 P	0.993 P	1.000 P
226	0.971 E	1.000 E	1.000 E
227	0.941 S	1.000 S	1.000 S
228	1.000 D	1.000 D	1.000 D
229	0.971 A	0.993 A	1.000 A
230	1.000 A	1.000 A	0.995 A
231	0.853 A	0.972 A	0.950 A
232	1.000 R	0.993 R	1.000 R
233	1.000 V	1.000 V	1.000 V
234	0.941 T	1.000 T	1.000 T
235	0.824 Q	1.000 Q	0.995 Q
236	1.000 I	0.986 I	0.995 I
237	1.000 L	1.000 L	1.000 L
238	1.000 S	1.000 S	1.000 S
239	0.912 S	0.951 S	0.900 S
240	1.000 L	1.000 L	1.000 L
241	1.000 T	1.000 T	1.000 T
242	0.941 I	1.000 I	0.990 I
243	0.971 T	1.000 T	1.000 T
244	1.000 Q	1.000 Q	0.980 Q
245	1.000 L	1.000 L	1.000 L
246	0.971 L	0.993 L	1.000 L
247	0.941 K	0.965 K	0.925 K
248	0.971 R	0.993 R	0.995 R
249	0.941 L	1.000 L	0.995 L
250	1.000 H	1.000 H	1.000 H
251	0.971 Q	0.979 Q	0.955 Q
252	1.000 W	1.000 W	1.000 W
253	0.971 I	0.986 I	1.000 I
254	0.912 N	1.000 N	0.990 N
255	0.941 E	1.000 E	1.000 E

256	0.941 D	1.000 D	1.000 D
257	0.941 C	0.993 C	0.995 C
258	0.853 S	0.972 S	0.960 S
259	0.941 T	1.000 T	0.990 T
260	0.971 P	1.000 P	1.000 P
261	0.971 C	1.000 C	1.000 C

NC_004102 SMSYSWTGALVTPCAAEEQKLPINALSNSLLRHHNLVYSTTSRSACQRQKKVTFDRLQVLDSDHYQDVLKEVKAAASKVKANLLSVE [86]
 5I..... [86]
 7T..... [86]
 34 ?.....I.....?.....?.....?.....?.....?.....?.....?.....E..... [86]
 116I.....M.....N..... [86]
 117I.....V.....SL..... [86]
 118I.....N..... [86]
 120I.....M.....N..... [86]
 137I.....S..... [86]
 148I.....H.....L..... [86]
 155I..... [86]
 157I.....T.....M..... [86]
 162I.....A.....R..... [86]
 166 ...T...I..... [86]
 171I..... [86]
 193I.....V.....SL..... [86]
 551 ...T...I.....M..... [86]
 553 ?.....?.....I.....?.....?.....?.....?.....?.....?.....?..... [86]
 631 ?.....I.....N..... [86]
 634 ?.....I.....N.....S..... [86]
 694 ?.....I.....?..... [86]
 695I..... [86]
 704 ?.....I.....?..... [86]
 813I.....G..... [86]
 818I.....S.....K..... [86]
 826I..... [86]
 1560I.....M..... [86]
 2816I.....S..... [86]
 2830I..... [86]
 2983 ...T...I..... [86]
 2998I.....Y.....NY.....R.....D..... [86]
 3145T.....S.....?..... [86]
 3207I.....M.....N..... [86]
 3209I..... [86]
 3217E..... [86]
 3228I.....?.....?..... [86]
 3540I.....E.....R..... [86]
 3542I.....S..... [86]
 6377 ...?...I.....?.....S..... [86]
 6557?..I.....T.....N.....?.. [86]
 8031I.....GL.....N..R..... [86]
 95II.....I..P.....P.....V.....N.....R.....AA [86]
 120L?.....M.....N..... [86]
 145?.....R..... [86]
 54 [86]
 92?.....D..... [86]

93?..... [86]
203 [86]

NC_004102 EACSLTPPHSAKSKFGYGAKDVRCHARKAVAHINSVWKDLLEDSVTPIDTTIMAKNEVFCVQPEKGGKPAHLLVFPDLGVRVCEK [172]
5 ...D.....N..... [172]
7R.....N.....E.....Y..... [172]
34N..... [172]
116R.....N.S.....N..... [172]
117R.....G.....N.....I..... [172]
118T.....S..... [172]
120R.....N..... [172]
137R.....?.....N.....?..... [172]
148R.....R.....N..... [172]
155N..... [172]
157R.....N..... [172]
162 ...D.....N.....?.....?.....?..... [172]
166N..... [172]
171R.....N..... [172]
193R.....N.....I..... [172]
551N..... [172]
553R.....?.....?.....N.....?.....?..... [172]
631R.....N.....E..... [172]
634R.....N.....N..... [172]
694R.....N.....?..... [172]
695R.....N..... [172]
704R.....S.....?N..... [172]
813R.....S.....IS.....R.....?..... [172]
818R.....S.....N..... [172]
826N..... [172]
1560R.....N.....L.....E..... [172]
2816N..... [172]
2830N.....?..... [172]
2983 D.....N..... [172]
2998N..... [172]
3145R.....N..... [172]
3207N..... [172]
3209R.....N..... [172]
3217R.....N.....E.A..... [172]
3228 ...D.....?.....N.....?..... [172]
3540R.....N..... [172]
3542R.....N..... [172]
6377R.....N..... [172]
6557R.....?.....?.....N.....E.....?..... [172]
8031?.....S..... [172]
95V.R.....?..... [172]

L159



L159

120LR.....N..... [172]
 145FL.....S.....A..... [172]
 54R.....N..... [172]
 92R.....N..... [172]
 93R.....N.....N..... [172]
 203 [172]

NC_004102 MALYDVVSKLPLAVMGSSYGFQYSPGQRVEFLVQAWKSKKTPMGFSYDTRCFDSTVTESDIRTEEAIYQCCDLPQARVAIKSLTE [258]
 5R.....R.....N.....?..R.... [258]
 7K.....?..... [258]
 34Q.....?.....?..R.....?.....?.....?.....?..... [258]
 116K.....RR.....N..... [258]
 117 [258]
 118IR...P...G.....R..... [258]
 120K..P.....A.....RR.....?..... [258]
 137K..?.....R.....R.....?.....R?.... [258]
 148D.....R..... [258]
 155K.....A.....R..... [258]
 157L.....R..... [258]
 162?..... [258]
 166R.....V..... [258]
 171T..P..... [258]
 193 [258]
 551N.....L..... [258]
 553?.....?.....?.....?..... [258]
 631T..V...D.....R..... [258]
 634N..... [258]
 694L.....R.....?..... [258]
 695 [258]
 704 [258]
 813Q.....K...RA..... [258]
 818G.....R..... [258]
 826A..... [258]
 1560K.....R..... [258]
 2816Q.....A.....RR.....N.....A..R.... [258]
 2830P.....R.....R..... [258]
 2983R.....?.....R..... [258]
 2998K.....A.....RR..... [258]
 3145Q.....ARR..... [258]
 3207K.....RR..... [258]
 3209 I.....Q.....?..... [258]
 3217K.....G..... [258]
 3228R.....?.....?..R.... [258]
 3540Q.....R.....R..... [258]
 3542Q.....R..... [258]

6377G.....N.....?..... [258]
6557K.....N..... [258]
8031K.....R.....R..... [258]
95 [258]
120LK..P.....A.....RR.....?..... [258]
145L.....N.....A.....R.....R..... [258]
54 [258]
92 [258]
93Q.....R..... [258]
203T..Q.....N.....RS..A.....H..V..S.....A.E..Q..R..... [258]

NC_004102 RLYVGGPLTNSRGENCYRRCRA **S282** SGVLTTCGNTLTICYIKARAACRAAGLQDCTMLV **C316 L320** CGDILVVICESAGVQEDAASLRAFTEAMT [344]
5?.....Q..... [344]
7?..... [344]
34Q.....R.....?..... [344]
116Q.....R.....?..... [344]
117?..... [344]
118Q.....R.....P..... [344]
120K.....Q.....R..?.....?.....R..... [344]
137??..Q.....R..... [344]
148?.....Q.....R.....?..... [344]
155Q.....R.....?..... [344]
157Q.....R..... [344]
162?.....?.....Q.....R..... [344]
166Q.....R..... [344]
171 [344]
193?..... [344]
551Q.....R..... [344]
553??..?..???.?.....?.....?.....?..... [344]
631Q.....R..I.....Q..... [344]
634Q.....R.....?..... [344]
694R..... [344]
695Q.....R..... [344]
704Q..... [344]
813T..... [344]
818Q.....R..... [344]
826Q.....R..... [344]
1560I.....Q.....R.....R..... [344]
2816R.....E.....R..... [344]
2830R..... [344]
2983Q.....R.....N..... [344]
2998Q.....G.....R..... [344]
3145Q.....R..... [344]
3207Q.....R.....R..... [344]
3209Q..... [344]

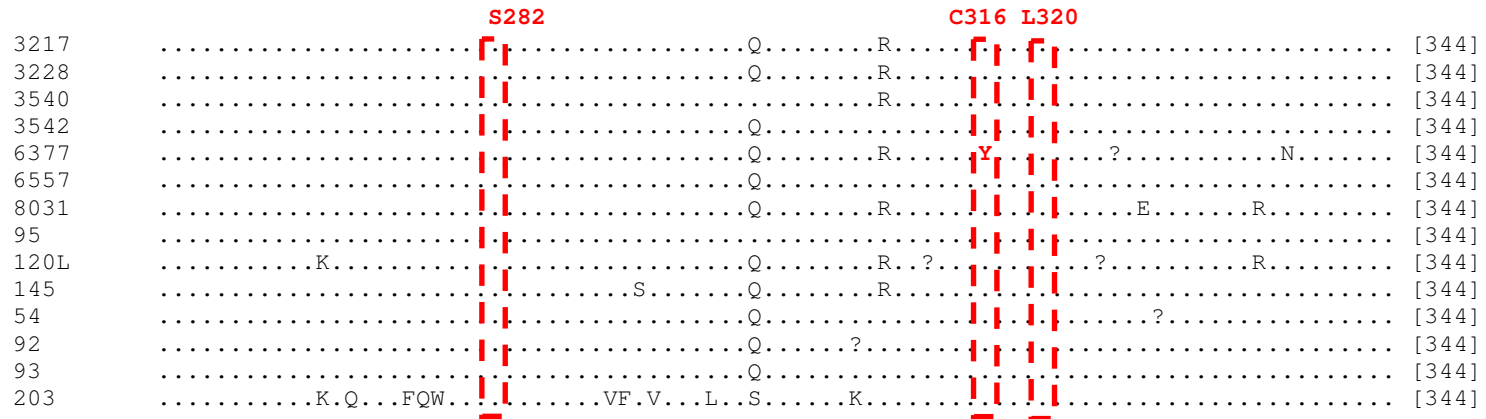


Figura 5.5 Sequências de aminoácidos da proteína NS5B do HCV-1a. Sequência padrão: NC_004102

D90208 SMSYTWGALITPCAAEESKLPINPLNSLLRHSMVYSTTSRSASLRQKKVTFDRLQVLDDHYRDVLKEMKAKASTVKARLLSIEEACKLTP [93]
4S.....A.....N..A.....Q.....K..V..... [93]
15A.....QN..A.....Q.....Q.....K..... [93]
68A.....N..A.....Q.....K..V..... [93]
98N..A.....Q.....Y.....K..V..... [93]
140A.....N..A.....Q.....Q..... [93]
162A.....PN..A.....Q.....Q.....K..V..... [93]
167A.....N..A.....Q.....K..V..... [93]
7872A.....N..A.....Q.....S..Q.....K...D..... [93]
508A.....PN..A.....Q.....V..... [93]
570A.....N..A.....Q.....V..... [93]
771S.....A.....H..A.....Q.....R.K..V..... [93]
893N..A.....N..A.....Q.....V..... [93]
2828R.....A.....N..A.....Q.....Q.....I.....K...D..... [93]
2986M.....A.....N..A.....Q.....M.....V...K.....V..... [93]
3049 -----.....A.....N..A.....Q.....V..... [93]
509A.....N..A.....Q.....Q.....V..... [93]
133A.....N..A.....Q.....Q.....I.....K...D..... [93]
770A.....N..A.....Q.....K..V...R... [93]
2820A.....N..A.....Q.....Q.....K..V.D..... [93]
2893RR.....A.....N..A.....Q.....V..... [93]
3136A.....N..A.....Q.....N..Q.....I.....K..... [93]
3154 ---.....RS..A.....NL..A.....Q.....P...TV...R... [93]
3208NW..A.....N..A.....Q.....Q.....K...D..... [93]
3225 -----.....A.....N..A.....GQ.....K..V..... [93]
3541S.....A.....N..A.....Q.....K..V..... [93]
3544 -----.....A.....N..A.....Q.....K..V..... [93]
3546S.....A.....N..A.....Q.....Q.....V..... [93]
3547 ---.....A.....N..A.....Q.....K...D..... [93]
3556 ---.....A.....N..A.....Q.....K..... [93]
3918A.....N..A.....Q.....Q.....V.....K...D..... [93]
4001 ---.....A.....N..A.....Q.....K..V..... [93]
4109A.....N..A.....Q.....K..V..... [93]
5108A.....N..A.....Q.....K..V..... [93]
8076A.....N..D.A.....Q.....K..... [93]
520 -----.....A.....QN..A.....Q.....K..V..... [93]
953 -----.....A.....N..A.....Q.....K..V...R... [93]
2889 -----.....A.....WI..A.....Q.....V.....V..... [93]
2976 -----.....A.....N..A.....Q.....Q.....R.K..V..... [93]

2980 -----A.....N..A.....Q.....V..... [93]
 2987 -----S..A.....N..A.....Q.....K..V..... [93]
 3011 -----ASC.S.A.....N..A.....Q.....M.....K..V..... [93]
 3046 -----A.....A.....QN..A.....Q.....M.....K..... [93]
 3134 -----A.....Y.N..A.....Q.....K..V..... [93]
 3140 -----V.A.....NK.A.....Q.....K..V..... [93]
 3536 -----AS...A.....N..A.....Q.....K..... [93]
 3550 -----A.....N..A.....Q.....Q...I.....K...D..... [93]
 3761 -----A.....N..A.....Q.....K..V..... [93]
 3848 -----A.....N..A.....Q.....Q.....K..... [93]
 3926 -----A.....N..A.....Q.....K..V..... [93]
 3859 -----A.....N..A.....Q.....V..... [93]
 3933 -----A.....N..A.....Q.....K..V..... [93]
 3773 -----.....K.....R... [93]

L159

D90208 PHSAKSKFGYGAKDVRSLSSRAVNHRSVWEDLLETETPIDTTIMAKNEVFCVQPEKGGGRKPAFLIVFPDLGVRVCEKMALYDVVSTLPQAV [186]
 4N..K.....N..K.....D.....**F**..... [186]
 15 ...R.....N..K..... [186]
 68N..K.I.....D..... [186]
 98 ...R.....N..K.....K..D.....I.....**F**..... [186]
 140N..I..... [186]
 162N.....K..D..... [186]
 167N..K.....N..K.....D.....**F**.....N..... [186]
 7872N..K.I.....**F**..... [186]
 508 ...R.....N..K.....S..K.....N.....I..... [186]
 570 ...R.....K.TR.H..K.....V.....A.....Y..... [186]
 771 ...R.....K.....Q.....**F**.....Y..... [186]
 893N..K.....N..K..... [186]
 2828N..K.I..... [186]
 2986 ...R.....N..K.....N..K.....D.....I..... [186]
 3049N..K.....N..K.....D.....I.....**F**..... [186]
 509N..K.....K..... [186]
 133K.I.....**F**..... [186]
 770N..K.....H..K.....D.....**F**.....Y.....N..... [186]
 2820N..I.....K..... [186]
 2893N..K.I.....N..K.....D.....**F**..... [186]
 3136N..GK.I.....**F**..... [186]
 3154 ...R.....N.....S.....K.....**F**..... [186]
 3208N.T.K.I.....**F**..... [186]
 3225N..K.....L..K.....D.....**F**..... [186]
 3541N..K..R.....K..D..... [186]
 3544N..K.I.....K.....D.....**F**.....I.....T..... [186]
 3546 ...R.....GK..R.....K.....**F**.....F..... [186]

L159

3547 N I Q [186]
3556 N . . K . . K D [186]
3918 N . . K . . I [186]
4001 R K K V [186]
4109 N . . K . . I K H [186]
5108 N . . K L K [186]
8076 R N . . RK K . . Q Y [186]
520 R N S [186]
953 N . . K H K D I [186]
2889 N . . K N K T I [186]
2976 R N . . K . . H K D I Y [186]
2980 N . . K K D [186]
2987 R N . . GK K N [186]
3011 N . . RK . . I V S [186]
3046 R N . . K S K D [186]
3134 R A RK K Y [186]
3140 N . . K K D [186]
3536 N . . K H K D [186]
3550 N . . K . . K [186]
3761 N . . K L K D I [186]
3848 N [186]
3926 R N . . RK . . D K . . Q Y [186]
3859 T . . N . . K N K T I [186]
3933 K . . R K D H [186]
3773 N K D [186]

D90208 MGPSYGFQYSPGQRVEFLVNTWKSKKCPMGFSYDTRCFDSTVTENDIRTEESIQCCDLAPEARQAIRSLTERLYVGGPLTNSKGQNCGYRRC [279]
4 ..S.....A.....S.....V.....K.....I..M..... [279]
15 ..S.....A.....S.....A.....I..... [279]
68KA.Q.....A.....V.....I..... [279]
98 ..S.....A.....A.....S.....I..... [279]
140 ..S.....A.....N.....V..... [279]
162A.....A.....S.....V.....I..... [279]
167A.....N.....V.....K.....I..... [279]
7872 ..S.....A.....A.....V..... [279]
508 ..S.....A.R.....A.....V.....I.....S..... [279]
570 ..S.....A.....N.....A.....S.....V.....K.....I..... [279]
771 ..S.....A.....A.....V.....I..... [279]
893 ..S.....A.....A.....A.....V.L.....I..... [279]
2828 ..S.....A.....V.....I..... [279]
2986A.....A.....T.....A.....S.....V.....I..... [279]
3049A.....A.....V.....I..... [279]
509A.....A.....V.....T..... [279]

133 ..S.....A.....V..... [279]
 770 ..S.....A.....V.....K.....I..... [279]
 2820 ..S.....A.....RN.....A.....V..... [279]
 2893 ..S.....A.....V.....K.....I..... [279]
 3136 ..S.....A.....N.....A.....V..... [279]
 3154 ..S.....A.....A.....S.....I.....S..... [279]
 3208 ..S.....A.....RN.....A.....V..... [279]
 3225 ..S.....A.....V.....K.....I..... [279]
 3541 ..S.....A.....N.....A.....S.....V.....L..... [279]
 3544 ..S.....A.....V.....I..... [279]
 3546 ..SA.....A.....R.....A.....S.....V.....K..... [279]
 3547 ..S.....A.....S.....A.....V.....I..... [279]
 3556 ..S.....KA.....V.....I..... [279]
 3918 ..S.....A.....A.....V..... [279]
 4001 ..S.....A.....A.....V.....K.....I.....R..... [279]
 4109 ..S.....A.....R.....A.....S.....V..... [279]
 5108A.....A.....S.....V.....I..... [279]
 8076A.....T.....A.....S.....V.....I..... [279]
 520 ..S.....KA.E.....N.....A.....S.....V.....I..... [279]
 953 ..S.....A.....S.....V.....I..... [279]
 2889 ..S.....A.....A.....V.....I..... [279]
 2976 ..S.....A.....V..... [279]
 2980A.....V.....A.....K.....I..... [279]
 2987 ..S.....A.....A.....S.....V.....I..... [279]
 3011 ..S.....KA.N.....RV.....A.....V.....I..... [279]
 3046 ..S.....A.....A.....S.....V.....V.....I..... [279]
 3134 ..S.....A.....T.....A.....S.....V.....I..... [279]
 3140 ..S.....A.....S.....V.....K.....I..... [279]
 3536 ..S.....A.....N.....V.....K.....I..... [279]
 3550 ..S.....A.....R.....V..... [279]
 3761 ..S.....A.....RN.....I.....K.....I..... [279]
 3848 ..S.....A.....T.....A.....V.....I..... [279]
 3926 ..S.....A.....A.....S.....V.....I..... [279]
 3859 ..S.....A.....A.....V.....I..... [279]
 3933A.....S.....V.....I..... [279]
 3773 ..S.....A.....S.....V.....I..... [279]

D90208 RAS^{S282}GVLTTCGNTLTCTYKATAACRAAKLQDCTMLV^{C316}EDDLVVICESAGTQEDAAALRAFTEAMTRYSAPPGDPPQPEYDLELITSC^{S368}SNVSV [372]
 4S.....N.....V..... [372]
 15S.....C.....S.....V..... [372]
 68S.....C.....V.....S.....V..... [372]
 98C.....S.....V..... [372]
 140S.....C.....S.....V..... [372]
 162S.....C.....V.....S.....V..... [372]
 167S.....C.....E.N.V..... [372]
 7872S.....C.....S.....V..... [372]

	S282		C316		S368			
508	S	C	S V	-----	[372]
570	S	C	S V	-----	[372]
771	S	C	S V	-----	[372]
893	S	C	S V	-----	[372]
2828	S	C	N V	-----	[372]
2986	S	C		-----	[372]
3049	S	C	S V	-----	[372]
509	S	C	V G V V	-----	[372]
133	S	C	S V N	[372]
770	S	C	S V		[372]
2820	S	C	N V		[372]
2893	S	C	S V N	[372]
3136	S	C	N V		[372]
3154	S	C	S V		[372]
3208	S	C	S V		[372]
3225	S	C	S V N	[372]
3541	S	C	V S V		EKA [372]
3544	S	C	S V		[372]
3546	S	C	S V		[372]
3547	S	C	S V		[372]
3556	S	C	N V		A [372]
3918	S	C	S V		[372]
4001	S	C	S V		[372]
4109	S	C	S V		[372]
5108	S	C	V S V		[372]
8076	S	C	S V		[372]
520	S	C	S V		[372]
953	S	C			[372]
2889	S	C	S V		[372]
2976	S	C	I E S V K	[372]
2980	S	C	N V		R [372]
2987	S	C	S V		[372]
3011	S	C	N V		[372]
3046	S	C	S V		[372]
3134	S	C	S V		[372]
3140	S	C	N V		[372]
3536	S	C	N S V		[372]
3550	S	C	S V		[372]
3761	S	C	L S V		[372]
3848	S	C	K S V		[372]
3926	S	C	S V		[372]
3859	S	C	S V		[372]
3933	S	C	S V		[372]
3773	S	C	R S V L	[372]

M414 L419 A421/R422/M423 C445 Y448

```

D90208 AHDASGKRVYYLTRDPTTPLARAAWETVRHTPVNSWLGNIIMYAPILWARMILMTHFFSILLAQEQLKALLCQIYGACYSIEPLDLPQIIER [465]
133 ..... A ..... H.V. .... [465]
770 ..... A ..... Q. [465]
2820 ..... A ..... H. .... Q. [465]
2893 ..... A ..... Q. [465]
3136 ..... A ..... V. L. .... H.V. .... Q. [465]
3154 ..... A ..... Q. [465]
3208 ..... A ..... V. .... H.V. .... Q. [465]
3225 ..... A ..... V. .... Q. [465]
3541 ..... Q. [465]
3544 ..... L. A ..... I. .... L. Q. [465]
3546 ..... A ..... Q. [465]
3547 ..... A ..... V. .... H.V. .... Q. [465]
3556 ..... A ..... I. H. .... [465]
3918 ..... A. I. .... H. .... Q. [465]
4001 ..... A ..... Y. .... Q. [465]
4109 ..... I. .... Q. [465]
5108 ..... A ..... Q. [465]
8076 ..... A ..... Q. [465]
520 ..... A ..... I. .... N. .... P. Q. [465]
953 ..... A ..... I. G. .... Q. [465]
2889 ..... I. F. A ..... V. V. L. I. .... F. .... Q. [465]
2976 ..... AK ..... Q. [465]
2980 ..... A ..... V. L. .... Q. [465]
2987 ..... A ..... Q. [465]
3011 ..... A ..... Q. [465]
3046 ..... A ..... Q. [465]
3134 ..... A ..... Q. [465]
3140 ..... A ..... Q. [465]
3536 ..... A ..... I. G. .... Q. [465]
3550 ..... V. A ..... H.V. .... Q. [465]
3761 ..... T. A ..... [465]
3848 ..... A ..... Q. [465]
3926 ..... A ..... Q. [465]
3859 ..... A ..... V. V. .... F. .... Q. [465]
3933 ..... A ..... Q. [465]
3773 ..... AK ..... Q. [465]

```

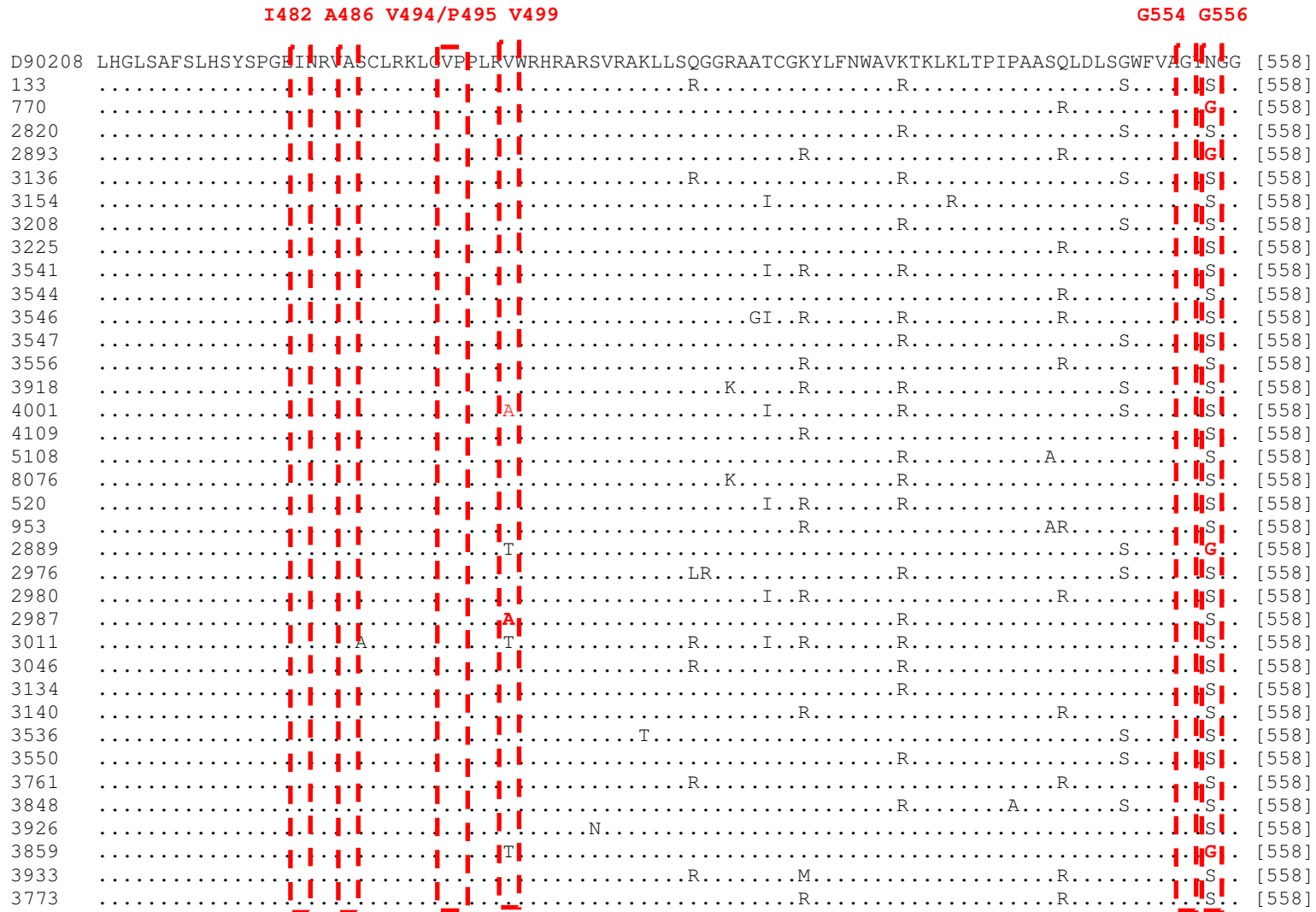



Figura 5.6 Sequências de aminoácidos da proteína NS5B do HCV-1b. Sequência padrão: D90208

5.5.3 Identificação de Padrões Característicos de Aminoácidos em Amostras Brasileiras/Frequência de cada Aminoácido em cada Posição na região NS5B

A Tabela 5.3 compara as frequências dos aminoácidos em 50 sequências brasileiras do HCV-1a (47 provenientes deste estudo e das únicas três sequências brasileiras disponíveis em banco de dados público, com os números de acesso EF032886, EF032887 e EF032896) com 585 sequências dos Estados Unidos (EUA) e 69 sequências da Europa obtidas do banco de dados do HCV (Los Alamos; <http://hcv.lanl.gov/content/hcv-db/index>). Esta análise permitiu a identificação de padrões característicos de aminoácidos em sítios da proteína NS5B do HCV. O sítio 212 apresentou o aminoácido polar positivo (R) em 52,1% das sequências brasileiras, que foi encontrado em apenas 14,0% das sequências americanas e em 7,2% das européias. Nesse sítio, as sequências estrangeiras apresentaram majoritariamente o aminoácido polar positivo (K). Por sua vez, as sequências estrangeiras apresentaram padrões de aminoácidos característicos em quatro sítios da polimerase.

Tabela 5.3. Comparação dos sítios da NS5B polimerase (N-terminal) de isolados do GT 1a, apresentando diferenças nas frequências dos aminoácidos em isolados brasileiros em relação a outras regiões geográficas (em negrito).

GT 1a (n)	Sítios na NS5B polimerase				
	11	184	212	309	327
EUA (585)	V (64,8) I (34,4)	L (58,6) V (21,0)	K (84,8) R (14,0)	Q (65,5) R (33,7)	A (74,4) Q (22,2)
EUROPA (69)	I (63,8) V (36,2)	V (44,9) L (26,1)	K (92,8) R (7,2)	R (73,9) Q (26,1)	Q (60,9) A (36,2)
BRASIL (50)	I (84,1) V (15,9)	L (75) V (2,1)	R (52,1) K (47,1)	R (70,8) Q (29,1)	A (93,2) Q (2,3)

Valores ao lado dos aminoácidos estão em porcentagem

Por sua vez, a comparação das frequências dos aminoácidos em 558 sítios da NS5B polimerase de 54 sequências brasileiras do HCV-1b (52 provenientes deste estudo e duas sequências brasileiras disponíveis em banco de dados público, com os números de acesso EF032891 e EF032895) com 194 sequências dos EUA e 63 da Europa, obtidas do banco de dados do HCV (Los Alamos; <http://hcv.lanl.gov/content/hcv-db/index>) revelou a existência de dois sítios que apresentaram padrões característicos de aminoácidos. O aminoácido polar positivo arginina (R) foi encontrado em 67% das sequências americanas no sítio 98, enquanto que o aminoácido polar não carregado asparagina (N) foi encontrado em 71,7% das sequências brasileiras no sítio 231. Os efeitos dos polimorfismos de aminoácidos encontrados para ambos os subtipos do HCV não são ainda conhecidos. Novos estudos podem determinar os efeitos da diversidade genética na estrutura da enzima, incluindo modelagem e dinâmica molecular, para entender melhor a relação entre a variação da sequência de aminoácidos e eventuais mudanças estruturais nas proteínas NS4B e NS5B.

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, esforços para o desenvolvimento de novos fármacos foram direcionados para a identificação de agentes capazes de inibir etapas específicas do ciclo replicativo do HCV. Vários inibidores DAAs específicos e direcionados às proteínas não-estruturais do HCV, bem como inibidores que interferem com a interação vírus-hospedeiro foram desenvolvidos e se encontram, atualmente, em diferentes fases de pesquisa clínica. Contudo, variantes resistentes a esses inibidores foram identificados em ensaios clínicos e em estudos *in vitro* (Bartels et al., 2008; Chase et al., 2009). A variabilidade genética de isolados brasileiros do HCV é pouco documentada (Peres-da-Silva et al., 2012). Neste contexto, analisou-se na presente tese a variabilidade genética de sequências dos genes NS3, NS4 e NS5 do HCV em amostras circulantes em nossa região, identificando isolados virais que apresentam mutações associadas com a diminuição da sensibilidade aos novos agentes DAAs e que também poderiam contribuir para o desenvolvimento de outros antivirais.

Inicialmente, foi analisada a ocorrência natural de mutações dominantes no domínio serina protease da região NS3 em 114 amostras brasileiras de pacientes virgens de tratamento e suas possíveis implicações para a terapia com os novos antivirais de atuação direta, uma vez que a NS3 protease se tornou o principal alvo molecular para novas abordagens terapêuticas por desempenhar importante papel na clivagem da poliproteína viral e, conseqüentemente, no processo replicativo viral. No primeiro artigo intitulado “Mutations in hepatitis C virus NS3 protease domain associated with resistance to specific protease inhibitors in antiviral therapy naive patients”, publicado na revista “Archives of Virology”, os resultados indicaram que os resíduos da tríade catalítica (H57, D81 e S139) e os resíduos R155 e A156, localizados no sítio de ligação da protease, foram altamente conservados entre os isolados estudados. Contudo, foi detectada a mutação V36L em 5,6% dos pacientes infectados pelo genótipo 1b (três sequências), enquanto que a substituição T54S foi encontrada em 4,1% dos isolados do genótipo 1a do HCV (duas sequências). De uma forma geral, os vírus que apresentam essas mutações na serina protease NS3 do HCV estão relacionados a um grau de baixa a média resistência ao inibidor telaprevir (Sarrazin et al., 2007). Os variantes V36 e T54 acarretam redução intermediária na eficácia da replicação viral, apesar dessas mutações localizarem-se no interior da proteína viral e longe do sítio de ligação com o inibidor, elas interferem na tríade catalítica da protease. Essas duas mutações levam a interação não pareada entre os resíduos da protease e o grupo ciclopropil do telaprevir, o que poderia explicar a resistência conferida por essas variantes virais (Yan et al., 1998; Barbato et al., 1999).

No segundo artigo intitulado “Genetic diversity of NS3 protease from Brazilian HCV isolates and possible implications on therapy with direct acting antiviral drugs”, foi investigada a

diversidade genética das 114 sequências da NS3 protease e suas possíveis implicações para a terapia antiviral de atuação direta. Essas sequências do domínio NS3 foram comparadas com outras de diferentes isolados do HCV disponíveis na base de dados do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) selecionadas com a utilização da ferramenta de busca BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Trabalhos recentes relataram que sequências do HCV do subtipo 1a podiam ser separadas em duas clades distintas nas análises filogenéticas com sequências parciais do gene NS5B, ou do genoma completo de sequências norte americanas e européias (Chevaliez et al. 2009, Pickett et al. 2011). Vários sítios informativos para esta distinção estão localizados próximos ou dentro de códons associados à resistência aos inibidores da serina protease NS3-4A, como o aminoácido Q41, formador da cavidade hidrofóbica na protease, que confere resistência ao inibidor boceprevir (Tong et al. 2008). Para determinar em qual clado as sequências brasileiras iriam se agrupar, foi construída uma árvore genética com as mesmas sequências utilizadas por Pickett e colaboradores (Pickett et al. 2011). A análise revelou que todas as sequências brasileiras, exceto duas, formaram um *subcluster* dentro do clado 1. Este *subcluster* apresentou características fenotípicas diferentes em relação à presença de mutações de resistência para inibidores macrocíclicos (MK-7009, ITMN-191, and TMC-435). As sequências do clado 1 do HCV apresentaram em 60% das mesmas o aminoácido lisina (K) no sítio 80, que confere resistência aos inibidores macrocíclicos. Em contrapartida, o aminoácido glutamina (Q) foi encontrado em 97,5% das sequências virais formadoras do clado 2 e em 93,8% das sequências brasileiras. Lenz e colaboradores (Lenz et al., 2012), em um ensaio clínico de fase IIb com o inibidor TMC435 (simeprevir), mostraram taxas de resposta virológica maiores em pacientes infectados pelo HCV subtipo 1a contendo o aminoácido Q80. Apesar dessas considerações, Bartels e colaboradores relataram que variantes virais de resistência são raramente encontrados em pacientes que ainda não receberam terapia com DAAs (Bartels et al., 2013), porém desconsideraram que a mutação de resistência ao inibidor simeprevir K80 encontra-se presente em frequências altas nas sequências norte americanas e européias formadoras do clado 1 (Peres-da-Silva et al., 2012; De Luca, et al., 2013), reforçando a importância em se considerar as informações das sequências dos clados na futura terapia com DAAs.

Um novo variante de resistência ao inibidor de protease boceprevir foi descrito, V55A (Qiu et al., 2009). Neste estudo, foram encontrados três variantes de resistência no clado 1 e em sequências brasileiras, e uma no clado 2, mas não no subtipo 1b. Estudos de dinâmica molecular demonstraram que esses variantes, além de promoverem constrição no sítio de ligação do inibidor, acarretam perda de ligações tipo pontes de hidrogênio na interação inibidor-proteína (Welsch et al., 2012). Adicionalmente, uma diminuição na capacidade replicativa para esses variantes foi detectada, pois a protease apresentou uma menor flexibilidade estrutural em comparação à proteína

selvagem (Welsch et al., 2012). Sugere-se que o subtipo 1a do HCV em particular, ou até mesmo um clado desse subtipo, possa ser mais propenso ao desenvolvimento de variantes de resistência aos novos inibidores DAAs.

A recente Portaria nº 25, de 12 de novembro de 2013, publicada pelo Ministério da Saúde no Diário Oficial da União, regulamenta a incorporação dos novos medicamentos telaprevir e boceprevir no Sistema Único de Saúde (SUS) para o tratamento das infecções pelo HCV (Ministério da Saúde, 2013). A terapia tripla com a incorporação dos inibidores de protease à terapia vigente baseada no uso de PEG-IFN α /RBV resultou em um aumento substancial nas taxas de RVS em pacientes infectados pelo genótipo 1. A utilização desses agentes na prática clínica representa um grande avanço no tratamento das infecções crônicas. Entretanto, a terapia tripla atual apresenta uma série de limitações, como baixa eficácia em pacientes não respondedores à terapia convencional, além de não poder ser administrada em pacientes que apresentam contraindicações ao PEG-IFN α ou RBV (Carreño, 2014).

A próxima geração de inibidores idealmente deverá apresentar uma maior cobertura antiviral entre os diferentes genótipos do HCV e menor interação medicamentosa, sendo o desenvolvimento de uma terapia quádrupla ou de regimes livres de IFN uma opção para esses pacientes. O sucesso na utilização dos DAAs irá exigir uma classificação precisa dos padrões de resposta ao tratamento, monitoramento da carga viral e dos perfis de resistência, assim como possíveis efeitos colaterais e interações medicamentosas. Vários inibidores de proteínas não estruturais do HCV foram desenvolvidos nos últimos anos, muitos com resultados bastante promissores em ensaios clínicos. Contudo, o surgimento de variantes apresentando mutações de resistência constitui um sério problema para o sucesso dos novos DAAs (Poveda et al., 2014). Sendo assim, também foi analisado o polimorfismo natural dos genes não estruturais NS4B, NS5A e NS5B, a fim de verificar se mutações associadas à resistência aos novos DAAs podem estar naturalmente presentes em isolados brasileiros.

Uma vez que o polimorfismo natural das sequências do gene NS5A de isolados do HCV da América Latina é pouco estudado e os inibidores para a proteína NS5A estão em fase adiantada de ensaio clínico, podendo fazer parte de uma terapia combinada livre de IFN, realizou-se um terceiro estudo com o objetivo de analisar a ocorrência natural de mutações dominantes na proteína NS5A. Um total de 106 amostras brasileiras virgens de tratamento do genótipo 1 do HCV foi sequenciado, e os resultados apresentados no artigo intitulado “NS5A inhibitor resistance-associated polymorphisms in Brazilian treatment-naive patients infected with genotype 1 hepatitis C virus”, que foi recentemente submetido para publicação na revista “Journal of Antimicrobial Chemotherapy”. Neste estudo, taxas similares de mutações de resistência primárias e secundárias para o daclatasvir (DCV) foram encontradas para os isolados do subtipo 1a e 1b. O DCV, um dos

inibidores mais promissores da proteína NS5A, encontra-se em fase III em ensaios clínicos e possui atividade antiviral tanto na terapia tripla como em terapias livres de IFN (Fontana et al, 2012; Suzuki et al, 2013). Dentre os isolados do subtipo 1a analisados, dois (3,85%) apresentaram as mutações primárias M28T e Y93H, e sete (13,46%) as substituições secundárias H58P, E62D ou H58P-E62D. Dentre os isolados do subtipo 1b, dois pacientes (3,70%) mostraram a mutação Y93H, enquanto que oito (14,8%) substituições secundárias. Um estudo recente revelou que a mutação secundária H58P preexistia como população viral dominante em um paciente antes de receber a terapia combinada dos inibidores asunaprevir (inibidor da NS3 protease) e DCV; após a falha terapêutica, a análise de sequências clonais revelou que a dupla mutação L31V-H58P estava presente em todas as sequências virais, com diminuição na sensibilidade ao DCV em > 2000 (McPhee et al., 2013). Da mesma forma é provável que a dupla mutação Q30R-E62D, que confere níveis altos de resistência ao DCV, foi responsável pela falha terapêutica em outro paciente (Sun et al., 2012). É importante salientar que as mutações secundárias potencializam as resistências primárias, mas por si só não estão associadas com diminuição da sensibilidade ao inibidor DCV. Estes resultados demonstram que os polimorfismos naturais podem influenciar o surgimento de variantes de resistência com possíveis consequências na prática clínica.

A análise de sequências nucleotídicas de regiões geográficas distintas pode evidenciar diferenças nas frequências dos polimorfismos naturais que poderiam impactar as taxas de resposta virológica na terapia com DAAs. Em contraste com os resultados desse estudo, Plaza e colaboradores relataram que nenhum dos 36 pacientes europeus virgens de tratamento coinfectados com o HIV, assim como nenhuma das 153 sequências subtipo 1a do HCV adicionalmente analisadas e disponíveis em banco de dados público apresentou variantes virais de resistência ao inibidor DCV. Os autores concluíram que mutações de resistência primária ao DCV não são vistas como polimorfismos naturais em populações virais do subtipo 1a; no entanto, são reconhecidas na maioria das sequências dos isolados dos subtipos 1b e do genótipo 4 (Plaza et al., 2012). Além disso, Suzuki e colaboradores demonstraram que 11,2% das sequências do subtipo 1b de pacientes japoneses apresentaram mutações de resistência para o DCV (Suzuki et al., 2012). No presente estudo, apenas 3,7% das sequências brasileiras do subtipo 1b apresentaram mutações de resistência ao DCV. Essas diferenças serão melhor entendidas a medida que mais sequências do gene NS5A do HCV da América Latina estiverem disponíveis em banco de dados de sequências público.

A heterogeneidade das sequências do gene NS5A também possibilitou que os isolados do subtipo 1a fossem distinguidos em dois clados, com as sequências brasileiras formando um grande grupo relacionado dentro do clado 1. Na análise filogenética, 65,8% das sequências que apresentaram mutações primárias nas posições 28, 30, 31, e 93 se agruparam no clado 1. Essas observações reforçam a importância em se considerar que as distinções fenotípicas entre os

genótipos do HCV possam vir a ser importantes em futuras abordagens terapêuticas com novos DAAs.

Apesar do papel da proteína NS4B no ciclo biológico do HCV ainda não estar completamente esclarecido, uma série de funções biológicas tem sido postuladas. De uma forma geral, a NS4B parece ser a proteína que detém um papel central no complexo replicativo, uma vez que se integra a membrana do RE e promove alterações específicas que resultam na formação da rede membranosa. Além disso, contribui diretamente para a replicação viral ao se ligar a extremidade 3' do RNA de polaridade negativa do HCV, estando também envolvida no processo de montagem e liberação das partículas virais (Jones et al., 2009). Um domínio na proteína NS4B é essencial para a replicação do genoma do vírus, trata-se da segunda alfa-hélice anfipática (4BAH2), conservada e localizada na porção N-terminal da proteína NS4B. Essa hélice anfipática (aa 43-65) exibe potencial para se auto-oligomerizar, assim como habilidade de promover agregação de vesículas lipídicas em conjuntos macromoleculares, remetendo a principal característica das redes membranosas. Devido à atividade promotora de agregação de vesículas, a 4BAH2 tornou-se importante alvo para o desenvolvimento de fármacos que têm como alvo a proteína NS4B. O sítio proteico 55, responsável por conferir resistência ao inibidor clemizole, reside na 4BAH2 (Einav et al., 2010). Neste estudo, constatou-se alto nível de conservação desse sítio entre as sequências do genótipo 1, sendo um provável reflexo da importante função biológica da 4BAH2 na agregação de vesículas lipídicas (Cho et al., 2010).

A terapia com o inibidor anguizole altera o padrão de distribuição subcelular da proteína NS4B, visto que, ao invés da proteína formar pequenos focos associados a membranas, uma quantidade significativa de proteínas em células tratadas formaram estruturas alongadas em forma de serpente (Bryson et al., 2010). A mutação de resistência ao anguizole também alterou o padrão de distribuição subcelular da proteína NS4B, pois mesmo na ausência do tratamento, células que continham mutantes H94R apresentaram um padrão de distribuição subcelular da proteína NS4B muito diferente do visto para a proteína tipo selvagem (Bryson et al., 2010). Ensaios *in vitro* demonstraram que modelos de replicons que continham os aminoácidos histidina (1b) ou glutamina (1a) na posição 94 foram altamente sensíveis ao tratamento com o inibidor anguizole, enquanto que os que apresentaram o aminoácido arginina (mutante 1b) foram moderadamente resistentes e aqueles com o aminoácido treonina (2a) apresentaram alta resistência ao fármaco (Bryson et al., 2010). Apesar desse sítio não ser estritamente conservado, uma vez que os aminoácidos glutamina (1a), asparagina/serina (1b) e treonina (2a) são observados em sequências referência dos genótipos indicados (Kuiken et al., 2005), nenhuma sequência analisada no presente estudo apresentou o aminoácido de resistência arginina (R), provavelmente refletindo o impacto que essa substituição teria no ciclo replicativo do HCV.

Ensaio *in vitro* descreveram que substituições de aminoácido nos sítios 98, 105, 203 ou 228 estão envolvidas com resistência aos inibidores PTC725, AP80978 ou silibina, além de constatar reduções na capacidade replicativa viral para os mutantes F98C, V105M, Q203R e D228N. Diferentemente dos efeitos provocados pelo inibidor anguizole e pelas mutações no sítio 94, os inibidores PTC725 e silibina, além de substituições no sítio 98, não alteraram a distribuição subcelular da proteína NS4B (Esser-Nobis et al., 2013; Gu et al., 2013). Nesta investigação, encontrou-se um isolado do subtipo 1b brasileiro apresentando a substituição F98L na população viral dominante, mutação esta que não altera a distribuição subcelular da proteína NS4B. Em recente análise de 1013 sequências disponíveis no banco de dados Los Alamos (Kuiken et al., 2005), Gu e colaboradores (2013) constataram que os sítios 98 e 105 são altamente conservados entre os isolados do genótipo 1, e que todas as sequências dos isolados do genótipo 2 apresentavam o polimorfismo natural L98, o que explicaria a baixa atividade antiviral do inibidor PTC725 para esse genótipo (Gu et al., 2013). Pretende-se, ainda, aumentar o número de sequências do subtipo 1b que codificam a porção N-terminal da NS4B, para avaliar a conservação dos sítios 55, 94 e a frequência da mutação F98L na população brasileira e compará-las com isolados de outras regiões geográficas.

Em um eventual regime terapêutico combinado, os fármacos direcionados para a proteína NS4B poderiam exercer atividade antiviral de forma complementar a outras classes de inibidores, assim como poderiam ser administrados com inibidores que têm como alvo outras funções da proteína NS4B; uma vez que, enquanto o clemizole não exerceu efeito sobre a atividade agregadora de vesículas lipídicas da 4BAH2, o anguizole marcadamente inibiu a agregação vesicular. Em contrapartida, o clemizole foi capaz de inibir a interação entre a NS4B e o RNA do HCV, função não exercida pelo inibidor anguizole, enquanto que o tratamento com silibina afetou a morfologia da rede membranosa, provavelmente pela modulação da interação entre as proteínas NS4B/NS3 (Esser-Nobis et al., 2013). Esses inibidores não apresentam resistência cruzada e podem ser utilizados em combinação com os já aprovados inibidores de protease telaprevir ou boceprevir (Bryson et al., 2010).

A proteína NS5B do HCV é uma RNA polimerase dependente de RNA, responsável por catalisar a síntese de um RNA complementar de polaridade negativa, utilizando o genoma do HCV como molde. As duas classes de inibidores para a NS5B polimerase, análogos nucleosídeos (NIs) e não-nucleosídeos, bloqueiam eficientemente a replicação do HCV (Rehman et al., 2011). Entretanto, diversos estudos *in vitro* e *in vivo* descreveram que variações de aminoácidos na polimerase causam resistência a esses inibidores, sendo os relatos de polimorfismos naturais de resistência a alguns inibidores NNIs relativamente comuns, pois esses inibidores apresentam uma menor barreira genética a resistência. Alves e colaboradores (2013) analisaram a presença de

mutações de resistência no gene NS5B polimerase do HCV em 800 sequências do genótipo 1 disponíveis no banco de dados Los Alamos (Alves et al., 2013). Contudo, a análise não contou com um número representativo de sequências brasileiras, devido ao baixo número de sequências depositadas. Na América Latina, alguns estudos analisaram a presença de variantes de resistência no gene NS5B considerando apenas fragmentos nucleotídicos pequenos (Castilho et al., 2011; Jaspe et al., 2012), sem realizar uma ampla análise que abrangesse os sítios responsáveis por conferir resistência a inibidores NNIs. Assim, são necessários dados mais detalhados sobre o polimorfismo natural no gene NS5B do HCV em nosso meio que, por sua vez, contribuirão para a predição de uma possível resistência aos inibidores de polimerase.

Em relação a resistência aos inibidores análogos nucleosídeos, recentemente foi descrito que a dupla mutação L159F/L320F diminui a sensibilidade aos inibidores NIs mericitabina, sofosbuvir e GS-938, com impacto na capacidade replicativa do vírus (Tong et al., 2014). Tong e colaboradores (2014) relataram que a mutação L159F foi observada apenas em um paciente participante do ensaio clínico JUMP-C, após receber terapia combinada do inibidor mericitabina e PEG-IFN α -2a/RBV, e em baixas prevalências em sequências depositadas no *GenBank* (Tong et al., 2014). Entretanto, em relação aos isolados brasileiros, o presente estudo mostrou que 25% das sequências do subtipo 1b apresentam essa variação presente na população viral dominante, enquanto que nenhuma sequência do subtipo 1a apresentou tal variação. Ensaio fenotípicos evidenciaram que a susceptibilidade ao fármaco pode ser amplamente influenciada pela capacidade replicativa dos variantes e por suas frequências em uma determinada amostra. Isolados que não continham a variação L159F/L320F presente em 100% da *quasispecies* virais apresentaram reduções de duas vezes na susceptibilidade ao inibidor mericitabina, enquanto que amostras que continham 100% dos mutantes L159F/L320F mostraram um redução na susceptibilidade de quatro a cinco vezes maior (Tong et al., 2014). Apesar de não ter sido detectada a dupla mutação em amostras brasileiras, a frequência do variante L159F observada para isolados brasileiros do subtipo 1b poderia influenciar na reposta terapêutica, caso o variante L320F emerja na população dominante. A análise estrutural da polimerase sugere que os aminoácidos nas posições 159 e 320 estão localizados próximos ao sítio ativo da enzima, o suficiente para interagir com substratos nucleosídeos trifosfatados. Estudos adicionais poderão determinar se/como alterações de aminoácidos nesses resíduos afetam a geometria do sítio de ligação na polimerase e reduzem a afinidade de ligação dos fármacos que interagem com o sítio ativo.

Apesar de ter sido realizada análise dos primeiros 344 aminoácidos da polimerase para os isolados do subtipo 1a, o número de variantes virais encontrados que causam resistência aos inibidores NNIs foi maior para os isolados do subtipo 1b. Foram observados 15 isolados do subtipo 1b apresentando a variação C316N (29%), enquanto que apenas um do subtipo 1a apresentou o

variante C316Y. Estes resultados estão de acordo com um recente estudo europeu que avaliou a ocorrência natural de resistência no gene NS5B em um grupo de paciente que não havia recebido terapia com DAAs, onde uma prevalência mais alta de mutações para os isolados do subtipo 1b foi encontrada, devido à presença dos variantes C316N (36,6%) (Paolucci et al., 2013). Em contrapartida, as frequências desse variante diferem de acordo com as regiões geográficas, isto é, em 2% dos pacientes infectados pelo genótipo 1 no norte do continente africano (Aissa Larousse et al., 2014), enquanto que a análise de 335 sequências do continente asiático mostrou taxa significativamente elevada (91,6%) (Jaspe et al., 2012).

Uma prevalência mais alta de substituições D310N, associada com possível resistência ao tratamento com IFN/RBV (Asahina et al., 2005), foi encontrada em isolados venezuelanos em relação aos brasileiros. Na análise filogenética realizada para avaliar o relacionamento genético entre os isolados do genótipo 1 com sequências de outras regiões geográficas, Jaspe e colaboradores reportaram que as sequências venezuelanas do subtipo 1a que apresentavam a variação D310N não se agruparam com as brasileiras, sugerindo que variações importantes nas sequências do HCV podem estar presentes em isolados circulando na América do Sul (Jaspe et al., 2012). De fato, nesta investigação, apenas 5,5% das sequências do subtipo 1b apresentou a variação V499A, que confere resistência ao inibidor BI207127, enquanto que dois outros estudos mostraram frequências mais altas nessa posição (13,3% e 16%) em isolados analisados fora da América do Sul (Paolucci et al., 2013; Aissa Larousse et al., 2014).

A ocorrência de variações em posições específicas nas sequências das proteínas NS3, NS4 e NS5 possibilitou a identificação de padrões de frequências característicos de aminoácidos em sequências brasileiras e entre os clados do subtipo 1a. Possíveis mudanças estruturais na proteína viral poderiam ser causadas pela presença desses diferentes aminoácidos e, assim, os dados desta tese demonstram que o HCV dispõe de padrões de diversidade genética distintos que reforçam a importância em considerar as informações das sequências nucleotídicas em uma futura abordagem terapêutica.

Como visto, as sequências brasileiras apresentaram 11 posições específicas na proteína NS5A, nas quais as frequências dos aminoácidos diferiram daquelas encontradas em isolados do subtipo 1a classificados nos clados 1 e 2. As diferenças mais marcantes encontradas nas sequências brasileiras foram as detecções do aminoácido positivamente carregado lisina (K) no sítio 215 e do aminoácido polar serina (S) no sítio 390, enquanto que os dois clados apresentaram o aminoácido hidrofóbico glicina (G) como frequências majoritárias, reforçando as diferenças entre as sequências de aminoácidos do subtipo 1a. Apesar das mutações de resistência aos inibidores da NS5A estarem localizados no domínio N-terminal da proteína NS5A, ensaios *in vitro* utilizando modelos de replicon híbridos do subtipo 1b do HCV, que continham os primeiros 100 aminoácidos derivados do

subtipo 1a, demonstraram uma diferença marcante nos níveis de resistência aos inibidores DAAs quando comparados aos modelos de replicons do subtipo 1a. Foi sugerido que possíveis interações com a porção C-terminal da NS5A ou com outro componente proteico no complexo replicativo afetaria os níveis de resistência ao DCV (Fridell et al. 2010). As implicações clínicas destes dados e a sua associação com o resultado da terapia antiviral serão mais evidentes no futuro, quando mais inibidores DAAs estiverem disponíveis para o tratamento das infecções pelo HCV.

No presente trabalho, o método de sequenciamento direto foi capaz de detectar apenas a população viral majoritária, enquanto que eventuais variantes minoritárias presentes em frequências baixas na população viral não são detectados. No entanto, estudos anteriores utilizando análise clonal evidenciaram que as sequências virais dominantes foram 100% representativas das *quasispecies* virais e que nenhum variante viral associado à resistência aos DAAs foi detectado em um nível subdominante (Colson et al, 2008; Kuntzen et al, 2008; Jardim et al., 2009). Entretanto, uma população viral resistente aos DAAs, presente em frequência baixa (2,5%), foi detectada por métodos de sequenciamento ultrasensíveis (pirosequenciamento) em um paciente virgem de tratamento (Lauck et al., 2012). De qualquer maneira, dada as elevadas taxas replicativas do HCV e a natureza propensa a erros da RNA polimerase RNA dependente, novas partículas virais apresentando substituições nucleotídicas podem ser criadas e perdidas a cada dia em uma forma dinâmica e sua prevalência na população viral será determinada por sua aptidão replicativa e por eventuais vantagens seletivas (Adiwijaya et al., 2010). Logo, variantes de resistência minoritárias podem ser formados em qualquer fase do curso da infecção e emergir como população dominante, após o início da terapia (Susser et al., 2011), sendo um motivo de preocupação ao uso futuro de DAAs.

Atualmente, não existem indicações para testes de resistência em pacientes que serão submetidos à terapia com DAAs, uma vez que os variantes de resistência são sensíveis a ação do IFN na terapia tripla e sua eventual presença não interfere em decisões terapêuticas. Mesmo que os inibidores da NS3 protease telaprevir e boceprevir sejam utilizados em combinação com PEGINF α -RBV para o tratamento das infecções crônicas pelo HCV, existe uma expectativa de que novos DAAs sejam utilizados em uma eventual combinação terapêutica, visando maior eficácia e restrição a emergência de vírus resistentes aos fármacos; contudo, o melhor modelo terapêutico combinado “livre de IFN” ainda é passível de definição. Os dados obtidos com este trabalho permitiram identificar, em pacientes que se encontram em fase de pré-tratamento antiviral, mutantes virais potencialmente resistentes aos novos fármacos para o tratamento da hepatite C, o que pode comprometer o sucesso terapêutico e será um importante campo de estudo para os próximos anos.

7 CONCLUSÕES

- 1) Os dados sobre polimorfismos naturais nas regiões NS3, NS4B, NS5A e NS5B do genoma do HCV, obtidos por sequenciamento nucleotídico, demonstraram que as mutações potencialmente relacionadas com resistência aos novos agentes DAAs estão presentes em isolados de pacientes com hepatite C crônica virgens de tratamento antiviral no Brasil;
- 2) A frequência das mutações de resistência é em geral baixa, dependendo da região não-estrutural e do subtipo do HCV, conforme segue:
 - a) Na região NS3, mutações aos inibidores de protease, V36L e T54S relacionadas a um grau de baixa a média resistência ao telaprevir, foram observadas em 5,6% e 4,1% dos isolados dos subtipos 1b e 1a. Variantes V55A, que conferem resistência ao inibidor boceprevir, foram encontrados em 4,1% dos isolados brasileiros do subtipo 1a, enquanto que nenhuma sequência do subtipo 1b apresentou tal variação;
 - b) Na região NS4B, uma sequência do subtipo 1b apresentou a variação F98L, responsável por conferir resistência aos inibidores AP80978, PTC725 e silibina;
 - c) Na região NS5A, dois isolados brasileiros do subtipo 1a (3,8%) apresentaram as mutações primárias M28T e Y93H, e sete (13,4%) as substituições secundárias H58P, E62D ou o duplo mutante H58P-E62D. Dentre os isolados do subtipo 1b, dois (3,7%) continham a mutação Y93H, enquanto que oito (14,8%) as substituições secundárias R30Q, L31M, P58S e I 280V;
 - d) Na NS5B, a variação L159F foi observada em 25% das sequências do subtipo 1b brasileiras, mas em nenhuma do subtipo 1a. Em relação aos inibidores NNIs, foram encontrados 15 isolados do subtipo 1b apresentando a variação C316N (29%), enquanto que apenas um isolado do subtipo 1a mostrou o variante C316Y. Ainda em relação ao subtipo 1b, 5,5% das sequências continham a variação de resistência V499A, 13,9% o variante A421V e 11,1% o variante S556G;
- 3) A análise do grau de relacionamento genético entre as sequências dos isolados do subtipo 1a do HCV provenientes do Brasil e de outros países revelou que:
 - a) as sequências da região NS3 formaram um *subcluster* dentro do clado 1, mostrando características fenotípicas distintas dos demais. Enquanto que 60% das sequências do

clado 1 apresentaram o aminoácido de resistência ao inibidor simeprevir lisina (K) no sítio 80 da protease, 93,8% das sequências brasileiras exibiram o aminoácido glutamina (Q) nesse sítio;

b) as sequências do gene NS5A do subtipo 1a do HCV circulantes no Brasil também se agruparam dentro do clado 1, onde de 65,8% das sequências com mutações primárias nas posições 28, 30, 31, e 93 se agruparam;

4) Padrões característicos de aminoácidos nas sequências dos isolados brasileiros dos subtipos 1a e 1b do HCV foram identificados em várias posições das proteínas NS3, NS4B, NS5A e NS5B, incluindo variações em sítios que ocasionam redução da eficácia terapêutica aos novos inibidores;

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abou-Setta AM. Transmission risk of hepatitis C virus via semen during assisted reproduction: how real is it? **Hum Reprod** 2004;19(12):2711-7.
- Adiwijaya BS, Herrmann E, Hare B, Kieffer T, Lin C, Kwong AD, et al. A multi-variant, viral dynamic model of genotype 1 HCV to assess the in vivo evolution of protease-inhibitor resistant variants. **PLoS Comput Biol** 2010; 6(4):e1000745.
- Agarwal A, Zhang B, Olek E, Robison H, Robarge L, Deshpande M. Rapid and sharp decline in HCV upon monotherapy with NS3 protease inhibitor, ACH-1625. **Antivir Ther** 2012;17(8):1533-9.
- Ahmed-Belkacem A, Ahnou N, Barbotte L, Wychowski C, Pallier C, Brillet R, et al. Silibinin and related compounds are direct inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. **Gastroenterology** 2010;138(3):1112-22.
- Aissa Larousse J, Trimoulet P, Recordon-Pinson P, Papuchon J, Azzouz MM, Ben Mami N, et al. Natural prevalence of hepatitis C virus (HCV) variants resistant to protease and polymerase inhibitors in patients infected with HCV genotype 1 in Tunisia. **J Med Virol** 2014; 86(8):1350-9.
- Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. **World J Gastroenterol** 2007; 13(17):2436-41.
- Alter HJ, Holland PV, Purcell RH. The emerging pattern of post-transfusion hepatitis. **Am J Med Sci** 1975; 270: 329-34.
- Alves R, Queiroz AT, Pessoa MG, da Silva EF, Mazo DF, Carrilho FJ, et al. The presence of resistance mutations to protease and polymerase inhibitors in Hepatitis C virus sequences from the Los Alamos databank. **J Viral Hepat** 2013; 20(6):414-21.
- Asahina Y, Izumi N, Enomoto N, Uchihara M, Kurosaki M, Onuki Y, et al. Mutagenic effects of ribavirin and response to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. **J Hepatol** 2005; 43(4):623-9.

Asselah T. ABT-450 combined with ritonavir, in addition to ABT-333 and ribavirin: a race for an interferon-free regimen to cure HCV infection. **J Hepatol** 2013a; 59:885-888.

Asselah T. Sofosbuvir-based interferon-free therapy for patients with HCV infection. **J Hepatol** 2013b; 59(6):1342-5.

Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, Marcellin P, Vierling JM, Zeuzem S, et al. Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. **N Engl J Med** 2011; 364(13):1207-17.

Barbato G, Cicero DO, Nardi MC, Steinkühler C, Cortese R, De Francesco R, et al. The solution structure of the N-terminal proteinase domain of the hepatitis C virus (HCV) NS3 protein provides new insights into its activation and catalytic mechanism. **J Mol Biol** 1999; 289(2):371-84

Barnard RJ, McHale CM, Newhard W, Cheney CA, Graham DJ, Himmelberger AL, et al. Emergence of resistance-associated variants after failed triple therapy with vaniprevir in treatment-experienced non-cirrhotic patients with hepatitis C-genotype 1 infection: a population and clonal analysis. **Virology** 2013; 443(2):278-84.

Bartels DJ, Zhou Y, Zhang EZ, Marcial M, Byrn RA, Pfeiffer T, et al. Natural prevalence of hepatitis C virus variants with decreased sensitivity to NS3.4A protease inhibitors in treatment-naive subjects. 2008 **J Infect Dis** 198:800-7.

Bartels DJ, Sullivan JC, Zhang EZ, Tigges AM, Dorrian JL, De Meyer S, et al. Hepatitis C virus variants with decreased sensitivity to direct-acting antivirals (DAAs) were rarely observed in DAA-naive patients prior to treatment. **J Virol** 2013; 87(3):1544-53.

Berg T, Sarrazin C, Herrmann E, Hinrichsen H, Gerlach T, Zachoval R, et al. Prediction of treatment outcome in patients with chronic hepatitis C: significance of baseline parameters and viral dynamics during therapy. **Hepatology** 2003; 37(3):600-9.

Berger KL, Lagacé L, Triki I, Cartier M, Marquis M, Lawetz C, et al. Viral resistance in hepatitis C virus genotype 1-infected patients receiving the NS3 protease inhibitor Faldaprevir (BI 201335) in a phase 1b multiple-rising-dose study. **Antimicrob Agents Chemother** 2013; 57(10):4928-36.

Blackard JT, Shata MT, Shire NJ, Sherman KE. Acute hepatitis C virus infection: a chronic

problem. **Hepatology** 2008; 47:321-331.

Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, et al. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. **J Virol** 2006; 80(14):6964-72.

Bortolotti F, Iorio R, Resti M, Cammà C, Marcellini M, Giacchino R, et al. Epidemiological profile of 806 Italian children with hepatitis C virus infection over a 15-year period. **J Hepatol** 2007; 46(5):783-90.

Branch AD, Stump DD, Gutierrez JA, Eng F, Walewski JL. The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. **Semin Liver Dis** 2005 ;25(1):105-17.

Brass V, Moradpour D, Blum HE. Hepatitis C virus infection: in vivo and in vitro models. **J Viral Hepat** 2007;14 Suppl 1:64-7

Bronowicki JP, Pol S, Thuluvath PJ, Larrey D, Martorell CT, Rustgi VK, et al. Randomized study of asunaprevir plus pegylated interferon- α and ribavirin for previously untreated genotype 1 chronic hepatitis C. **Antivir Ther** 2013;18(7):885-93.

Bryson PD, Cho NJ, Einav S, Lee C, Tai V, Bechtel J, et al. A small molecule inhibits HCV replication and alters NS4B's subcellular distribution. **Antiviral Res** 2010; 87(1):1-8.

Carreño V. Review article: management of chronic hepatitis C in patients with contraindications to anti-viral therapy. **Aliment Pharmacol Ther** 2014; 39(2):148-62.

Castilho MC, Martins AN, Horbach IS, Perez Rde M, Figueiredo FA, Pinto Pde T, et al. Association of hepatitis C virus NS5B variants with resistance to new antiviral drugs among untreated patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2011; 106(8):968-75.

Cavalheiro Nde P. Sexual transmission of hepatitis C. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo** 2007; 49 n^o.5.

Chase R, Skelton A, Xia E, Curry S, Liu S, McMonagle P, et al. A novel HCV NS3 protease mutation selected by combination treatment of the protease inhibitor boceprevir and NS5B polymerase inhibitors. 2009 **Antiviral Res** 84:178-84.

Chen S, Wang YM. Evolutionary study of hepatitis C virus envelope genes during primary infection. **Chin Med J** 2007; 120:2174-2180.

Chevaliez S, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus serologic and virologic tests and clinical diagnosis of HCV-related liver disease. **Int J Med Sci** 2006;3(2):35-40.

Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Brillet R, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus (HCV) genotype 1 subtype identification in new HCV drug development and future clinical practice. **PLoS One** 2009; 4(12):e8209.

Cho NJ, Dvory-Sobol H, Lee C, Cho SJ, Bryson P, Masek M, et al. Identification of a class of HCV inhibitors directed against the nonstructural protein NS4B. **Sci Transl Med** 2010;2(15):15ra6.

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science** 1989; 244(4902):359-62.

Coburn CA, Meinke PT, Chang W, Fandozzi CM, Graham DJ, Hu B, et al. Discovery of MK-8742: an HCV NS5A inhibitor with broad genotype activity. **ChemMedChem** 2013; 8(12):1930-40.

Colson P, Brouk N, Lembo F, Castellani P, Tamalet C, Gérolami R. Natural presence of substitution R155K within hepatitis C virus NS3 protease from a treatment-naïve chronically infected patient. **Hepatology** 2008; 47(2):766-7.

Cossart YE. Broadsheet. Number 49: Laboratory investigation of hepatitis C: a review. **Pathology** 1999;31(2):102-8.

Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: a sequence logo generator. **Genome Res** 2004; 14(6):1188-90.

Davidson F, Simmonds P, Ferguson JC, Jarvis LM, Dow BC, Follett EA, et al. Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' non-coding region. **J Gen Virol** 1995; 76 (Pt 5):1197-204.

de Almeida AJ, Campos-de-Magalhães M, de Melo Marçal OP, Brandão-Mello CE, Okawa MY, de

Oliveira RV, et al. Hepatitis C virus-associated thrombocytopenia: a controlled prospective, virological study. **Ann Hematol** 2004; 83(7):434-40.

de Almeida AJ, Campos-de-Magalhães M, Brandão-Mello CE, de Oliveira RV, Yoshida CF, Lampe E. Detection of hepatitis C virus in platelets: evaluating its relationship to viral and host factors. **Hepatogastroenterology** 2007; 54(75):964-8.

de Bruijne J, Weegink CJ, Jansen PL, Reesink HW. New developments in the antiviral treatment of hepatitis C. **Vox Sang** 2009;97(1):1-12.

De Clercq E. Current race in the development of DAAs (direct-acting antivirals) against HCV. **Biochem Pharmacol** 2014; pii: S0006-2952(14)00229-9. [Epub ahead of print]

De Luca A, Di Giambenedetto S, Prosperi M et al. Two distinct HCV genotype 1a clades: geographical distribution and association with natural resistance mutations to HCVNS3/4A inhibitors. **Antiviral Ther** 2013; 18 Suppl 1: A47.

DeGoey DA, Randolph JT, Liu D, Pratt J, Hutchins C, Donner P, et al. Discovery of ABT-267, a pan-genotypic inhibitor of HCV NS5A. **J Med Chem** 2014; 57(5):2047-57.

Descamps V, Op de Beeck A, Plassart C, Brochot E, François C, Helle F, et al. Strong correlation between liver and serum levels of hepatitis C virus core antigen and RNA in chronically infected patients. **J Clin Microbiol** 2012; 50(2):465-8.

Drummer HE, Maerz A, Pountourios P. Cell surface expression of functional hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. **FEBS Lett** 2003; 546(2-3):385-90.

Dubois F, Barin F, Goudeau A. [Anti-HCV serology for screening, diagnosis and surveillance of hepatitis C: role of the immunoblot]. **Ann Biol Clin (Paris)** 1998; 56(4):417-26.

Egger D, Wölk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, et al. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. **J Virol** 2002; 76(12):5974-84.

Einav S, Sobol HD, Gehrig E, Glenn JS. The hepatitis C virus (HCV) NS4B RNA binding inhibitor

clemizole is highly synergistic with HCV protease inhibitors. **J Infect Dis** 2010; 202(1):65-74.

Einav S, Gerber D, Bryson PD, Sklan EH, Elazar M, Maerkl SJ, et al. Discovery of a hepatitis C target and its pharmacological inhibitors by microfluidic affinity analysis. **Nat Biotechnol** 2008; 26(9):1019-27.

Esser-Nobis K, Romero-Brey I, Ganten TM, Gouttenoire J, Harak C, Klein R, et al. Analysis of hepatitis C virus resistance to silibinin in vitro and in vivo points to a novel mechanism involving nonstructural protein 4B. **Hepatology** 2013; 57(3):953-63.

Fabrycki J, Zhao Y, Patel D, Yang G, Podos S, Yang W, et al. Findings from clinical virology studies on sofosbuvir, a phase 2 HCV NS3 protease inhibitor, indicate a high pharmacological barrier to viral resistance. Abstracts of the 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL 2013), Amsterdam, The Netherlands, 24 - 28 April 2013. **J Hepatol** 2013; 58, Suppl 1, S488

Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. **N Engl J Med** 1975; 292:767-770.

Ferenci P, Scherzer TM, Kerschner H, Rutter K, Beinhardt S, Hofer H, et al. Silibinin is a potent antiviral agent in patients with chronic hepatitis C not responding to pegylated interferon/ribavirin therapy. **Gastroenterology** 2008;135(5):1561-7.

Ferraris P, Blanchard E, Roingeard P. Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes. **J Gen Virol** 2010; 91(Pt 9):2230-7.

Ferrero S, Lungaro P, Bruzzone BM, Gotta C, Bentivoglio G, Ragni N. Prospective study of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus: a 10-year survey (1990-2000). **Acta Obstet Gynecol Scand** 2003; 82(3):229-34.

Flisiak R, Feinman SV, Jablkowski M, Horban A, Kryczka W, Pawlowska M, et al. The cyclophilin inhibitor Debio 025 combined with PEG IFNalpha2a significantly reduces viral load in treatment-naïve hepatitis C patients. **Hepatology** 2009; 49(5):1460-8.

Fontana RJ, Hughes EA, Appelman H, Hindes R, Dimitrova D, Bifano M. Case report of successful

peginterferon, ribavirin, and daclatasvir therapy for recurrent cholestatic hepatitis C after liver retransplantation. **Liver Transpl** 2012; 18(9):1053-9.

Forns X, Bukh J. The molecular biology of hepatitis C virus. Genotypes and quasispecies. **Clin Liver Dis** 1999; 3(4):693-716.

Frank C, Mohamed MK, Strickland GT, Lavanchy D, Arthur RR, Magder LS, et al. The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. **Lancet** 2000; 355(9207):887-91.

Fridell RA, Qiu D, Wang C, Valera L, Gao M. Resistance analysis of the hepatitis C virus NS5A inhibitor BMS-790052 in an in vitro replicon system. **Antimicrob Agents Chemother** 2010; 54(9):3641-50.

Fridell RA, Qiu D, Valera L, Wang C, Rose RE, Gao M. Distinct functions of NS5A in hepatitis C virus RNA replication uncovered by studies with the NS5A inhibitor BMS-790052. **J Virol** 2011; 85(14):7312-20.

Friebe P, Bartenschlager R. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. **J Virol** 2002; 76(11):5326-38.

Friebe P, Lohmann V, Krieger N, Bartenschlager R. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. **J Virol**. 2001; 75(24):12047-57.

Fried MW, Buti M, Dore GJ, Flisiak R, Ferenci P, Jacobson I, et al. Once-daily simeprevir (TMC435) with pegylated interferon and ribavirin in treatment-naïve genotype 1 hepatitis C: the randomized PILLAR study. **Hepatology** 2013; 58(6):1918-29.

Gane E, Foster GR, Cianciara J, Stedman C, Ryder S, Buti M, et al. Antiviral activity, pharmacokinetics, and tolerability of AZD7295, a novel NS5A inhibitor, in a placebo-controlled multiple ascending dose study in HCV genotype 1 and 3 patients. Abstracts of the 45th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL 2010), Vienna, Austria, 14-18 April 2010. **J Hepatol** 2010a; 52:S464.

Gane EJ, Roberts SK, Stedman CA, Angus PW, Ritchie B, Elston R, et al. Oral combination therapy

with a nucleoside polymerase inhibitor (RG7128) and danoprevir for chronic hepatitis C genotype 1 infection (INFORM-1): a randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. **Lancet** 2010b; 376(9751):1467-75.

Gane EJ, Stedman CA, Hyland RH, Ding X, Svarovskaia E, Symonds WT, et al. Nucleotide polymerase inhibitor sofosbuvir plus ribavirin for hepatitis C. **N Engl J Med** 2013; 368:34-44.

Gao M, Nettles RE, Belema M, Snyder LB, Nguyen VN, Fridell RA, et al. Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. **Nature** 2010; 465(7294):96-100.

Gao M. Antiviral activity and resistance of HCV NS5A replication complex inhibitors. **Curr Opin Virol** 2013; 3: 514-20.

Gastaminza P, Cheng G, Wieland S, Zhong J, Liao W, Chisari FV. Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. **J Virol** 2008; 82(5):2120-9.

Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. **Nature** 2009; 461(7262):399-401.

Gelderblom HC, Menting S, Beld MG. Clinical performance of the new rRoche COBAS TaqMan HCV Test and High Pure System for extraction, detection and quantitation of HCV RNA in plasma and serum. **Antivir Ther** 2006; 11(1):95-103.

Gerberding JL. Incidence and prevalence of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus, and cytomegalovirus among health care personnel at risk for blood exposure: final report from a longitudinal study. **J Infect Dis** 1994; 170(6):1410-7.

Gosert R, Egger D, Lohmann V, Bartenschlager R, Blum HE, Bienz K, et al. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. **J Virol** 2003; 77(9):5487-92.

Guedj J, Dahari H, Shudo E, Smith P, Perelson AS. Hepatitis C viral kinetics with the nucleoside polymerase inhibitor mericitabine (RG7128). **Hepatology** 2012 Apr;55(4):1030-7.

Glenn JS. Molecular virology of the hepatitis C virus: implication for novel therapies. **Infect Dis Clin North Am** 2006; 20(1):81-98.

Grakoui A, Wychowski C, Lin C, Feinstone SM, Rice CM. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. **J Virol** 1993; 67(3):1385-95.

Gu Z, Graci JD, Lahser FC, Breslin JJ, Jung SP, Crona JH, et al. Identification of PTC725, an orally bioavailable small molecule that selectively targets the hepatitis C Virus NS4B protein. **Antimicrob Agents Chemother** 2013; 57(7):3250-61.

Gupta E, Bajpai M, Choudhary A. Hepatitis C virus: Screening, diagnosis, and interpretation of laboratory assays. **Asian J Transfus Sci** 2014; 8(1):19-25.

Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, et al. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. **Ann Intern Med** 2004; 140(5):346-55.

Hagan H, Pouget ER, Des Jarlais DC, Lelutiu-Weinberger C. Meta-regression of hepatitis C virus infection in relation to time since onset of illicit drug injection: the influence of time and place. **Am J Epidemiol** 2008; 168(10):1099-1109.

Hanoulle X, Badillo A, Wieruszeski JM, Verdegem D, Landrieu I, Bartenschlager R, et al. Hepatitis C virus NS5A protein is a substrate for the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity of cyclophilins A and B. **J Biol Chem** 2009; 284(20):13589-601.

Hauri AM, Armstrong GL, Hutin YJ. The global burden of disease attributable to contaminated injections given in health care settings. **Int J Std Aids** 2004; 15:7-16.

He LF, Alling D, Popkin T, Shapiro M, Alter HJ, Purcell RH. Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration. **J Infect Dis** 1987; 156(4):636-40.

Hebner CM, Harris J, Oldach D, Miller MD, Mo H. Emergence and Persistence of NS5B Mutations Following Combination Treatment with Tegobuvir (GS-9190) plus Standard of Care--Long-Term follow-up from the Phase 2b Study GS-US-196-0103. **J Hepatol** 2011; 54:S478-9

Hebner CM, Han B, Brendza KM, Nash M, Sulfab M, Tian Y, et al. The HCV non-nucleoside inhibitor Tegobuvir utilizes a novel mechanism of action to inhibit NS5B polymerase function. **PLoS One** 2012;7(6):e39163.

Heck JA, Meng X, Frick DN. Cyclophilin B stimulates RNA synthesis by the HCV RNA dependent RNA polymerase. **Biochem Pharmacol** 2009;77(7):1173-80.

Hoofnagle JH. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. **Hepatology** 1997; 26(3 Suppl 1):15S-20S. Review.

Hotho DM, de Bruijne J, Spaan M, Treitel MA, Boonstra A, de Knecht RJ, et al. Sustained virologic response after therapy with the HCV protease inhibitor narlaprevir in combination with peginterferon and ribavirin is durable through long-term follow-up. **J Viral Hepat** 2013; 20(4):e78-81.

Houghton M, Weiner A, Han J, Kuo G, Choo QL. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. **Hepatology** 1991; 14(2):381-8.

Indolfi G, Resti M. Perinatal transmission of hepatitis C virus infection. **J Med Virol** 2009; 81(5):836-843

Jacobson IM, Gordon SC, Kowdley KV, Yoshida EM, Rodriguez - Torres M, Sulkowski MS, et al. Sofosbuvir for hepatitis C genotype 2 or 3 in patients without treatment options. **N Engl J Med** 2013; 368:1867 - 1877.

Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, Di Bisceglie AM, Reddy KR, Bzowej NH, et al. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. **N Engl J Med** 2011; 364(25):2405-16.

Jardim AC, Yamasaki LH, de Queiróz AT, Bittar C, Pinho JR, Carareto CM, et al. Quasispecies of hepatitis C virus genotype 1 and treatment outcome with peginterferon and ribavirin. **Infect Genet Evol** 2009; 9(4):689-98.

Jaspe RC, Sulbarán YF, Sulbarán MZ, Loureiro CL, Rangel HR, Pujol FH. Prevalence of amino acid mutations in hepatitis C virus core and NS5B regions among Venezuelan viral isolates and comparison with worldwide isolates. **Virology** 2012; 9:214.

Jiang Y, Andrews SW, Condroski KR, Buckman B, Serebryany V, Wenglowky S, et al. Discovery of danoprevir (ITMN-191/R7227), a highly selective and potent inhibitor of hepatitis C virus (HCV) NS3/4A protease. **J Med Chem** 2014; 57(5):1753-69.

Jones DM, Patel AH, Targett-Adams P, McLauchlan J. The hepatitis C virus NS4B protein can trans-complement viral RNA replication and modulates production of infectious virus. **J Virol** 2009; 83(5):2163-77.

Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, Nakano Y, Furuta S, Nishioka K, et al. Hepatitis C in hospital employees with needlestick injuries. **Ann Intern Med** 1991; 115(5):367-9.

Kohara M. Hepatitis C virus replication and pathogenesis. **J Dermatol Sci** 2000; 22(3):161-8.

Kolykhalov AA, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM. Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. **J Virol** 2000; 74(4):2046-51.

Kolykhalov AA, Feinstone SM, Rice CM. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. **J Virol** 1996; 70(6):3363-71.

Koutsoudakis G, Kaul A, Steinmann E, Kallis S, Lohmann V, Pietschmann T, et al. Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. **J Virol** 2006; 80(11):5308-20.

Kuiken C, Yusim K, Boykin L, Richardson R. The Los Alamos hepatitis C sequence database. **Bioinformatics** 2005; 21(3):379-84.

Kuntzen T, Timm J, Berical A, Lennon N, Berlin AM, Young SK, et al. Naturally occurring dominant resistance mutations to hepatitis C virus protease and polymerase inhibitors in treatment-naïve patients. **Hepatology** 2008; 48(6):1769-78.

Lalezari J, Farell G, Shah P, Lawitz E, Schwabe C, Walsh D, et al. PPI-668, a potent new pan-genotypic HCV NS5A inhibitor; phase 1 efficacy and safety. Abstracts of the 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, MA, 9-12 November 2012. **Hepatology** 2012; 56:1065A.

Lam AM, Espiritu C, Bansal S, Micolochick Steuer HM, Zennou V, Otto MJ, et al. Hepatitis C virus nucleotide inhibitors PSI-352938 and PSI-353661 exhibit a novel mechanism of resistance requiring multiple mutations within replicon RNA. **J Virol** 2011a; 85(23):12334-42.

Lam AM, Espiritu C, Murakami E, Zennou V, Bansal S, Micolochick Steuer HM, et al. Inhibition of hepatitis C virus replicon RNA synthesis by PSI-352938, a cyclic phosphate prodrug of β -D-2'-deoxy-2'- α -fluoro-2'- β -C-methylguanosine. **Antimicrob Agents Chemother** 2011b; 55(6):2566-75.

Lambert N. Value of HCV antigen-antibody combined HCV assay in hepatitis C diagnosis. **Dev Biol (Basel)** 2007;127:113-21.

Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk ME, et al. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. **Science** 2010; 327(5962):198-201.

Larrey D, Lohse AW, de Ledinghen V, Trepo C, Gerlach T, Zarski JP, et al. Rapid and strong antiviral activity of the non-nucleosidic NS5B polymerase inhibitor BI 207127 in combination with peginterferon alfa 2a and ribavirin. **J Hepatol** 2012; 57(1):39-46.

Lauck M, Alvarado-Mora MV, Becker EA, Bhattacharya D, Striker R, Hughes AL, et al. Analysis of hepatitis C virus intrahost diversity across the coding region by ultradeep pyrosequencing. **J Virol** 2012; 86(7):3952-60.

Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. **Liver Int** 2009;29 Suppl 1:74-81.

Lawitz E, Poordad F, Kowdley KV, Cohen DE, Podsadecki T, Siggelkow S, et al. A phase 2a trial of 12-week interferon-free therapy with two direct-acting antivirals (ABT-450/r, ABT-072) and ribavirin in IL28B C/C patients with chronic hepatitis C genotype 1. **J Hepatol** 2013a; 59:18-23.

Lawitz E, Hill J, Vince B, Murillo A, Gruener D, Marbury T, et al. ACH - 2684 demonstrates potent

viral suppression in genotype 1 hepatitis C patients with and without cirrhosis: safety, pharmacokinetic, and viral kinetic analysis. Abstracts of the 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL 2013), Amsterdam, The Netherlands, 24 - 28 April 2013. **J Hepatol** 2013b; 58, Suppl 1, S347.

Lawitz E, Mangia A, Wyles D, Rodriguez - Torres M, Hassanein T, Gordon SC, et al. Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection. *N Engl J Med* 2013c; 368:1878 - 1887.

Lawitz EJ, Rodriguez-Torres M, Denning J, Mathias A, Mo H, Gao B, et al. All-oral therapy with nucleotide inhibitors sofosbuvir and GS-0938 for 14 days in treatment-naïve genotype 1 hepatitis C (nuclear). **J Viral Hepat** 2013d; 20(10):699-707.

Lemon SM, Walker CM, Alter MJ, Yi M. Hepatitis C virus. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, et al. **Fields Virology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 1253-1304.

Lenz O, Fevery B, Vijgen J, Verbeeck J, Peeters M, Beumont-Mauviel M, Zeuzem S, & Picchio G. TMC435 in patients infected with HCV genotype 1 who have failed previous pegylated interferon/ribavirin treatment: Virology of the ASPIRE trial. **J Hepatology** 2012; Supplement 2, 56: S5.

Lim SR, Qin X, Susser S, Nicholas JB, Lange C, Herrmann E, et al. Virologic escape during danoprevir (ITMN-191/RG7227) monotherapy is hepatitis C virus subtype dependent and associated with R155K substitution. **Antimicrob Agents Chemother** 2012 Jan;56(1):271-9.

Lin C, Kwong AD, Perni RB. Discovery and development of VX-950, a novel, covalent, and reversible inhibitor of hepatitis C virus NS3.4A serine protease. **Infect Disord Drug Targets** 2006; 6(1):3-16.

Lindenbach BD. Virion assembly and release. **Curr Top Microbiol Immunol** 2013; 369:199-218.

Lindenbach BD, Meuleman P, Ploss A, Vanwolleghem T, Syder AJ, McKeating JA, et al. Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2006; 103(10):3805-9.

Lindenbach BD, Rice CM. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. **Nature** 2005; 436: 933-938.

Link JO, Taylor JG, Xu L, Mitchell M, Guo H, Liu H, et al. Discovery of ledipasvir (GS-5885): a potent, once-daily oral NS5A inhibitor for the treatment of hepatitis C virus infection. **J Med Chem** 2014; 57(5):2033-46.

Liu R, Kong R, Mann P, Ingravallo P, Zhai Y, Xia E, et al. In vitro resistance analysis of Merck's HCV NS5a inhibitor MK-8742 demonstrates increased potency against clinical resistance variants and improved resistance profile. Abstracts of the 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL 2012), Barcelona, Spain, 18-22 April 2012. **J Hepatol** 2012; 56, Suppl 2, S334-S335.

Lok AS, Gunaratnam NT. Diagnosis of hepatitis C. **Hepatology** 1997; 26(3 Suppl 1):48S-56S.

Martins T, Narciso-Schiavon JL, Schiavon LL. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C. **Rev Assoc Med Bras** 2011; 57:107-112.

Mihm U, Herrmann E, Sarrazin C, Zeuzem S. Review article: predicting response in hepatitis C virus therapy. **Aliment Pharmacol Ther** 2006; 23(8):1043-54.

Madhava V, Burgess C, Drucker E. Epidemiology of chronic hepatitis C virus infection in sub-Saharan Africa. **Lancet Infect Dis** 2002; 2(5):293-302.

Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. **Lancet** 2001; 358(9286):958-65.

Marcellin P, Popa S, Streinu-Cercel A, Boyer N, Dospinoiu D, Patat A, et al. ALS-2200, a novel once-daily nucleotide HCV polymerase inhibitor, demonstrated potent antiviral activity in treatment-naive patients with compensated cirrhosis or genotype 2-4 chronic hepatitis C. Abstracts of the International Liver Congress™ 2013 – 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Amsterdam, The Netherlands, 24 April 2013-28 April 2013. **J Hepatol** 2013; 58, Suppl 1:S355.

Marconi A, Candido S, Talamini R, Libra M, Nicoletti F, Spandidos DA, et al. Prevalence of hepatitis C virus infection among health-care workers: A 10-year survey. **Mol Med Report** 2010; 3(4):561-4.

McPhee F, Hernandez D, Yu F, Ueland J, Wang C, Huang H, et al. Characterization of virologic escape in HCV genotype 1 null-responders receiving a combination of the NS3 protease inhibitor BMS-650032 and NS5A inhibitor BMS-790052 . **J Hepatol** 2011; 54(Suppl. 1):S28–S29.

McPhee F, Sheaffer AK, Friberg J, Hernandez D, Falk P, Zhai G, et al. Preclinical Profile and Characterization of the Hepatitis C Virus NS3 Protease Inhibitor Asunaprevir (BMS-650032). **Antimicrob Agents Chemother** 2012; 56(10):5387-96.

McPhee F, Hernandez D, Yu F, Ueland J, Monikowski A, Carifa A, et al. Resistance analysis of hepatitis C virus genotype 1 prior treatment null responders receiving daclatasvir and asunaprevir. **Hepatology** 2013; 58(3):902-11.

Medrano J, Neukam K, Rallón N, Rivero A, Resino S, Naggie S, et al. Modeling the probability of sustained virological response to therapy with pegylated interferon plus ribavirin in patients coinfecting with hepatitis C virus and HIV. **Clin Infect Dis** 2010; 51(10):1209-16.

Membreno FE, Lawitz EJ. The HCV NS5B nucleoside and non-nucleoside inhibitors. **Clin Liver Dis** 2011; 15(3):611-26.

Ministério da Saúde. Estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil. Brasília: **Ministério da Saúde**; 2010.

Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções. Brasília: **Ministério da Saúde**; 2011.

Ministério da Saúde. Suplemento 1. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções. Manejo do paciente infectado cronicamente pelo genótipo 1 do HCV e fibrose avançada. Brasília: **Ministério da Saúde**; 2013.

Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, et al. The lipid droplet is an

important organelle for hepatitis C virus production. **Nat Cell Biol** 2007; 9(9):1089-97.

Mok J, Pembrey L, Tovo PA, Newell ML. European Paediatric Hepatitis C Virus Network. When does mother to child transmission of hepatitis C virus occur? **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed** 2005; 90(2):F156-60.

Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. **Nat Rev Microbiol** 2007; 5(6):453-63.

Moscato GA, Giannelli G, Grandi B, Pieri D, Marsi O, Guarducci I, et al. Quantitative determination of hepatitis C core antigen in therapy monitoring for chronic hepatitis C. **Intervirology** 2011; 54(2):61-5.

Ogawa E, Furusyo N, Kajiwara E, Nomura H, Dohmen K, Takahashi K, et al. Influence of low-density lipoprotein cholesterol on virological response to telaprevir-based triple therapy for chronic HCV genotype 1b infection. **Antiviral Res** 2014; 104:102-9.

Oliveira-Filho AB, Pimenta Ado S, Rojas Mde F, Chagas MC, Crespo DM, Crescente JA, Lemos JA. Likely transmission of hepatitis C virus through sharing of cutting and perforating instruments in blood donors in the State of Pará, Northern Brazil. **Cad Saude Publica** 2010; 26(4):837-44.

Osinusi A, Meissner EG, Lee YJ, Bon D, Heytens L, Nelson A, et al. Sofosbuvir and ribavirin for hepatitis C genotype 1 in patients with unfavorable treatment characteristics: a randomized clinical trial. **JAMA** 2013; 310(8):804-11.

Ozaras R & Tahan V. Acute hepatitis C: prevention and treatment. **Expert Review of Anti-Infective Therapy** 2009; 7:351-361.

Pang OS, Jankowsky E, Planet PJ, Pyle AM. The hepatitis C viral NS3 protein is a processive DNA helicase with cofactor enhanced RNA unwinding. 2002 **EMBO**; 21:1168-1176.

Papatheodoridis G, Hatzakis A. Public health issues of hepatitis C virus infection. **Best Pract Res Clin Gastroenterol** 2012; 26(4):371-80.

Paolucci S, Fiorina L, Mariani B, Gulminetti R, Novati S, Barbarini G, et al. Naturally occurring resistance mutations to inhibitors of HCV NS5A region and NS5B polymerase in DAA treatment-naïve patients. *Virology* 2013; 10:355.

Pastore L, Fiore JR, Tateo M, De Benedittis M, Petrucci M, Casalino C, et al. Detection of hepatitis C virus-RNA in saliva from chronically HCV-infected patients. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2006;19(1):217-24.

Paul D, Romero-Brey I, Gouttenoire J, Stoitsova S, Krijnse-Locker J, Moradpour D, et al. NS4B self-interaction through conserved C-terminal elements is required for the establishment of functional hepatitis C virus replication complexes. *J Virol* 2011; 85(14):6963-76.

Pawlotsky JM, Pellerin M, Bouvier M, Roudot-Thoraval F, Germanidis G, Bastie A, et al. Genetic complexity of the hypervariable region 1 (HVR1) of hepatitis C virus (HCV): influence on the characteristics of the infection and responses to interferon alfa therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol* 1998; 54(4):256-64.

Pawlotsky JM. Use and interpretation of hepatitis C virus diagnostic assays. *Clin Liver Dis* 2003; 7(1):127-37.

Pawlotsky JM. Therapeutic implications of hepatitis C virus resistance to antiviral drugs. *Advances in Gastroenterology* 2009; 4:205-219.

Pawlotsky JM, Najera I, Jacobson I. Resistance to mericitabine, a nucleoside analogue inhibitor of HCV RNA-dependent RNA polymerase. *Antivir Ther* 2012;17(3):411-23.

Pearlman BL. Hepatitis C virus infection in African Americans. *Clin Infect Dis* 2006; 42(1):82-91.

Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 2004; 39: 5-19.

Peres-da-Silva A, de Almeida AJ, Lampe E. Mutations in hepatitis C virus NS3 protease domain associated with resistance to specific protease inhibitors in antiviral therapy naïve patients. **Arch Virol** 2010;155(5):807-11.

Peres-da-Silva A, Almeida AJ, Lampe E. Genetic diversity of NS3 protease from Brazilian HCV isolates and possible implications for therapy with direct-acting antiviral drugs. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2012; 107: 254-61.

Perz, JF, Farrington LA, Pecoraro C, Hutin YJF, Armstrong GL. Estimated global prevalence of hepatitis C virus infection [abstract 957]. 42nd Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America; 2004 Sept 30-Oct; Boston, Massachusetts (USA). IDSA: Arlington, Virginia; 2004:214.

Pickett BE, Striker R, Lefkowitz EJ. Evidence for separation of HCV subtype 1a into two distinct clades. **J Viral Hepat** 2011; 18(9):608-18.

Plaza Z, Soriano V, Vispo E et al. Prevalence of natural polymorphisms at the HCV NS5A gene associated with resistance to daclatasvir, an NS5A inhibitor. **Antivir Ther** 2012; 17: 921-6.

Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, de Jong YP, et al. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. **Nature** 2009; 457(7231):882-6.

Poordad F, McCone J Jr, Bacon BR, Bruno S, Manns MP, Sulkowski MS, et al. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. **N Engl J Med** 2011; 364(13):1195-206.

Poordad F, Lawitz E, Kowdley KV, Cohen DE, Podsadecki T, Siggelkow S, et al. Exploratory study of oral combination antiviral therapy for hepatitis C. **N Engl J Med** 2013; 368:45 - 53.

Poveda E, Wyles DL, Mena A, Pedreira JD, Castro-Iglesias A, Cachay E. Update on hepatitis C virus resistance to direct-acting antiviral agents. **Antiviral Res** 2014; 108:181-91.

Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. **Lancet** 1997; 349(9055):825-32.

Prince AM, Huima-Byron T, Parker TS, Levine DM. Visualization of hepatitis C virions and

putative defective interfering particles isolated from low-density lipoproteins. **J Viral Hepat.** 1996; 3(1):11-7.

Prüss-Ustün A, Rapiti E, Hutin Y. Estimation of the global burden of disease attributable to contaminated sharps injuries among health-care workers. **Am J Ind Med** 2005;48(6):482-90.

Puro V, Petrosillo N, Ippolito G. Risk of hepatitis C seroconversion after occupational exposures in health care workers. Italian Study Group on Occupational Risk of HIV and Other Bloodborne Infections. **Am J Infect Control** 1995; 23(5):273-7.

Qiu D, Lemm JA, O'Boyle DR, Sun JH, Nower PT, Nguyen V, et al. The effects of NS5A inhibitors on NS5A phosphorylation, polyprotein processing and localization. **J Gen Virol** 2011; 92(Pt 11):2502-11.

Qiu P, Sanfiorenzo V, Curry S, Guo Z, Liu S, Skelton A, et al. Identification of HCV protease inhibitor resistance mutations by selection pressure-based method. **Nucleic Acids Res** 2009; 37(10):e74.

Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, Cai T, Di Iulio J, Mueller T, et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. **Gastroenterology** 2010; 138(4):1338-45, 1345.e1-7.

Reddy PG, Bao D, Chang W, Chun BK, Du J, Nagarathnam D, et al. 2'-deoxy-2'- α -fluoro-2'- β -C-methyl 3',5'-cyclic phosphate nucleotide prodrug analogs as inhibitors of HCV NS5B polymerase: discovery of PSI-352938. **Bioorg Med Chem Lett** 2010; 20(24):7376-80.

Rehman S, Ashfaq UA, Javed T. Antiviral drugs against hepatitis C virus. **Genet Vaccines Ther** 2011; 9:11.

Resti M, Azzari C, Mannelli F, Moriondo M, Novembre E, Martino M, et al. Mother to child transmission of hepatitis C virus: prospective study of risk factors and timing of infection in children born to women seronegative for HIV-1. **Tuscany Study Group on Hepatitis C Virus Infection.** **BMJ** 1998; 317(7156):437-41.

Riddell LA, Sherrard J. Blood-borne virus infection: the occupational risks. **Int J STD AIDS** 2000;

11(10):632-9.

Romano KP, Ali A, Aydin C, Soumana D, Ozen A, Deveau LM, et al. The molecular basis of drug resistance against hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitors. **PLoS Pathog** 2012;8(7):e1002832.

Roingard P, Hourieux C, Blanchard E, Brand D, Ait-Goughoulte M. Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. **Biol Cell** 2004; 96:103-108.

Rong L, Dahari H, Ribeiro RM, Perelson AS. Rapid emergence of protease inhibitor resistance in hepatitis C virus. **Sci Transl Med** 2010; 2(30):30ra32.

Sarrazin C. Highly sensitive hepatitis C virus RNA detection methods: molecular backgrounds and clinical significance. **J Clin Virol** 2002; 25 Suppl 3:S23-9.

Sarrazin C, Kieffer TL, Bartels D, Hanzelka B, Müh U, Welker M, et al. Dynamic hepatitis C virus genotypic and phenotypic changes in patients treated with the protease inhibitor telaprevir. **Gastroenterology** 2007; 132(5):1767-77.

Serfaty L, Forns X, Goeser T, Ferenci P, Nevens F, Carosi G, et al. Insulin resistance and response to telaprevir plus peginterferon α and ribavirin in treatment-naïve patients infected with HCV genotype 1. **Gut** 2012; 61(10):1473-80.

Sheng XC, Casarez A, Cai R, Clarke MO, Chen X, Cho A, et al. Discovery of GS-9256: a novel phosphinic acid derived inhibitor of the hepatitis C virus NS3/4A protease with potent clinical activity. **Bioorg Med Chem Lett** 2012; 22:1394-1396.

Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. **Lancet Infect Dis** 2005; 5(9):558-67.

Shi ST, Polyak SJ, Tu H, Taylor DR, Gretch DR, Lai MM. Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins. **Virology** 2002; 292(2):198-210.

Shih IH, Vliegen I, Peng B, Yang H, Hebner C, Paeshuyse J, et al. Mechanistic characterization of GS-9190 (Tegobuvir), a novel nonnucleoside inhibitor of hepatitis C virus NS5B polymerase.

Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(9):4196-203.

Steinmann E, Pietschmann T. Hepatitis C virus p7-a viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy. **Viruses** 2010; 2(9):2078-95.

Stuyver L, van Arnhem W, Wyseur A, Hernandez F, Delaporte E, Maertens G. Classification of hepatitis C viruses based on phylogenetic analysis of the envelope 1 and nonstructural 5B regions and identification of five additional subtypes. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1994; 91(21):10134-8.

Summa V, Ludmerer SW, McCauley JA, Fandozzi C, Burlein C, Claudio G, et al. MK-5172, a selective inhibitor of hepatitis C virus NS3/4a protease with broad activity across genotypes and resistant variants. **Antimicrob Agents Chemother** 2012; 56(8):4161-7.

Sun JH, O'Boyle DR, Zhang Y, Wang C, Nower P, Valera L, et al. Impact of a baseline polymorphism on the emergence of resistance to the hepatitis C virus nonstructural protein 5A replication complex inhibitor, BMS-790052. **Hepatology** 2012; 55(6):1692-9.

Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. **Nat Genet** 2009; 41(10):1100-4.

Susser S, Vermehren J, Forestier N, Welker MW, Grigorian N, Füller C, et al. Analysis of long-term persistence of resistance mutations within the hepatitis C virus NS3 protease after treatment with telaprevir or boceprevir. **J Clin Virol** 2011; 52(4):321-7.

Suzuki F, Sezaki H, Akuta N et al. Prevalence of hepatitis C virus variants resistant to NS3 protease inhibitors or the NS5A inhibitor (BMS-790052) in hepatitis patients with genotype 1b. **J Clin Virol** 2012; 54: 352-4.

Suzuki Y, Ikeda K, Suzuki F, Toyota J, Karino Y, Chayama K, et al. Dual oral therapy with daclatasvir and asunaprevir for patients with HCV genotype 1b infection and limited treatment options. **J Hepatol** 2013; 58(4):655-62.

Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, Wakita T. Molecular biology of hepatitis C virus. **J Gastroenterol** 2007; 42(6):411-23.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol Biol Evol** 2011; 28(10):2731-9.

Tan SL, Katze MG. How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. **Virology** 2001; 284(1):1-12.

Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. **Nat Genet** 2009; 41(10):1105-9.

Tanaka T, Kato N, Cho MJ, Sugiyama K, Shimotohno K. Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. **J Virol** 1996; 70(5):3307-12.

Tellinghuisen TL, Rice CM. Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. **Curr Opin Microbiol.** 2002; 5(4):419-27.

Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Rice CM. Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. **Nature** 2005; 435(7040):374-9.

Terrault NA. Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. **Hepatology** 2002; 36(5 Suppl 1):S99-105

Thiel HJ, Collett MS, Gould EA, Heinz FX, Houghton M, Meyess G, et al. Flaviviridae. In: Fauquier CM, Mayo MA, Msnilogg J, Desslberger U, Baa LA, eds. Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICT. 2005:979-96.

Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. **Nature** 2009; 461(7265):798-801.

Thursz M, Fontanet A. HCV transmission in industrialized countries and resource-constrained areas. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol** 2014;11(1):28-35.

Tong X, Bogen S, Chase R, Girijavallabhan V, Guo Z, Njoroge FG, et al. Characterization of

resistance mutations against HCV ketoamide protease inhibitors. **Antiviral Res** 2008; 77(3):177-85.

Tong X, Le Pogam S, Li L, Haines K, Piso K, Baronas V, et al. In vivo emergence of a novel mutant L159F/L320F in the NS5B polymerase confers low-level resistance to the HCV polymerase inhibitors mericitabine and sofosbuvir. **J Infect Dis** 2014; 209(5):668-75.

Tscherne DM, Jones CT, Evans MJ, Lindenbach BD, McKeating JA, Rice CM. Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. **J Virol** 2006; 80(4):1734-41.

Uchida M, Hino N, Yamanaka T, Fukushima H, Imanishi T, Uchiyama Y, et al. Hepatitis C virus core protein binds to the C-terminal region of NS5B RNA polymerase. **Hepatol Res** 2002; 22(4):297-306.

Vandelli C, Renzo F, Romanò L, Tisminetzky S, De Palma M, Stroffolini T, et al. Lack of evidence of sexual transmission of hepatitis C among monogamous couples: results of a 10-year prospective follow-up study. **Am J Gastroenterol** 2004; 99(5):855-9.

Venkatraman S, Bogen SL, Arasappan A, Bennett F, Chen K, Jao E, et al. Discovery of SCH 503034, a selective, potent, orally bioavailable hepatitis C virus NS3 protease inhibitor: a potential therapeutic agent for the treatment of hepatitis C infection. **J Med Chem** 2006; 49(20):6074-86.

Verbeeck J, Stanley MJ, Shieh J, Celis L, Huyck E, Wollants E, et al. Evaluation of Versant hepatitis C virus genotype assay (LiPA) 2.0. **J Clin Microbiol** 2008; 46(6):1901-6.

Verdegem D, Badillo A, Wieruszeski JM, Landrieu I, Leroy A, Bartenschlager R, Penin F, Lippens G, Hanouille X. Domain 3 of NS5A protein from the hepatitis C virus has intrinsic alpha-helical propensity and is a substrate of cyclophilin A. **J Biol Chem** 2011; 286(23):20441-54.

Vince B, Lawitz E, Searle S, Marbury T, Robison H, Robarge L, et al. Novel NS5A inhibitor ACH-2928 phase 1 results healthy volunteers and HCV GT-1 patients. Abstracts of the 47 Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL 2012), Barcelona, Spain, 18-22 April 2012. **J Hepatol** 2012; 56, Suppl 2, S480-S481.

Wagoner J, Negash A, Kane OJ, Martinez LE, Nahmias Y, Bourne N, et al. Multiple effects of

silymarin on the hepatitis C virus lifecycle. **Hepatology** 2010;51(6):1912-21.

Welsch C, Domingues FS, Susser S, Antes I, Hartmann C, Mayr G, et al. Molecular basis of telaprevir resistance due to V36 and T54 mutations in the NS3-4A protease of the hepatitis C virus. **Genome Biol** 2008;9(1):R16.

Wasley A, Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. **Semin Liver Dis** 2000;20(1):1-16.

Welsch C, Schweizer S, Shimakami T, Domingues FS, Kim S, Lemon SM, et al. Ketoamide resistance and hepatitis C virus fitness in val55 variants of the NS3 serine protease. **Antimicrob Agents Chemother** 2012; 56(4):1907-15.

Widell A, Shev S, Mansson S, Zhang YY, Foberg U, Norkrans G, et al. Genotyping of hepatitis C virus isolates by a modified polymerase chain reaction assay using type specific primers: epidemiological applications. **J Med Virol** 1994; 44(3):272-9.

Winqvist J, Abdurakhmanov E, Baraznenok V, Henderson I, Vrang L, Danielson UH. Resolution of the interaction mechanisms and characteristics of non-nucleoside inhibitors of hepatitis C virus polymerase. **Antiviral Res** 2013; 97(3):356-68.

Wong KA, Worth A, Martin R, Svarovskaia E, Brainard DM, Lawitz E, et al. Characterization of Hepatitis C virus resistance from a multiple-dose clinical trial of the novel NS5A inhibitor GS-5885. **Antimicrob Agents Chemother** 2013; 57(12):6333-40.

Wozniak AL, Griffin S, Rowlands D, Harris M, Yi M, Lemon SM, et al. Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production. **PLoS Pathog** 2010; 6(9):e1001087.

Xu Z, Choi J, Yen TSB, Lu W, Strohecker A, Govindarajan S, et al. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. **EMBO J** 2001; 20(14):3840-8.

Yan Y, Li Y, Munshi S, Sardana V, Cole JL, Sardana M, et al. Complex of NS3 protease and NS4A peptide of BK strain hepatitis C virus: a 2.2 Å resolution structure in a hexagonal crystal form. **Protein Sci** 1998; 7(4):837-47.

Yanagi M, St Claire M, Emerson SU, Purcell RH, Bukh J. In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999; 96(5):2291-5.

Yang F, Robotham JM, Nelson HB, Irsigler A, Kenworthy R, Tang H. Cyclophilin A is an essential cofactor for hepatitis C virus infection and the principal mediator of cyclosporine resistance in vitro. **J Virol** 2008; 82(11):5269-78.

Yang H, Robinson M, Corsa AC, Peng B, Cheng G, Tian Y, et al. Preclinical characterization of the novel hepatitis C virus NS3 protease inhibitor GS-9451. **Antimicrob Agents Chemother** 2014; 58(2):647-53.

Yang W, Sun Y, Hou X, Zhao Y, Fabrycki J, Chen D, et al. ACH-806, an NS4A antagonist, inhibits hepatitis C virus replication by altering the composition of viral replication complexes. **Antimicrob Agents Chemother** 2013; 57(7):3168-77.

Yen T, Keeffe EB, Ahmed A. The epidemiology of hepatitis C virus infection. **J Clin Gastroenterol** 2003; 36(1):47-53.

Yi G, Deval J, Fan B, Cai H, Soulard C, Ranjith-Kumar CT, et al. Biochemical study of the comparative inhibition of hepatitis C virus RNA polymerase by VX-222 and filibuvir. **Antimicrob Agents Chemother** 2012; 56(2):830-7.

You DM, Pockros PJ. Simeprevir for the treatment of chronic hepatitis C. **Expert Opin Pharmacother** 2013; 14(18):2581-9.

You S, Rice CM. 3' RNA elements in hepatitis C virus replication: kissing partners and long poly(U). **J Virol** 2008; 82(1):184-95.

Zahn A, Jennings N, Ouwehand WH, Allain JP. Hepatitis C virus interacts with human platelet glycoprotein VI. **J Gen Virol** 2006; 87(Pt 8):2243-51.

Zeisel MB, Felmlee DJ, Baumert TF. Hepatitis C virus entry. **Curr Top Microbiol Immunol** 2013;369:87-112.

Zeuzem S, Hultcrantz R, Bourliere M, Goeser T, Marcellin P, Sanchez-Tapias J, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3. **J Hepatol** 2005; 42(3):434.

Zeuzem S, Andreone P, Pol S, Lawitz E, Diago M, Roberts S, et al. Telaprevir for retreatment of HCV infection. **N Engl J Med** 2011; 364(25):2417-28.

Zeuzem S, Buggisch P, Agarwal K, Marcellin P, Sereni D, Klinker H, et al. The protease inhibitor, GS-9256, and non-nucleoside polymerase inhibitor tegobuvir alone, with ribavirin, or pegylated interferon plus ribavirin in hepatitis C. **Hepatology** 2012; 55(3):749-58.

Zeuzem S, Asselah T, Angus P, Zarski JP, Larrey D, Müllhaupt B, et al. Faldaprevir (BI 201335), deleobuvir (BI 207127) and ribavirin oral therapy for treatment-naive HCV genotype 1: SOUND-C1 final results. **Antivir Ther** 2013a;18(8):1015-9.

Zeuzem S, Soriano V, Asselah T, Bronowicki JP, Lohse AW, Müllhaupt B, et al. Faldaprevir and deleobuvir for HCV genotype 1 infection. **N Engl J Med** 2013b; 369(7):630-9.

9 ARTIGO 4 (ANEXO)

O estudo colaborativo realizado em 2013 teve como objetivo entender a dinâmica de dispersão do HCV em diferentes regiões do Brasil. A análise de 676 sequências da região NS5B do vírus revelou que a epidemia dessa infecção no território nacional resultou de múltiplas introduções virais no País, e da transmissão autóctone dos subtipos 1a, 1b, 3a e dos genótipos 2, 4 e 5. A epidemia do subtipo 1a ocorreu a partir da disseminação de um clado principal, enquanto que as dos subtipos 1b e 3a são caracterizadas pela difusão simultânea de várias linhagens independentes do HCV. Este estudo também sugere que a diversidade do HCV no Brasil foi moldada pela frequente migração viral entre os diferentes estados brasileiros e pela disseminação viral local. Os dados dessa análise fazem parte do manuscrito intitulado “Genetic diversity of HCV in Brazil”, publicado na “Antiviral Therapy”.

Original article

Genetic diversity of HCV in Brazil

Elisabeth Lampe^{1*}, Lia Lewis-Ximenez¹, Marcia P Espírito-Santo¹, Nathália M Delvaux¹, Sergio A Pereira¹, Allan Peres-da-Silva¹, Regina MB Martins², Marcelo A Soares³, André F Santos³, Luãna L Vidal³, Fabiana N Germano³, Ana Maria B de Martinez⁴, Rossana Basso⁴, João R Rebello Pinho⁵, Fernanda M Malta⁵, Michele Gomes-Gouvêa⁵, Ricardo A Moliterno⁶, Dennis A Bertolini⁶, Mayara AT Fujishima⁶, Gonzalo Bello⁷

¹Laboratório de Hepatites Virais, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

²Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brazil

³Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁴Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, Brazil

⁵Departamento de Gastroenterologia Faculdade de Medicina da USP, São Paulo, Brazil

⁶Departamento de Ciências Básicas da Saúde e Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brazil

⁷Laboratório de AIDS Et Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

*Corresponding author e-mail: elampe@ioc.fiocruz.br

Background: Many studies have documented the molecular epidemiological scenario of HCV within individual Brazilian states, but we still have an incomplete understanding of the dispersion dynamics of the virus in different regions throughout the country.

Methods: A total of 676 HCV NS5B gene sequences of subtypes 1a ($n=321$), 1b ($n=170$) and 3a ($n=185$), isolated from seven different Brazilian states covering four out of five regions were analysed in the present study. We also analysed 22 HCV NS5B gene sequences of minor genetic variants including genotype 2 ($n=13$), genotype 4 ($n=6$) and subtype 5a ($n=3$). Brazilian HCV sequences were aligned with sequences of non-Brazilian origin and subjected to maximum likelihood phylogenetic analyses.

Results: These analyses revealed that the Brazilian HCV epidemic resulted from multiple introductions and autochthonous transmission of subtypes 1a, 1b, 3a and genotypes 2, 4 and 5. Brazilian HCV subtype 1a epidemic

is dominated by the dissemination of one major clade; while Brazilian HCV subtypes 1b and 3a epidemics are characterized by concurrent dissemination of several independent HCV lineages. Some HCV Brazilian lineages of subtypes 1a, 1b, 2b and 3a were successful in becoming established and disseminated through several regions in the country. Despite significant phylogenetic intermixing of Brazilian sequences, the distribution of HCV strains from different states across lineages was not completely homogeneous.

Conclusions: These results demonstrate the existence of multiple introductions and local propagation of both prevalent and uncommon HCV genetic variants in Brazil and identify some major Brazilian HCV clades with nationwide dissemination. This study also suggests that the observed HCV diversity in Brazil has been shaped by both frequent viral migration among regions and *in situ* viral dissemination.

Introduction

HCV infects nearly 2.5% of the world's human population (>160 million people) and is recognized as a major cause of hepatitis and liver cancer worldwide [1]. HCV is a member of the *Hepacivirus* genus of the *Flaviviridae* family. The virus is classified into six major genotypes (labelled 1 to 6), each with multiple subtypes (labelled 1a, 1b, and so on) [2]. A recent study showed that HCV subtype 1a isolates can be further sub-categorized into two distinct sub-subtypes designated 1 and 2 [3]. Although most HCV lineages

remain restricted to endemic regions of Africa and Asia, a few HCV lineages (such as subtypes 1a, 1b and 3a) are globally disseminated. These 'epidemic' HCV lineages have likely exploited highly efficient routes of viral transmission that arose during the 20th century such as blood transfusion, haemodialysis, injection drug use and non-sterile medical injections [4–6].

It has been estimated that around 1.4% of the Brazilian population (>2.5 million people) is HCV-positive [7,8]. Most diagnosed cases of HCV infection occur in

the south-east region, followed by the south, central-west, north-east and north Brazilian regions; yet the estimated prevalence rate of HCV infection is roughly similar in different regions of the country [7]. The most prevalent HCV strains in Brazil are genotypes 1 (50–78%) and 3 (11–43%), varying in different proportions according to the geographic area. Genotype 2 is found to a lesser extent throughout the country (1–11%), whereas genotypes 4 and 5 have been rarely found (<1%) [9–21]. Previous studies based on the analysis of the NS5B gene showed that multiple introductions of the epidemic HCV subtypes have occurred in Brazil, although only a few HCV clades have been successfully disseminated during the second half of the 20th century [22,23]. Additional characterization of the NS3 gene of HCV isolates from Rio de Janeiro further revealed that most Brazilian subtype 1a sequences branched within the previously designated clade 1 [24].

Most previous studies have focused on the analysis of HCV epidemics within individual Brazilian states, but Brazil is a country of continental dimensions and little is known on the dispersion dynamics of HCV across different regions. In this study, partial NS5B gene sequences of HCV subtype 1a ($n=321$), 1b ($n=170$) and 3a ($n=185$) strains, along with 22 sequences of the less prevalent genotypes 2, 4 and 5, isolated from seven Brazilian states, were combined with HCV sequences from other countries to determine the degree of isolation of each local HCV epidemic and to identify the scale of expansion of major Brazilian HCV lineages.

Methods

HCV sequences datasets

Partial NS5B gene sequences were obtained from a total of 254 HCV strains (subtype 1a=99, subtype 1b=76, subtype 3a=61, genotype 2=10, genotype 4=6 and subtype 5a=2) isolated in the south (Rio Grande do Sul), south-east (Rio de Janeiro), central-west (Goiás and Mato Grosso do Sul) and north (Amapá) Brazilian regions, between 2002 and 2011. These new sequences were added along with 444 Brazilian HCV NS5B gene sequences (subtype 1a=222, subtype 1b=94, subtype 3a=124, genotype 2=3 and genotype 5=1) isolated in the south-east (São Paulo), central-west (Goiás, Mato Grosso and Mato Grosso do Sul) and north (Rondônia) regions that were previously published [18,22,23,25–27]. The Brazilian HCV sequences were analysed together with global reference sequences available at the Los Alamos HCV database [28] that matched the selected genomic region. In order to illustrate the extent of genetic diversity of most prevalent HCV lineages, subtype 1a reference sequences were represented by isolates of both clade 1 and clade 2 taken from various cities in the United States, Europe

and Latin America, whereas subtypes 1b and 3a reference sequences were represented by isolates from Africa, Asia, Europe, the Caribbean, North America, South America, the former Soviet Union and Oceania.

Phylogenetic analyses

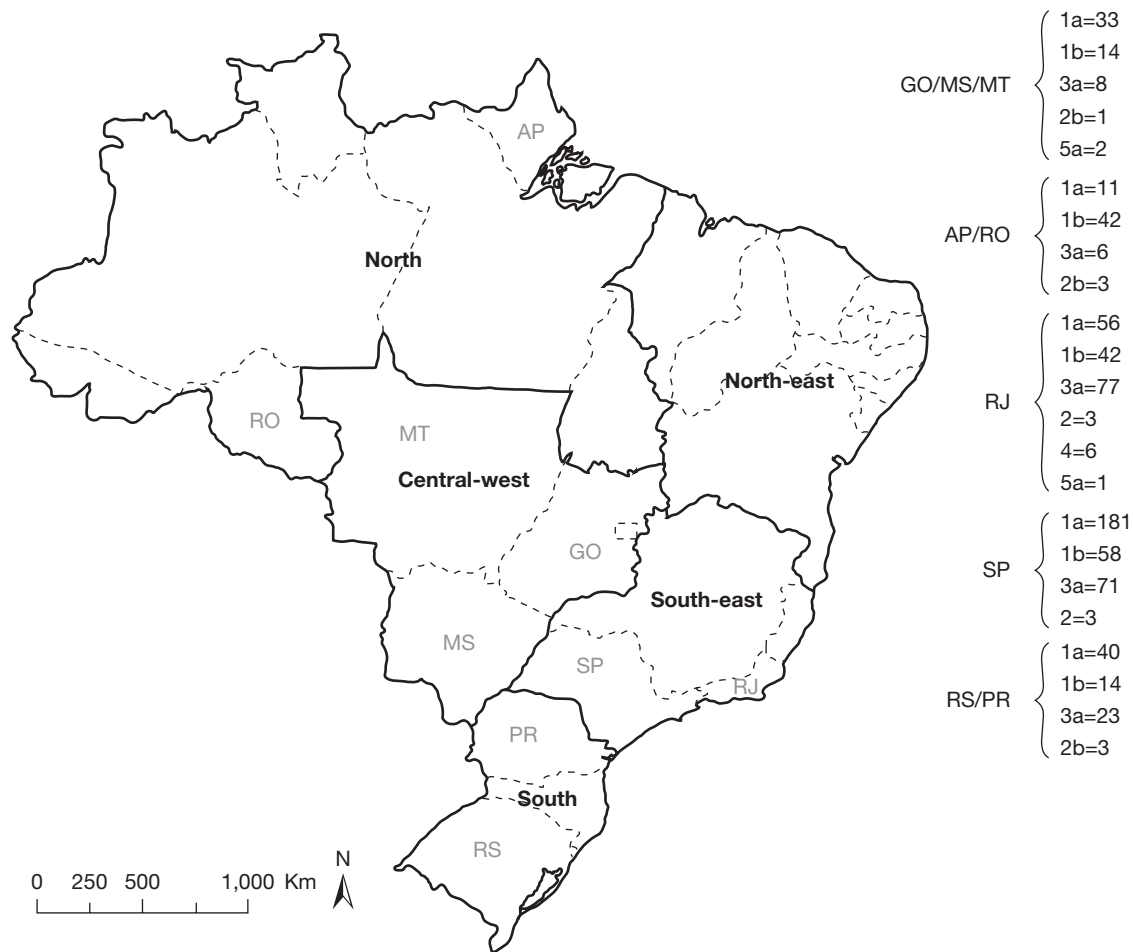
Nucleotide sequences were aligned using CLUSTAL X program [29] to generate a final alignment of 297 bp (nucleotide positions 8309–8606 relative to the reference sequence H77). Phylogenies were reconstructed by the maximum likelihood (ML) method with PhyML [30] in an online web server [31]. ML trees were reconstructed under the GTR+I+ Γ_4 [32] nucleotide substitution model, selected using the jModeltest program [33]. Heuristic tree searches were performed using the SPR branch-swapping algorithm. The reliability of the phylogenies was estimated with the approximate likelihood-ratio test (*aLRT*) [34] based on a Shimodaira–Hasegawa-like procedure.

Results

A total of 698 HCV Brazilian NS5B gene sequences (subtype 1a=321, subtype 1b=170, subtype 3a=185, genotype 2=13, genotype 4=6 and subtype 5a=3) were analysed in the present study. The most prevalent Brazilian HCV strains, 1a, 1b and 3a, were isolated from seven different states including Rio de Janeiro (RJ) and São Paulo (SP) from the south-east region, Goiás (GO) and Mato Grosso do Sul (MS) from the central-west region, Amapá (AP) and Rondônia (RO) from the north region, and Rio Grande do Sul (RS) from the south region (Figure 1). Uncommon Brazilian HCV strains of genotypes 2, 4 and 5 were isolated from eight different states including RJ and SP from the south-east region, Mato Grosso, GO and MS from the central-west region, RO from the north region, and Parana (PR) and RS from the south region (Figure 1).

ML phylogenetic analysis of partial NS5B gene showed that HCV subtype 1a isolates previously designated as clade 1 and clade 2 formed two distinct monophyletic sub-clusters, confirming the classification of Pickett *et al.* [3] (Figure 2A). The vast majority (98%) of Brazilian HCV subtype 1a sequences branched within clade 1 and only a few strains isolated in RJ ($n=3$), GO ($n=2$), RS ($n=1$) and AP ($n=1$) branched within clade 2 (Figure 2A). Most (83%) clade 1 Brazilian strains formed a highly supported monophyletic sub-cluster here called BR1a-I (Figure 2A). The remaining clade 1 Brazilian isolates branched in a second monophyletic sub-clade, here designated BR1a-II, or were interspersed among clade 1 strains of non-Brazilian origin (Figure 2A). Brazilian sequences from different country regions were highly intermixed in the phylogenetic tree, pointing to a low degree of viral

Figure 1. Political map of Brazil showing its regions and states



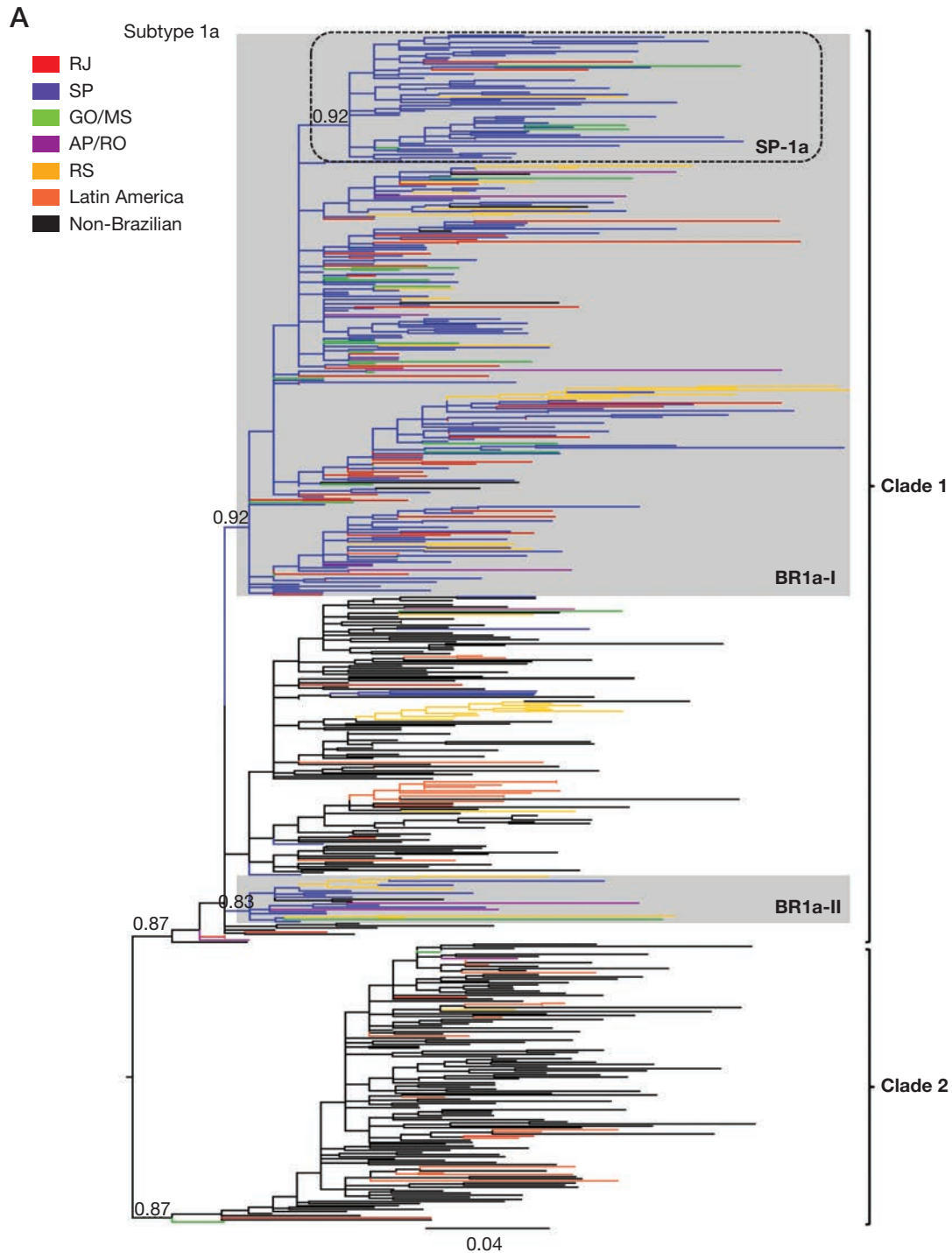
Limits of regions and states are indicated by black and grey lines respectively. The position of the nine states analysed in the present study are indicated with a two letter code: Amapá (AP), Goiás (GO), Mato Grosso (MT), Mato Grosso do Sul (MS), Parana (PR), Rio de Janeiro (RJ), Rio Grande do Sul (RS), São Paulo (SP) and Rondônia (RO). The number of HCV sequences from each location included in the present study is indicated.

isolation by geographic origin. One highly supported ($aLRT=0.93$) Brazilian sub-clade mainly composed of sequences from SP, however, was identified within lineage BR1a-I (Figure 2A). This clade, here called SP-1a, comprised 30% of subtype 1a sequences from SP, 15% of sequences from GO/MS and <5% of sequences from other Brazilian states (Table 1). Another interesting observation is that while most sequences from RJ (84%), SP (96.5%) and GO/MS (91%) branched within Brazilian clades BR1a-I and BR1a-II, an important fraction of sequences from RS (30%) branched outside these Brazilian lineages (Table 1).

The 170 Brazilian HCV subtype 1b sequences analysed in this study were distributed in multiple ($n>30$) independent lineages among global reference sequences (Figure 2B). Most Brazilian subtype 1b lineages are

of small size ($n<5$). A total of seven Brazilian clades (BR1b-I to BR1b-VII), however, contained ≥ 10 strains. Some of these major Brazilian subtype 1b clades were highly supported ($aLRT>0.93$) whereas others displayed only a moderate support ($0.75<aLRT<0.90$; Figure 2B). Together, the seven major Brazilian clades contain 75% of Brazilian subtype 1b sequences and their scale of dissemination seems to be highly variable. Although clades BR1b-VI and BR1b-VII contain sequences from all geographic regions, clade BR1b-III contains sequences from one single state (AP). Analysis of strain composition of major Brazilian lineages indicated that 30% of sequences from RJ branched within clade BR1b-IV, 55% of sequences from SP and 64% of sequences from GO/MS branched within clades BR1b-II and BR1b-VII, 64% of sequences from AP/RO

Figure 2. Maximum likelihood phylogeny of prevalent Brazilian HCV subtypes



(A) Subtype 1a strains of Brazilian ($n=321$) and non-Brazilian ($n=228$) origin. Brackets indicate the monophyletic clusters formed by reference sequences from Europe and North America previously classified as clades 1 and 2. The tree root was placed at the branch connecting clades 1 and 2. (B) Subtype 1b strains of Brazilian ($n=170$) and non-Brazilian ($n=157$) origin. The tree was rooted with three subtype 1m strains from West Africa (AF037235, AF037236 and AF037237; not shown). (C) Subtype 3a strains of Brazilian ($n=185$) and non-Brazilian ($n=118$) origin. The tree was rooted with three subtype 3b strains from Pakistan (AB444464, AB444465 and AB444466; not shown). The colours of external branches represent the geographic region from where the HCV strains were sampled, according to the legend given in each figure. For visual clarity, internal branches of the major Brazilian lineage were also coloured. Grey boxes indicate Brazilian monophyletic clades with ≥ 10 individuals. The dotted box highlights the position of the monophyletic sub-cluster SP-1a. Approximate likelihood-ratio test (*aLR7*) support values are indicated only at key nodes. The scale bar is in units of nucleotide substitutions per site. AP, Amapá; GO, Goiás; MS, Mato Grosso do Sul; RJ, Rio de Janeiro; RO, Rondônia; RS, Rio Grande do Sul; SP, São Paulo.

Figure 2. Continued

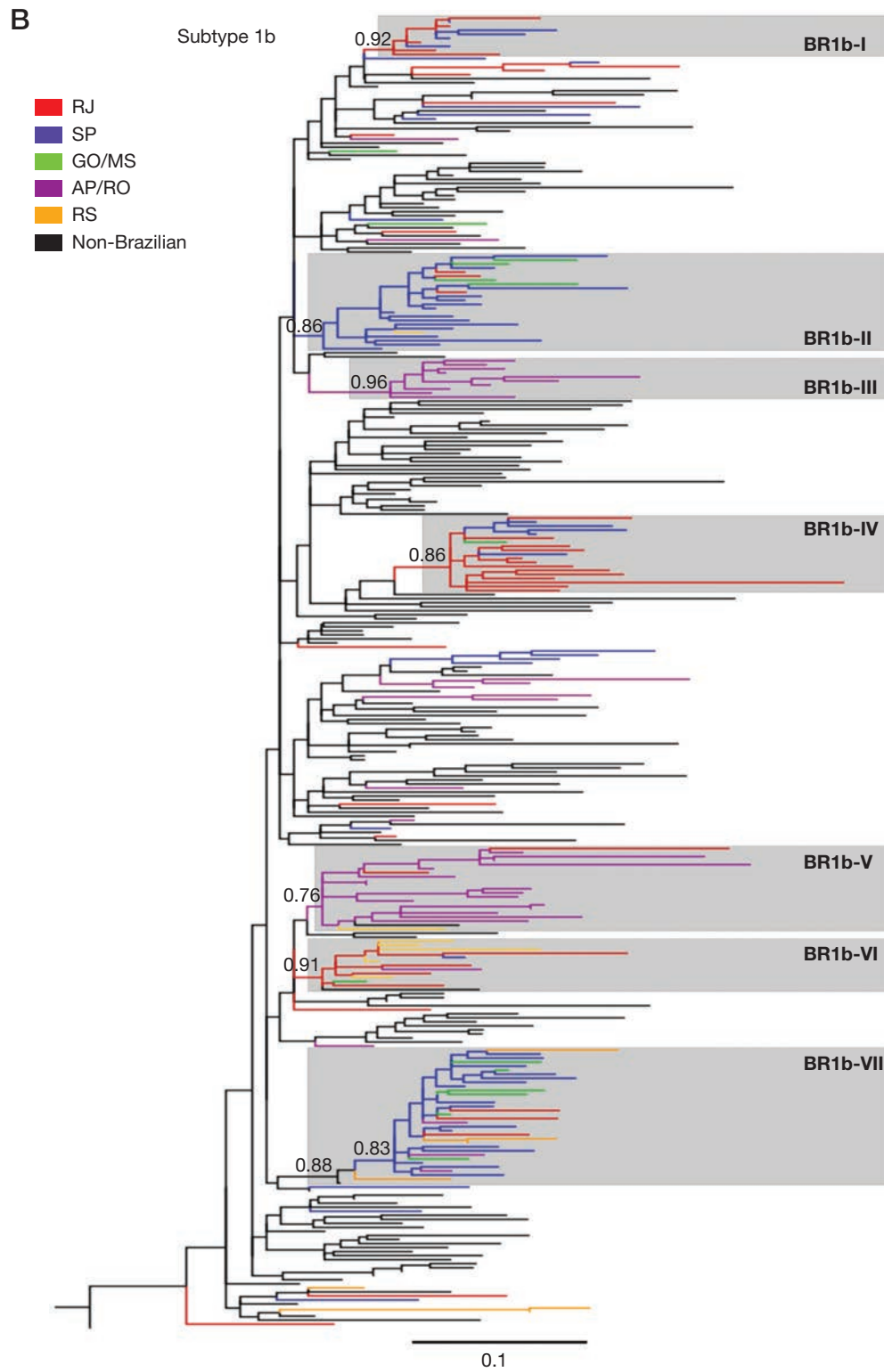
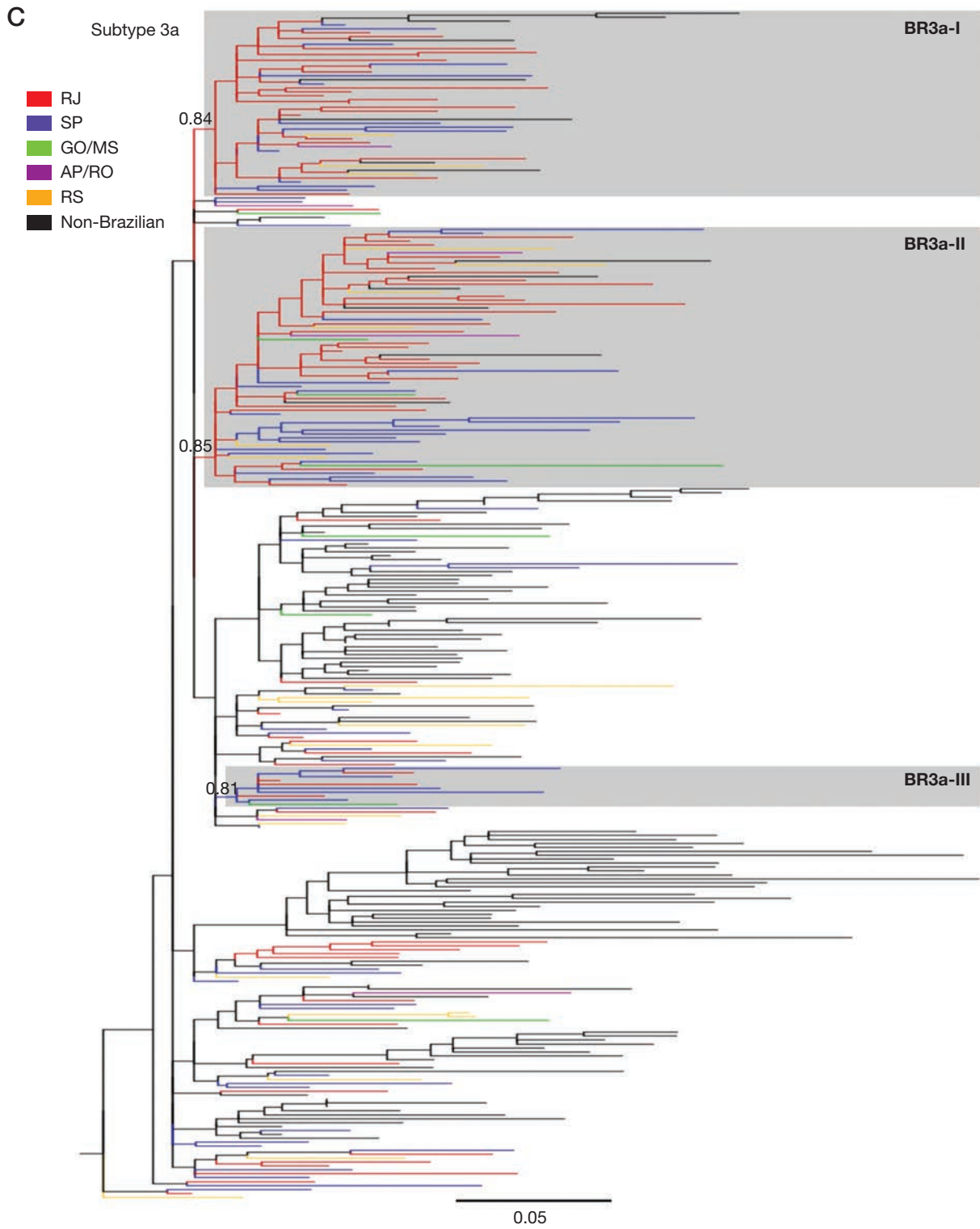


Figure 2. Continued



branched within clades BR1b-III and BR1b-V and 64% of sequences from RS branched within clades BR1b-VI and BR1b-VII (Table 1).

Similarly to the Brazilian subtype 1b, the 185 Brazilian subtype 3a sequences were scattered across several ($n > 30$) independent lineages that were intermixed among reference sequences of non-Brazilian origin (Figure 2C). Most Brazilian subtype 3a lineages are of small size ($n < 5$), with exception of three clades (BR3a-I to BR3a-III) with medium support ($0.80 < aLRT < 0.90$) that contain ≥ 10 strains (Figure 2C). The three major Brazilian clades contained 62% of Brazilian subtype 3a sequences included here. Analysis of strain composition of major Brazilian lineages indicates no clear association between location and phylogenetic clades. The major Brazilian clade, here named BR3a-II, was detected in all country regions and contained a similar proportion of sequences from each location, ranging between 26% and 38% (Table 1). The clade BR3a-I contained a total of 37 sequences, including 13% of sequences from RS, 27% of sequences from RJ and 18% of sequences from SP (Table 1). The minor clade, designated BR3a-III, contained a total of 10 sequences, including 5% of sequences from RJ, 7% of sequences from SP and 12% of sequences from GO/MS (Table 1). The low number of HCV subtype 3a sequences from RS, GO/MS and AP/RO included in this study may explain the apparent absence of sequences from these regions within minor Brazilian clades.

ML phylogenetic analysis of a partial NS5B gene from uncommon HCV Brazilian strains revealed the existence of multiple introductions and autochthonous transmission of genotypes 2, 4 and 5 in Brazil (Figure 3). The six genotype 4 sequences from RJ branched in two well-supported lineages with three sequences each that were classified as subtypes 4a and 4b. The 13

genotype 2 Brazilian sequences formed three well-supported monophyletic clades. The major clade belongs to subtype 2b and included sequences from RO ($n=3$), RS ($n=2$), GO ($n=1$), PR ($n=1$), RJ ($n=1$) and SP ($n=1$). Two sequences from SP branched in a second clade within subtype 2a, whereas the other two sequences from RJ formed an independent clade positioned between subtypes 2c, 2i and 2j. Finally, the three genotype 5 sequences branched in two independent lineages within subtype 5a.

Discussion

Despite many regional studies on Brazilian HCV genotype distribution, the dispersion dynamics of the virus in Brazil as a whole is largely unknown. Two previous studies showed that multiple introductions of HCV subtypes 1a, 1b and 3a occurred in the southeast and central-west Brazilian regions in the second half of the 20th century [22,23]. Here, the number of analysed Brazilian localities was expanded and new insights were observed in the diversity of HCV subtypes. Despite the fact that our assembled dataset derived from convenience studies, the data observed reflect the heterogeneity of HCV variants occurring in Brazil as a country.

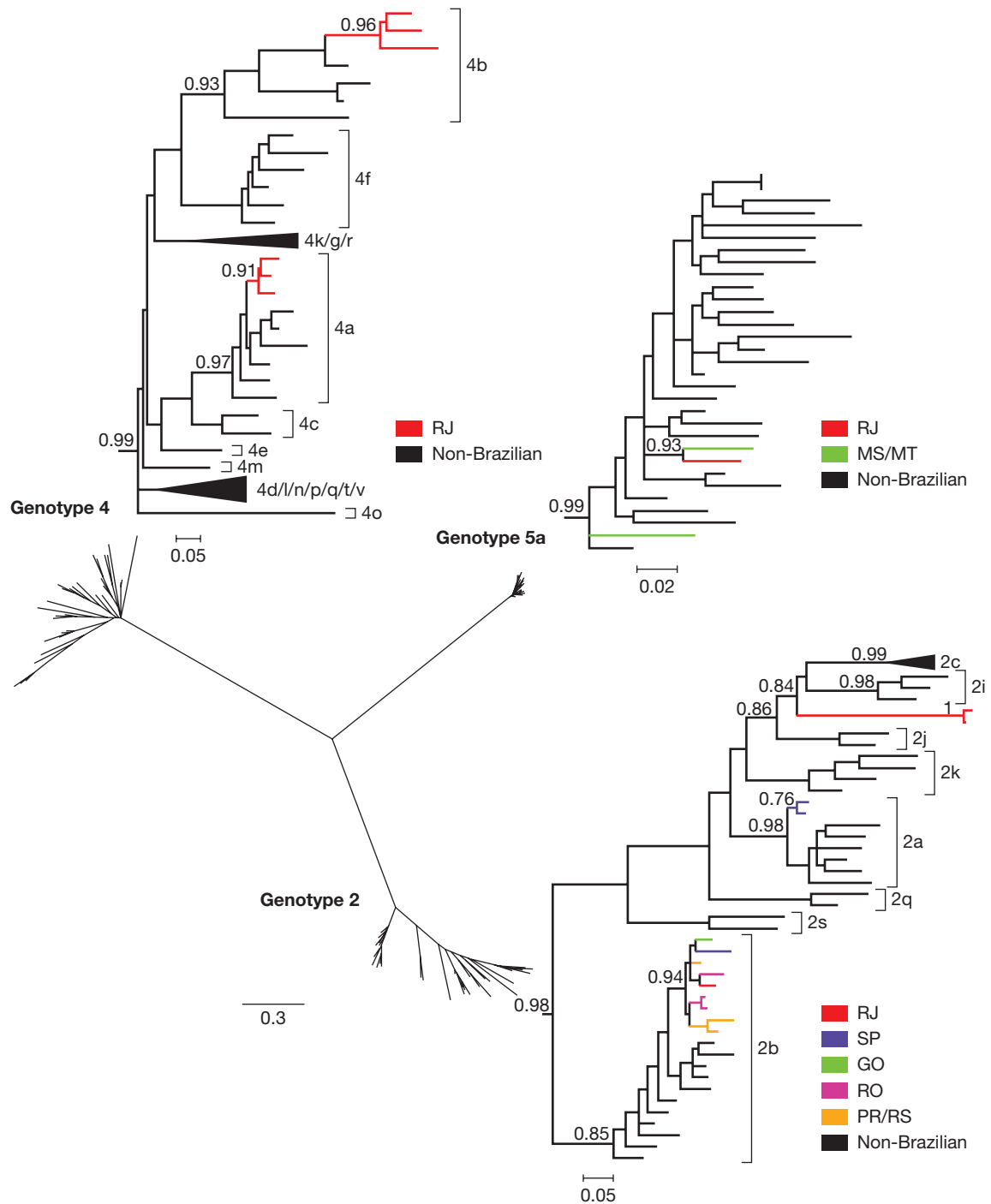
Most (98%) Brazilian subtype 1a strains grouped in clade 1. Within clade 1, Brazilian strains from different regions formed two distinct and monophyletic exclusive clusters demonstrating at least two entries and subsequent irradiation of this subtype in the country. Brazilian sequences from different locations were highly intermixed in the two major country-specific clade 1 monophyletic clusters, indicating a low degree of viral isolation by geographic origin. However, the

Table 1. Distribution of HCV sequences among major Brazilian lineages

Subtype	Lineage	Location				
		RS	RJ	SP	GO/MS	AP/RO
1a	I	22 (55)	46 (82)	164 (91)	29 (88)	7 (64)
	I (SP)	1 (2.5)	2 (4)	54 (30)	5 (15)	-
	II	6 (15)	1 (2)	10 (5.5)	1 (3)	2 (18)
1b	I	-	5 (12)	5 (9)	-	-
	II	1 (7)	3 (7)	16 (28)	4 (29)	-
	III	-	-	-	-	10 (24)
	IV	-	13 (31)	5 (9)	1 (7)	-
	V	1 (7)	2 (5)	-	-	17 (40)
	VI	5 (36)	4 (9)	1 (2)	1 (7)	1 (2)
	VII	4 (29)	3 (7)	16 (28)	5 (36)	3 (7)
3a	I	3 (13)	21 (27)	13 (18)	-	-
	II	6 (26)	27 (35)	21 (30)	3 (38)	2 (33)
	III	-	4 (5)	5 (7)	1 (12)	-

Values are n (%) of sequence from each location that belong to major HCV subtype 1a, 1b and 3a Brazilian lineages identified in the maximum-likelihood phylogenetic analysis. AP, Amapá; GO, Goiás; MS, Mato Grosso do Sul; RJ, Rio de Janeiro; RO, Rondônia; RS, Rio Grande do Sul; SP, São Paulo.

Figure 3. Maximum likelihood phylogeny of uncommon Brazilian HCV strains of genotype 2, genotype 4 and subtype 5a



A close view of the sub-tree corresponding to each HCV genotype/subtype is shown. The colours of external branches represent the geographic region from where the HCV strains were sampled, according to the legend given in each figure. Approximate likelihood-ratio test (*aLRT*) support values are indicated only at key nodes. The scale bar is in units of nucleotide substitutions per site. GO, Goiás; MS, Mato Grosso do Sul; MT, Mato Grosso; RJ, Rio de Janeiro; RO, Rondônia; RS, Rio Grande do Sul; SP, São Paulo.

circulation of clade 1 HCV sequences of ‘non-Brazilian’ origin in RS was higher (30%) than in any other Brazilian state (<15%). Interestingly, HCV subtype 1a strains from other Latin American countries were more evenly distributed among clades 1 and 2 sequences from USA and Europe, and only a few clade 1 strains from other countries of Latin America grouped within Brazilian monophyletic clades. This demonstrates that the pattern of dispersion of HCV subtype 1a in Brazil was unique and different from the other Latin American countries. Despite the fact that some Brazilian samples were located basally to clade 1, the geographical and temporal origin of this clade remains unknown and warranted further investigation.

The segregation of most Brazilian HCV NS5B subtype 1a sequences in a distinct and strongly supported monophyletic group within clade 1 has been also recently reported in a phylogenetic analysis of the entire NS3 region with strains from the state of Rio de Janeiro [35]. Of note was the observation that 93.8% of the Brazilian subclade 1 sequences present the glutamine (Q) amino acid residue at position 80, whereas 60% of non-Brazilian sequences of that clade exhibited a lysine (K). 80K has been reported to exhibit reduced susceptibility to macrocyclic inhibitors (MK-7009, ITMN-191 and TMC-435) [36,37]. Recently, in a clinical Phase IIb trial with TMC435, Lenz *et al.* [38] found that the sustained virological response rates were significantly higher in patients infected with HCV subtype 1a containing the Q80K polymorphism at baseline. These results show that information regarding sequence variations among HCV genotypes, subtypes and even clades within subtypes may be important for therapeutic approaches using new antiviral drugs.

Brazilian strains of HCV subtypes 1b and 3a were dispersed in many monophyletic lineages interlaced with those of other countries, suggesting multiple introductions of both HCV subtypes in Brazil. Some major Brazilian clades composed of ≥ 10 sequences were identified within each HCV subtype that together comprised 75% and 63% of subtype 1b and 3a sequences included here, respectively. Analysis of strain composition of major Brazilian lineages provided evidence that HCV subtype 1b strains exhibit some level of genetic isolation by geographic origin, whereas HCV subtype 3a strains display a more random phylogenetic mixing by sampling location, fully consistent with our previous findings [22]. It is important to note, however, that some major Brazilian subtype 1b and 3a clusters displayed only a moderate support ($0.75 < aLRT < 0.90$), indicating that partial NS5B gene sequences may not be informative enough to resolve all within-subtype relationships. Thus, the statistical support of Brazilian HCV subtype 1b and 3a clusters here identified should be confirmed in the future by increasing the length of

the NS5B gene sequences analysed or by concatenating different partial gene fragments.

The results presented here demonstrate that HCV subtypes 2a, 2b, 4a, 4b and 5a were also introduced into the country, as well as a divergent HCV genotype 2 lineage that branched between clades 2c, 2i and 2j. Sequencing of larger fragments or full-length genomes is necessary to undoubtedly classify these two HCV Brazilian strains as recombinant viruses or as a new subtype within genotype 2. Of note, all minor HCV genotypes here analysed established autochthonous transmission networks. Most networks seem to be restricted to a few individuals from the same state, with exception of subtype 2b lineage that was disseminated throughout the different regions here studied. Analysis of a larger number of samples for these ‘rare’ HCV subtypes will be necessary to obtain a more detailed knowledge of their transmission dynamics in Brazil.

In summary, in this study we show evidence of complex HCV genotype and subtype dissemination dynamics in Brazil, as expected in a country with continental proportions. Although subtype 1a appeared to be robustly widespread from a single entry event, subtypes 1b and 3a showed evidence of multiple small introductions in definite regions of the country. This study further suggests that viral transmission between different Brazilian regions seems to be more frequent for HCV subtypes 1a and 3a than for subtype 1b and demonstrates the existence of multiple introductions and autochthonous transmission of genotypes 2, 4 and 5 in Brazil. With the increasing evidence of distinct phenotypes of HCV genotypes, subtypes and intra-subtype clades with respect to response to treatment and drug resistance, a continuous surveillance of HCV genetic diversity in a large country such as Brazil is relevant.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the ‘Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico’ (CNPq) the ‘Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior’ (CAPES) the ‘Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro’ (FAPERJ) and ‘Programa de Excelência em Pesquisa – PROEP/FIOCRUZ’. The authors wish also to thank ‘Plataforma Genômica de Sequenciamento de DNA/PDTIS-FIOCRUZ’ for DNA sequencing.

Disclosure statement

The authors declare no competing interests.

References

1. Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect* 2011; **17**:107–115.

2. Simmonds P, Bukh J, Combet C, *et al.* Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005; **42**:962–973.
3. Pickett BE, Striker R, Lefkowitz EJ. Evidence for separation of HCV subtype 1a into two distinct clades. *J Viral Hepat* 2011; **18**:608–618.
4. Hauri AM, Armstrong GL, Hutin YJ. The global burden of disease attributable to contaminated injections given in health care settings. *Int J STD AIDS* 2004; **15**:7–16.
5. Tanaka Y, Hanada K, Orito E, *et al.* Molecular evolutionary analyses implicate injection treatment for schistosomiasis in the initial hepatitis C epidemics in Japan. *J Hepatol* 2005; **42**:47–53.
6. Pybus OG, Cochrane A, Holmes EC, Simmonds P. The hepatitis C virus epidemic among injecting drug users. *Infect Genet Evol* 2005; **5**:131–139.
7. Brazil Health Ministry. Department of STDs, AIDS and viral hepatitis, Brasil. [Viral hepatitis in numbers]. Portuguese. (Accessed 15 April 2013.) Available from <http://www.aids.gov.br/pagina/hepatites-virais-em-numeros>
8. Zarife MA, Silva LK, Silva MB, *et al.* Prevalence of hepatitis C virus infection in north-eastern Brazil: a population-based study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; **100**:663–668.
9. Stuyver L, Rossau R, Wyseur A, *et al.* Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J Gen Virol* 1993; **74**:1093–1102.
10. Holland PV, Barrera JM, Ercilla MG, *et al.* Genotyping hepatitis C virus isolates from Spain, Brazil, China, and Macau by a simplified PCR method. *J Clin Microbiol* 1996; **34**:2372–2378.
11. Martins RM, Vanderborcht BO, Yoshida CF. Hepatitis C virus genotypes among blood donors from different regions of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; **93**:299–300.
12. Oliveira ML, Bastos FI, Sabino RR, *et al.* Distribution of HCV genotypes among different exposure categories in Brazil. *Braz J Med Biol Res* 1999; **32**:279–282.
13. Silva LK, Parana R, Souza SP, *et al.* Hepatitis C virus genotypes in a northeastern area of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2000; **62**:257–260.
14. Pereira LM, Spinelli V, Ximenes RA, *et al.* Chronic hepatitis C infection: influence of the viral load, genotypes, and GBV-C/HGV coinfection on the severity of the disease in a Brazilian population. *J Med Virol* 2002; **67**:27–32.
15. Perez RM, Ferraz ML, Figueiredo MS, *et al.* Unexpected distribution of hepatitis C virus genotypes in patients on hemodialysis and kidney transplant recipients. *J Med Virol* 2003; **69**:489–494.
16. Campiotto S, Pinho JR, Carrilho FJ, *et al.* Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2005; **38**:41–49.
17. Martins RM, Teles SA, Freitas NR, *et al.* Distribution of hepatitis C virus genotypes among blood donors from mid-west region of Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2006; **48**:53–55.
18. Carneiro MA, Teles SA, Lampe E, *et al.* Molecular and epidemiological study on nosocomial transmission of HCV in hemodialysis patients in Brazil. *J Med Virol* 2007; **79**:1325–1333.
19. Freitas SZ, da Cunha RV, Martins RM, Teles SA, Ibanhes ML, Motta-Castro AR. Prevalence, genotypes and risk factors associated with hepatitis C virus infection in hemodialysis patients in Campo Grande, MS, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; **103**:405–408.
20. Lopes CL, Teles SA, Espirito-Santo MP, *et al.* Prevalence, risk factors and genotypes of hepatitis C virus infection among drug users, central-western Brazil. *Rev Saude Publica* 2009; **43** Suppl 1:43–50.
21. Oliveira ML, Yoshida CF, Telles PR, *et al.* Trends in HCV prevalence, risk factors and distribution of viral genotypes in injecting drug users: findings from two cross-sectional studies. *Epidemiol Infect* 2009; **137**:970–979.
22. Lampe E, Espirito-Santo MP, Martins RM, Bello G. Epidemic history of hepatitis C virus in Brazil. *Infect Genet Evol* 2010; **10**:886–895.
23. Romano CM, de Carvalho-Mello IM, Jamal LF, *et al.* Social networks shape the transmission dynamics of hepatitis C virus. *PLoS ONE* 2010; **5**:e11170.
24. Peres-da-Silva A, Almeida AJ, Lampe E. Genetic diversity of NS3 protease from Brazilian HCV isolates and possible implications for therapy with direct-acting antiviral drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; **107**:254–261.
25. Oliveira ML, Bastos FI, Telles PR, *et al.* Epidemiological and genetic analyses of hepatitis C virus transmission among young/short- and long-term injecting drug users from Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Virol* 2009; **44**:200–206.
26. Vieira DS, Alvarado-Mora MV, Botelho L, Carrilho FJ, Pinho JR, Salcedo JM. Distribution of hepatitis C virus (HCV) genotypes in patients with chronic infection from Rondonia, Brazil. *Virol J* 2011; **8**:165.
27. Ribeiro LC, Souto FJ, do Espírito-Santo MP, G-Oliveira R, Lampe E. An autochthonous case of hepatitis C virus genotype 5a in Brazil: phylogenetic analysis. *Arch Virol* 2009; **154**:665–670.
28. Kuiken C, Yusim K, Boykin L, Richardson R. The Los Alamos hepatitis C sequence database. *Bioinformatics* 2005; **21**:379–384.
29. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997; **25**:4876–4882.
30. Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 2003; **52**:696–704.
31. Guindon S, Lethiec F, Duroux P, Gascuel O. PHYML Online – a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res* 2005; **33**:W557–W559.
32. Rodríguez F, Oliver JL, Marin A, Medina JR. The general stochastic model of nucleotide substitution. *J Theor Biol* 1990; **142**:485–501.
33. Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 2008; **25**:1253–1256.
34. Anisimova M, Gascuel O. Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. *Syst Biol* 2006; **55**:539–552.
35. Peres-da-Silva A, Almeida AJ, Lampe E. Genetic diversity of NS3 protease from Brazilian HCV isolates and possible implications for therapy with direct-acting antiviral drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; **107**:254–261.
36. Bae A, Sun SC, Qi X, *et al.* Susceptibility of treatment-naïve hepatitis C virus (HCV) clinical isolates to HCV protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**:5288–5297.
37. Halfon P, Locarnini S. Hepatitis C virus resistance to protease inhibitors. *J Hepatol* 2011; **55**:192–206.
38. Lenz O, Fevery B, Vijgen J, *et al.* TMC435 in patients infected with HCV genotype 1 who have failed previous pegylated interferon/ribavirin treatment: virologic analyses of the ASPIRE trial. *J Hepatol* 2012; **56** Suppl 2:S5.