

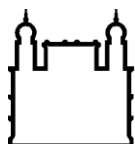
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação Medicina Tropical

**MUTAÇÕES NA REGIÃO NS3 DO GENOMA DO VÍRUS DA HEPATITE C  
ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA AOS INIBIDORES DE PROTEASE**

**VANESSA DUARTE DA COSTA**

Rio de Janeiro  
Março de 2016



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

***VANESSA DUARTE DA COSTA***

Mutações na região NS3 do genoma do vírus da hepatite C associadas à resistência aos inibidores de protease

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical

**Orientador (es):** Dr<sup>a</sup> Elisabeth Lampe

**RIO DE JANEIRO**  
Março de 2016

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

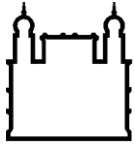
C837 Costa, Vanessa Duarte da

Mutações na região NS3 do genoma do vírus da hepatite C associadas à resistência aos inibidores de protease / Vanessa Duarte da Costa. – Rio de Janeiro, 2016.  
xvii, 90 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2016.  
Bibliografia: f. 71-90

1. Hepatite. 2. Mutação de resistência. 3. Inibidores de protease. I.  
Título.

CDD 616.3623



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

***AUTORA: VANESSA DUARTE DA COSTA***

**MUTAÇÕES NA REGIÃO NS3 DO GENOMA DO VÍRUS DA HEPATITE C  
ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA AOS INIBIDORES DE PROTEASE**

**ORIENTADOR (ES): Dr<sup>a</sup> Elisabeth Lampe**

**Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr<sup>a</sup>.** Natalia Motta de Araújo - Presidente (Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz)

**Prof. Dr.** Christian Maurice Gabriel Niel (Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz)

**Prof. Dr<sup>a</sup>.** Luísa Hoffmann (Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ)

**Prof. Dr<sup>a</sup>.** Vanessa Salete de Paula (Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz)

**Prof. Dr<sup>a</sup>.** Patrícia Alvarez da Silva Baptista (Biomanguinhos – Fiocruz)

Rio de Janeiro, 10 de Março de 2016.

## DEDICATÓRIA

*À Deus e à minha religião, cuja fé me ajuda a sempre seguir em frente e enfrentar todos os obstáculos com força e dignidade;*

*Aos meus pais, Rosane e José, pelo apoio, paciência e ensinamentos incondicionais durante minha caminhada pessoal e profissional;*

*À minha família, cujo apoio me ajuda a superar desafios;*

*Ao meu companheiro Robson por todos os momentos em que eu precisava de alguém ao meu lado.*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup>. Elisabeth Lampe, pela oportunidade de crescer profissionalmente e permitir que este trabalho fosse realizado;

À Dr<sup>a</sup>. Nathália Motta Delvaux Ramos, pela paciência e dedicação em me ajudar;

À Islene e Selma por serem sempre tão gentis comigo;

À Dr<sup>a</sup>. Lia Lewis, Dr<sup>a</sup> Luciana e Paulo do Ambulatório de Hepatites Virais por todo o apoio;

Ao Dr. Carlos Eduardo Brandão;

À equipe do Laboratório de Hepatites Virais, em especial Dr<sup>a</sup> Márcia Paschoal, Dr. Adilson José, Vanessa Alves, Maristella Matos, Moyra Portilho, Allan Peres e Lucy Dalva, pelo apoio e conselhos durante todas as etapas do projeto;

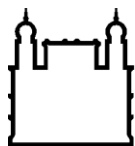
À minha turma da Medicina Tropical, que diante das dificuldades, sempre se mostrou unida e capaz de superar qualquer desafio;

Aos amigos queridos, que em todos os momentos, estiveram ao meu lado. Os conselhos vindos de vocês são preciosos e me ajudaram nos momentos em que eu mais precisava;

Ao CNPq, pelo apoio financeiro durante a realização deste projeto.

“No meio da confusão, encontre a simplicidade.  
A partir da discórdia, encontre a harmonia.  
No meio da dificuldade reside a oportunidade.”

Albert Einstein



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### MUTAÇÕES NA REGIÃO NS3 DO GENOMA DO VÍRUS DA HEPATITE C ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA AOS NOVOS ANTIVIRAIS

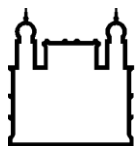
#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Vanessa Duarte da Costa

Introdução: Um dos fatores limitantes da eficácia da terapia antiviral no tratamento da infecção pelo vírus da Hepatite C (HCV) com o uso de inibidores de protease (IP) é o surgimento de resistência causada por mutações pontuais. Objetivo: Analisar a prevalência de mutações na região da serino-protease da NS3 associadas à resistência aos IP em pacientes infectados pelos subtipos 1a e 1b do HCV. Métodos: Extração de RNA viral, reação de PCR com *primers* específicos para cada subtipo e purificação seguida pela reação de sequenciamento nucleotídico foram realizadas. As sequências obtidas abrangendo os nucleotídeos 3466-3961 do genoma do HCV foram editadas no programa MEGA 6.0. As substituições observadas nas posições de aminoácidos associadas à resistência aos IP foram relacionadas após submissão ao site geno2pheno. Resultados: Um total de 65 amostras (Subtipo 1a: n=47; Subtipo 1b: n=18) de pacientes não-respondedores ao tratamento prévio por terapia dupla IFN/RBV (n=8) ou terapia tripla com IP boceprevir ou telaprevir (n=15) e virgens de tratamento (n=42) foram sequenciadas. As mutações V36M/L e R155K foram observadas apenas no subtipo 1a, em 33,3% e 4,7% respectivamente, dos pacientes não-respondedores à terapia dupla/tripla. Em pacientes virgens de tratamento, a mutação V36M foi observada em uma (3,8%) sequência do subtipo 1a e a T54S em uma (6,25%) do subtipo 1b. A mutação Q80K associada à resistência ao Simeprevir não foi observada em nenhuma sequência do subtipo 1a neste estudo, porém foi detectada pela primeira vez no Brasil em uma sequência do subtipo 1b de paciente virgem de tratamento. Conclusão: Os dados desse trabalho destacam que os isolados brasileiros do HCV apresentam um padrão distinto de polimorfismos associados à resistência ao simeprevir em comparação a outros países, evidenciando que não há necessidade de incorporação de testes de resistência pré-tratamento para pacientes infectados por subtipos 1a e 1b do HCV.





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **MUTATIONS IN THE NS3 REGION OF THE HEPATITIS C VIRUS ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO NEW ANTIVIRALS**

#### **ABSTRACT**

#### **MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL**

**Vanessa Duarte da Costa**

Introduction: One of the limiting factors of the effectiveness of the antiviral therapy of hepatitis C virus (HCV) infection with the use of protease inhibitors (PI) is the emergence of resistance due to point mutations. Aim: To analyze the prevalence of mutations in the HCV NS3 serine protease associated with PI resistance in patients infected with subtypes 1a and 1b of HCV. Methods: Viral RNA extraction, PCR reactions with specific primers for each subtype and purification followed by nucleotide sequencing reaction were performed. The obtained sequences covering nucleotides 3466-3961 of the HCV genome were analyzed by MEGA 6.0 program. The substitutions observed in the amino acid positions associated with PI resistance were related after submission to the site geno2pheno. Results: A total of 65 samples (subtype 1a: n=47; subtype 1b: n=18) of non-responding patients to previous treatment by dual therapy IFN/RBV (n=8) or triple therapy with PI boceprevir or telaprevir (n=15) and treatment-naïve patients (n=42) were sequenced. V36M/L and R155K mutations were observed only in the subtype 1a, in 33.3% and 4.7%, respectively, of non-responders to double/triple therapy. In treatment-naive patients, V36M mutation was observed in one (3.8%) sequence of subtype 1a and T54S in one (6.25%) of subtype 1b. The Q80K mutation associated with resistance to simeprevir was not observed in any sequence subtype 1a in this study, but was for the first time detected in Brazil in a subtype 1b sequence of a treatment-naive patient. Conclusion: Data from this study point out that the Brazilian isolates of HCV have a distinct pattern of polymorphisms associated with resistance to simeprevir in comparison to other countries, showing that there is no need to incorporate pretreatment resistance tests for infected patients with subtypes 1a and 1b of HCV.

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>IX</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 Histórico da hepatite C	1
1.2 Epidemiologia	2
1.3 Estrutura e organização genômica do HCV	3
1.3.1 Proteínas estruturais do HCV	5
1.3.2 Proteínas não-estruturais do HCV	6
1.4 Variabilidade genética e distribuição geográfica do HCV	9
1.5 Replicação do HCV	10
1.6 Manifestações clínicas da infecção por HCV	12
1.7 Abordagem diagnóstica da hepatite C	14
1.7.1 Testes sorológicos (detecção da infecção pelo HCV)	14
1.7.2 Detecção do RNA viral	15
1.7.3 Detecção do antígeno <i>core</i>	16
1.7.4 Genotipagem do HCV	16
1.8 Abordagem terapêutica da hepatite C	17
1.8.1 Fatores preditivos de resposta ao tratamento	18
1.8.2 Evolução do tratamento da hepatite C crônica	19
1.8.3 Simeprevir	24
1.8.4 Mutações de resistência	26
1.9 Justificativa	28
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
Objetivo geral	31
Objetivos específicos	31
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>32</b>
3.1 População do estudo	32
3.1.1 Critérios de inclusão	32
3.1.2 Critérios de exclusão	32
3.1.3 Considerações éticas	32
3.1.4 Perfil dos pacientes	33
3.2 Extração do RNA viral	34
3.3 Transcrição reversa e amplificação do ácido nucléico	35
3.4 RT-PCR	36
3.5 <i>Nested</i> -PCR	37
3.6 Análise dos produtos amplificados	38
3.7 Purificação e quantificação dos produtos da PCR	38
3.8 Reação de sequenciamento	39
3.9 Alinhamento de sequências	41
3.10 Identificação de mutações associadas com resistência antiviral	41
3.11 Alinhamento das sequências em logo	42

<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	43
4.1	Análise das mutações de resistência associadas aos inibidores de protease	43
4.2	Mutações de resistência associadas aos inibidores de protease em pacientes infectados com o subtipo 1a	45
4.2.1	Mutações de resistência associadas aos inibidores de protease em pacientes não-respondedores à terapia dupla com PEG-IFN e RBV infectados com o subtipo 1a	45
4.2.2	Mutações de resistência associadas aos inibidores de protease em pacientes não-respondedores à terapia tripla com telaprevir/boceprevir, PEG-IFN e RBV infectados com o subtipo 1a	46
4.2.3	Mutações de resistência associadas aos inibidores de protease em pacientes virgens de tratamento infectados com o subtipo 1a	49
4.3	Mutações de resistência associadas aos inibidores de protease em pacientes infectados com o subtipo 1b	50
4.3.1	Mutações de resistência associadas aos inibidores de protease em pacientes não-respondedores à terapia dupla com PEG-IFN e RBV infectados com o subtipo 1b	52
4.3.2	Mutações de resistência associadas aos inibidores de protease em pacientes não-respondedores à terapia tripla com telaprevir/boceprevir, PEG-IFN e RBV infectados com o subtipo 1b	53
4.3.3	Mutações de resistência associadas aos inibidores de protease em pacientes virgens de tratamento infectados com o subtipo 1b	53
4.4	Alinhamento das sequências em logo	56
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	59
<b>6</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	69
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	70
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	71
<b>9</b>	<b>ANEXOS</b>	91
	Anexo 1	91
	Anexo 2	93

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Organização estrutural do HCV	4
Figura 1.2: Organização genômica do HCV com destaque em azul para a região estrutural e em vermelho para a região não-estrutural	5
Figura 1.3: Ciclo replicativo do HCV destacando as seguintes etapas (1) Interação entre o vírus e os receptores de membrana celular com internalização do vírus, (2) Endocitose, (3) Desnudamento e liberação citoplasmática, (4) Tradução mediada por IRES e processamento do precursor da poliproteína, (5) Processamento da poliproteína com a clivagem das proteínas não-estruturais, (6) Formação do complexo de replicação, (7, 8 e 9) Replicação do RNA, (10) Empacotamento e montagem, (11) Maturação do vírion nas vesículas de transporte e (12) Liberação do vírion	12
Figura 1.4: Características basais que influenciam a RVS	19
Figura 1.5: Associação entre DAAs e proteínas não-estruturais que representam alvos de inibição do ciclo reprodutivo do HCV	20
Figura 1.6: Esquema terapêutico com Telaprevir em pacientes infectados com HCV genótipo 1	21
Figura 1.7: Esquema terapêutico com Boceprevir em pacientes infectados com HCV genótipo 1	22
Figura 1.8: Medicamentos coadministrados e duração do tratamento recomendados para o tratamento associado ao OLYSIO™	25
Figura 3.1: Representação esquemática da região sequenciada em relação à cepa padrão H77 do subtipo 1a no genoma do HCV	41
Figura 4.1: Resultado da mutação na posição 36 (V36L) e sua relação com os inibidores de protease após submissão de sequência deste estudo ao site geno2pheno	46
Figura 4.3: Resultado das mutações nas posições 36 e 155 e sua relação com os inibidores de protease após submissão de sequência deste estudo ao site geno2pheno	48
Figura 4.4: Resultado da mutação na posição 174 e sua relação com os	50

inibidores de protease após submissão de sequência deste estudo ao site  
geno2pheno

Figura 4.5: Resultado das mutações nas posições 43 e 170 e sua relação com os inibidores de protease após submissão de sequência deste estudo ao site geno2pheno 52

Figura 4.6: Resultado da mutação na posição 54 e sua relação com os inibidores de protease após submissão de sequência deste estudo ao site geno2pheno 55

Figura 4.7: Resultado da mutação na posição 80 (Q80H) e sua relação com os inibidores de protease após submissão de sequência deste estudo ao site geno2pheno 55

Figura 4.8: Resultado da mutação na posição 80 (Q80K) e sua relação com os inibidores de protease após submissão de sequência deste estudo ao site geno2pheno 56

Figura 4.9: Representação gráfica dos aminoácidos obtida através de análise no programa WebLogo (subtipo 1a) 57

Figura 4.10: Representação gráfica dos aminoácidos obtida através de análise no programa WebLogo (subtipo 1b) 58

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1.1: Relação entre mutações de resistência e inibidores de protease do HCV	28
Quadro 3.1: Reagentes da RT-PCR para os subtipos 1a e 1b	36
Quadro 3.2: Reagentes da <i>nested</i> -PCR para os subtipos 1a e 1b	37
Quadro 3.3: Reagentes da reação de seqüenciamento para os subtipos 1a e 1b	40
Quadro 4.1: Mutações identificadas em pacientes não-respondedores (terapia dupla e terapia tripla) e pacientes virgens de tratamento infectados com o subtipo 1a do HCV	44
Quadro 4.2: Mutações associadas à resistência e possível resistência aos IP de primeira geração (boceprevir e telaprevir) e de segunda geração (simeprevir) observadas em pacientes não-respondedores à terapia dupla infectados com o subtipo 1a	45
Quadro 4.3: Mutações associadas à resistência e possível resistência aos IP de primeira geração (boceprevir e telaprevir) e de segunda geração (simeprevir) observadas em pacientes não-respondedores à terapia tripla infectados com o subtipo 1a	47
Quadro 4.4: Mutações associadas à resistência e possível resistência aos IP de primeira geração (boceprevir e telaprevir) e segunda geração (simeprevir) observadas em pacientes virgens de tratamento infectados com o subtipo 1a	49
Quadro 4.5: Mutações identificadas em pacientes não-respondedores (terapia dupla e terapia tripla) e pacientes virgens de tratamento infectados com o subtipo 1b do HCV	51
Quadro 4.6: Mutações associadas à resistência e possível resistência aos IP de primeira geração (boceprevir e telaprevir) e de segunda geração (simeprevir) observadas em pacientes não-respondedores à terapia dupla infectados com o subtipo 1b	52

Quadro 4.7: Mutações associadas à resistência e possível resistência aos IP de primeira geração (boceprevir e telaprevir) e segunda geração (simeprevir) observadas em pacientes virgens de tratamento infectados com o subtipo 1b	54
Tabela 1.1: Antivirais de ação direta para uso clínico e em desenvolvimento	20
Tabela 1.2: Indicações para tratamento imediato com os novos antivirais de ação direta	23
Tabela 1.3: Esquema terapêutico relacionado a cada genótipo do HCV	24
Tabela 3.1: Perfil dos pacientes e número de amostras	33
Tabela 3.2: Oligonucleotídeos utilizados para o estudo da região NS3	36

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

G	Glicina
A	Alanina
L	Leucina
V	Valina
I	Isoleucina
P	Prolina
F	Fenilalanina
S	Serina
T	Treonina
C	Cisteína
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
Anti-HCV	Anticorpo contra o vírus da hepatite C
ALT	Alanina aminotransferase
CD81	<i>Cluster of Differentiation 81</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	DNA complementar
CHC	Carcinoma Hepatocelular
DAA	<i>Direct-acting antiviral agents</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
E1	Glicoproteína do envelope 1
E2	Glicoproteína do envelope 2
EMA	European Medicines Agency



EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da USP
HAV	Vírus da hepatite A
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HRV1	Região hipervariável 1
HRV2	Região hipervariável 2
IFN	Interferon
IL28B	Gene interleucina 28 B humana
IRES	Sítio interno de entrada ribossomal
ISDR	<i>IFN-sensitive determining region</i> (Região determinante de sensibilidade ao interferon)
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLR	Receptor da Lipoproteína de baixa densidade
LiPA	<i>Line Probe Assay</i>
mRNA	RNA mensageiro
MS	Ministério da Saúde
NANB	hepatite não-A não-B
NAT	Amplificação de Ácidos Nucléicos
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
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	<i>Open reading frame</i> (Fase de leitura aberta)
P7	Proteína P7
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG-IFN	Interferon peguilado
PTI	Púrpura trombocitopênica idiopática
RBV	Ribavirina

RFLP	Polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase após síntese de DNA complementar por transcrição reversa
RVS	Resposta Viroológica Sustentada
RVR	Resposta Viroológica Rápida
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polimorfismo de nucleotídeo único)
SR-BI	<i>Scavenger receptor class B type I</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TMA	Amplificação mediada por transcrição
UTR	<i>Untranslated region</i> (Região não traduzida)
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de muito baixa densidade)

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Histórico da hepatite C

Muitos anos foram percorridos desde a caracterização da hepatite não-A não-B, em 1975, até a descoberta do vírus da hepatite C (HCV), em 1989, por Choo *et al.* Até a década de 1980, cerca de 10% de todos os pacientes que recebiam transfusão de sangue e derivados nos Estados Unidos apresentavam hepatite pós-transfusional, ocasionando cerca de 15.000 novos casos de hepatite secundária à transfusão. Com o desenvolvimento de novas técnicas para a detecção do antígeno de superfície do vírus da Hepatite B (então denominado antígeno Austrália) ficou claro que o mesmo era responsável por menos de 25% desses casos. Os testes sorológicos mostraram que a transmissão do vírus da hepatite A (HAV) raramente ocorria através do sangue. Por essa razão, foi introduzido o termo hepatite não-A não-B (NANB) para a designação desses casos (Feinstone *et al.*, 1975).

Em 1989, um grupo composto por Choo *et al.* elucidou a natureza do vírus responsável pela hepatite NANB pós-transfusional. A metodologia utilizada no novo agente foi inédita. A partir do soro de chimpanzés infectados com sangue de pacientes com hepatite NANB, os autores isolaram todo o ácido nucléico e, a partir desse *pool*, obtiveram uma biblioteca de fragmentos de DNA complementar usando transcriptase reversa com iniciadores randômicos. Esse processo deu origem a cerca de 6 milhões de sequências complementares aos ácidos nucléicos encontrados no soro infeccioso. As sequências foram inseridas em fagos vetores e expressos em *Escherichia coli*. Cada polipeptídeo resultante foi testado contra soros de pacientes com hepatite NANB crônica para detectar reatividade com anticorpos séricos. Após cerca de um milhão de testes terem sido realizados foi identificada uma amostra que reagia com anticorpos dos soros infectados, mas não reagia com os soros-controle (não infectados). O fragmento de DNA complementar que foi usado para dar origem a esse polipeptídeo foi então, usado como sonda de hibridização para extrair o ácido nucléico original a partir do qual o fragmento havia sido gerado. Dessa maneira, o genoma completo do agente suspeito foi identificado. Foi encontrado RNA de fita simples com cerca de 10.000 nucleotídeos de comprimento. Esse agente foi denominado de vírus da Hepatite C (HCV).

## **1.2 Epidemiologia**

As hepatites virais constituem uma das maiores causas de transplantes hepáticos no mundo, com destaque para a hepatite C (CDC, 2014). As estimativas mais recentes da hepatite C revelam que nos últimos 15 anos ocorreu um aumento na soroprevalência para 2,8%, o que equivale a mais de 185 milhões de infectados mundialmente (Mohd Hanafiah *et al.*, 2013).

A hepatite C apresenta elevado impacto na saúde pública global, cuja agressão hepatocelular causada pelo HCV leva a fibrose hepática, cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC). Nas fases avançadas, pode levar ao óbito (Mandell *et al.*, 2010). Estima-se que entre 60% e 70% dos portadores da infecção por HCV desenvolverão doença hepática crônica, necessitando de assistência à saúde especializada e de alta complexidade. Adicionalmente, estima-se que a hepatite C seja responsável por aproximadamente 350.000 mortes por ano (CDC, 2014).

A prevalência da infecção pelo HCV em uma população somente pode ser estimada por estudos sorológicos, porque muitos dos que apresentam viremia persistente não manifestam sintomas clínicos. Embora o HCV seja endêmico no mundo, existe um grau de variabilidade na taxa de prevalência em sua distribuição geográfica. Países com as maiores taxas de prevalência descritas estão localizados na Ásia e na África, ao contrário de países da América do Norte e região Norte e Ocidental da Europa que apresentam as menores prevalências (Araújo e Barone, 2010). A incidência é maior em comunidades de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, chegando a aproximadamente 4 a 6% em alguns grupos populacionais de regiões da África e do Oriente Médio, e até 18,1% no Egito (Frank *et al.*, 2000). Nos Estados Unidos, na Europa e no Japão, a prevalência atinge médias entre 1 a 2% da população geral (Perz *et al.*, 2004).

No Brasil, dados do inquérito soroepidemiológico de base populacional, iniciado em 2004, mostram prevalência de anti-HCV entre 0,94 e 1,89% na faixa etária compreendida entre 10 e 69 anos (MS, 2009). Neste estudo de prevalência de base populacional, realizado nas capitais brasileiras, as seguintes prevalências de anti-HCV foram encontradas: 2,1% na Região Norte, 0,7% no Nordeste, 1,3% no Centro-Oeste, 1,3% no Sudeste; 1,2% na Região Sul e 0,8% no Distrito Federal. Os fatores de risco mais relevantes encontrados na população de 13 a 69 anos foram o uso de drogas injetáveis e o uso de droga inalada (MS, 2010). Segundo a análise da

série histórica brasileira realizada pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), estima-se que existam no Brasil entre 1,4 e 1,7 milhões de portadores de hepatite C – número significativamente inferior às estimativas da Organização Mundial da Saúde (Lavanchy D, 2009; Lavanchy D, 2011). Grande parte dos portadores de hepatite C desconhece o diagnóstico e o tratamento da doença, assim como muitos ignoram como ocorreu a transmissão. No Brasil, aproximadamente 10.000 casos são notificados a cada ano (DATASUS, 2014). Atualmente 86% dos casos notificados de hepatite C concentram-se nas regiões Sul e Sudeste (DATASUS, 2014).

A transmissão do HCV ocorre principalmente por via sanguínea através da exposição ao sangue contaminado: transfusão de sangue não triado para HCV, receptores de derivados do plasma - raro atualmente, transplante de órgãos, exposição percutânea (tatuagem, lesões provocadas por instrumentos perfurocortantes: agulhas, bisturi, etc), e compartilhamento de instrumentos utilizados para injeção de drogas ilícitas. A transmissão nosocomial pode ocorrer em trabalhadores da área da saúde e unidades de hemodiálise. Além disso, também deve ser considerada a transmissão parenteral decorrente de procedimentos dentários, acupuntura e procedimentos invasivos e em menor frequência a transmissão vertical e sexual.

### **1.3 Estrutura e organização genômica do HCV**

O HCV é um vírus RNA de fita simples de polaridade positiva, envelopado, pertence ao gênero *Hepacivirus* da família *Flaviviridae*. O diâmetro varia de 42 a 65 nm e seu genoma possui 9,7 kilobases de comprimento (Figura 1.1). Conforme representado na figura 1.2, o genoma viral possui duas pequenas regiões não codificantes em cada extremidade e uma longa fase de leitura aberta (*open reading frame*) que codifica uma poliproteína com cerca de 3000 aminoácidos que, pela ação de proteases virais e celulares é clivada em proteínas estruturais (*core*, E1 e E2) e não-estruturais (P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B), essas últimas responsáveis pela replicação viral (Strauss E, 2001). 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 suscetíveis à infecção natural

(Brass *et al.*, 2007). A grande dificuldade de estudo da hepatite C reside no fato de ser o HCV um patógeno humano, não havendo animal de experimentação de pequeno porte para o estudo de todo o ciclo infeccioso e de imunopatogênese (Bukh J *et al.*, 2012), bem como falta ainda um sistema de cultura de células eficiente para os diferentes genótipos do HCV (Sung *et al.*, 2015).

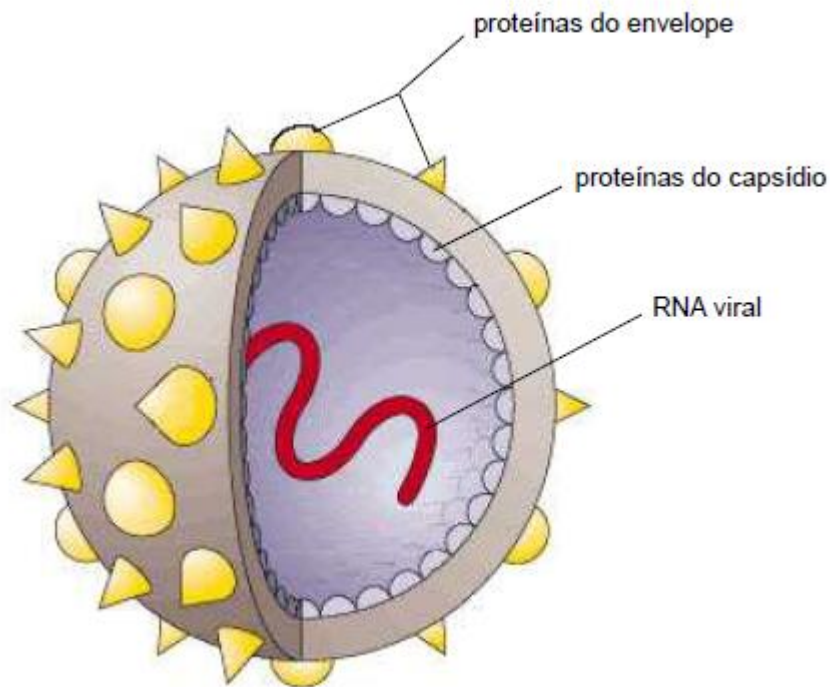


Figura 1.1: Organização estrutural do HCV (Fonte: Strauss E, 2001)

As proteínas não-estruturais são responsáveis pela replicação e empacotamento do genoma viral dentro do capsídeo, o qual é formado pelas proteínas estruturais. Uma das proteínas não-estruturais mais importantes na replicação viral é a proteína NS3 que, no domínio aminoterminal (N-terminal) tem atividade de serino-protease em associação com o cofator NS4A, e na extremidade carboxiterminal (C-terminal) apresenta atividade de NTPase/helicase. Essa serino-protease é responsável pela clivagem das junções das proteínas não-estruturais NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A e NS5A/NS5B, e a NTPase/helicase é responsável pela remodelação do RNA através da hidrólise de ATP, sendo esse processo essencial para a tradução e replicação do genoma do HCV (Kolykhalov *et al.*, 2000).

A região 5' UTR é altamente conservada entre diferentes isolados de HCV e contém um sítio interno para entrada ribossomal (IRES) essencial para a tradução *cap*-independente do RNA viral. Por causa da grande variedade de RNAs celulares que são transcritos por um mecanismo *cap*-dependente, a região 5' UTR do HCV representa um mecanismo interessante para o desenvolvimento de alvos antivirais, além disso, é a região de escolha para o diagnóstico do HCV por técnicas de biologia molecular. Sua estrutura é composta de 4 domínios (I-IV) altamente ordenados. 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).

Já em relação à região 3' UTR, acredita-se que esta seja importante na iniciação da replicação do genoma viral dependendo do genótipo do HCV (Evaldo e Antonio, 2010), além de ser composta por 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).

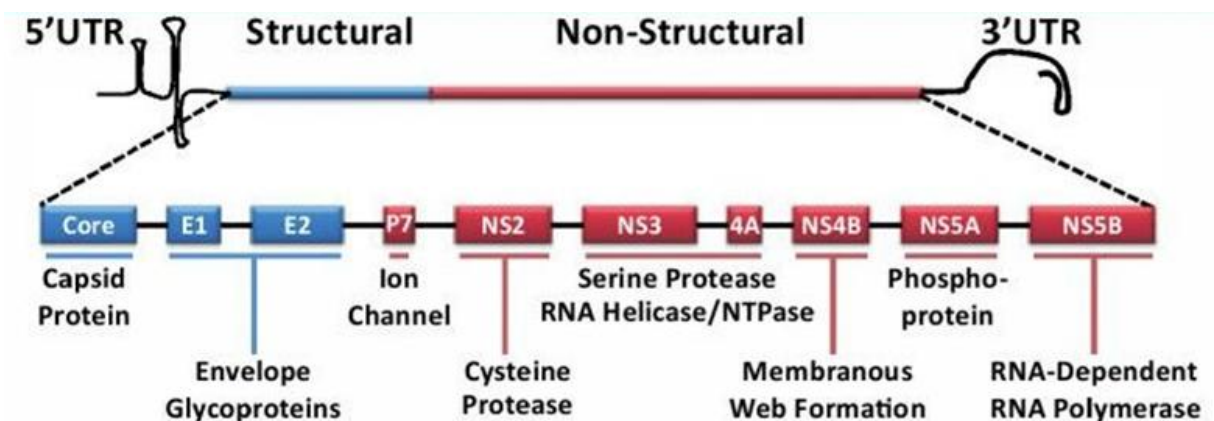


Figura 1.2: Organização genômica do HCV com destaque em azul para a região estrutural e em vermelho para a região não-estrutural (Fonte: <http://www.medscape.com>)

### 1.3.1 Proteínas estruturais do HCV

#### a) Core

A proteína *core*, a primeira a ser produzida durante a síntese da poliproteína, é uma proteína de ligação ao RNA e está envolvida na formação do nucleocapsídeo. É composta de 191 aminoácidos e seu peso molecular é de aproximadamente 21 kDa. Ela é removida da poliproteína por peptidases do hospedeiro que clivam na região C-terminal e liberam a forma imatura desta proteína (Santolini *et al.*, 1994).

Posteriormente, o peptídeo de sinal presente na região C-terminal da proteína *core* é processado por peptidases do hospedeiro resultando na proteína madura (Mclauchlan *et al.*, 2000). O *core* maduro consiste de um domínio hidrofílico maior na porção N-terminal, com muitos resíduos básicos, e um domínio hidrofóbico menor na porção C-terminal.

#### b) Envelope (E1 e E2)

As proteínas de envelope E1 e E2 são glicoproteínas altamente glicosiladas, na qual são liberadas da poliproteína viral por peptidases de sinal do hospedeiro. As proteínas do envelope E1 e E2 apresentam pesos moleculares de aproximadamente 35 kDa e 70 kDa, respectivamente. Essas proteínas são essenciais para a entrada do vírus na célula e para a montagem das partículas infecciosas (Wakita *et al.*, 2005; Bartosch *et al.*, 2006; Cocquerel *et al.*, 2006). Por estarem envolvidas na entrada do vírus na célula constituem importante alvo no desenvolvimento de moléculas antivirais que bloqueiem a entrada do HCV (Helle *et al.*, 2006).

A glicoproteína E2 apresenta na sua extremidade C-terminal, entre as proteínas estruturais e não-estruturais, uma pequena proteína de 63 aminoácidos, da família das viroporinas denominada p7, sendo esta liberada da poliproteína por peptidases do hospedeiro. Já na sua extremidade N-terminal, uma região conhecida como região hipervariável 1 (*Hypervariable region* ou HVR1) de 27 aminoácidos apresenta grande variabilidade tanto na sequência de nucleotídeos como na de aminoácidos. Outra região hipervariável, compreendendo 7 aminoácidos nas posições 91-97, denominada HVR2, também foi descrita, mas sua importância e função não estão bem caracterizadas. Recentes pesquisas mostram que a HVR2 é essencial para a integridade estrutural e para a formação do heterodímero E1E2 (Kato *et al.*, 1992; McCaffrey *et al.*, 2011; Albecka *et al.*, 2011).

### **1.3.2 Proteínas não-estruturais do HCV**

#### a) NS2

A proteína NS2 apresenta 217 aminoácidos e seu domínio N-terminal é composto por três segmentos transmembranares cuja localização é direcionada para o interior do retículo endoplasmático. Com o domínio N-terminal da NS3, forma a autoprotease NS2-NS3 que catalisa a clivagem no local NS2 / NS3 (Hijikata *et al.*,



1993; Grakoui *et al.*, 1993a; Grakoui *et al.*, 1993b). O domínio de protease NS2 é altamente conservado entre os genótipos de HCV. A atividade de protease da NS2 é estimulada pelo domínio serino-protease da NS3, definindo este domínio como um cofator estimulatório para a NS2 (Schregel *et al.*, 2009).

#### b) NS3

A proteína NS3 é uma proteína hidrofílica, apresenta peso molecular de 70 kDa e 217 aminoácidos. Possui atividade de protease, helicase e nucleotidase. Seu domínio N-terminal atua como serino-protease e é responsável pela proteólise de toda a região não-estrutural da poliproteína viral (Bartenschlager *et al.*, 1994). A NS3 forma um complexo não covalente com a NS4A que é um polipeptídeo ancorado na membrana. A NS4A age como um cofator da NS3 e também a estabiliza. Para que a clivagem da poliproteína seja eficiente, é necessária a presença deste cofator, especialmente no sítio NS4B/NS5A, sugerindo que NS3 e NS4A formem um complexo estável (Drazan *et al.*, 2000; Brass *et al.*, 2006).

Na proteína NS3 também foram identificados importantes epítomos associados com a resposta humoral e celular para a resolução da infecção, tornando-se um alvo importante para o desenvolvimento de vacina. A proteína NS3 interage com diversas proteínas virais e pode estar envolvida na hepatocarcinogênese. A proteína NS3 também parece interagir com a proteína quinase A e quinase C, que participam da transdução de sinais intracelulares, e participam do mecanismo patogênico do HCV, principalmente no desenvolvimento de CHC, ao interagir com a proteína p53 (Tellinghuisen *et al.*, 2002).

#### c) NS4

Em adição ao seu papel na ativação e estabilização da protease NS3, a proteína NS4A, de aproximadamente 8 kDa e composta por 54 aminoácidos, também apresenta a função de ancoragem da NS3 na membrana do retículo endoplasmático via o seu domínio hidrofóbico N-terminal. Estudos também demonstram a interação com a NS4B, além da regulação da fosforilação da NS5A (Korth *et al.*, 2000).

A NS4B é uma proteína integral de membrana associada à membrana do retículo endoplasmático. Os domínios N-terminal e C-terminal são orientados para o citoplasma, além da presença de seis segmentos transmembranares. Acredita-se

que a NS4B esteja envolvida no processo de replicação viral via interação com domínios das proteínas virais do envelope.

#### d) NS5

Através da ação conjunta da NS3 e da NS4A, duas proteínas codificadas a partir da região NS5: NS5A e NS5B são liberadas. A NS5A é uma fosfoproteína associada à membrana que pode ser encontrada na forma fosforilada basal de 56 kDa e na forma hiperfosforilada de 58 kDa. A proteína NS5A apresenta-se na forma hiperfosforilada. A proteína é fosforilada em resíduos de serina e treonina, sendo hiperfosforilada na presença de NS4A (Neddermann *et al.*, 1999).

Estudos demonstram que a NS5A está envolvida, diretamente e/ou por interação com proteínas celulares, no processo de replicação viral. Além disso, a hiperfosforilação da NS5A através das proteínas não-estruturais NS3, NS4A e NS4B suportam a hipótese de que a NS5A seja um componente essencial para o complexo de replicação do HCV. A proteína NS5A tem provocado interesse na pesquisa por seu potencial papel na modulação da resposta ao tratamento com Interferon-alfa (Pawlotsky JM, 2000; Katze *et al.*, 2002). Estudos japoneses identificaram uma região da NS5A, denominada região determinante de sensibilidade ao interferon (*IFN-sensitive determining region* ou ISDR) associada com resposta ao IFN (Enomoto *et al.*, 1996). Muitas outras funções têm sido atribuídas recentemente a NS5A, incluindo a ativação da transcrição e o envolvimento na regulação do crescimento celular e vias de sinalização celular. No entanto, o papel da NS5A na patogênese da hepatite C continua a ser estabelecida.

A NS5B foi identificada como a RNA-Polimerase dependente de RNA, e é responsável por ambos os passos de replicação do genoma de HCV que prossegue através da síntese de um RNA de cadeia negativa complementar, usando o genoma como um molde e a síntese subsequente da cadeia positiva de RNA a partir desse molde de RNA de cadeia negativa (Penin F, 2003). Essa enzima não apresenta mecanismos de reparo, o que acarreta uma percentagem muito grande de erros de incorporação de nucleotídeos durante a replicação do RNA, tornando o genoma viral suscetível a inúmeras substituições de nucleotídeos (Forns *et al.*, 1999). Os sítios para a atividade da proteína NS5B possuem especial afinidade de ligação com segmentos de poli U, como aquele presente na extremidade da região 3' UTR do HCV. A existência de um elemento de replicação *cis* no seu domínio C-terminal, em

conjunto com a região 3' UTR, garante a iniciação da replicação do genoma completo a partir de 3' UTR (You *et al.*, 2004).

#### **1.4 Variabilidade genética e distribuição geográfica**

As cepas de HCV são classificadas em sete genótipos reconhecidos (1-7) com base na análise filogenética de sequências de genomas virais completos. Numerados de 1 a 7, os genótipos contêm variantes mais relacionadas, os subtipos, classificados alfabeticamente (1a, 1b, 3a, 3e, etc) (Simmonds *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2007, Smith DB *et al.*, 2014). Em média, os genótipos diferem, no genoma completo, de 30% a 35% com relação aos nucleotídeos enquanto os subtipos diferem de 20% a 25% (Simmonds *et al.*, 1993; Murphy *et al.*, 2007).

Dentro de um mesmo genótipo e subtipo podemos ainda ter variações no genoma do HCV, que são denominadas *quasispecies*. Isso ocorre devido à falta de um processo reparativo da RNA-polimerase dependente de RNA do vírus, com o surgimento de mutações. A maior ou menor diversidade das *quasispecies* parece estar relacionada com a pressão imunológica, já que costuma ser pequena nas fases iniciais da doença, com aminotransferases normais, sendo de alta heterogeneidade nos casos de doença hepática mais avançada e/ou baixa resposta terapêutica.

Já foi estabelecido que alguns subtipos, especificamente 1a, 1b, 2a, 3a, apresentam uma distribuição cosmopolita e são responsáveis por uma grande proporção de infecções por HCV em países de alta renda. Acredita-se que esses subtipos de características epidêmicas migraram rapidamente nas décadas anteriores à descoberta do HCV por meio de sangue infectado, produtos derivados do sangue e uso de drogas injetáveis (Smith *et al.*, 1997; Pybus *et al.*, 2005; Magiorkinis *et al.*, 2009). As cepas referentes aos genótipos 1 e 2 são principalmente encontradas na África Ocidental, do genótipo 3 no sul da Ásia, do genótipo 4 na África Central e no Oriente Médio, do genótipo 5 na África do Sul e do genótipo 6 no Sudeste Asiático (Smith *et al.*, 1997; Simmonds P, 2001; Pybus *et al.*, 2009). Em relação ao genótipo 7, foi isolado no Canadá de quatro imigrantes originários da República Democrática do Congo (Murphy *et al.*, 2007).

No Brasil, foi demonstrada uma maior prevalência do genótipo 1 (64-72%), seguido pelo genótipo 3 (25-30%) e o genótipo 2 (2-5%) (Campiotto *et al.*, 2005).

## 1.5 Replicação do HCV

O processo replicativo se inicia com a entrada do vírion nos hepatócitos, sendo um processo altamente coordenado que envolve diversas moléculas de superfície celular em passos sequenciais.

Uma característica predominante da partícula de HCV é a relação com lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) e de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDLs) (Lindenbach *et al.*, 2013), ou seja, componentes lipoproteicos estão diretamente relacionados com a entrada do HCV na célula hospedeira. Como resultado da associação entre o vírus e as lipoproteínas, o receptor de LDL (LDLR) tem sido proposto como um potencial fator de fixação para o HCV. O processo de entrada nos hepatócitos também requer proteínas do hospedeiro, incluindo dois fatores de ligação glicosaminoglicanos. Outras moléculas de superfície celular têm sido identificadas como possíveis receptores para o HCV nos processos de adsorção, tais como: SR-BI (*scavenger receptor class B type I*), CD81 da família das tetraspaninas, proteínas de junção claudina-1 e ocludina.

Após a adsorção à superfície da célula hospedeira, o vírus interage com co-receptores, o que leva a rearranjos moleculares na membrana plasmática e, subsequentemente, resulta na internalização viral (Figura 1.3). 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). Acredita-se que a liberação do nucleocapsídeo para o citosol ocorra após a fusão da proteína do envelope do HCV à membrana do endossoma. Acredita-se que este processo é desencadeado de uma forma independente do receptor, mas dependente do pH, e está estreitamente relacionado com a composição lipídica (Haid *et al.*, 2009). Além do pH ácido, o colesterol das membranas também apresenta um forte efeito na fusão entre vírus e célula hospedeira (Corver *et al.*, 2000; Moesker *et al.*, 2010; Stiasny *et al.*, 2011). A partícula viral é então submetida a um processo de desnudamento, com posterior liberação do RNA genômico. A tradução da proteína se inicia com a formação de um complexo estável entre o IRES na região 5' UTR com a subunidade 40S ribossomal, fatores de iniciação da célula hospedeira e proteínas virais. Posteriormente, ocorre o processamento da poliproteína viral com a clivagem das proteínas não-estruturais por proteases virais e celulares. As proteínas estruturais, assim como a p7, são

geradas pela ação de peptidases 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). Após o processamento da poliproteína, forma-se o complexo de replicação denominado “rede membranosa”, incluindo proteínas virais não-estruturais e proteínas celulares (Gu *et al.*, 2013). O complexo de replicação está associado às membranas do retículo endoplasmático da célula hospedeira, sendo formado por membranas com modificações morfológicas, onde é possível identificar proteínas virais e o RNA viral em processo de replicação. 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 interage com cópias da proteína do *core*, formando o nucleocapsídeo. O envelope é adquirido no interior do retículo endoplasmático. Para a formação de novos vírions, é realizada a montagem de proteínas virais, glicoproteínas e o RNA genômico a partir de um processo que envolve múltiplas etapas, incluindo componentes virais e da célula hospedeira. Após a montagem, ocorre a maturação do vírion no interior da vesícula de transporte e sua posterior liberação da célula hospedeira.

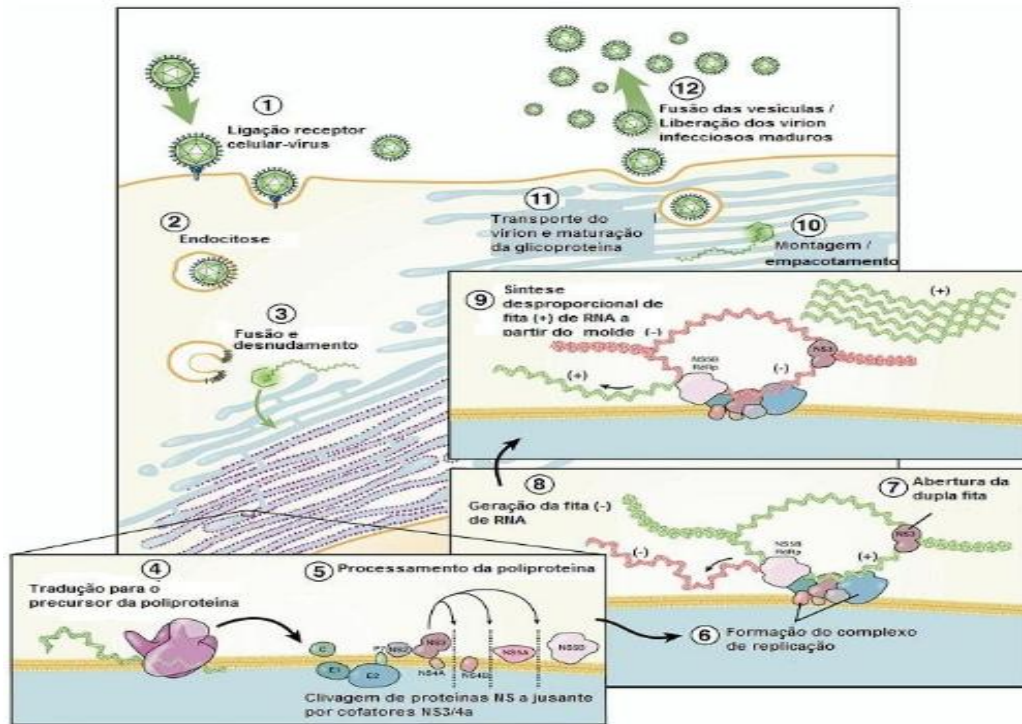


Figura 1.3: Ciclo replicativo do HCV destacando as seguintes etapas (1) Interação entre o vírus e os receptores de membrana celular com internalização do vírus, (2) Endocitose, (3) Desnudamento e liberação citoplasmática, (4) Tradução mediada por IRES e processamento do precursor da poliproteína, (5) Processamento da poliproteína com a clivagem das proteínas não- estruturais, (6) Formação do complexo de replicação, (7, 8 e 9) Replicação do RNA, (10) Empacotamento e montagem, (11) Maturação do vírion nas vesículas de transporte e (12) Liberação do vírion (Fonte: Pawlotsky *et al.*, 2007).

### 1.6 Manifestações clínicas da infecção por HCV

Após a exposição com o HCV o período de incubação da infecção pode variar entre 2 e 25 semanas (média de 6 a 7 semanas). A infecção pelo HCV é marcada por uma evolução silenciosa, cujos sintomas são inespecíficos e autolimitados e a infecção dificilmente é diagnosticada na fase inicial (Chen *et al.*, 2006; Focaccia R, 2013). O HCV é um agente que raramente causa infecção aguda sintomática. Aproximadamente 500 casos de infecção aguda por HCV no Brasil são notificados todos os anos (PCDT, 2015). De modo geral, quando aguda, a hepatite C apresenta evolução subclínica: cerca de 80% dos casos têm apresentação assintomática e anictérica, o que dificulta o diagnóstico. Os sinais e sintomas são comuns às demais doenças parenquimatosas crônicas do fígado e costumam manifestar-se apenas em fases mais avançadas da doença (Mandell *et al.*, 2010). Em geral, a infecção por

HCV desencadeia um processo degenerativo discreto e progressivo, culminando com fibrose e cirrose hepática anos após a exposição ao agente infeccioso (CDC, 2014; Araujo e Barone, 2010).

A fase aguda da hepatite C pode durar até seis meses, mas o término da infecção costuma acontecer até a 12ª semana. Caracteriza-se pela elevação das aminotransferases séricas, principalmente ALT, associada ou não a período prodrômico, caracterizado por náuseas, vômitos, fadiga, febre baixa e cefaleia. Posteriormente podem aparecer outras manifestações clínicas como dor abdominal, icterícia, prurido, colúria, acolia e artralgias, associadas ao aparecimento de HCV-RNA (Mandell *et al.*, 2010). Menos de 10% dos pacientes apresentam icterícia, ao passo que não mais de 20% apresentam sintomas inespecíficos, sendo o quadro clínico semelhante àquele de outros agentes que causam hepatites virais e o diagnóstico diferencial somente é possível mediante a realização de testes rápidos ou sorológicos para detecção de anticorpos específicos. A eliminação viral espontânea após a infecção aguda pelo HCV ocorre em 30 a 40% dos casos. Alguns fatores do hospedeiro estão associados à eliminação viral espontânea: idade abaixo de 40 anos, sexo feminino, aparecimento de icterícia e fatores genéticos como polimorfismo da interleucina-28B (IL28B) (The European Association for the Study of the Liver, 2014; American Association for the Study of Liver Diseases, 2014; World Health Organization, 2014).

Um aspecto clínico importante da hepatite C é o alto índice de progressão a cronicidade, sendo que após a exposição ao vírus, 60 a 70% evoluem para a infecção crônica e, em média, 20% podem evoluir para cirrose ao longo de um período de 20 a 30 anos (Poynard *et al.*, 1997) e 1% a 5% dos pacientes desenvolve CHC (Charlton M, 2001). Com o estabelecimento da infecção crônica, dificilmente ocorrerá a resolução espontânea da viremia (Lemon *et al.*, 2007). A fase crônica da hepatite C caracteriza-se por anti-HCV reagente por mais de seis meses e confirmação diagnóstica com HCV-RNA detectável. Diante da ocorrência de sintomas inespecíficos, o diagnóstico habitualmente é realizado na fase crônica da doença quando for realizado teste sorológico de rotina ou por doação de sangue (Roth *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2000). Os níveis séricos de ALT apresentam elevações intermitentes em 60% a 70% daqueles que têm infecção crônica (Mandell *et al.*, 2010). Nos casos mais graves, ocorre progressão para cirrose e descompensação hepática. A ocorrência de casos fatais da doença está associada a

complicações, tais como a hepatopatia crônica e o desenvolvimento de CHC, reforçando a necessidade de identificar a doença precocemente.

## **1.7 Abordagem diagnóstica da hepatite C**

O diagnóstico da infecção pelo HCV baseia-se na detecção de anticorpos anti-HCV (testes indiretos), na detecção do RNA viral e do antígeno do *core* (testes diretos) e técnicas de genotipagem. O RNA do HCV é o marcador molecular que pode ser detectado no soro ou plasma a partir da 1ª semana após a exposição ao HCV, constituindo-se a melhor ferramenta para diagnóstico precoce da infecção aguda (Houghton *et al.*, 1991, Ozaras *et al.*, 2009). Os anticorpos anti-HCV podem ser encontrados em média quatro a seis semanas após a exposição ao vírus, embora possam levar meses para serem detectados.

### **1.7.1 Testes sorológicos (detecção de anticorpos anti-HCV)**

#### **a) Ensaio imunoenzimático**

Atualmente, a terceira geração de testes imunoenzimáticos para detecção de anticorpos anti-HCV é comumente utilizada no diagnóstico laboratorial com sensibilidade estimada em 98,9% e a especificidade foi observada em 100% dos pacientes na fase crônica da doença (Alborino *et al.*, 2011; Colin *et al.*, 2001). O ensaio imunoenzimático de 3ª geração, que inclui um antígeno da NS5 e 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 (Cossart *et al.*, 1999). Em 2008, a 4ª geração de ensaios imunoenzimáticos tornou-se disponível. Os antígenos utilizados foram derivados do *core* (dois diferentes *clusters* de epítomos), NS3, NS4A, NS4B e regiões da NS5A. Os antígenos da NS3 e NS4 foram derivados dos genótipos 1a, 1b, 2 e 3.

#### **b) Testes rápidos**

São testes para a determinação qualitativa do anticorpo anti-HCV, por método imunocromatográfico, usando antígenos sintéticos e recombinantes do *core*, NS3 e



NS4 imobilizados na membrana de nitrocelulose para identificação seletiva de anti-HCV em amostra mínima de soro ou sangue. O FDA aprovou em 2010, para uso em pacientes maiores de 15 anos considerados em risco para a infecção por HCV, o teste OraQuick HCV Rapid Antibody (OraSure Technologies, Bethlehem, PA).

c) Técnica de *immunoblotting*

Os testes de *immunoblotting* baseiam-se na imobilização de antígenos específicos do HCV em fita de nitrocelulose, identificando-se contra qual antígeno do vírus acontece à reatividade do soro testado (Dubois *et al.*, 1998). Esses testes incluem proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos da região hipervariável E2, porção helicase da NS3, NS4A, NS4B e regiões da NS5B.

### **1.7.2 Detecção do RNA viral**

a) PCR em tempo real

A PCR em tempo real é uma metodologia quantitativa que envolve a técnica de PCR com sistema de detecção de sinais fluorescentes cuja fluorescência emitida pela clivagem da sonda específica é detectada por um sensor anexado ao termociclador. A quantidade de fluorescência é proporcional do DNA (ou cDNA) presente na amostra inicial. A sensibilidade desse teste é relatada como sendo de cerca de 10 UI/mL (Gelderblom *et al.*, 2006).

b) Amplificação Mediada por Transcrição (TMA)

O sistema de amplificação mediada por transcrição amplifica grandes quantidades de RNA em ensaios isotérmicos que utilizam coordenadamente as enzimas transcriptase reversa (efetua uma cópia de cDNA de fita simples a partir do RNA), RNase H (destrói o RNA do híbrido RNA-cDNA) e RNA polimerase (produz inúmeras cópias do RNA de fita simples). A reação também depende de dois iniciadores, porém, diferentemente da PCR, amplifica o RNA ao invés do DNA.

### c) DNA ramificado (*branched*) (bDNA)

Esses ensaios intensificam o sinal ao amplificar o marcador (fluorocromos ou enzimas) fixado ao ácido nucléico. Esse sistema apresenta uma série de sondas primárias e uma sonda secundária ramificada, marcada com enzima. 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 *et al.*, 2003).

#### **1.7.3 Detecção do antígeno do core**

Em pacientes infectados por HCV, já se demonstrou que o nível do antígeno do *core* se correlaciona com os níveis do RNA do HCV para vários genótipos (Chevaliez *et al.*, 2014). Por ser barato e de fácil execução, a quantificação do antígeno do *core* pode ser utilizada como alternativa aos testes de amplificação de ácidos nucléicos (NAT) para a detecção do RNA do HCV (Tillmann *et al.*, 2014).

#### **1.7.4 Genotipagem do HCV**

A determinação de diferentes genótipos do HCV é importante para prever a probabilidade de resposta e determinar a duração da terapia antiviral. Dentre as técnicas moleculares, o método de referência para a genotipagem do HCV é o sequenciamento nucleotídico de regiões específicas do genoma do HCV, sendo as regiões do *core*/E1 ou NS5B as mais estudadas, com posterior análise filogenética (Murphy *et al.*, 2007). A região 5'UTR 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). Entretanto, outras técnicas também podem ser realizadas, tais como: RFLP (Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição), na qual 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), LiPA (*line immuno probe assay*) e PCR em tempo real, como por exemplo, o Abbott RealTime HCV Genotype II (Abbott Molecular), que apresenta sondas específicas marcadas para o genótipo/subtipo viral que minimiza a contaminação com produtos amplificados.

## 1.8 Abordagem terapêutica da hepatite C

O tratamento para Hepatite C evoluiu muito rapidamente nos últimos anos. De acordo com o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções de 2011 (portaria do Ministério da Saúde nº 221 de 13 de Julho de 2011), o esquema recomendado para o tratamento dos pacientes portadores de hepatite C crônica com genótipo 1 é a associação de Interferon peguilado (PEG-IFN) e ribavirina (RBV) durante 48 a 72 semanas. Já para o tratamento dos pacientes portadores de hepatite C crônica com os genótipos 2 ou 3, na inexistência de fatores preditores de baixa RVS, o esquema recomendado é a associação de IFN convencional e RBV, durante 24 semanas. Quando há existência de fatores preditores de baixa RVS, o esquema de tratamento para esses genótipos é a associação de PEG-IFN e RBV, durante 24 a 48 semanas. Importante destacar que a erradicação do vírus está relacionada com o resultado de HCV-RNA indetectável na 24ª semana pós-tratamento, sendo essa condição denominada Resposta Viroológica Sustentada (RVS). A RVS é o objetivo primário para uma terapia bem-sucedida e está associada com maior durabilidade do *clearance* viral (Swain *et al.*, 2010). Pacientes com CHC que apresentam RVS após a terapia antiviral apresentam menor risco de mortalidade se comparados aos que não apresentam RVS (Backus *et al.*, 2011). Portanto, a RVS é o marcador padrão para um tratamento antiviral de sucesso em ensaios clínicos.

A via de administração do PEG-IFN é a subcutânea, a partir de injeções semanais, ao contrário do interferon convencional cujas injeções eram administradas diariamente ou três vezes por semana. A RBV é um análogo de nucleosídeo da guanosina e é administrada oralmente. Ao adicionar RBV ao interferon, a RVS aumenta, entretanto incorpora mais efeitos colaterais ao tratamento antiviral, tais como anemia hemolítica, e ocasionalmente *rash* cutâneo e insônia.

O tratamento na fase aguda da infecção pelo HCV tem como objetivo reduzir o risco de progressão para hepatite crônica. O tratamento sempre deve ser considerado nos casos de hepatite C aguda, sendo necessário um esforço contínuo para diagnosticá-la o mais precocemente possível. Quando a infecção é tratada precocemente, as taxas de RVS alcançam valores superiores a 80% e, em algumas situações, próximos de 98%.

### **1.8.1 Fatores preditivos de resposta ao tratamento com Interferon/Ribavirina**

Alguns fatores preditivos de resposta ao tratamento associados ao sucesso terapêutico com interferon e ribavirina são: sexo feminino, idade inferior a 40 anos, genótipo não 1, fibrose mínima, carga viral baixa, atividade inflamatória inexistente ou mínima e ausência de obesidade. O mais importante fator preditivo parece ser o genótipo do HCV. Em pacientes infectados pelo genótipo 1, a Resposta Viroológica Sustentada (RVS) encontra-se em taxas mais baixas (41 a 52%) quando comparada aos genótipos 2 e 3 (76 a 84%). Entretanto, a idade à época da infecção, o gênero e o grau de fibrose também traduzem pior prognóstico para a resposta terapêutica. Mais recentemente, a análise da cinética viral na quarta semana e a obtenção da Resposta Viroológica Rápida (RVR) passaram a ser consideradas excelentes preditores de RVS e, até mesmo, da possibilidade de encurtamento do tempo de tratamento. Aproximadamente 12% a 47% dos pacientes com infecção pelo genótipo 1 do HCV, especialmente aqueles com carga viral basal baixa, alcançavam RVR durante o tratamento com Interferon PEG-IFN e RBV (Brandão-Mello CE, 2014). Diversos estudos demonstraram que, além do genótipo, variações genéticas do hospedeiro também podem influenciar na diferença a resposta ao tratamento (Imazeki *et al.*, 2010) tais como polimorfismos de base única (SNPs) próximos do gene codificante de IL28B localizados no cromossomo 19. 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 figura 1.4 exemplifica os fatores preditivos relacionados ao hospedeiro e ao vírus que estão associados à baixa RVS no tratamento baseado em interferon associado à ribavirina.

## Características basais que influenciam a RVS

Características relacionadas à doença — Baixa RVS	Características relacionadas ao paciente — Baixa RVS
<ul style="list-style-type: none"><li>• Genótipo 1</li><li>• Carga viral basal alta</li><li>• Biópsia hepática: Fibrose avançada e cirrose</li><li>• Esteatose</li><li>• Resistência insulínica</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Idade: &gt; 40</li><li>• Raça: Negra</li><li>• Sexo: Masculino</li><li>• Peso corporal elevado</li><li>• Adesão: Dose incompleta</li><li>• Genética: SNPs</li><li>• IL28b</li></ul>

Figura 1.4: Características basais que influenciam a RVS no tratamento baseado em interferon/ribavirina (Fonte: Brandão-Mello CE, 2014)

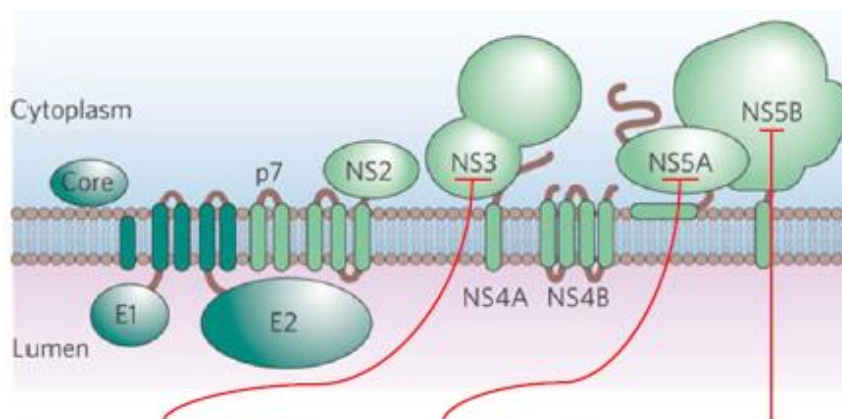
### 1.8.2 Evolução do tratamento da hepatite C crônica

A necessidade de um regime terapêutico com menores efeitos colaterais, que permitam menores níveis de desistência dos pacientes, e que impeçam o progresso da doença para cirrose descompensada e CHC vem recebendo destaque nas recentes pesquisas.

Os avanços obtidos no conhecimento do ciclo reprodutivo do HCV em cultura de células e estudos baseados no modelo tridimensional das proteínas virais permitiram a descoberta de diversas moléculas que bloqueiam especificamente a ação de diversas proteínas virais em diferentes etapas do ciclo viral (Pawlotsky *et al.*, 2007; Soriano *et al.*, 2011, Asselah *et al.*, 2014). Estes compostos foram genericamente denominados de DAAs (antivirais de ação direta) (tabela 1.1) e têm como alvo proteínas virais envolvidas no ciclo replicativo do HCV, tais como as proteínas não-estruturais, NS3/4A protease, NS5B polimerase e NS5A proteína (Figura 1.5).

Tabela 1.1: Antivirais de ação direta para uso clínico e em desenvolvimento  
(Adaptado para o português de Ermis F *et al.*, 2015)

ANTIVIRAIS DE AÇÃO DIRETA			
Inibidores de protease NS3/4A	Inibidores NS5A	Inibidores NS5B	
Aprovados: Telaprevir, Boceprevir, Simeprevir, Paritaprevir	Aprovados: Daclatasvir, Ombitasvir	Inibidores análogos nucleosídeos	Inibidores não análogos de nucleosídeos
Fase 2: Sovaprevir, ACH-2684, Narlaprevir, Vedroprevir	Fase 1: ACH-2928, PPI-461	Aprovados: Sofosbuvir	Fase 1: PPI-383
Fase 3: Asunaprevir, Danoprevir, Vaniprevir, MK-5172	Fase 2: GS-5816, ACH-3102, PPI-668, GSK2336805, Samatasvir, BMS-824393	Fase 2: Mericitabine, VX-135	Fase 2: GS-9669, TMC647055I, VX-222
	Fase 3: Ledipasvir, MK-8742		Fase 3: Dasabuvir, BMS-791325



<u>NS3/4A inhibitors (-previr)</u>	<u>NS5A inhibitors (-asvir)</u>	<u>NS5B inhibitors (-buvir)</u>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• telaprevir*</li> <li>• boceprevir*</li> <li>• simeprevir*</li> <li>• paritaprevir*</li> <li>• ABT-493<sup>§</sup></li> <li>• asunaprevir<sup>§</sup></li> <li>• grazoprevir<sup>§</sup></li> <li>• vedroprevir<sup>§</sup></li> <li>• GS-9857<sup>§</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ledipasvir*</li> <li>• ombitasvir*</li> <li>• daclatasvir<sup>§</sup></li> <li>• GS-5816<sup>§</sup></li> <li>• ABT-530<sup>§</sup></li> <li>• elbasvir<sup>§</sup></li> <li>• MK-8408<sup>§</sup></li> <li>• JNJ-845<sup>§</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• sofosbuvir*</li> <li>• dasabuvir*</li> <li>• beclabuvir<sup>§</sup></li> <li>• GS-9669<sup>§</sup></li> <li>• TMC-055<sup>§</sup></li> <li>• MK-3682<sup>§</sup></li> </ul>

Figura 1.5: Associação entre DAAs e proteínas não-estruturais que representam alvos de inibição do ciclo reprodutivo do HCV (Fonte: Lam BP *et al.*, 2015)

O Ministério da Saúde do Brasil, através da portaria nº 25 de 12 de novembro de 2013, aprovou os Suplementos 1 e 2 do Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções, que preconiza a incorporação dos inibidores de protease (IP) Telaprevir e Boceprevir para o tratamento de pacientes infectados com o genótipo 1 do HCV. O Telaprevir estaria recomendado para pacientes com cirrose hepática compensada (Metavir F4 ou evidências menos invasivas de cirrose), e para pacientes Metavir F3 nulos de resposta a tratamento prévio com PEG-IFN e RBV (Figura 1.6). Já o Boceprevir, poderia ser utilizado para pacientes com fibrose avançada (Metavir F3 e F4/cirrose), de acordo com critérios de individualização de tratamento, com base em relatório médico detalhado, relação risco-benefício e autorização dos Comitês Estaduais. O tratamento com Boceprevir deve necessariamente ser precedido por 4 semanas de uso da terapia dupla com PEG-IFN e RBV. Esse período é denominado de “*lead-in*” e é obrigatório no esquema de tratamento com boceprevir (Figura 1.7).

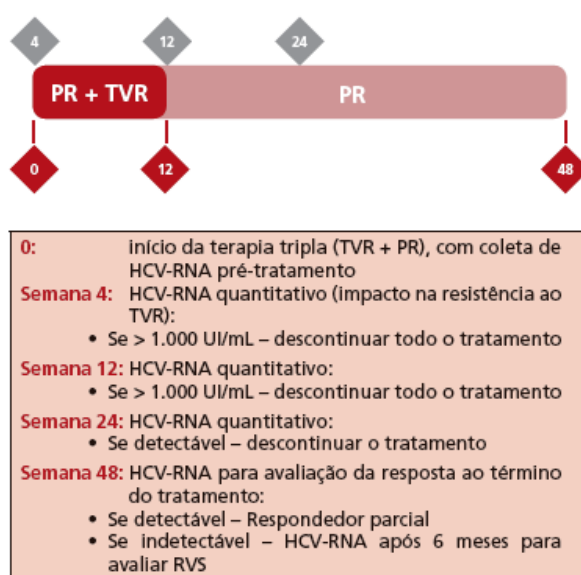


Figura 1.6: Esquema terapêutico com Telaprevir em pacientes infectados com HCV genótipo 1 (Fonte: Ministério da Saúde, 2013)

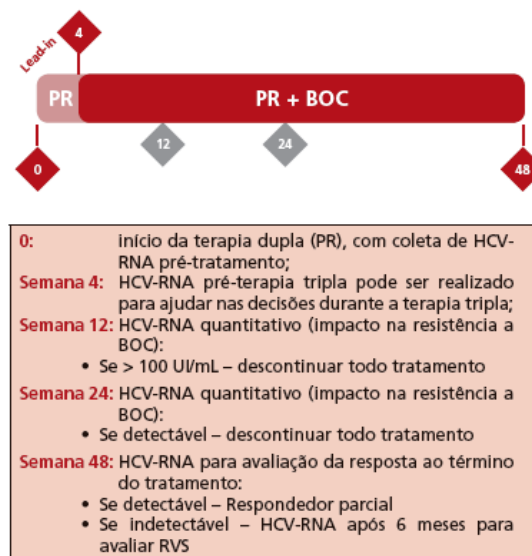


Figura 1.7: Esquema terapêutico com Boceprevir em pacientes infectados com HCV genótipo 1 (Fonte: Ministério da Saúde, 2013)

Os inibidores de protease de primeira geração telaprevir e boceprevir em combinação com PEG-IFN e RBV demonstraram-se eficazes no tratamento de pacientes infectados com o genótipo 1, visto que não são indicados para os genótipos 2 e 3. Essa terapia tripla resultou em maiores taxas de RVS no caso de pacientes virgens de tratamento (61-75%) quando comparada à terapia dupla (38-49%) (Hezode *et al.*, 2009; Mchutchinson *et al.*, 2009; Kwo *et al.*, 2010; Jacobson *et al.*, 2011; Poordad *et al.*, 2011, Sherman *et al.*, 2011; Kumada *et al.*, 2012). Contudo, apesar dos avanços terapêuticos com estes tratamentos, os resultados obtidos ainda não são considerados satisfatórios por diversos fatores: longo tempo de terapia (24 a 48 semanas), necessidade de ingestão de grande número de comprimidos (10 a 16 comprimidos/dia) associado ao uso de medicamento injetável semanalmente e dificuldade no tratamento do paciente portador de coinfeção HCV/HIV. Além desses fatores, os inibidores de protease de primeira geração estão associados com efeitos colaterais importantes. No caso do telaprevir, o paciente pode ter náuseas, diarreia, *rash* e anemia. Recentemente, descobriu-se que o telaprevir está relacionado à uma redução da função renal (medida a partir da taxa de filtração glomerular), o que provoca a diminuição da eliminação renal de RBV, e consequentemente, um grau maior de anemia hemolítica (Tempestilli *et al.*, 2014). Já o boceprevir, está associado à anemia, dor de cabeça e náuseas. Esses medicamentos também apresentam interações medicamentosas significativas. De acordo com informações apresentadas no Congresso de Medicina Tropical



(Fortaleza, 2015), o encerramento de produção dos medicamentos telaprevir e boceprevir ocorreu em Agosto de 2014 e Março de 2015, respectivamente.

Diante dos fatores apresentados e da necessidade de acesso a novos tratamentos, o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções de 2015 ressalta o uso de novos antivirais de ação direta propostos para o tratamento da hepatite C, na qual estão disponíveis no mercado brasileiro com aprovação da Anvisa: sofosbuvir, um análogo nucleotídeo que inibe a polimerase do HCV; simeprevir, um inibidor de protease de segunda geração; daclatasvir, um inibidor da NS5A. A tabela 1.2 apresenta as indicações para tratamento imediato com os novos DAAs.

Tabela 1.2: Indicações para tratamento imediato com os novos antivirais de ação direta

<b>Indicações para tratamento imediato</b>	
Coinfecção HCV/HIV	Pós-transplante de fígado
Manifestações extra-hepáticas	Linfoma, gamopatia monoclonal, mieloma múltiplo e outras doenças hematológicas malignas
Crioglobulinemia	Fibrose hepática avançada (METAVIR F3 ou F4)
Sinais clínicos ou evidências ecográficas sugestivas de cirrose hepática	Biópsia hepática com resultado METAVIR F2 presente há mais de três anos
Insuficiência hepática e ausência de carcinoma hepatocelular	Púrpura trombocitopênica idiopática (PTI)
Insuficiência renal crônica	

A tabela 1.3 ressalta os esquemas terapêuticos correspondentes a cada genótipo do HCV de acordo com resultados obtidos a partir de ensaios clínicos descritos no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções (2015).

Tabela 1.3: Esquema terapêutico relacionado a cada genótipo do HCV

Genótipo	Perfil da infecção	Regime terapêutico	Tempo
<b>Genótipo 1</b>	Monoinfecção HCV	Sofosbuvir + simeprevir	12 semanas
	Monoinfecção HCV	Sofosbuvir + daclatasvir	12 semanas
	Cirrose Child-Pugh B e C, paciente experimentado com BOC/TEL ou coinfeção HIV/HCV	Sofosbuvir + daclatasvir	24 semanas
<b>Genótipo 2</b>	Não há distinção entre perfis*	Sofosbuvir + ribavirina	12 semanas
<b>Genótipo 3</b>	PR autorizado	Sofosbuvir + PR	12 semanas
	PR contraindicado	Sofosbuvir + Daclatasvir	12 semanas
<b>Genótipo 4</b>	PR autorizado	Daclatasvir + PEG-IFN + ribavirina	24 semanas
	PR contraindicado	Sofosbuvir + daclatasvir	12 semanas

Legenda: PR: PEG-IFN + RBV

### 1.8.3 Simeprevir (Olysio®)

O medicamento Olysio® é um composto macrocíclico que se liga não-covalentemente à NS3/4A protease do HCV inibindo a sua ação e consequentemente ajuda no combate da infecção pelo HCV ao impedir a multiplicação do vírus. O simeprevir, princípio ativo de OLYSIO™, é um inibidor da protease NS3/4A do HCV, a qual é essencial para a replicação viral. O simeprevir é considerado um inibidor de protease (IP) de segunda geração devido a melhor afinidade de ligação, quando comparado aos IP de primeira geração com estrutura linear. O medicamento foi produzido pela Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda. ® e aprovado pelo FDA em 22 de novembro de 2013 para o tratamento de pacientes infectados com hepatite C crônica. Em maio de 2014, a Janssen apresentou um pedido suplementar ao FDA para o uso combinado entre simeprevir e sofosbuvir em regime terapêutico de uma vez por dia por 12 semanas para pacientes infectados com o genótipo 1 do HCV. De acordo com o Relatório de Recomendação da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC), disponibilizado em abril de 2015, o simeprevir apresenta indicação aprovada na Anvisa para as seguintes indicações: (1) em associação à alfa peginterferona e ribavirina, nos casos de adultos com infecção por HCV genótipo

1 virgens de tratamento e que falharam ao tratamento anterior para HCV baseado em interferona, coinfeção por HIV-1 e genótipo 1 do HCV e adultos com infecção por HCV genótipo 4 (virgens ou com tratamento prévio), e (2) em associação com sofosbuvir (400 mg, uma vez ao dia) em pacientes infectados pelo HCV genótipo 1, com resposta nula anterior e pacientes virgens de tratamento (Figura 1.8).

População de pacientes	Histórico de tratamento	Esquema e Duração do Tratamento
<b>OLYSIO™ associado à alfapeginterferona e ribavirina</b>		
Pacientes com ou sem cirrose, monoinfectados por VHC genótipo 1 ou 4	Virgens de tratamento ou com recidiva anterior <sup>1</sup>	12 semanas de OLYSIO™ associado à alfapeginterferona e ribavirina seguido por 12 semanas adicionais de alfapeginterferona e ribavirina (duração total do tratamento de 24 semanas) <sup>2</sup>
Pacientes com ou sem cirrose monoinfectados por VHC genótipo 1 ou 4	Não respondedores a terapia prévia <sup>3</sup> (incluindo aqueles com resposta parcial e resposta nula)	12 semanas de OLYSIO™ associado à alfapeginterferona e ribavirina seguido por 36 semanas adicionais de alfapeginterferona e ribavirina (duração total do tratamento de 48 semanas) <sup>2</sup>
Pacientes coinfectados por VHC genótipo 1/ HIV-1, sem cirrose	Virgens de tratamento ou com recidiva anterior <sup>1</sup>	12 semanas de OLYSIO™ associado à alfapeginterferona e ribavirina seguido por 12 semanas adicionais de alfapeginterferona e ribavirina (duração total do tratamento de 24 semanas) <sup>2</sup>
Pacientes coinfectados por VHC genótipo 1/ HIV-1	Não respondedores a terapia prévia <sup>3</sup> (incluindo aqueles com resposta parcial e resposta nula), ou com cirrose (independente do histórico de tratamento)	12 semanas de OLYSIO™ associado à alfapeginterferona e ribavirina seguido por 36 semanas adicionais de alfapeginterferona e ribavirina (duração total do tratamento de 48 semanas) <sup>2</sup>
<b>OLYSIO™ associado ao sofosbuvir</b>		
Pacientes com VHC genótipo 1, com ou sem cirrose, sem coinfeção por HIV	Virgens de tratamento, com recidiva anterior e sem resposta anterior <sup>3</sup> (incluindo aqueles com resposta parcial e resposta nula)	12 semanas de OLYSIO™ + sofosbuvir (com ou sem ribavirina) <sup>4,5</sup>

Figura 1.8: Medicamentos coadministrados e duração do tratamento recomendados para o tratamento associado ao OLYSIO™ (Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/index.asp](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/index.asp))

O simeprevir está disponível em cápsulas de 150 mg em blíster com 28 cápsulas, cuja dosagem é 150 mg uma vez ao dia, durante 12 semanas, administrada durante a refeição. Os efeitos adversos referentes ao medicamento

são aumento dos níveis de bilirrubina no sangue, sensibilidade à luz do sol (fotossensibilidade), constipação, prurido e erupção na pele.

Em ensaio clínico QUEST-1 realizado por Jacobson e colaboradores em 2014, foi avaliada a eficácia do simeprevir com PEG/IFN e RBV em pacientes virgens de tratamento infectados com o genótipo 1 do HCV. A RVS na 12<sup>a</sup> semana pós-tratamento nos grupos com administração de simeprevir e placebo foi de 80% e 50%, respectivamente. Em relação aos subtipos, a RVS foi de 71% para o subtipo 1a, enquanto que no subtipo 1b foi de 90%. Já em estudos realizados por Manns e colaboradores (2014) relatando os resultados obtidos nos ensaios clínicos QUEST-2, realizados em pacientes sem tratamento prévio, revelaram que as taxas de RVS na 12<sup>a</sup> semana foram maiores com o uso de simeprevir associado ao IFN/RBV (209/257, 81%), quando comparados ao grupo placebo com IFN/RBV (67/134, 50%). No ensaio clínico ASPIRE, foram incluídos pacientes não-respondedores à terapia dupla com PEG/IFN e RBV que foram então tratados com simeprevir, PEG/IFN e RBV por 12, 24 ou 48 semanas. As taxas de RVS no grupo com o uso do simeprevir foram maiores quando comparadas ao grupo controle com administração de placebo (38-59% com simeprevir e 19% no grupo controle) (Welch *et al.*, 2015).

#### **1.8.4 Mutações de resistência**

Um dos fatores limitantes da eficácia da terapia antiviral com as novas drogas DAA é o surgimento de resistência que, por sua vez, são causadas por mutações pontuais (Kuntzen *et al.*, 2008). Devido à alta produção de partículas virais do HCV (100 vezes maior que o HIV) e à alta taxa de erro da RNA polimerase (aproximadamente 10 vezes maior que a transcriptase reversa), o potencial de existência de polimorfismos de resistência e o desenvolvimento de resistência em curto prazo, após exposição aos IP é maior se comparado ao HIV (Neumann *et al.*, 1998; Martell *et al.*, 1992). Assim sendo, o rápido aparecimento de cepas com mutação de resistência limitou o uso dos DAA como monoterapia. Os principais sítios na proteína NS3 onde a ocorrência de mutações pode conferir resistência aos inibidores da serino-protease NS3, telaprevir e boceprevir, foram localizados nos *locus* V36, T54, V55, R155, A156 e V170 (Susser *et al.*, 2009). As mutações associadas ao Simeprevir foram: Q80K, R155T/K, D168A/H/T/V e V/I170A/T/L (Poveda *et al.*, 2014). Polimorfismos naturais nos códon 54 e 155 foram

observados em pacientes que não foram tratados anteriormente com IP (Kuntzen *et al.*, 2008). Em um estudo anterior realizado por Peres-da-Silva e colaboradores (2010), a mutação T54S foi encontrada com uma frequência de 4,1% em variantes do subtipo 1a no Rio de Janeiro. Estes dados sugerem que essa substituição já está presente em variantes brasileiras mesmo na ausência da pressão seletiva da droga. Em ensaio clínico de QUEST-2, no grupo de pacientes tratados com simeprevir que não responderam ao tratamento foi realizada a análise de sequências antes e após tratamento em 42 pacientes. Em 41 (98%) destes pacientes foi encontrada mutações na NS3 nas posições 80, 122, 155 e 168 nas amostras com falha no tratamento.

As taxas globais de RVS são menores para o subtipo 1a quando comparadas ao subtipo 1b. No ensaio clínico QUEST-1, o polimorfismo Q80K revelou-se presente em 41% dos pacientes infectados com o subtipo 1a e está associado com menores taxas de RVS. Verificou-se então, que pacientes infectados com o genótipo 1a que possuem o polimorfismo Q80K apresentam uma redução na RVS para o simeprevir, quando comparados aos pacientes sem esta mutação (Lenz *et al.*, 2013). A mutação Q80K está associada com resistência ao simeprevir e é bastante comum nos EUA (40%) e Europa (4-16%) (Nishiya *et al.*, 2014). A presença da mutação natural Q80K na região de protease NS3 do HCV, direciona a uma redução da susceptibilidade *in vitro* a alguns inibidores de protease macrocíclicos (Bae *et al.*, 2010) e reduz *in vivo* a resposta terapêutica ao simeprevir (Asselah *et al.*, 2014). As diretrizes terapêuticas americanas e européias para a infecção por HCV recomendam a triagem de pacientes infectados com o subtipo 1a para a presença do polimorfismo Q80K antes da administração do simeprevir, além da recomendação pelo FDA e *European Medicines Agency* (EMA) para o desenvolvimento de esquemas alternativos com os medicamentos sofosbuvir e daclatasvir para pacientes que apresentam esse polimorfismo.

No Brasil, a ocorrência da mutação Q80K é citada em baixa frequência (6%) em estudo realizado por nosso grupo (Peres-da-Silva *et al.*, 2012) em uma população de pacientes não tratados anteriormente. Uma baixa prevalência da mutação Q80K (1,8%) também foi observada em um estudo realizado em São Paulo (de Carvalho *et al.*, 2014), bem como no trabalho de revisão (0,4%) realizado por Vidal e colaboradores (2015), ressaltando baixa prevalência da mutação Q80K. O quadro 1.1 representa as mutações em diferentes posições da região NS3 que

estão associadas com menor susceptibilidade aos inibidores de protease (IP) (Poveda *et al.*, 2014; Wyles DL, 2012).

Quadro 1.1: Relação entre mutações de resistência e inibidores de protease do HCV

	V36A/M	T54S/A	V55A/K	Q80R/K	R155K/T/Q	A156S/D/T/V	D168A/V/T/H /E/T	V/I170A/ TL
Telaprevir, GT 1a	M				K/T			
Telaprevir, GT 1b	A				Q			
Boceprevir, GT 1a					K/T			
Boceprevir, GT 1b								
Faldaprevir								
Danoprevir							E/T	
Vaniprevir								
Simeprevir								
Asunaprevir								
Paritaprevir (ABT-450)								
MK-5172								
Sovaprevir (ACH-1625)								

### 1.9 Justificativa

Os estudos com os IP telaprevir e boceprevir permitiram um avanço na terapêutica contra o HCV estimulando a pesquisa de diversos DAA. Poveda e colaboradores (2014) destacam que, a seleção de mutações de resistência na região NS3 do HCV para pacientes tratados com telaprevir e boceprevir, pode ser relevante se o retratamento com inibidores de protease de segunda geração, como o simeprevir, for considerado. Estudos demonstraram que após a descontinuação do uso dos IP de primeira geração, mutações de resistência tendem a desaparecer após um acompanhamento médio de 30 meses na maioria dos pacientes (>85%). Entretanto, a existência de dados que avaliem estratégias de retratamento com inibidores de protease ainda são limitados. As terapias baseadas em DAA em combinação com PEG/IFN e RBV devem considerar a presença de polimorfismos naturais ou variantes associadas à resistência (RAVs) que podem influenciar negativamente a resposta virológica em pacientes cuja

resposta ao interferon é baixa, tais como pacientes infectados com o subtipo 1a e que não apresentem o genótipo CC do gene IL28B (Barnard *et al.* 2012, McPhee *et al.*, 2012, 2013).

Em um estudo realizado por nosso grupo em 2010, Peres-da-Silva e colaboradores observaram que substituições associadas à resistência a IP podem ser encontradas em isolados circulando no Brasil em pacientes virgens de tratamento antiviral. No domínio NS3/4A protease, a variação V36L foi encontrada em 5,6% dos isolados do subtipo 1b e a substituição T54S em 4,16% das sequências do subtipo 1a. Frequências semelhantes de mutações associadas com telaprevir e boceprevir foram encontradas posteriormente em outros estudos realizados no Rio de Janeiro (Hoffmann *et al.*, 2013) e em São Paulo (Zeminian *et al.*, 2013, Nishiya *et al.*, 2014, de Carvalho *et al.*, 2014), sendo que no estudo de Nishiya e colaboradores a frequência de mutações associadas com telaprevir e boceprevir foi bem maior em cepas do subtipo 1a (20% vs 8% das cepas do subtipo 1b).

As mutações associadas ao simeprevir são: Q80K, R155T/K, D168A/H/T/V e V/I170A/T/L (Poveda *et al.*, 2014). Importante ressaltar o impacto negativo da mutação Q80K na resposta virológica ao tratamento com simeprevir, PEG/IFN e RBV, bem como a alta prevalência da mutação Q80K entre pacientes infectados com o subtipo 1a (19-48%) em diversos países (Poveda *et al.*, 2014). Alguns estudos demonstraram que a mutação Q80R está associada com resistência ao simeprevir, faldaprevir e asunaprevir, entretanto o significado clínico dessa descoberta é desconhecido (Lagacé *et al.*, 2012; Poveda *et al.*, 2014). No Brasil, a ocorrência da mutação Q80K é citada em baixa frequência. Em estudo realizado anteriormente por nosso grupo (Peres-da-Silva *et al.*, 2012), dentre uma população de pacientes não tratados previamente, a mutação Q80K foi observada somente em 3 de 48 sequências do subtipo 1a. Outro estudo realizado em São Paulo também observou baixa frequência (1,8%) nas sequências do subtipo 1a (de Carvalho *et al.*, 2014). Em amostras do subtipo 1b a mutação Q80K não foi encontrada em amostras do Rio de Janeiro (Peres-da-Silva *et al.*, 2012) condizente com uma taxa de 0,2% observada globalmente (Alves *et al.*, 2013). Contudo, a baixa frequência da mutação Q80K em amostras brasileiras do subtipo 1a contrasta com os de outras regiões geográficas, onde a mutação de resistência

ao inibidor simeprevir Q80K varia bastante, de 4-16% na Europa e cerca de 40% nos EUA (Alves *et al.*, 2013; De Luca *et al.*, 2013).

Estes dados mostram claramente que os isolados brasileiros do HCV apresentam um padrão distinto de polimorfismos associados à resistência aos novos antivirais indicando a necessidade de mais estudos relacionados à prevalência de mutações, principalmente para os IP de segunda geração, tais como o simeprevir. A identificação de mutações de resistência em pacientes virgens de tratamento é necessária de modo a avaliar qual será a melhor abordagem terapêutica para cada paciente, podendo este ser um possível candidato ao uso de simeprevir que demonstrou em ensaios clínicos promover maior aderência e tolerância ao tratamento antiviral da hepatite C. Poucos estudos brasileiros demonstram a prevalência de mutações de resistência em pacientes com resposta nula à terapia dupla com PEG-IFN e RBV e terapia tripla com telaprevir/boceprevir, PEG-IFN e RBV destacando assim, a necessidade de mais pesquisas que discutam o possível retratamento desses pacientes com inibidores de protease de segunda geração, tais como o simeprevir.

De grande importância é a determinação da prevalência da mutação Q80K em amostras do subtipo 1a e 1b, e com isto promover subsídios ao Ministério da Saúde sobre a efetividade do simeprevir em nosso país e se há necessidade ou não de realizar teste de resistência antes de utilizar a droga. Este projeto pretende ainda incluir amostras de pacientes sem tratamento prévio, de pacientes não-respondedores à terapia dupla e terapia tripla com telaprevir ou boceprevir associados à PEG-IFN e RBV. Deste modo espera-se adicionar conhecimento teórico e prático das pesquisas do tratamento antiviral da hepatite C, e fornecer informações úteis para o entendimento epidemiológico das mutações de resistência associadas à doença em nosso meio.



## **2 OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Analisar a prevalência de mutações de resistência no domínio serino-protease da região NS3 do HCV associadas à diminuição de resposta aos inibidores da protease em pacientes com hepatite C crônica.

### **Objetivos Específicos**

- Sequenciar a região do domínio serino-protease da região NS3 do HCV dos subtipos 1a e 1b e avaliar as mutações de resistência descritas na literatura em pacientes virgens de tratamento e não-respondedores à terapia dupla (PEG-IFN e RBV) e tripla (telaprevir/boceprevir, PEG-IFN e RBV) para os antivirais de ação direta telaprevir, boceprevir e simeprevir utilizados para o tratamento da hepatite C crônica;
- Analisar a prevalência da mutação de resistência Q80K dos subtipos 1a e 1b e avaliar a necessidade da incorporação de testes de resistência pré-tratamento para a terapia com simeprevir.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 População do estudo**

#### **3.1.1 Critérios de inclusão**

- Pacientes acima de 18 anos, masculino ou feminino;
- Diagnóstico positivo para infecção crônica por HCV (anti-HCV reagente por mais de 6 meses e confirmação diagnóstica com HCV-RNA detectável);
- Pacientes infectados com genótipo 1;
- Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

#### **3.1.2 Critérios de exclusão**

- Pacientes positivos para o antígeno de superfície da Hepatite B (HBsAg);
- Ausência de informações demográficas, clínicas e laboratoriais para avaliação final sobre o perfil de cada paciente.

#### **3.1.3 Considerações éticas**

- Foram incluídas no estudo amostras de pacientes atendidos no Hospital Universitário Gaffrée e Guinle/UNIRIO do Rio de Janeiro. Estas amostras eram provenientes de pacientes não-respondedores à terapia tripla antiviral com telaprevir/boceprevir, PEG-IFN e RBV (n=7) e pacientes virgens de tratamento (n=6) e fazem parte do projeto de pesquisa intitulado “Mutações em genes não estruturais do vírus da Hepatite C associados à resistência a drogas de ação direta”, aprovado pela comissão de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, sob parecer nº 204.445 (Anexo 1).

- Também foram incluídas amostras de pacientes atendidos no Ambulatório de Hepatites Virais/FIOCRUZ, cujas considerações éticas são:
  - Pacientes não-respondedores à terapia dupla com PEG-IFN e RBV (n=8): aprovado pela comissão de Ética em Pesquisa da Fiocruz, sob parecer favorável do CEP 142/01 (Anexo 2);
  - Pacientes não-respondedores aos inibidores de protease de primeira geração (n=8) e pacientes virgens de tratamento (n=36): Os pacientes em terapia tripla antiviral (telaprevir ou boceprevir sempre associado à alfapeginterferona e ribavirina) ou virgens de tratamento das unidades de saúde do Sistema Único de Saúde (SUS) foram tratados de acordo com o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções - Suplemento 1, de Janeiro de 2013 do Ministério da Saúde ([http://www.aids.gov.br/publicacao/2011/protocolo\\_clinico\\_e\\_diretrizes\\_terapeuticas\\_para\\_hepatite\\_viral\\_c\\_e\\_coinfeccoes](http://www.aids.gov.br/publicacao/2011/protocolo_clinico_e_diretrizes_terapeuticas_para_hepatite_viral_c_e_coinfeccoes)). Este protocolo contempla o Termo de esclarecimento e responsabilidade, o qual foi assinado pelos pacientes, onde está previsto que parte das amostras de sangue pode ser utilizada para realização de teste de resistência genotípica.

### 3.1.4 Perfil dos pacientes

A população de estudo compreendeu de 65 pacientes, dos quais 23 eram de pacientes não-respondedores ao tratamento prévio e 42 virgens de tratamento (tabela 3.1).

Tabela 3.1: Perfil dos pacientes e número de amostras

<b>Perfil dos pacientes</b>		
<b>Subtipo HCV</b>	<b>Não-respondedores (n=23)</b>	<b>Virgens de tratamento (n=42)</b>
1a	21	26
1b	2	16

A população de estudo foi categorizada em 2 grupos de pacientes conforme tipo de tratamento:

**A) Pacientes não-respondedores**

- 8 amostras de soro de pacientes não-respondedores à terapia dupla com PEG-IFN e RBV após 48 semanas de tratamento (Subtipo 1a: n=7; Subtipo 1b: n=1)
- 15 amostras de soro de pacientes não-respondedores à terapia tripla com telaprevir/boceprevir, PEG-IFN e RBV após 12 semanas de tratamento (carga viral >100 UI/mL com o uso de boceprevir e >1000 UI/mL com o uso de telaprevir) (Subtipo 1a: n=14; Subtipo 1b: n=1)

**B) Pacientes virgens de tratamento**

- 42 pacientes virgens de tratamento (Subtipo 1a: n=26; Subtipo 1b: n=16)

**3.2 Extração do RNA viral**

As amostras de soro foram submetidas à extração do ácido nucleico viral utilizando-se o conjunto de reagentes comercial High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Life Science), conforme as instruções do fabricante e descritas a seguir:

1. Em microtubo de 1,5 mL, foram adicionados 200 µl de soro, 200 µl da solução de trabalho (Binding Buffer com Poly A) e 50 µl de Proteinase K.
2. Incubação por 10 minutos a 72 °C;
3. Foram adicionados 100 µl de Binding Buffer;
4. Combinar os tubos de filtragem com os tubos coletores. As soluções contendo as amostras foram transferidas para os tubos de filtragem com a membrana de sílica gel;
5. Centrifugação por 1 minuto a 8000 g;
6. O conteúdo foi descartado e o tubo de filtragem foi combinado a um novo tubo coletor;
7. Após combinar os tubos, foram adicionados 500 µl do “Inhibitor Removal Buffer” ao tubo de filtragem;

8. Centrifugação por 1 minuto a 8000 g;
9. O conteúdo foi descartado e o tubo de filtragem foi combinado a um novo tubo coletor;
10. Após remover os inibidores, foram adicionados 450 µl de “Wash buffer” ao tubo de filtragem;
11. Centrifugação por 1 minuto a 8000 g;
12. Após a primeira lavagem e centrifugação, o conteúdo foi descartado e o tubo de filtragem foi combinado a um novo tubo coletor;
13. Foram adicionados 450 µl de “wash buffer” ao tubo de filtragem;
14. Centrifugação por 1 minuto a 8000 g e descarte do conteúdo. Centrifugar novamente por 10 segundos a 13000 g para retirar qualquer resíduo do tampão de lavagem;
15. O tubo coletor foi descartado e o tubo de filtragem foi inserido em um microtubo de 1,5 mL;
16. Foram adicionados 50 µl de tampão de eluição ao tubo de filtragem;
17. Centrifugação por 1 minuto a 8000 g;
18. O ácido nucleico eluído foi utilizado para a obtenção do DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa.

### **3.3 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 os subtipos 1a e 1b foram desenhados a partir de sequências brasileiras, considerando a região do genoma que abrange as posições de maior relevância para o estudo de mutações associadas à resistência. Na tabela 3.2, são apresentadas as sequências dos oligonucleotídeos utilizados para as reações de transcrição reversa, PCR e *nested*-PCR.

Tabela 3.2: Oligonucleotídeos utilizados para o estudo da região NS3

Iniciadores	Polaridade	PCR	Posição no genoma	Subtipo	Sequências (5' – 3')
1aF1	Forward	RT-PCR	3456 - 3475	1a	GCCTCYTAGGRTGYATARTYAC
1aR1	Reverse	RT-PCR	3948 – 3967	1a	ACCGGGGACCTCATRGTTGT
1aF2	Forward	Nested-PCR	3466 – 3484	1a	GYATARTCACCAGCYTRAC
1aR2	Reverso	Nested-PCR	3942 – 3961	1a	GACCTCATRGTTGTCTYTAG
1bF1	Forward	RT-PCR	3456 – 3475	1b	CTACTTGGYTGYATCRTCAC
1bR1	Reverso	RT-PCR	4071 – 4090	1b	TTGTACCCTTGGGCYGCRTA
1bF2	Forward	Nested-PCR	3465 – 3484	1b	TGYATCRTCACYAGCCTCAC
1bR2	Reverso	Nested-PCR	3942 - 3961	1b	GACCGCATRGTRGTYTCCAT

### 3.4 RT-PCR

Para a transcrição reversa com subsequente amplificação da região-alvo por PCR foram preparadas reações de mistura contendo o conjunto de reagentes e oligonucleotídeos iniciadores da RT-PCR representativos de cada subtipo indicados no quadro 3.1.

Quadro 3.1: Reagentes da RT-PCR para os subtipos 1a e 1b

Reagentes	Volume de reação
Água destilada DNase RNase free	4,5 µL
2x Reaction Mix	12,5 µL
RNase OUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor 40 U/µL	1 µL
Primer senso (10 pmol)	0,5 µL
Primer anti-senso (10 pmol)	0,5 µL
SuperScript™ III RT / Platinum® Taq DNA Polimerase	1 µL

Foram acrescentados 5 µL do RNA do HCV de cada amostra aos 20 µL da mistura da reação de RT-PCR. As amostras foram colocadas em Termociclador Mastercycler® ep (EPPENDORF) e submetidas a seguidos ciclos de temperatura, conforme descrito a seguir:

**Transcrição Reversa:** 45°C – 45 min

**Desnaturação inicial:** 94°C – 2 min

**Desnaturação:** 94°C – 15 s  
**Hibridização:** 53°C – 30 s  
**Extensão:** 68°C – 90 s

} 35X

**Extensão final:** 68°C – 5 min

4°C

### 3.5 *Nested-PCR*

O DNA obtido após amplificação foi utilizado para uma nova amplificação da região-alvo, utilizando-se iniciadores de síntese internos. Foram preparadas reações de mistura de reagentes de PCR e oligonucleotídeos iniciadores da *nested-PCR* representativos para cada subtipo indicados no quadro 3.2.

Quadro 3.2: Reagentes da *nested-PCR* para os subtipos 1a e 1b

Reagentes	Volume de reação
Água destilada DNase RNase free	84,4 µL
dNTPs 10 mM	2,2 µL
Buffer 10x	11 µL
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	3,3 µL
<i>Primer</i> senso (10 pmol)	1,8 µL
<i>Primer</i> anti-senso (10 pmol)	1,8 µL
Platinum Taq DNA Polimerase (5U/ µL)	0,5 µL

Foram adicionados 5 µL de DNA da reação de RT-PCR em 105 µL da mistura de reagentes da *nested*-PCR correspondente. As amostras foram colocadas em Termociclador Mastercycler® ep (EPPENDORF) e submetidas a seguidos ciclos de temperatura, conforme descrito a seguir:

**Desnaturação inicial:** 94°C – 5 min  
**Desnaturação:** 94°C – 30 s  
**Hibridização:** 55°C – 30 s  
**Extensão:** 72°C – 60 s  
**Extensão final:** 72°C – 1 min  
4°C

} 30X

### **3.6 *Análise dos produtos amplificados***

Os produtos amplificados (495 pb, subtipo 1a; 496 pb, subtipo 1b) foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5%. Foram aplicados 10 µL do produto de *nested*-PCR homogeneizados com 2 µL do tampão da amostra (azul de bromofenol 0,25%) e aplicados no gel de agarose (Agarose 1,5% em tampão TBE 1X - Tris base 90mM, ácido bórico 90mM e EDTA 2mM - contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio). Para comparação do tamanho dos fragmentos amplificados na PCR, foi utilizado 1µL do padrão de peso molecular DNA ladder/100 pb diluído em 9 µL de tampão TBE 1X e 2 µL de tampão da amostra (azul de bromofenol 0,25%), os quais foram aplicados no primeiro orifício do gel de agarose. As amostras foram submetidas à eletroforese (100 Volts) durante aproximadamente 1 hora e o gel foi examinado sob transiluminação ultravioleta UVP® Transilluminator (ClinX, Shanghai, China).

### **3.7 *Purificação e quantificação dos produtos da PCR***

O volume restante de 100 µL do produto de PCR foi submetido à purificação na qual se utilizou o kit comercial High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Life Science). O kit apresenta um sistema de membrana de sílica gel para a ligação do DNA, tampões de lavagem e eluição, conforme orientações do fabricante descritas a seguir:



1. Foram adicionados 500 µl do Binding Buffer para cada 100 µl do PCR em um microtubo de 1,5 mL;
2. Combinou-se o tubo de filtração com o tubo coletor e todo o volume foi adicionado ao tubo de filtração;
3. Centrifugação por a 13000 g por 30-60 segundos;
4. O conteúdo foi descartado e combinou-se o tubo de filtração ao mesmo tubo coletor;
5. Foram adicionados 500 µl de tampão de lavagem ao tubo de filtração;
6. Centrifugação a 13000 g por 1 minuto;
7. O conteúdo foi descartado e combinou-se o tubo de filtração ao mesmo tubo coletor;
8. Foram adicionados 200 µl de tampão de lavagem ao tubo de filtração;
9. Centrifugação a 13000 g por 1 minuto;
10. O conteúdo e o tubo coletor foram descartados para que o tubo de filtração fosse combinado a um microtubo de 1,5 mL;
11. Foram adicionados 50 µl de tampão de eluição ao tubo de filtração;
12. Centrifugação a 13000 g por 1 minuto;
13. Os microtubos contendo o DNA eluído foram estocados a temperatura de -20°C para análise posterior.

Após purificação do produto de PCR foi realizada a quantificação do DNA em gel de agarose 1.5%, utilizando o padrão de peso molecular Low DNA Mass Ladder. De acordo com o volume de produto purificado aplicado no gel foi possível estimar a quantidade de DNA presente em cada banda através da comparação com o padrão de bandas.

### **3.8 Reação de sequenciamento**

Após purificação e quantificação do DNA, as amostras foram sequenciadas em ambas as direções a partir de mistura de reagentes, cada qual contendo os oligonucleotídeos senso e anti-senso empregados na *nested*-PCR de acordo com o subtipo de cada amostra, como especificado a seguir: 5'-GYATARTCACCAGCYTRAC-3' e 5'-GACCTCATRGTTGTCTYTAG-3' para sequenciamento do produto da *nested*-PCR da NS3 do subtipo 1a e 5'-TGYATCRTCACYAGCCTCAC-3' e 5'-GACCGCATRGTRGTYTCCAT-3' para

sequenciamento do produto da nested-PCR da NS3 do subtipo 1b. Foi utilizado o conjunto de reagentes BigDye Terminator versão 3.1 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), de acordo com os volumes de reagentes apresentados no quadro 3.3 a seguir:

Quadro 3.3: Reagentes da reação de seqüenciamento para os subtipos 1a e 1b

Reagentes	Volume da reação
<i>Primer</i> senso ou anti-senso* (3,2 pmol)	1 µl
Tampão 5x	1,5 µl
Big Dye	1 µl

\*Foram realizadas quatro misturas de reagentes, sendo que duas são para o subtipo 1a e duas para o subtipo 1b (cada uma com o *primer* na direção senso ou anti-senso)

Foram distribuídos 6,5 µL de produto purificado em 3,5 µL da mistura de reagentes. As amostras foram colocadas em Termociclador Mastercycler® ep (EPPENDORF) e submetidas a seguidos ciclos de temperatura, conforme descrito a seguir:

**Desnaturação inicial:** 96°C – 2 min  
**Desnaturação:** 94°C – 10 seg  
**Hibridização:** 50°C – 5 seg  
**Extensão:** 60°C – 4 min

} 40x

Após o término dos ciclos, a placa foi mantida em refrigeração (4°C) até ser encaminhada para o sequenciador ABI-3730 (CD Genomics, Nova York, EUA) da plataforma de sequenciamento de DNA do PDTIS/FIOCRUZ ou do Laboratório de Hepatites Virais do IOC/FIOCRUZ.



*al.*, 2008; Kuntzen *et al.*, 2008; Gaudieri *et al.*, 2009; Lenz *et al.*, 2010, Margeridon-Thermet *et al.* 2014). Para a análise da prevalência das mutações associadas à resistência encontradas neste estudo apenas as assinaladas por R foram consideradas. De algumas amostras ilustramos o resultado tal como este é apresentado pelo site.

### **3.11 Alinhamento das sequências em logo**

Para destacar a presença de mutações nos sítios da protease envolvidos na resistência aos inibidores DAAs, foram construídos gráficos em formato logo, utilizando-se a ferramenta WebLogo 3 (<http://weblogo.berkeley.edu/>), a partir do alinhamento de aminoácidos correspondente de cada subtipo (Crooks *et al.*, 2004).

## **4 RESULTADOS**

### ***4.1 Análise das mutações de resistência associadas aos inibidores de protease***

Os resultados das mutações de resistência associadas aos inibidores de protease em pacientes não-respondedores e pacientes virgens de tratamento serão apresentados para cada subtipo do HCV, pois os subtipos 1a e 1b apresentam diferentes padrões de resistência aos IP.

As mutações identificadas após alinhamento das sequências de nucleotídeos dos subtipos 1a e 1b e submissão ao site <http://hcv.geno2pheno.org/index.php> do Max Planck Institute for Informatics) serão demonstradas em quadros relacionando a prevalência de cada mutação observada de acordo com o perfil de paciente incluído no estudo. Cada quadro destaca as mutações associadas à resistência e possível resistência aos IP telaprevir, boceprevir e simeprevir cuja relação entre mutação e medicamento será discutida em tópico posterior.

### ***4.2 Mutações de resistência associadas aos inibidores de protease em pacientes infectados com o subtipo 1a***

O quadro 4.1 apresenta as mutações de resistência e possível resistência em pacientes não-respondedores (terapias dupla e tripla) e virgens de tratamento infectados com o subtipo 1a. Na literatura, poucos estudos foram encontrados com o perfil de pacientes não-respondedores de forma que os dados do presente estudo podem fornecer informações úteis para uma melhor abordagem terapêutica para pacientes com resposta nula ao tratamento realizado.

Quadro 4.1: Mutações identificadas em pacientes não-respondedores (terapia dupla e terapia tripla) e pacientes virgens de tratamento infectados com o subtipo 1a do HCV.

<b>HCV Subtipo 1a</b>		
<b>Não-respondedores</b>		<b>Virgens de tratamento</b>
<b>n=21</b>		
<b>Terapia dupla</b>	<b>Terapia tripla</b>	<b>n=26</b>
<b>n=7</b>	<b>n=14</b>	
V36L	V36M	V36M
2 (28,6%)	5 (35,7%)	1 (3,8%)
N174S	N174S	N174S
2 (28,6%)	1 (7,1%)	3 (11,5%)
	R155K	
	1 (7,1%)	

Conforme evidenciado no quadro 4.1, as mutações observadas em pacientes não-respondedores à terapia dupla com PEG-IFN e RBV infectados com o subtipo 1a (n=7) foram (1) V36L em 2/7 (28,6%) pacientes e (2) N174S em 2/7 (28,6%) pacientes não-respondedores à terapia dupla. Já em pacientes não-respondedores à terapia tripla com telaprevir/boceprevir, PEG-IFN e RBV infectados com o subtipo 1a (n=14), as mutações identificadas foram (1) V36M em 5/14 (35,7%) pacientes, (2) N174S em 1/14 (7,1%) paciente e (3) R155K em 1/14 (7,1%) paciente. As mutações observadas dentre os vinte e seis pacientes incluídos no estudo foram (1) V36M em 1/26 (3,8%) e (2) N174S em 3/26 (11,5%) pacientes.

Os resultados destacam que mutações na posição 36 foram encontradas nos três perfis de pacientes incluídos no estudo, o que pode estar relacionado com uma maior taxa de falha terapêutica em pacientes infectados com o subtipo 1a que apresentam mutações no sítio V36 (V36L e V36M). Já a mutação N174S, cujo relato na literatura para cada um dos perfis de pacientes incluídos no presente estudo é escasso, foi observada nos três perfis de pacientes.

#### 4.2.1 Mutações de resistência associadas aos inibidores de protease em pacientes não-respondedores à terapia dupla com PEG-IFN e RBV infectados com o subtipo 1a

O quadro 4.2 destaca as mutações de resistência e possível resistência observadas em pacientes não-respondedores à terapia dupla com PEG-IFN e RBV pertencentes ao subtipo 1a (n=7) e sua relação com os IP telaprevir, boceprevir e simeprevir após análise realizada pelo site geno2pheno.

Quadro 4.2: Mutações associadas à resistência e possível resistência aos IP de primeira geração (boceprevir e telaprevir) e de segunda geração (simeprevir) observadas em pacientes não-respondedores à terapia dupla infectados com o subtipo 1a.

HCV Subtipo 1a			
Não-respondedores		Resistência	
Mutações	Terapia dupla (n=7)	BOC/TVR	SMP
V36L	2 (28,6%)	R (BOC) PR (TVR)	PR
N174S	2 (28,6%)	PR (TVR)	—

Legenda: BOC: Boceprevir; TVR: Telaprevir; SMP: Simeprevir; PR: Possível resistente/ R: Resistente/ - :Substituição não associada ao medicamento após análise no site geno2pheno

A mutação V36L foi identificada em 2/7 (28,6%) pacientes não-respondedores à terapia dupla. Em relação ao telaprevir e simeprevir, esse polimorfismo indica uma possibilidade de resistência, enquanto que para o boceprevir foi observado estar associado à resistência, de modo que o uso de boceprevir está menos indicado para estes pacientes (Figura 4.1). A mutação N174S foi identificada em 2/7 (28,6%) pacientes não-respondedores à terapia dupla. De acordo com o site geno2pheno, essa mutação representa uma possível resistência ao telaprevir e apenas uma substituição não associada à resistência para o telaprevir. Além das mutações destacadas no quadro 4.2 foi identificada, após submissão de sequência ao site geno2pheno, a substituição I170V em 1/7 (14,3%) pacientes não-respondedores à terapia dupla, entretanto evidencia-se que essa substituição não está relacionada à resistência para esse perfil de paciente.







Drug Resistance		
Drugs	Scored mutations	Resistance analysis
Asunaprevir	none	susceptible 
Boceprevir	36L	resistant 
Grazoprevir	none	susceptible 
Paritaprevir	none	susceptible 
Simeprevir	36L	possibly resistant 
Telaprevir	36L	possibly resistant 
Detailed Mutation Information		
	Mutation	Resistance analysis
Boceprevir	36L	resistant
Simeprevir	36L	possibly resistant
Telaprevir	36L	possibly resistant

Figura 4.1: Resultado da mutação na posição 36 (V36L) e sua relação com os inibidores de protease após submissão de sequência deste estudo ao site geno2pheno.

A prevalência total de resistência em pacientes não-respondedores à terapia dupla infectados pelo subtipo 1a foi de 28,6% (apenas a mutação V36L foi considerada cuja resistência ao boceprevir foi discutida). Consideraram-se apenas as mutações associadas à resistência, ou seja, não foram consideradas as mutações com possibilidade de resistência e substituição.

#### **4.2.2 Mutações de resistência associadas aos inibidores de protease em pacientes não-respondedores à terapia tripla com telaprevir/boceprevir, PEG-IFN e RBV infectados com o subtipo 1a**

O quadro 4.3 apresenta as mutações encontradas em pacientes não-respondedores à terapia tripla com telaprevir/boceprevir, PEG-IFN e RBV (n=14) pertencentes ao subtipo 1a. O objetivo de avaliar esse perfil de paciente foi destacar em cada caso se há ou não a possibilidade de retratamento com simeprevir diante da falha terapêutica observada com o uso dos IP de primeira geração.



Quadro 4.3: Mutações associadas à resistência e possível resistência aos IP de primeira geração (boceprevir e telaprevir) e de segunda geração (simeprevir) observadas em pacientes não-respondedores à terapia tripla infectados com o subtipo 1a.

<b>HCV Subtipo 1a</b>			
<b>Não-respondedores</b>		<b>Resistência</b>	
<b>Mutações</b>	<b>Terapia tripla (n=14)</b>	<b>BOC/TVR</b>	<b>SMP</b>
V36M	5 (35,7%)	R	PR
R155K	1 (7,1%)	R	R
N174S	1 (7,1%)	PR (TVR)	—

Legenda: BOC: Boceprevir; TVR: Telaprevir; SMP: Simeprevir; PR: Possível resistente/ R: Resistente/ - :Substituição não associada ao medicamento após análise no site geno2pheno

A mutação V36M foi identificada em 5/14 (35,7%) pacientes não-respondedores à terapia tripla e de acordo com análise do site geno2pheno, está diretamente relacionada à resistência para os IP de primeira geração boceprevir e telaprevir e representa uma possível resistência ao simeprevir (Figura 4.2). Já a mutação R155K foi observada em 1/14 (7,1%) pacientes não-respondedores à terapia tripla e está relacionada à resistência para os IP de primeira e segunda geração. Destaca-se que juntamente com esta mutação, identificamos a mutação V36M neste paciente que também influencia de maneira negativa a resposta antiviral ao telaprevir, pois, indica resistência a esse DAA (Figura 4.3). A mutação N174S foi identificada em 1/14 (7,1%) pacientes não-respondedores à terapia tripla. Algumas substituições não associadas à resistência foram destacadas no perfil genético de alguns pacientes, tais como: V55I (12/14; 86%), Q80L (1/14; 7,1%), S122T (1/14; 7,1%), R155C (1/14; 7,1%), R155S (1/14; 7,1%) e I170L (1/14; 7,1%).







Drug Resistance		
Drugs	Scored mutations	Resistance analysis
Asunaprevir	none	susceptible 
Boceprevir	36M	resistant 
Grazoprevir	none	susceptible 
Paritaprevir	none	susceptible 
Simeprevir	36M	possibly resistant 
Telaprevir	36M	resistant 
Detailed Mutation Information		
	Mutation	Resistance analysis
<b>Boceprevir</b>	36M	resistant
<b>Simeprevir</b>	36M	possibly resistant
<b>Telaprevir</b>	36M	resistant

Figura 4.2: Resultado da mutação na posição 36 (V36M) e sua relação com os inibidores de protease após submissão de sequência deste estudo ao site geno2pheno.







Drug Resistance		
Drugs	Scored mutations	Resistance analysis
Asunaprevir	155K	resistant 
Boceprevir	36M,55I,155K	resistant 
Grazoprevir	155K	possibly resistant 
Paritaprevir	155K	resistant 
Simeprevir	36M,155K	resistant 
Telaprevir	36M,55I,155K	resistant 
Detailed Mutation Information		
	Mutation	Resistance analysis
<b>Asunaprevir</b>	155K	resistant
<b>Boceprevir</b>	155K	resistant
	36M	resistant
	55I	substitution on scored position
<b>Grazoprevir</b>	155K	possibly resistant
<b>Paritaprevir</b>	155K	resistant
<b>Simeprevir</b>	155K	resistant
	36M	possibly resistant
<b>Telaprevir</b>	155K	resistant
	36M	resistant
	55I	substitution on scored position

Figura 4.3: Resultado das mutações nas posições 36 e 155 e sua relação com os inibidores de protease após submissão de sequência deste estudo ao site geno2pheno.

A prevalência total de resistência em pacientes não-respondedores à terapia tripla infectados pelo subtipo 1a foi de 42,8% (foram consideradas apenas as mutações V36M e R155K que estão relacionadas à resistência para telaprevir/boceprevir). Neste cálculo, também não foram consideradas as mutações com possibilidade de resistência e substituição.

#### **4.2.3 Mutações de resistência associadas aos inibidores de protease em pacientes virgens de tratamento infectados com o subtipo 1a**

O quadro 4.4 evidencia as mutações encontradas em pacientes virgens de tratamento infectados com o subtipo 1a (n=26).

Quadro 4.4: Mutações associadas à resistência e possível resistência aos IP de primeira geração (boceprevir e telaprevir) e segunda geração (simeprevir) observadas em pacientes virgens de tratamento infectados com o subtipo 1a.

<b>HCV Subtipo 1a</b>			
<b>Virgem de tratamento (n=26)</b>		<b>Resistência</b>	
<b>Mutações</b>	<b>n</b>	<b>BOC/TVR</b>	<b>SMP</b>
V36M	1 (3,8%)	R	PR
N174S	3 (11,5%)	PR (TVR) SB (BOC)	–

Legenda: BOC: Boceprevir; TVR: Telaprevir; SMP: Simeprevir; PR: Possível resistente/ R: Resistente/ SB: Substituição/ - :Substituição não associada ao medicamento após análise no site geno2pheno

A mutação V36M foi observada em 1/26 (3,8%) pacientes virgens de tratamento. Quando relacionada ao simeprevir, indica uma possível resistência, entretanto quando comparada aos IP de primeira geração boceprevir e telaprevir, indica resistência. A mutação N174S foi identificada em 3/26 (11,5%) pacientes virgens de tratamento incluídos neste estudo e representa uma possível resistência para o medicamento telaprevir e apenas uma substituição não associada à resistência para o medicamento boceprevir. O site geno2pheno não evidenciou grau de resistência para o simeprevir, sendo os pacientes candidatos ao uso deste medicamento (Figura 4.4). Assim como nos outros perfis de pacientes também foram

evidenciadas substituições não relacionadas à resistência aos IP, tais como: V55I (12/26; 46,1%), R117C (1/26; 3,8%), S122G (1/26; 3,8%) e N174K (1/26; 3,8%.

Drug Resistance		
Drugs	Scored mutations	Resistance analysis
Asunaprevir	none	susceptible
Boceprevir	174S	substitution on scored position
Grazoprevir	none	susceptible
Paritaprevir	none	susceptible
Simeprevir	none	susceptible
Telaprevir	174S	possibly resistant
Detailed Mutation Information		
	Mutation	Resistance analysis
Boceprevir	174S	substitution on scored position
Telaprevir	174S	possibly resistant

Figura 4.4: Resultado da mutação na posição 174 e sua relação com os inibidores de protease após submissão de sequência deste estudo ao site geno2pheno.

A prevalência total de resistência em pacientes virgens de tratamento infectados pelo subtipo 1a foi de 3,8% (a mutação V36M foi a única que demonstrou relação de resistência aos IP). Neste cálculo, também não foram consideradas as mutações com possibilidade de resistência e substituições.

### **4.3 Mutações de resistência associadas aos inibidores de protease em pacientes infectados com o subtipo 1b**

O quadro 4.5 apresenta as mutações de resistência em pacientes não-respondedores à terapia dupla, terapia tripla e virgens de tratamento infectados com o subtipo 1b. No tratamento da hepatite C, a definição dos subtipos é importante visto que pacientes infectados com o subtipo 1a tendem a apresentar maiores taxas de recidiva quando comparados aos pacientes infectados com o subtipo 1b (Ermis *et al.*, 2015), o que poderia explicar uma menor ênfase em relação a abordagem sobre mutações de resistência para esse subtipo. Entretanto, cabe ressaltar a importância de estudos sobre resistência para pacientes tratados com IP como conhecimento teórico para uma melhor abordagem terapêutica naqueles que não respondem à

terapia dupla com PEG-IFN e RBV ou tripla com telaprevir/boceprevir, PEG-IFN e RBV infectados com o subtipo 1b.

Quadro 4.5: Mutações identificadas em pacientes não-respondedores (terapia dupla e terapia tripla) e pacientes virgens de tratamento infectados com o subtipo 1a do HCV.

<b>HCV Subtipo 1b</b>		
<b>Não-respondedores</b>		<b>Virgens de tratamento</b>
<b>n=2</b>		
<b>Terapia dupla</b>	<b>Terapia tripla</b>	
<b>n=1</b>	<b>n=1</b>	<b>n=16</b>
F43V	—	T54S
1 (100%)		1 (6,3%)
		Q80H
		1 (6,3%)
		Q80K
		1 (6,3%)

O quadro 4.5 destaca que a mutação observada em paciente não-respondedor à terapia dupla com PEG-IFN e RBV infectado com o subtipo 1b (n=1) foi a F43V. No estudo em questão não foram identificadas mutações de resistência para o paciente não-respondedor à terapia tripla infectado com o subtipo 1b (n=1). Em relação aos pacientes virgens de tratamento infectados com o subtipo 1b (n=16), as mutações observadas foram (1) T54S, (2) Q80H e (3) Q80K. Cada uma das mutações foi identificada com a prevalência de 6,3%, o que corresponde a 1 dentre os 16 pacientes virgens de tratamento. Ressaltando que as mutações não foram identificadas no mesmo paciente, e sim em três pacientes distintos.

### 4.3.1 Mutações de resistência associadas aos inibidores de protease em pacientes não-respondedores à terapia dupla com PEG-IFN e RBV infectados com o subtipo 1b

O quadro 4.6 ressalta as mutações associadas à resistência e possível resistência encontradas em paciente não-respondedor à terapia dupla com PEG-IFN e RBV (n=1).

Quadro 4.6: Mutações associadas à resistência e possível resistência aos IP de primeira geração (boceprevir e telaprevir) e segunda geração (simeprevir) para pacientes não-respondedores à terapia dupla infectados com o subtipo 1b.

HCV Subtipo 1b			
Não-respondedores		Resistência	
Mutações	Terapia dupla (n=1)	BOC/TVR	SMP
F43V	1 (100%)	PR (BOC) SB (TVR)	R

Legenda: BOC: Boceprevir; TVR: Telaprevir; SMP: Simeprevir; PR: Possível resistente/ R: Resistente/ SB: Substituição

A mutação F43V foi identificada em 1/1 (100%) paciente não-respondedor à terapia dupla e, de acordo com análise realizada pelo site gen2pheno está associada à resistência ao simeprevir e possível resistência à boceprevir. A substituição I170V foi observada em 1/1 (100%) paciente não-respondedor à terapia dupla, porém não apresenta associação com resistência após submissão da sequência ao site geno2pheno (Figura 4.5).

	Mutation	Resistance analysis
Asunaprevir	36V	substitution on scored position
	43V	possibly resistant
Boceprevir	170V	substitution on scored position
	36V	substitution on scored position
	36V	substitution on scored position
Grazoprevir	36V	substitution on scored position
Simeprevir	43V	resistant
	36V	substitution on scored position
	170V	substitution on scored position
	36V	substitution on scored position
Telaprevir	170V	substitution on scored position
	43V	substitution on scored position
	36V	substitution on scored position

Figura 4.5: Resultado das mutações nas posições 43 e 170 e sua relação com os inibidores de protease após submissão de sequência deste estudo ao site geno2pheno.

A mutação F43V não foi relatada em estudos *in vivo* em pacientes não-respondedores à terapia dupla. Sendo assim, o resultado para essa mutação não será incluído no cálculo de prevalência total de resistência nesse perfil de pacientes. Além disso, por ser um estudo que incluiu amostras de conveniência, um paciente apresentando essa mutação é indicativo de resistência conforme discutido, contudo mais estudos seriam necessários para corroborar com a evidência de resistência para o simeprevir. Diante do exposto, a prevalência total de resistência em pacientes não-respondedores à terapia dupla infectados com o subtipo 1b não foi estimada devido ao “n” reduzido e pouco suporte científico.

#### ***4.3.2 Mutações de resistência associadas aos inibidores de protease em pacientes não-respondedores à terapia tripla com telaprevir/boceprevir, PEG-IFN e RBV infectados com o subtipo 1b***

Não foram identificadas mutações de resistência ou possível resistência nesse perfil de paciente, somente a substituição I170V, entretanto não está associada à resistência aos IP de acordo com análise do site geno2pheno. Diante do exposto, a prevalência total de resistência para pacientes não-respondedores à terapia tripla infectados com o subtipo 1b foi de 0%.

#### ***4.3.3 Mutações de resistência associadas aos inibidores de protease em pacientes virgens de tratamento infectados com o subtipo 1b***

O quadro 4.7 ressalta as mutações de resistência e possível resistência em pacientes virgens de tratamento infectados com o subtipo 1b (n=16). As mutações relacionadas são aquelas associadas aos IP de primeira geração (boceprevir e telaprevir) e de segunda geração (simeprevir).

Quadro 4.7: Mutações associadas à resistência e possível resistência aos IP de primeira geração (boceprevir e telaprevir) e segunda geração (simeprevir) para pacientes virgens de tratamento infectados com o subtipo 1b.

<b>HCV Subtipo 1b</b>			
<b>Virgem de tratamento (n=16)</b>		<b>Resistência</b>	
Mutações	n	BOC/TVR	SMP
T54S	1 (6,3%)	R (BOC) PR (TVR)	SB
Q80H	1 (6,3%)	–	PR
Q80K	1 (6,3%)	–	R

Legenda: BOC: Boceprevir; TVR: Telaprevir; SMP: Simeprevir; PR: Possível resistente/ R: Resistente/ SB: Substituição/ - :Substituição não associada ao medicamento após análise no site geno2pheno

A mutação T54S foi identificada em 1/16 (6,3%) pacientes virgens de tratamento infectados pelo subtipo 1b, com o resultado de resistência ao boceprevir, possível resistência ao telaprevir e substituição não associada à resistência para o simeprevir obtido através da análise realizada pelo site geno2pheno (Figura 4.6). Já a mutação Q80H foi identificada em 1/16 (6,3%) pacientes virgens de tratamento infectados pelo subtipo 1b e é apontada no site geno2pheno como possivelmente resistente ao simeprevir (Figura 4.7). A mutação Q80K foi observada em 1/16 (6,3%) dos pacientes virgens de tratamento infectados pelo subtipo 1b e de acordo com análise realizada pelo site do Instituto Max Planck, indica resistência ao simeprevir (Figura 4.8). Substituições não associadas à resistência após submissão de sequências ao site geno2pheno foram evidenciadas, tais como: V55I (1/16; 6,3%), R117C (1/16; 6,3%), S122T (2/16; 12,5%), I170V (8/16; 50%) e S174T (1/16; 6,3%).

A prevalência total de resistência em pacientes virgens de tratamento infectados pelo subtipo 1b foi de 12,6% (soma das prevalências das mutações T54S e Q80K). Neste cálculo, também não foram consideradas as mutações com possibilidade de resistência e substituições.



Drug Resistance		
Drugs	Scored mutations	Resistance analysis
Asunaprevir	none	susceptible
Boceprevir	36V,54S,55I,170V	resistant
Grazoprevir	none	susceptible
Paritaprevir	none	susceptible
Simeprevir	36V,170V	substitution on scored position
Telaprevir	36V,54S,55I,170V	possibly resistant

Detailed Mutation Information		
	Mutation	Resistance analysis
<b>Boceprevir</b>		
	54S	resistant
	55I	substitution on scored position
	36V	substitution on scored position
	170V	substitution on scored position
<b>Simeprevir</b>		
	36V	substitution on scored position
	170V	substitution on scored position
<b>Telaprevir</b>		
	54S	possibly resistant
	55I	substitution on scored position
	170V	substitution on scored position
	36V	substitution on scored position

Figura 4.6: Resultado da mutação na posição 54 e sua relação com os inibidores de protease após submissão de sequência deste estudo ao site geno2pheno.

	Mutation	Resistance analysis
<b>Asunaprevir</b>		
	36V	substitution on scored position
	80H	substitution on scored position
<b>Boceprevir</b>		
	170V	substitution on scored position
	36V	substitution on scored position
<b>Grazoprevir</b>		
	36V	substitution on scored position
<b>Simeprevir</b>		
	80H	possibly resistant
	36V	substitution on scored position
	170V	substitution on scored position
<b>Telaprevir</b>		
	170V	substitution on scored position
	36V	substitution on scored position

Figura 4.7: Resultado da mutação na posição 80 (Q80H) e sua relação com os inibidores de protease após submissão de sequência deste estudo ao site geno2pheno.

Drug Resistance		
Drugs	Scored mutations	Resistance analysis
Asunaprevir	80K	possibly resistant
Boceprevir	36V	substitution on scored position
Grazoprevir	none	susceptible
Paritaprevir	none	susceptible
Simeprevir	36V,80K	resistant
Telaprevir	36V,117C	substitution on scored position
Detailed Mutation Information		
	Mutation	Resistance analysis
<b>Asunaprevir</b>		
	80K	possibly resistant
<b>Boceprevir</b>		
	36V	substitution on scored position
<b>Simeprevir</b>		
	80K	resistant
	36V	substitution on scored position
<b>Telaprevir</b>		
	117C	substitution on scored position
	36V	substitution on scored position

Figura 4.8: Resultado da mutação na posição 80 (Q80K) e sua relação com os inibidores de protease após submissão de sequência deste estudo ao site geno2pheno.

#### 4.4 Alinhamento das sequências em logo

O programa WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>) é uma ferramenta com o potencial de gerar representações gráficas na forma de logotipo a partir do alinhamento de múltiplas sequências. Essas representações indicam uma descrição precisa de características intrínsecas às sequências e revelam graus de variabilidade de um determinado aminoácido. Cada logotipo consiste em letras referentes aos aminoácidos em cada posição da sequência estudada. A altura de cada aminoácido (medida em bits) reflete sua relativa frequência na posição correspondente. No presente estudo, foi gerada uma representação gráfica das sequências de aminoácidos da protease do HCV para os subtipos 1a e 1b.

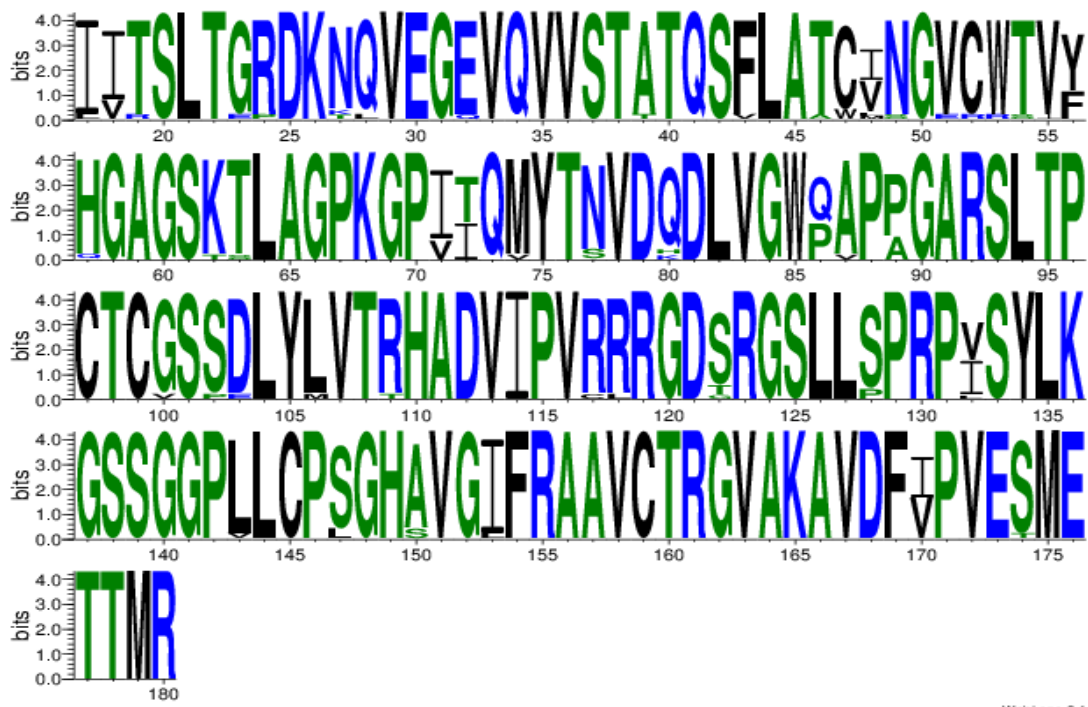
Na figura das sequências de aminoácidos do subtipo 1a (figura 4.9) podemos observar que a região sequenciada apresenta alto grau de conservação, com

apenas poucas posições com grande variabilidade como na região compreendida entre os aminoácidos 40 e 55, esta última relacionada com mutações associada com resistência aos IP quando a substituição for V55A. Nas sequências deste estudo referentes ao subtipo 1a, 24/47 (51%) amostras sequenciadas apresentaram o aminoácido isoleucina (I). Esta proporção é muito maior do que a observada em amostras de outros países, onde é encontrada em baixa frequência (Margeridon-Thermet *et al.*, 2014). Na posição 80 em sequências do subtipo 1a, 45 amostras sequenciadas apresentaram o aminoácido glutamina (Q), uma o aminoácido leucina (L) e em nenhuma foi encontrada o aminoácido lisina (K).



Figura 4.9: Representação gráfica dos aminoácidos obtida através de análise no programa WebLogo (subtipo 1a).

Na figura das sequências de aminoácido do subtipo 1b (figura 4.10) podemos observar que a região sequenciada apresenta uma maior variabilidade em diversas posições de aminoácidos. Trabalhos anteriores relatam a maior variabilidade das sequências brasileiras do subtipo 1b (Lampe *et al.*, 2013). Em relação às posições associadas com resistência destacamos a posição 80, onde uma sequência apresentou o aminoácido histidina (H) e uma a mutação de resistência lisina (K).



WebLogo 3.4

Figura 4.10: Representação gráfica dos aminoácidos obtida através de análise no programa WebLogo (subtipo 1b).

## 5 DISCUSSÃO

A identificação de mutações de resistência e possível resistência para os IP telaprevir, boceprevir e simeprevir é relevante para o entendimento da melhor abordagem terapêutica a ser utilizada. A informação descrita no presente trabalho associa as mutações a cada medicamento para o perfil de pacientes não-respondedores a um tratamento prévio ou virgens de tratamento visando o tratamento ideal, ou seja, que permita alcançar a RVS e a inexistência de complicações decorrentes da doença. Ao estudar pacientes não-respondedores à terapia dupla, foi possível avaliar a relação de cada mutação observada com a resistência primária que poderiam ou não causar mesmo antes da abordagem terapêutica com DAAs. Já com a utilização dos DAAs telaprevir e boceprevir no tratamento e posterior falha terapêutica dos pacientes incluídos no estudo após 12 semanas de tratamento, foi essencial a identificação de mutações que revelaram maior ou menor chance de sucesso terapêutico com o uso de simeprevir conforme recomendado no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções de 2015.

Diante da evolução no tratamento antiviral da hepatite C com os DAAs, poucos estudos discutem resistência em pacientes submetidos à terapia dupla com PEG-IFN e RBV, entretanto é importante ressaltar que diante da mutação observada em sequência nucleotídica é possível relacionar o paciente com uma abordagem terapêutica com menor chance de falha em um possível retratamento com IP. A mutação V36L, identificada com prevalência de 28,6%, está associada à resistência para boceprevir, de modo que seu uso estaria menos indicado para os dois pacientes com falha terapêutica para PEG-IFN e RBV em um futuro tratamento com DAAs. Mesmo com a escassez de informações sobre resistência para esse perfil de paciente, estudo de Hoffmann e colaboradores (2013) avaliou a heterogeneidade de sequências da região NS3 de um grupo de pacientes brasileiros com hepatite C crônica tratados com PEG-IFN e RBV. Entre os 68 pacientes avaliados, três (4,4%) apresentaram pelo menos uma mutação relacionada à resistência para telaprevir e boceprevir, dentre elas a mutação V36L. Essa mutação foi identificada em todos os momentos do tratamento com terapia dupla (antes, durante e depois) em 1/10 (10%) paciente infectado com o subtipo 1a com cargas virais indetectáveis durante o tratamento e reicidiu após seis meses de tratamento. Este estudo brasileiro, assim

como a prevalência de 28,6% para essa mutação evidenciada no presente estudo, destaca a influência negativa da mutação V36L no tratamento com IP, principalmente para o boceprevir. A mutação N174S, identificada com prevalência de 28,6%, representa uma possível resistência ao telaprevir e apenas uma substituição não associada à resistência para o telaprevir em pacientes não-respondedores à terapia dupla, permitindo então concluir que essa mutação apresenta um baixo grau de resistência primária em pacientes que não foram submetidos ao tratamento com DAAs e possivelmente apresentam alta probabilidade de sucesso terapêutico através de um retratamento com simeprevir. A escassez de informações na literatura referente a essa mutação para pacientes não-respondedores dificulta uma análise mais fidedigna de qual seria a melhor abordagem terapêutica quanto ao uso de IP, principalmente para o simeprevir cujos estudos não demonstraram relatos dessa mutação em pacientes não-respondedores.

Além das mutações de resistência e possível resistência destacadas no presente estudo, destaca-se também a identificação de substituições não associadas à resistência como forma de ampliar os conhecimentos sobre resistência entre diferentes perfis de pacientes. Em pacientes não-respondedores à terapia dupla infectados com o subtipo 1a, observou-se a substituição I170V com prevalência de 14,3%. Essa substituição não está associada à resistência de acordo com análise do site geno2pheno, e não se encontram relatos sobre sua influência para pacientes não-respondedores à PEG-IFN e RBV. Conclui-se que a causa de falha terapêutica para esse paciente não está relacionada a essa substituição, visto que fatores do hospedeiro (genótipo CT ou TT do gene IL28B) ou fatores virais (grau de fibrose) também podem estar associados a um pior prognóstico para a resposta terapêutica. Em estudo brasileiro de Zeminian e colaboradores (2013) que incluiu pacientes com hepatite C crônica não tratados com IP, sendo 28/37 (75,68%) submetidos ao tratamento com PEG-IFN ressalta que a substituição I170V não altera as características físico-químicas dos aminoácidos em comparação com o aminoácido selvagem e que as implicações desse fato para a resistência ainda permanecem incertas. Essa informação é interessante no sentido de que outras causas além da resistência podem influenciar na futura abordagem para o paciente que apresenta essa substituição relacionada à diversidade genética que o HCV apresenta entre os isolados brasileiros.

Em relação às mutações observadas em pacientes não-respondedores à terapia tripla com telaprevir/boceprevir, PEG-IFN e RBV pertencentes ao subtipo 1a, destaca-se a mutação V36M com prevalência de 35,7%, sendo esta relacionada à resistência para os IP de primeira geração boceprevir e telaprevir. O tratamento por DAAs para o paciente com mutação V36M deve ser considerado de forma cautelosa diante das possibilidades de resistência envolvendo IP. Tal mutação pode ter representado falha terapêutica para o IP de primeira geração utilizado, além disso, sua presença constitui um preditor de mau prognóstico no tratamento antiviral da hepatite C com o uso de simeprevir. Sullivan e colaboradores (2013) realizaram uma análise retrospectiva com o objetivo de determinar a prevalência de mutações de resistência entre pacientes tratados com telaprevir em ensaios clínicos de fase 3. Entre os 388 pacientes não-respondedores incluídos no estudo, 299 apresentaram mutações de resistência (subtipo 1a: 232/269; 86%). A mutação V36M foi identificada em 28/232 (12%) pacientes com falha terapêutica para telaprevir, evidenciando assim sua importância como mutação indicativa de resistência cujo mau prognóstico não revela confiabilidade no uso de IP de primeira geração. Já em estudo de Barnard e colaboradores (2013), diferentes mutações de resistência foram detectadas em pacientes não-respondedores à terapia tripla com boceprevir/PEG-IFN e RBV infectados pelo subtipo 1a. Dentre elas, está a mutação V36M com uma alta prevalência de 60% indicando ser um preditor de possível falha terapêutica com o uso de IP de primeira geração. Poucos dados da literatura revelam a importância dessa mutação no tratamento com terapia dupla através do uso de boceprevir/telaprevir, entretanto a prevalência de 35,7% encontrada no presente estudo revela que a mutação V36M apresenta considerável associação à resistência para boceprevir e telaprevir.

Já a mutação R155K, observada com prevalência de 7,1% entre pacientes não-respondedores à terapia tripla, corrobora com dados da literatura no sentido de estar associada à elevado grau de resistência aos IP de primeira geração e segunda geração. O estudo de Nishiya e colaboradores (2014) ressalta que a substituição na posição 155 (R155K) necessita apenas da transição de um único nucleotídeo para conferir resistência no subtipo 1a, enquanto que a mutação no subtipo 1b necessita de 2 trocas de nucleotídeos (transversão), ou seja, a barreira genética para resistência aos inibidores de protease pode variar de acordo com os diferentes subtipos do HCV. Pawlotsky e colaboradores (2011) reportaram maior frequência de

falha virológica para o subtipo 1a devido à baixa barreira genética para resistência viral quando comparado ao subtipo 1b. Mesmo que esteja presente em apenas uma amostra, é importante destacar sua presença em um paciente não-respondedor a terapia antiviral com telaprevir, PEG-IFN e RBV, sendo um preditor de mau prognóstico no tratamento antiviral da hepatite C. Destaca-se que no mesmo paciente foi identificada a mutação V36M que também indica resistência a telaprevir. A combinação de mutações nos *locus* 36 e 155 representam alta resistência para o telaprevir e pode inibir a ação da droga (Sarrazin *et al.*, 2007).

A escassez de comprovação científica da associação entre a mutação N174S, identificada com prevalência de 7,1% no presente estudo, e resistência em pacientes não-respondedores à terapia tripla com telaprevir/boceprevir foi considerado o resultado relatado através do site do Instituto Max Planck de possível resistência para o telaprevir. Conclui-se que a mutação N174S não apresenta influência negativa para o tratamento antiviral da hepatite C com simeprevir, de modo que o site não informa características de resistência para este medicamento.

O estudo sobre mutações de resistência, possível resistência e substituições em pacientes virgens de tratamento infectados com o subtipo 1a torna possível determinar em cada caso se aquele paciente é um candidato ao uso de simeprevir como uma abordagem terapêutica que resultaria em maiores taxas de RVS. Ressaltando que em ensaios clínicos de pacientes em tratamento prévio, como o QUEST-1, por exemplo, a taxa de RVS de pacientes tratados com simeprevir, PEG-IFN e RBV na 12ª semana de tratamento foi de 80%, enquanto aqueles tratados com PEG-IFN e RBV foi de 50%.

A mutação V36M é uma das mutações mais comuns relacionadas ao subtipo 1a, além da mutação R155K (Schneider *et al.*, 2014) e foi observada no presente estudo com prevalência de 3,8% entre pacientes virgens de tratamento infectados com o subtipo 1a. As substituições V36A/G/L/M estão relacionadas a níveis médios de resistência para telaprevir (Welsch *et al.*, 2008), o que corrobora com resultado indicado pelo site geno2pheno na qual a mutação V36M está relacionada à resistência para o IP de primeira geração telaprevir. Em estudo anterior realizado por Peres-da-Silva e colaboradores (2010) não foram detectadas mutações na posição 36 em amostras do subtipo 1a, mas apenas nas do subtipo 1b (5,6%; V36L). O estudo realizado por Nishiya e colaboradores (2014) em doadores de sangue em São Paulo ressalta a baixa prevalência (4%) da mutação V36L em amostras



brasileiras do subtipo 1a. Estas frequências estão próximas às encontradas nos EUA (1-2% para V36M) e Europa (3–6% para V36L e V55A). A mutação V36M, assim como a V55A, quando associada a uma baixa resposta ao interferon pode determinar uma baixa RVS em pacientes tratados com boceprevir (Howe *et al.*, 2013).

Já a mutação N174S, identificada no presente estudo com prevalência de 11,5% entre pacientes virgens de tratamento infectados com o subtipo 1a também foi relatada no estudo de Paolucci e colaboradores (2012) em pacientes virgens de tratamento e está associada à possível resistência para boceprevir/telaprevir. Os três pacientes na condição de pré-tratamento incluídos no presente estudo seriam, portanto, candidatos à terapia antiviral com simeprevir, para o qual não foi evidenciada relação de resistência.

Dentre as substituições identificadas a partir da análise do site geno2pheno para os pacientes virgens de tratamento referentes ao subtipo 1a, está a substituição V55I com prevalência de 46,1%. A análise realizada através do site do Instituto Max Planck não menciona que a posição 55 está relacionada à resistência aos IP lineares boceprevir e telaprevir, porém, indica apenas uma substituição de aminoácidos que é suscetível aos IP relacionados, incluindo o simeprevir. Estudo realizado por Margeridon-Thermet e colaboradores (2014) destaca a mutação V55I como sendo uma substituição de aminoácido resistente aos IP de baixa prevalência, com apenas uma amostra entre 136 de pacientes virgens de tratamento relacionados ao subtipo 1a. Palanisamy e colaboradores (2013) destacaram a prevalência dessa mutação em 5,7% (3/57) entre os pacientes virgens de tratamento infectados pelo subtipo 1a. Destaca-se, portanto, a discrepância de resultados diante de uma maior prevalência evidenciada no nosso estudo quando comparado aos da literatura. A substituição S122G, identificada com prevalência de 3,8% no presente estudo, também não está associada à resistência de acordo com o site gen2pheno, o que corrobora com resultado discutido por Izquierdo e colaboradores (2014), relatando que esta substituição não está associada à resistência ao simeprevir.

Em relação às demais mutações descritas na literatura associadas à resistência aos IP, tais como V55A e T54S, estas não foram observadas no presente estudo. A mutação V55A foi evidenciada em 7,5% dos pacientes virgens de tratamento em pesquisa de Palanisamy e colaboradores (2013), podendo estar relacionada a uma baixa RVS quando associada a uma baixa resposta ao interferon

(na fase “*lead-in*”) durante o tratamento com boceprevir (apenas 7% dos pacientes obtiveram RVS no estudo de Howe *et al.*, 2013). A combinação de mutações em dois diferentes códon, tais como T54S e V55I, foi observada também por Palanisamy e colaboradores (2013), e não parece afetar o aumento de resistência aos IP, estando associado a um baixo nível de resistência. As mutações A156T e R155K foram descritas como sendo de resistência moderada a alta aos IPs (Bartels *et al.*, 2008; Zeuzem *et al.*, 2005; Tong *et al.*, 2006, 2008). Estas mutações não foram observadas nesse perfil de pacientes, em concordância com estudo anterior realizado por nosso grupo (Peres-da-Silva *et al.*, 2010), onde os *locus* R155 e A156 foram conservados entre todas sequências analisadas em pacientes virgens de tratamento infectados com o subtipo 1a.

A análise das mutações associadas à resistência e possível resistência entre pacientes infectados com o subtipo 1b do HCV, revela uma importante observação relacionada à mutação F43V na qual foi identificada pela primeira vez *in vivo* em paciente não-responder à terapia dupla com PEG-IFN e RBV e de acordo com resultado do site gen2pheno está associada à resistência ao simeprevir. Lenz e colaboradores (2010) descreveram o perfil de resistência *in vitro* para os IP e destacaram que o *locus* F43 está associado à resistência ao simeprevir. Algumas mutações de resistência determinaram diferentes níveis de susceptibilidade (nas posições 43, 80, 155 e 156) sendo que a mutação F43V demonstrou significativa redução nos níveis de susceptibilidade ao simeprevir *in vitro* quando comparada à mutação F43S que obteve um efeito mais modesto em relação à resistência aos IP de segunda geração para o subtipo 1b. Concluiu-se que *in vitro* a mutação F43V apresenta maiores níveis de resistência quando comparada a mutação F43S. Não existia ainda na literatura estudo *in vivo* que relate a presença da mutação F43V em pacientes não-respondedores à terapia dupla, entretanto é considerável destacar a importância dessa mutação para o estudo de resistência relacionado ao simeprevir, visto que em único paciente do presente estudo esta mutação foi observada e relatou-se o perfil de resistência à terapia dupla com PEG-IFN e RBV, podendo indicar, maior possibilidade de falha terapêutica com o uso de simeprevir quando comparado aos IP de primeira geração.

Cabe ressaltar que as mutações de resistência T54A, T54S, V55A, A156S e V170A identificadas em estudo de Barnard e colaboradores (2013) que incluiu pacientes não-respondedores à terapia tripla infectados com o subtipo 1b, não foram

observadas no paciente do presente estudo. Para esse perfil de paciente, não foram identificadas mutações de resistência ou possível resistência, somente a substituição I170V. Concluiu-se então que a falha terapêutica pode estar relacionada a fatores intrínsecos do hospedeiro ou fatores virais que resultem em um mau prognóstico da doença.

Dentre as mutações observadas em pacientes virgens de tratamento infectados com o subtipo 1b, está a mutação T54S com baixa prevalência de 6,3%. Estudo realizado em São Paulo (Nishiya *et al.*, 2014), evidencia a presença dessa mutação em 2/75 (2,7%) dos pacientes infectados pelo subtipo 1b do HCV, destacando assim, baixa prevalência do polimorfismo T54S em estudos brasileiros, conforme também demonstrado por nosso grupo (Peres-da-Silva *et al.*, 2012), com prevalência 6,25% (1/16) entre o mesmo perfil de pacientes. Já em estudos internacionais, Shepherd e colaboradores (2015) ressaltaram que a mutação T54S confere baixa resistência para boceprevir e telaprevir, mas não para simeprevir (Sarrazin *et al.*, 2007; Kieffer *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2013), conforme também observado no presente estudo de modo que a análise realizada pelo site geno2pheno revela que a mutação T54S é indicativa de resistência para boceprevir, possível resistência ao telaprevir e apenas uma substituição não associada à resistência para o simeprevir. Kuntzen e colaboradores (2008) identificaram a mutação T54S em 2/145 (1,4%) dos pacientes virgens de tratamento infectados com o subtipo 1b. Baixa prevalência também foi evidenciada por Margeridon-Thermet e colaboradores (2014), onde a mutação T54S foi identificada em 1/55 (1,8%). Diante do exposto, concluiu-se que o uso dos IP de primeira geração para o tratamento desse paciente pode acarretar na falha terapêutica, sendo este um possível candidato para a terapia antiviral por simeprevir, visto que a presença dessa mutação não está relacionada à resistência ao IP de segunda geração.

Ao relacionar a mutação Q80H com uma possível resistência à simeprevir conforme apontado pelo site geno2pheno, destaca-se que não foi possível encontrar estudos brasileiros que apresentem essa mutação entre pacientes virgens de tratamento. Entretanto em estudos internacionais como o de Suzuki e colaboradores (2010), a mutação Q80H juntamente com as mutações V36A, T54S e D168E foram detectadas em 15/307 (4,9%) dos pacientes japoneses sem tratamento prévio infectados com o subtipo 1b, definindo assim uma baixa prevalência nesse perfil de paciente, assim como identificado no presente estudo.

No presente estudo, não foi observada a mutação Q80K em isolados do subtipo 1a, tendo sido detectada apenas em uma amostra do subtipo 1b de um paciente virgem de tratamento. No Brasil esta mutação não foi relatada anteriormente em amostras do subtipo 1b, confirmando a sua baixa prevalência. A mutação Q80K é observada com mais frequência em isolados do subtipo 1a e raramente é detectada em amostras do subtipo 1b. No trabalho de Alves e colaboradores (2013), analisando 1383 sequências da região NS3 disponíveis no GenBank, a mutação Q80K foi detectada em 36% das sequências do subtipo 1a, enquanto que apenas 0,2% das sequências do subtipo 1b apresentavam esta mutação.

A prevalência do polimorfismo Q80K varia de acordo com as regiões geográficas, onde EUA apresentam maiores níveis de prevalência permanecendo entre 37-47% (Bae *et al.*, 2010; Bartels *et al.*, 2013). No estudo realizado por Margeridon-Thermet e colaboradores (2014) nos EUA, a prevalência dessa mutação foi de 22% (30/136 infectados pelo subtipo 1a) e não foi evidenciada presença dessa mutação para o subtipo 1b. Na Europa, Shepherd e colaboradores (2015) evidenciaram prevalência de 13,69% (20/146) na coorte de pacientes escoceses virgens de tratamento, taxas estas similares às encontradas na França (10,5%), Itália (10,1%), Londres (16%) e Suécia (5,7%) (Vicenti *et al.*, 2012; Palanisamy *et al.*, 2013; Morel *et al.*, 2014; Leggewie *et al.*, 2013). Shepherd destaca ainda, que a presença da mutação Q80K ou Q80R influencia negativamente a adição do uso de simeprevir à terapia com PEG-IFN e RBV, e por essa razão, foi recomendado tanto nos EUA como na Europa que pacientes infectados com o subtipo 1a com evidência dessas mutações, não sejam tratados com simeprevir.

No Brasil, contrastando com dados de outros países, a prevalência da mutação Q80K é muito baixa. Peres-da-Silva e colaboradores (2012) ao analisarem a distribuição desta mutação em relação à posição filogenética relativa aos dois subgrupos (clade) do subtipo 1a verificaram que a mutação Q80K foi encontrada na maioria das sequências do GenBank relativas à clade 1 com 60% das sequências do subtipo 1a exibindo o aminoácido lisina (K) no sítio 80, enquanto que 97,5% das sequências da clade 2 permaneceram conservados com o aminoácido glutamina (Q). As sequências da América do Norte são encontradas com maior frequência na clade 1, enquanto que as da Europa são mais comumente observadas na clade 2. As amostras brasileiras formam um ramo separado na clade 1, contudo

apresentaram uma frequência muito baixa do aminoácido K na posição 80, apenas uma amostra (2%), em 47 sequenciadas, apresentou esta mutação no trabalho de Peres-da-Silva e colaboradores (2012). Estes dados são condizentes com os do presente trabalho no qual nenhuma sequência dentre as 47 analisadas do subtipo 1a apresentou a mutação Q80K, demonstrando que os subtipos do HCV de diferentes regiões geográficas apresentam um padrão distinto de diversidade genética.

Outros estudos realizados no Brasil confirmam a baixa prevalência da mutação Q80K. Hoffmann e colaboradores (2013) analisaram uma coorte de 68 pacientes do Rio de Janeiro, infectados cronicamente com o genótipo 1 e tratados com PEG-IFN e RBV. A mutação T54S foi detectada em 1 paciente não-respondedor (1/32) e 1 paciente que atingiu a RVS no sétimo dia de tratamento (1/26), enquanto que as mutações V36L e V55A foram observadas em 1 paciente recidivante (1/10), porém, a mutação Q80K não foi identificada em nenhum desses perfis de pacientes. Nishiya e colaboradores (2014) analisaram a existência de variantes de resistência aos IP em uma população de doadores de sangue de São Paulo (n=125) e a mutação Q80K não foi encontrada nessa casuística. Um total de 171 pacientes virgens de tratamento por IP (54 infectados com o subtipo 1a e 117 com o subtipo 1b) foi incluído em estudo realizado por de Carvalho e colaboradores (2014) em São Paulo que detectou a mutação Q80K em apenas uma sequência referente ao subtipo 1a e em nenhuma sequência do subtipo 1b. O aminoácido glutamina (Q) permaneceu conservado na posição 80 entre 52 das 54 sequências do subtipo 1a e em 114 das 117 sequências do subtipo 1b. A mutação Q80L, não associada à resistência aos IP de primeira e segunda geração, foi identificada em 1 e 3 sequências dos subtipos 1a e 1b, respectivamente. Nos estudos de Vidal e colaboradores (2015) cujo objetivo foi o de avaliar a prevalência global da mutação Q80K em 3082 sequências correspondentes à pacientes virgens de tratamento obtidos através dos bancos de dados Los Alamos e GenBank foi também constatado que no Brasil a prevalência foi baixa, de 0,9% (1/110) para o subtipo 1a, enquanto que para o subtipo 1b a mutação Q80K não foi encontrada (0/115).

Os dados desse trabalho destacam que os isolados brasileiros do HCV apresentam um padrão distinto de polimorfismos associados à resistência ao simeprevir em relação ao observado em diversos países do continente europeu e nos EUA, de modo que o uso de simeprevir tem alta probabilidade de apresentar

efetividade em nosso país. Além disso, diante dos resultados alcançados nesse estudo em concordância com os da literatura, podemos concluir que não há necessidade de teste de resistência para pacientes brasileiros infectados por subtipos 1a e 1b do HCV.

## 6 PERSPECTIVAS

As perspectivas com este projeto incluem a elaboração de artigo científico e publicação em periódico indexado com o objetivo de divulgação dos resultados obtidos neste trabalho.

A continuação da linha de pesquisa envolve:

- O estudo de mutações de resistência associadas aos antivirais de ação direta Sofosbuvir e Daclatasvir aprovados pela Anvisa para o tratamento antiviral da hepatite C;
- Comparação entre a análise de mutações de resistência encontradas em sequências brasileiras obtidas no GenBank e as encontradas no presente estudo de acordo com o perfil do paciente;

## 7 CONCLUSÕES

- O grupo de pacientes infectados pelo subtipo 1a que apresentou maior prevalência de mutações de resistência foi o de não-respondedores à terapia tripla (42,8%). Entre os pacientes infectados pelo subtipo 1b, o grupo que apresentou a maior prevalência de mutações de resistência foi o de pacientes virgens de tratamento (12,6%);
- O subtipo 1a apresentou maior frequência de mutações de resistência (75,2%) quando comparado ao subtipo 1b (12,6%);
- A mutação de resistência V36M (6/65) foi a mais frequente na amostragem incluída no estudo;
- A mutação Q80K associada à resistência ao simeprevir não foi observada em nenhum paciente infectado pelo subtipo 1a, ao contrário do subtipo 1b onde a mutação Q80K foi detectada pela primeira vez no Brasil em uma cepa de HCV referente a um paciente virgem de tratamento;
- Destaca-se, portanto, um padrão distinto de polimorfismos associados à resistência ao simeprevir nas amostras brasileiras comparado às de países do continente europeu e EUA onde a prevalência de Q80K é relativamente alta;
- A baixa prevalência de mutação na posição 80 (1/65; 1,5%) sugere que não há necessidade de teste de resistência antes do início do tratamento com simeprevir, em pacientes brasileiros infectados pelos subtipos 1a e 1b do HCV.



## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Affonso de Araújo, Evaldo Stanislau; Barone, Antonio Alci. Hepatite C. Barueri: Editora Manole Ltda., 2010. 556 p.

Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:12766-12771.

Albecka A, Montserret R, Krey T, Tarr AW, Diesis E, Ball JK *et al.* Identification of New Functional Regions in Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2. *Journal of Virology* 2011 85(4), 1777–1792.

Alborino F, Burighel A, Tiller FW, van Helden J, Gabriel C, Raineri A *et al.* Multicenter evaluation of a fully automated third-generation anti-HCV antibody screening test with excellent sensitivity and specificity. *Med Microbiol Immunol* 2011; 200: 77-83.

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.

American Association for the Study of Liver Diseases. AASLD Practice Guidelines: Recommendations for Testing, Managing and Treating Hepatitis C [Internet]. AASLD; 2014. Available from: [www.aasld.org](http://www.aasld.org).

Asselah T, Marcellin P. Second-wave IFN-based triple therapy for HCV genotype 1 infection: Simeprevir, faldaprevir and sofosbuvir. *Liver Int.* 2014 34 Suppl 1:60-8.

Backus LI, Boothroyd DB, Phillips BR, Belperio P, Halloran J, Mole LA. A sustained virologic response reduces risk of allcause mortality in patients with hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011; 9: 509-516.e1.

Bae A, Sun SC, Qi X, Chen X, Ku K, Worth A, Wong KA *et al.* Susceptibility of treatment-naïve hepatitis c virus (HCV) clinical isolates to HCV protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54, 5288-5297.

Barnard RJ, Howe JA, Ogert RA, Zeuzem S, Poordad F, Gordon SC *et al.* Analysis of boceprevir resistance associated amino acid variants (RAVs) in two phase 3 boceprevir clinical trials. *Virology* 2012; 444, 329–336.

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. *J Infect Dis* 2008; 198:800–807.

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; Feb;87(3):1544-53.

Bartenschlager R, Ahlborn-Laake L, Mous J, Jacobsen H. Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *J Virol* 1994; 68(8):5045-55.

Bartosch B, Cosset FL. Cell entry of hepatitis C virus. *Virology* 2006 Apr 25; 348(1):1-12.

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.

Brandão-Mello CE. Tratamento da hepatite crônica pelo vírus C – Novas perspectivas. *JBM* 2014 Janeiro/Fevereiro, Vol. 102 N° 1.

Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST A e HV. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2011. Available from: [http://www.aids.gov.br/publicacao/2011/protocolo\\_clinico\\_e\\_diretrizes\\_terapeuticas\\_para\\_hepatite\\_viral\\_c\\_e\\_coinfeccoes](http://www.aids.gov.br/publicacao/2011/protocolo_clinico_e_diretrizes_terapeuticas_para_hepatite_viral_c_e_coinfeccoes).

Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST A e HV. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções - Suplemento 1 [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2013. [http://www.aids.gov.br/publicacao/2011/protocolo\\_clinico\\_e\\_diretrizes\\_terapeuticas\\_para\\_hepatite\\_viral\\_c\\_e\\_coinfeccoes](http://www.aids.gov.br/publicacao/2011/protocolo_clinico_e_diretrizes_terapeuticas_para_hepatite_viral_c_e_coinfeccoes).

Brass V, Moradpour D, Blum HE. Molecular Virology of Hepatitis C Virus (HCV): 2006 Update. *International Journal of Medical Sciences* 2006; 3(2):29-34.

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

Bukh J. Animal models for the study of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Gastroenterology* 2012; 142:1279–1287.

Campiotto S, Pinho JR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJ, Spinelli V *et al.* Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2005 Jan; 38(1):41-9.

Centers for Disease Control and Prevention. Hepatitis C Information for Health Professionals [Internet]. 2014. Disponível em: <http://www.cdc.gov/hepatitis/HCV/HCVfaq.htm>.

Charlton M. Hepatitis C infection in liver transplantation. *Am J Transplant* [Internet]. 2001 Sep [cited 2015 Apr 24]; 1(3):197–203. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12102252>.

Chen S, Morgan T. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *International Journal of Medical Sciences*, 2006; 3(2), 47-52.

Chevaliez S, Soulier A, Poiteau L, Bouvier-Alias M, Pawlotsky JM. Clinical utility of hepatitis C virus core antigen quantification in patients with chronic hepatitis C. *J Clin Virol* 2014; 61: 145-148

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 Apr 21; 244(4902):359-62.

Cocquerel L, Voisset C, Dubuisson J. Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J Gen Virol*. 2006 May; 87(Pt 5):1075-84.

Colin C, Lanoir D, Touzet S, Meyaud-Kraemer L, Bailly F, Trepo C. Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature. *J Viral Hepat* 2001; 8:87-95.

Corver J, Ortiz A, Allison SL, Schlich J, Heinz FX, Wilschut J. Membrane fusion activity of tick-borne encephalitis virus and recombinant subviral particles in a liposomal model system. *Virology* 2000; 269:37-46.

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 Jun; 14 (6): 1188-90.

Cubero M, Esteban JI, Otero T, Sauleda S, Bes M, Esteban R *et al*. Naturally occurring NS3-protease-inhibitor resistant mutant A156T in the liver of an untreated chronic hepatitis C patient. *Virology* 2008; 370:237–245.

DATASUS. Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN [Internet]. 2014. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb>.

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' noncoding region. *J Gen Virol* 1995; 76 ( Pt 5):1197-204.

Disponível em: <http://www.medscape.com>, acesso em 23 de Outubro de 2015.

Disponível em: <http://www.hcv.lanl.gov>, acesso em 15 de Dezembro de 2015.

De Carvalho IM, Alves R, de Souza PA, da Silva EF, Mazo D, Carrilho FJ *et al.* Protease inhibitor resistance mutations in untreated Brazilian patients infected with HCV: novel insights about targeted genotyping approaches. *J Med Virol.* 2014; Oct: 86 (10):1714-21.

De Luca A, Di Giambenedetto S, Prosperi M, Lo Presti A, Torti C, Caudai C *et al.* Two distinct HCV genotype 1a clades: geographical distribution and association with natural resistance mutations to HCV NS3/4A inhibitors. *Antiviral Ther.* 2013; 18 (Suppl 1):A47.

Drazan KE. Molecular biology of hepatitis C infection. *Liver Transplantation* 2000; 6:396-406.

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.

EMA.[http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002777/human\\_med\\_001766.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002777/human_med_001766.jsp&mid=WC0b01ac058001d124).

Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C *et al.* Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996; 334:77– 81.

Ermis F, Tasci ES. New treatment strategies for hepatitis c infection. *World J Hepatol.* 2015 Aug 18; 7(17): 2100–2109.

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 Apr 10; 292(15):767-70.

Focaccia R. (2013). Tratado de Hepatites Virais e Doenças Associadas. São Paulo: Atheneu.

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.

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.

Gaudieri S, Rauch A, Pfafferott K, Barnes E, Cheng W, McCaughan G *et al*. Hepatitis C virus drug resistance and immune-driven adaptations: relevance to new antiviral therapy. *Hepatology* 2009; 49:1069–1082.

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.

Grakoui A, Wychowsky C, Lin C, Feinstone S, Rice C. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol*. 1993a Mar; 67(3): 1385–1395.

Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice C. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993b Nov 15; 90(22): 10583–10587.

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.

Haid S, Pietschmann T, Pécheur EI. Low pH-dependent hepatitis C virus membrane fusion depends on E2 integrity, target lipid composition, and density of virus particles. *J Biol Chem* 2009; 284: 17657-17667.

Helle F, Wychowski C, Vu-Dac N, Gustafson KR, Voisset C, Dubuisson J. Cyanovirin-N inhibits hepatitis C virus entry by binding to envelope protein glycans. *J Biol Chem*. 2006 Sep 1; 281(35):25177-83.

Hézode C, Forestier N, Dusheiko G, Ferenci P, Pol S, Goeser T *et al*. PROVE2 Study Team. Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N Engl J Med*. 2009 Apr 30; 360(18):1839-50.

Hijikata M, Mizushima H, Akagi T, Mori S, Kakiuchi N, Kato N *et al*. Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol*. 1993 Aug; 67(8): 4665–4675.

Hoffmann L, Ramos JA, Souza EV, Araújo Ramos AL, Villela-Nogueira CA, Urményi TP *et al*. Dynamics of resistance mutations to NS3 protease inhibitors in a cohort of Brazilian patients chronically infected with hepatitis C virus (genotype 1) treated with pegylated interferon and ribavirin: a prospective longitudinal study. *Virology* 2013; 50: 57.

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.

Howe J, Long J, Black S, Chase R, McMonagle P, Curry S *et al*. Pooled clinical trial analyses of the effects of detectable baseline HCV NS3/4a resistance-associated

variants on the efficacy of boceprevir + pegylated interferon/ribavirin therapy. *Hepatology* 2013; 58.

Imazeki F, Yokosuka O, Omata M. Impact of IL28B SNPs on control of hepatitis C virus infection: a genome wide association study. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010; 8(5):49.

Izquierdo L, Helle F, François C, Castelain S, Duverlie G, Brochet E. Simeprevir for the treatment of hepatitis C virus infection. *Pharmgenomics Pers Med.* 2014 Aug; 14;7:241-9.

Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, Di Bisceglie AM, Reddy KR, Bzowej NH *et al.* ADVANCE Study Team. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2011 Jun 23; 364(25):2405-16.

Jacobson IM, Dore GJ, Foster GR, Fried MW, Radu M, Rafalsky VV *et al.* Simeprevir with pegylated interferon alfa 2a plus ribavirin in treatment-naive patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection (QUEST-1): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2014 Aug 2; 384(9941):403-13.

Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda. OLYSIO (simeprevir) - Bula do profissional de saúde aprovada pela ANVISA [Internet]. 2015. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/index.asp](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/index.asp).

Jiang M, Mani N, Lin C, Ardzinski A, Nelson M, Reagan D *et al.* In vitro phenotypic characterization of hepatitis C virus NS3 protease variants observed in clinical studies of telaprevir. *Antimicrob Agents Chemother* 2013 Dec; 57(12):6236-45.

Kato N, Ootsuyama Y, Ohkoshi S, Nakazawa T, Sekiya H, Hijikata M *et al.* Characterization of hypervariable regions in the putative envelope protein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 Nov 30; 189(1):119-27.

Katze MG, He Y, Gale M Jr. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:675–687.



Kieffer TL, De Meyer S, Bartels DJ, Sullivan JC, Zhang EZ, Tigges A *et al.* Hepatitis C viral evolution in genotype 1 treatment-naïve and treatment-experienced patients receiving telaprevir-based therapy in clinical trials. *PLoS One* 2012; 7(4):e34372.

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.

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.

Korth MJ, Katze MG. Evading the interferon response: hepatitis C virus and the interferon induced protein kinase, PKR. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2000; 242:197-224.

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.

Kumada H, Toyota J, Okanoue T, Chayama K, Tsubouchi H, Hayashi N. Telaprevir with peginterferon and ribavirin for treatment-naïve patients chronically infected with HCV of genotype 1 in Japan. *J Hepatol* 2012; 56: 78–84.

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: 1769-1778.1.

Kwo PY, Lawitz EJ, McCone J, Schiff ER, Vierling JM, Pound D *et al.* SPRINT-1 investigators. Efficacy of boceprevir, an NS3 protease inhibitor, in combination with peginterferon alfa-2b and ribavirin in treatment-naïve patients with genotype 1

hepatitis C infection (SPRINT-1): an open-label, randomised, multicentre phase 2 trial. *Lancet*. 2010 Aug 28; 376 (9742): 705-16.

Lam BP, Jeffers T, Younoszai Z, Fazel Y, Younossi ZM. The changing landscape of hepatitis C virus therapy: focus on interferon-free treatment. *Therap Adv Gastroenterol*. 2015 Sep;8(5):298-312.

Lampe E, Lewis-Ximenez L, Espírito-Santo MP, Delvaux NM, Pereira SA, Peres-da-Silva A *et al*. Genetic diversity of HCV in Brazil. *Antivir Ther*. 2013; 18 (3 Pt B):435-44.

Lagacé L, White PW, Bousquet C, Dansereau N, Dô F, Llinas-Brunet M *et al*. In vitro resistance profile of the hepatitis C virus NS3 protease inhibitor BI 201335. *Antimicrob Agents Chemother* 2012 Jan; 56(1):569-72.

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

Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect*. 2011 Feb; 17(2):107-15.

Leggiewie M, Sreenu VB, Abdelrahman T, Leitch EC, Wilkie GS, Klymenko T *et al*. Natural NS3 resistance polymorphisms occur frequently prior to treatment in HIV-positive patients with acute hepatitis C. *AIDS* 2013 Sep 24; 27(15):2485-8.

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

Lenz O, Verbinnen T, Lin TI, Vijgen L, Cummings MD, Lindberg J *et al*. In vitro resistance profile of the hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor TMC435. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 May; 54(5):1878-87.

Lenz O, Fevery B, Vijgen L *et al*. 2013. TMC-435 in patients infected with HCV genotype 1 who failed previous pegylated interferon/ribavirin treatment: virologic analyses of the ASPIRE trial. In: Presented at 49th Annual Meeting of the European

Association for the Study of the Liver, 18–22 April 2013, Barcelona, Spain. (Abstract 1329).

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

McPhee F, Hernandez D, Yu F *et al.* A description of virologic escape in HCV genotype 1-infected patients treated with daclatasvir (BMS-790052) in combination with ribavirin and peginterferon alfa-2a or peinterferon alfa-2b. *J. Hepatol.* 2012; 56, S473.

McPhee F, Toyota J, Chayama D *et al.* Analysis of HCV resistance variants in a phase 3 trial of daclatasvir combined with asunaprevir for Japanese patients with genotype 1b infection. In: 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease, 1–5 November, 2013, Washington DC, USA. (Abstract 1111).

Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed. Philadelphia: Elsevier; 2010.

Manns M, Marcellin P, Poordad F, de Araujo ES, Buti M, Horsmans Y *et al.* Simeprevir with pegylated interferon alfa 2a or 2b plus ribavirin in treatment-naive patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection (QUEST-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* 2014; 384(9941):414-26.

Magiorkinis G, Magiorkinis E, Paraskevis D, Ho SY, Shapiro B, Pybus OG *et al.* The Global Spread of Hepatitis C Virus 1a and 1b: A Phylodynamic and Phylogeographic Analysis. *PLoS Med.* 2009 Dec; 6(12):e1000198.

Margeridon-Thermet S, Le Pogam S, Li L, Liu TF, Shulman N, Shafer RW *et al.* Similar prevalence of low-abundance drug-resistant variants in treatment-naive patients with genotype 1a and 1b hepatitis C virus infections as determined by ultradeep pyrosequencing. *PLoS One.* 2014 Aug 20; 9(8):e105569.

Martell M, Esteban JI, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R *et al.* Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J. Virol.* 1992; 66, 3225–3229.

McCaffrey K, Gouklani H, Boo I, Poubourios P, Drummer HE. The variable regions of hepatitis C virus glycoprotein E2 have an essential structural role in glycoprotein assembly and virion infectivity. *J Gen Virol.* 2011 Jan; 92.

Mclauchlan, J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat.* 2000 Jan; 7(1):2-14.

McHutchison JG, Everson GT, Gordon SC, Jacobson IM, Sulkowski M, Kauffman R *et al.* PROVE1 Study Team. Telaprevir with peginterferon and ribavirin for chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med.* 2009 Apr 30; 360(18):1827-38.

Ministério da Saúde [homepage na internet]. Doenças transmissíveis. Hepatites virais [acesso em 22 de fevereiro de 2009]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=28074](http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=28074).

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST A e HV. Relatório técnico do estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil: dados preliminares. Recife: Ministério da Saúde; 2010.

Moesker B, Rodenhuis-Zybert IA, Meijerhof T, Wilschut J, Smit JM. Characterization of the functional requirements of West Nile virus membrane fusion. *J Gen Virol* 2010; 91:389-393.

Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *HEPATOLOGY* 2013; 57:1333-1342.

Morel V, Duverlie G, Brochot E. Patients eligible for treatment with simeprevir in a French center. *J Clin Virol.* 2014 Sep; 61(1):149-51.

Murphy DG, Willems B, Deschenes M, Hilzenrat N, Mousseau R, Sabbah S. Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences. *J Clin Microbiol* 2007; 45:1102-1112.

Neddermann P, Clementi A, De Francesco R. Hyperphosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein requires an active NS3 protease, NS4A, NS4B, and NS5A encoded on the same polyprotein. *J Virol* 1999; 73(12):9984-91.

Neumann, AU, Lam NP, Dahari H *et al.* Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 1998; 282, 103–107.

Nishiya AS, Almeida-Neto C, Ferreira SC, Alencar CS, Di-Lorenzo-Oliveira C, Levi JE *et al.* HCV Genotypes, Characterization of Mutations Conferring Drug Resistance to Protease Inhibitors, and Risk Factors among Blood Donors in São Paulo, Brazil. *PLoS One*. 2014 Jan 21; 9(1):e86413.

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

Palanisamy N, Danielsson A, Kokkula C, Yin H, Bondeson K, Wesslén L *et al.* Implications of baseline polymorphisms for potential resistance to NS3 protease inhibitors in Hepatitis C virus genotypes 1a, 2b and 3a. *Antiviral Res.* 2013 Jul; 99(1):12-17.

Paolucci S, Fiorina L, Piralla A, Gulminetti R, Novati S, Barbarini G *et al.* Naturally occurring mutations to HCV protease inhibitors in treatment-naïve patients. *Virol J.* 2012 Oct 24; 9:245.

Pawlotsky JM. Hepatitis C virus resistance to antiviral therapy. *Hepatology* 2000; 32:889–896.

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

Pawlotsky JM, Chevaliez S, McHutchison JG. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology* 2007 May; 132(5):1979-98.

Pawlotsky JM. Treatment failure and resistance with direct-acting antiviral drugs against hepatitis C virus. *Hepatology* 2011 53: 1742–1751.

Penin F. Structural biology of hepatitis C virus. *Clin Liver Dis* 7 2003 1–21.

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: 807-811.

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.

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.

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 Aug; 108:181-91.

Poordad F, McCone J Jr, Bacon BR, Bruno S, Manns MP, Sulkowski MS *et al.* SPRINT-2 Investigators. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med.* 2011 Mar 31; 364(13):1195-206.

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* [Internet]. 1997 Mar 22 [cited 2015 Jan 11]; 349(9055):825–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9121257>.

Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções 2015. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/publicacao/2015/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-hepatite-c-e-coinfecoes>.

Pybus OG, Cochrane A, Holmes EC, Simmonds P. The hepatitis C virus epidemic among injecting drug users. *Infect Genet Evol* 2005; 5:131-139.

Pybus OG, Barnes E, Taggart R, Lemey P, Markov PV, Rasachak B *et al*. Genetic history of hepatitis C virus in East Asia. *J Virol*. 2009 Jan; 83(2):1071-82.

Roth WK, Weber M, Buhr S, Drosten C, Weichert W, Sireis W *et al*. Yield of HCV and HIV-1 NAT after screening of 3.6 million blood donations in central Europe. *Transfusion* 2002; 42(7):862-8.

Santolini E, Migliaccio G, La Monica N. Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol*. 1994 Jun; 68(6):3631-41.

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

Schneider MD, Sarrazin C. Antiviral therapy of hepatitis C in 2014: do we need resistance testing? *Antiviral Res*. 2014 May; 105:64-71.

Schregel V, Jacobi S, Penin F, Tautz N. Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 5342–5347.

Shepherd SJ, Abdelrahman T, MacLean AR, Thomson EC, Aitken C, Gunson RN. Prevalence of HCV NS3 pre-treatment resistance associated amino acid variants within a Scottish cohort. *J Clin Virol*. 2015 Apr; 65:50-3.

Sherman K, Flamm S, Afdhal N, Nelson D, Sulkowski M, Everson G *et al*. Response-guided telaprevir combination treatment for hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2011; 365: 1014–1024.

Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B *et al*. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol*. 1993 Nov; 74 ( Pt 11):2391-9.

Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C *et al*. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994 May; 19(5):1321-4.

Simmonds P. The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. *J Gen Virol* 2001; 82:693-712.

Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S *et al*. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005 Oct; 42(4):962-73.

Smith DB, Pathirana S, Davidson F, Lawlor E, Power J, Yap PL, Simmonds P. The origin of hepatitis C virus genotypes. *J Gen Virol* 1997; 78(Pt 2): 321-328.

Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, Simmonds P. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: update criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* 2014 Jan; 59(1):318-27.



Soriano V, Vispo E, Poveda E, Labarga P, Martin-Carbonero L, Fernandez-Montero JV *et al.* Directly acting antivirals against hepatitis C virus. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Aug; 66(8):1673-86.

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.

Sullivan JC, De Meyer S, Bartels DJ, Dierynck I, Zhang EZ, Spinks J *et al.* Evolution of treatment-emergent resistant variants in telaprevir phase 3 clinical trials. *Clin Infect Dis.* 2013 Jul;57(2):221-9.

Susser S, Welsch C, Wang Y, Zettler M, Domingues FS, Karey U *et al.* Characterization of resistance to the protease inhibitor boceprevir in hepatitis C virus-infected patients. *Hepatology* 2009; 50: 1709-1718.

Suzuki F, Sezaki H, Akuta N, Suzuki Y, Seko Y, Kawamura Y *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; 54:352-354

Swain MG, Lai MY, Shiffman ML, Cooksley WG, Zeuzem S, Dieterich DT *et al.* A sustained virologic response is durable in patients with chronic hepatitis C treated with peginterferon alfa-2a and ribavirin. *Gastroenterology* 2010; 139: 1593-1601.

Stiasny K, Fritz R, Pangerl K, Heinz FX. Molecular mechanisms of flavivirus membrane fusion. *Amino Acids* 2011; 41:1159-1163.

Strauss E. Hepatite C. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2001 jan-fev, 34(1):69-82.

Sung PS, Shin EC, Yoon SK. Interferon Response in Hepatitis C Virus (HCV) Infection: Lessons from Cell Culture Systems of HCV Infection. *Int J Mol Sci*. 2015 Oct 7; 16(10):23683-94.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, and Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 2013 30: 2725-2729.

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 Aug; 5(4):419-27.

Tempestilli M, Lionetti R, D'Offizi G, Montalbano M, Giaffreda A, Fazio S *et al*. Increased plasma concentration of ribavirin as a result of renal dysfunction in hepatitis C virus patients treated with telaprevir. *Hepatology* 2014; 60:1109–1110.

The European Association for the Study of the Liver. Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection [Internet]. EASLD; 2014. Available from: [www.easl.eu](http://www.easl.eu).

Thomas DL, Astemborski J, Rai RM, Anania FA, Schaeffer M, Galai N *et al*. The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors. *JAMA* 2000; 284(4):450-6.

Tillmann HL. Hepatitis C virus core antigen testing: role in diagnosis, disease monitoring and treatment. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 6701-6706.

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

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: 177-185.

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.

US FDA. Olysio (Simeprevir) for the Treatment of Chronic Hepatitis C in Combination Antiviral Treatment. Disponível em: <http://www.fda.gov/forpatients/illness/hepatitisbc/ucm377234.htm>.

Vicenti I, Rosi A, Saladini F, Meini G, Pippi F, Rossetti B *et al.* Naturally occurring hepatitis C virus (HCV) NS3/4A protease inhibitor resistance-related mutations in HCV genotype 1-infected subjects in Italy. *J Antimicrob Chemother* 2012 Apr; 67(4):984-7.

Vidal LL, Santos AF, Soares MA. Worldwide distribution of the NS3 gene 80K polymorphism among circulating hepatitis C genotype 1 viruses: implication for simeprevir usage. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Jul; 70(7):2024-7.

Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z *et al.* Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med.* 2005 Jul; 11(7):791-6.

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 Jan 23; 9(1):R16.

Welch NM, Jensen DM. Pegylated interferon based therapy with second-wave direct-acting antivirals in genotype 1 chronic hepatitis C. *Liver Int.* 2015 Jan; 35 Suppl 1:11-7.

World Health Organization. Guidelines for the Screening, Care and Treatment of Persons with Hepatitis C Infection [Internet]. Geneva, editor. World Health Organization; 2014. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK263483/>.

Wyles DL. Beyond telaprevir and boceprevir: resistance and new agents for hepatitis C virus infection. *Top Antivir Med*. 2012 Oct-Nov; 20(4):139-45.


You S, Stump DD, Branch AD, Rice CM. A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2004; 78(3): 1352-66.

Zeminian LB, Padovani JL, Corvino SM, Silva GF, Pardini MI, *et al*. Variability and resistance mutations in the hepatitis C virus NS3 protease in patients not treated with protease inhibitors. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013; 108: 13–17.

Zeuzem S, Sarrazin C, Rouzier R, Tarral A, Brion N, Forestier N *et al*. Anti-viral activity of SCH 503034, a HCV protease inhibitor administered as monotherapy in HCV-1 patients refractory to pegylated interferon (PEG-INF- $\alpha$ ). *Hepatology* 2005 42: 233A-234A.

## 9 ANEXOS

### Anexo 1: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (Parecer número 204.445)

<b>HOSPITAL UNIVERSITÁRIO GAFFRÉE E GUINLE/HUGG/UNIRIO</b>		
<b>PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</b>		
<b>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</b>		
<b>Título da Pesquisa:</b> Mutações em genes não-estruturais do vírus da hepatite C associadas à resistência às drogas antivirais de ação direta		
<b>Pesquisador:</b> ADILSON JOSÉ DE ALMEIDA		
<b>Área Temática:</b> Área 4. Equipamentos, insumos e dispositivos para saúde novos, ou não registrados no país.		
<b>Versão:</b> 2		
<b>CAAE:</b> 12361913.9.0000.5258		
<b>Instituição Proponente:</b> Hospital Universitário Gaffrée e Guinle/HUGG/UNIRIO		
<b>Patrocinador Principal:</b> Financiamento Próprio		
<b>DADOS DO PARECER</b>		
<b>Número do Parecer:</b> 204.445		
<b>Data da Relatoria:</b> 19/02/2013		
<b>Apresentação do Projeto:</b>		
Trata-se de projeto de pesquisa que analisará, retrospectivamente, material biológico armazenado na soroteca da disciplina de Clínica Médica B da EMC - 10ª enfermaria do HUGG		
<b>Objetivo da Pesquisa:</b>		
Por análise do soro de portadores de isolados virais da hepatite C, genótipo 1, identificar eventuais mutações genéticas detectadas através do sequenciamento nucleotídeo da amostra		
<b>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</b>		
Por ser análise retrospectiva, não pode se falar em riscos. A identificação pretendida poderá, no futuro, subsidiar estudo que venha a analisar a relação dessas mutações com a sensibilidade de novos antivirais. um eventual benefício.		
<b>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:</b>		
Trata-se de pesquisa já analisada anteriormente e que retorna com as correções sugeridas no relatório inicial.		
<b>Endereço:</b> Rua Mariz e Barros nº 775		
<b>Bairro:</b> Tijuca	<b>Município:</b> RIO DE JANEIRO	<b>CEP:</b> 22.270-004
<b>UF:</b> RJ	<b>Telefone:</b> (21)1264-5317	<b>Fax:</b> (21)1264-5177
<b>E-mail:</b> hugg@unirio.br;cephugg@gmail.com		

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
GAFFREE E  
GUINLE/HUGG/UNIPIO



**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Considerado não cabível.

**Recomendações:**

As recomendações prévias apresentadas ao colegiado e referendadas foram corrigidas.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências apontadas no relatório inicial, avalizadas pelo colegiado do CEP, foram sanadas.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Sim

**Considerações Finais a critério do CEP:**

aprovado

**O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.**

RIO DE JANEIRO, 25 de Fevereiro de 2013

Assinador por:  
**Pedro Eder Portari Filho**  
(Coordenador)

Endereço: Rua Mariz e Barros nº 775 CEP: 22.270-004  
Bairro: Tijuca UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)1264-5317 Fax: (21)1264-5177 E-mail: hugg@unirio.br;cephugg@gmail.com

Anexo 2: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FIOCRUZ (CEP 142/01)

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 18 de maio de 2010.

**PARECER**

**Título do Projeto:** "Fase Aguda de Infecção pelo Vírus da Hepatite C Avaliação da Resposta Imunológica Celular e Humoral"

**Protocolo CEP:** 142/01

**Registro CONEP:** 2830

**Pesquisadora Responsável:** Lia Laura Lewis Ximenez de Sousa Rodrigues

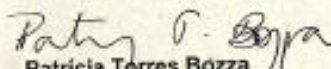
**Instituição:** IOC/VIROLOGIA

Foi submetida à apreciação do CEP/FIOCRUZ, relatório parcial ao projeto supra-mencionado.

Por se tratar da continuidade de um projeto e por não apresentar fatos novos que indiquem desacordos com a Resolução 196/96, foi aprovado o documento acima mencionado.

Informamos, outrossim, que deverão ser apresentados relatórios parciais anuais e relatório final do projeto de pesquisa.

Além disso, qualquer modificação ou emenda ao protocolo de pesquisa, deve ser submetida à apreciação do CEP/FIOCRUZ.



**Patrícia Torres Bozza**  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
Em Seres Humanos da Fundação Oswaldo Cruz