

**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Variações nas regiões 5' não traduzidas e na proteína não estrutural NS5A do vírus da Hepatite C em pacientes infectados com o genótipo 1

Flávio Marcos Gomes Araújo

**Belo Horizonte
Dezembro
2008**

TESE DBCM-CPqRR

F.M.G. ARAÚJO

2008

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Variações nas regiões 5' não traduzidas e na proteína não
estrutural NS5A do vírus da Hepatite C em pacientes
infectados com o genótipo 1

por

Flávio Marcos Gomes Araújo

Tese apresentada com vista à obtenção do
título de Doutor em Ciências da Saúde na
área de Concentração Biologia Celular e
Molecular
Orientação: Dr. Guilherme Corrêa Oliveira

Belo Horizonte
Dezembro
2008

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

A658v
2008

Araújo, Flávio Marcos Gomes.

Variações nas regiões 5' não traduzida e na proteína não estrutural NS5A do vírus da Hepatite C em pacientes infectados com o genótipo 1 / Flávio Marcos Gomes Araújo . – Belo Horizonte, 2008.

xviii, 120 f.: il.; 210 x 297mm.

Anexos: 102 - 124

Bibliografia: f.: 125 – 138

Tese (Doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Hepatite C/genética 2. Regiões 5' não traduzidas/genética 3. Interferon Alfa/genética I. Título. II. Oliveira, Guilherme Corrêa de (Orientação)

CDD – 22. ed. – 616.362 3

**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Variações nas regiões 5' não traduzidas e na proteína não estrutural NS5A do vírus da Hepatite C em pacientes infectados com o genótipo 1

POR

Flávio Marcos Gomes Araújo

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares (Presidente)

Dra. Erna Geessien Kroon

Dra. Jaqueline Germano de Oliveira

Dr. Flávio Guimarães da Fonseca

Dra. Betânia Paiva Drumond

Tese defendida e aprovada em: 22/12/2008

DEDICATÓRIA

À minha querida Iza, esposa e companheira,
pelo amor, incentivo e por estar sempre ao
meu lado há tantos anos.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Dr. Guilherme Corrêa de Oliveira por todo apoio, orientação, companheirismo, estímulo e confiança na minha formação, pela paciência e capacidade de ensinamento, de criação e espírito inovador.

Aos sujeitos da pesquisa, que colaboraram com o conhecimento científico, sem a perspectiva de ganho pessoal.

À Dra. Rosângela Teixeira pela oportunidade de trabalharmos juntos, pelo acolhimento e amizade.

À Dra. Ariane Machado-Lima e ao Dr. Alan Durham pelas análises de predição de estruturas secundárias de RNA.

Ao Dr. Álvaro José Romanha pelo convívio e aprendizado da ciência.

Ao curso de Pós-Graduação e professores pela atenção, qualidade do curso e pelo grande aprendizado.

A Maureen pela amizade, assistência e atenção para resolver todos os problemas.

Aos Amigos Livia, Rômulo, Ademar, Anderson, Luiza, Mariana e Fernanda, pela descontração e pelas várias horas de diversão.

Ao Ivan Vieira Sonoda e ao Dr. Nilton Rodrigues Barnabé pela amizade e sugestões na elaboração dos artigos.

A Dra. Ângela Volpini e à Dra. Diana Bahia pelas sugestões enriquecedoras e pelo convívio.

Ao Dr. Aristobolo Mendes da Silva pela discussão dos resultados dos experimentos de luciferase.

Aos amigos do LPCM: Dra. Rosiane, Regina, Rosana, Dra. Silvane, Fernanda B., Fernanda F., Jerônimo, Daniel, Marcela, Marcilene, Máira, Sara, Paula, Kelly, Luciana Márcia, Elisângela, Lorenza, Joice, Patrícia, Raul, Gabriela, Kênya e Silvia pela convivência e pela ajuda na realização e compreensão dos experimentos.

A biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito aos textos completos utilizados na minha tese.

Ao Instituto René Rachou, CNPq e Fapemig pelo apoio financeiro ao estudo.

Ao Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular – IRR/FIOCRUZ, minha segunda casa, pelo crescimento científico e oportunidade ilimitadas de aprimoramento.

No mais, agradeço a todos que participaram de alguma forma desse projeto e me acompanharam durante esse percurso.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 VÍRUS DA HEPATITE C.....	19
1.2 EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO.....	20
1.3 HISTÓRIA NATURAL.....	22
1.4 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICOS.....	23
1.5 TRATAMENTO DA HEPATITE C.....	25
1.6 VARIABILIDADE GENÉTICA DO HCV.....	28
1.7 ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA.....	31
1.7.1 Tradução do Genoma Viral.....	34
1.8 IMPLICAÇÕES CLÍNICAS DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO HCV.....	37
2 JUSTIFICATIVA.....	40
3 OBJETIVOS.....	41
3.1 OBJETIVO GERAL.....	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1 CÁLCULO DA AMOSTRA.....	42
4.2 PACIENTES.....	43
4.3 TRATAMENTO.....	45
4.4 DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL E GENOTIPAGEM.....	46
4.5 OBTENÇÃO DO RNA.....	47
4.6 SÍNTESE DE CDNA DA 5' RNC.....	47
4.7 AMPLIFICAÇÃO DA 5' RNC.....	48
4.8 PCR ANINHADO DA 5' RNC.....	48
4.9 SÍNTESE DE CDNA E AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO NS5A.....	48
4.10 PCR ANINHADO DA REGIÃO NS5A.....	49
4.11 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	50
4.12 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	50
4.13 EXTRAÇÃO DE DNA DO GEL DE AGAROSE.....	50
4.14 CLONAGEM NO VETOR PIRF.....	51
4.15 SEQÜENCIAMENTO.....	52
4.16 ELETROFORESE DE PROTEÍNA EM GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE.....	53
4.17 PREDIÇÃO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA 5' RNC.....	54
4.17.1 Análise da estrutura secundária utilizando o RNAfold.....	54
4.17.2 Análise da estrutura secundária utilizando o RNASHAPES.....	55
4.17.3 Análise da estrutura secundária utilizando o RNApdist.....	56
4.18 LINHAGENS CELULARES.....	57
4.19 CULTIVO CELULAR.....	57
4.20 MONITORAMENTO DA CONTAMINAÇÃO DA CULTURA DE CÉLULAS POR MYCOPLASMA SP.....	58
4.21 TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS.....	59
4.22 WESTERN BLOT.....	60
4.23 GENÉTICA DE POPULAÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	60
5 RESULTADOS.....	62
5.1 GÊNERO E SUBTIPO DO HCV INFLUENCIAM NA RESPOSTA VIROLÓGICA SUSTENTADA AO TRATAMENTO.....	62

5.3 VARIAÇÕES NA SEQÜÊNCIA DA 5' RNC PODEM AFETAR A ESTRUTURA SECUNDÁRIA DO RNA VIRAL	71
5.3.1 Análise da Energia Livre Mínima calculada pelo programa RNAfold	71
5.3.2 Análise das shapes da estrutura secundária utilizando o programa RNASHapes	72
5.3.2.1 Análise do Domínio I	72
5.3.2.2 Análise do Domínio II	73
5.3.2.3 Análise do Domínio III e IV	74
5.3.3 Análise do espaço de estruturas utilizando o programa RNApdist	76
5.4 A 5' RNC É CAPAZ DE INDUZIR A TRADUÇÃO DE UM GENE REPÓRTER	77
5.5 A 5' RNC É CAPAZ DE INDUZIR A TRADUÇÃO DE PROTEÍNAS REPÓRTERES ATIVAS DE FORMA DIFERENCIAL	78
5.6 SEQÜENCIAMENTO DO DOMÍNIO PKRBDB/ISDR DA PROTEÍNA NS5A	80
5.7 VARIABILIDADE E DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA	85
6 DISCUSSÃO	90
7 CONCLUSÕES	101
8 ANEXOS	102
9 REFERÊNCIAS	125

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Árvore filogenética de seqüências do HCV. Os ramos maiores representam os genótipos e os ramos menores os subtipos. Os números representam os seis principais genótipos. Fonte: (Simmonds, 2005).....	29
FIGURA 2	Organização genômica do vírus da hepatite C, apresentando as regiões não codificantes 5' e 3' (RNC); as proteínas estruturais, capsídeo (C), e do envelope (E1, E2) e as proteínas não estruturais NS2, NS3, NS4, NS5A e NS5B (Research Center for Emerging Infectious Diseases, Osaka, Japão).	32
FIGURA 3	Esquema da estrutura secundária da 5' RNC do genoma do HCV mostrando os 4 domínios (I-IV). O sítio de entrada interno do ribossomo (IRES) é formado pelos domínios II-IV. O códon inicial é mostrado em preto na alça do domínio IV.....	35
FIGURA 4	Fluxograma com as etapas a serem realizadas com as amostras de soro coletadas dos pacientes.....	42
FIGURA 5	Distribuição geográfica dos pacientes de acordo com as coordenadas geográficas de sua cidade de origem no Estado de Minas Gerais: Belo Horizonte - 1; Carmo do Paraíba -2; Dores do Indaiá -3; Cordisburgo -4; São José da Lapa -5; Conselheiro Lafaiete -6; Mariana -7; Ponte Nova -8; Jequeri -9; Carangola -10; Contagem - 11; Vespasiano -12; Jequitibá -13; Ubaporanga -14.....	44
FIGURA 6	Esquema da estrutura do vetor pIRF mostrando a região promotora CMV, o gene da Firefly Luciferase (Fluc), a 5' RNC do HCV e o gene da Renilla Luciferase (Rluc). A posição relativa dos sítios de restrição BamHI e PstI estão representadas.....	51
FIGURA 7	Resposta terapêutica segundo a idade dos pacientes. NR- paciente não respondedor e R - paciente respondedor.....	62

FIGURA 8	Resposta terapêutica segundo o gênero. NR- paciente não respondedor e R - paciente respondedor.....	63
FIGURA 9	Resposta terapêutica entre os genótipos 1a e 1b do HCV. NR- paciente não respondedor e R - paciente respondedor.....	63
FIGURA 10	Número de substituições observadas na seqüência viral da 5' RNC dos 33 pacientes.....	65
FIGURA 11	Representação esquemática da estrutura secundária da 5' RNC com as localizações das substituições (Honda et al., 1999).....	66
FIGURA 12	Alinhamento das 33 seqüências da 5' NCR do vírus da hepatite C.....	67
FIGURA 13	Diferenças entre a Energia Livre Mínima (ELM) da 5' RNC do genoma viral dos pacientes e do padrão do HCV ($ELM_{paciente} - ELM_{HCV}$) calculadas através do RNAfold sem o uso de restrições. Diferenças positivas indicam a perda de estabilidade da 5' RNC do genoma viral quando comparada com a estrutura padrão do HCV e diferenças negativas o ganho de estabilidade. ELM padrão HCV: -141,6 kcal/mol.....	71
FIGURA 14	Diferenças entre os valores de Energia Livre Mínima (ELM) da 5' RNC do genoma viral dos pacientes e do padrão do HCV ($ELM_{paciente} - ELM_{HCV}$) calculados através do RNAfold com o uso de restrições. Diferenças positivas indicam a perda de estabilidade da 5' RNC do genoma viral quando comparada com a estrutura padrão do HCV. ELM padrão HCV: -126,7 kcal/mol.....	72
FIGURA 15	Probabilidades de predição das shapes para o domínio I da 5' RNC.....	73

FIGURA 16	Probabilidades de predição das shapes para o domínio II da 5' RNC.....	74
FIGURA 17	Probabilidades de predição das shapes para o domínio IIIId da 5' RNC	75
FIGURA 18	Probabilidades de predição de shapes para o domínio IIIe da 5' RNC.....	75
FIGURA 19	Probabilidades de predição das shapes para o domínio IV da 5' RNC	76
FIGURA 20	Valores de divergência entre a 5' RNC padrão do HCV e do genoma viral dos pacientes calculados através do RNAdist.....	77
FIGURA 21	Resultado do Western blot realizado com extratos de células 293T transfectadas com diferentes construções. Neste experimento foi utilizados anticorpos anti-luciferase contra a proteína luciferase de Renilla reniformes e Photinus pyralis.....	78
FIGURA 22	Eficiência de tradução da 5' RNC utilizando as células 293T e HepG ₂ . A eficiência de tradução foi quantificada pela razão da expressão da Rluc/Fluc. Este experimento foi realizado em triplicata e o desvio padrão calculado a partir dos dados obtidos.....	79
FIGURA 23	Alinhamento das seqüências de aminoácidos do domínio PKRBD/ISDR de 20 pacientes não respondedores do genótipo 1b e 8 do genótipo 1a. As substituições sublinhadas estão localizadas dentro do domínio ISDR da proteína NS5A.....	81
FIGURA 24	Alinhamento das seqüências de aminoácidos do domínio PKRBD/ISDR de 13 pacientes respondedores do genótipo 1b e 3 do genótipo 1a. As substituições sublinhadas estão localizadas dentro do domínio ISDR da	

proteína NS5A.....82

FIGURA 25 Representação gráfica da distribuição dos aminoácidos ao longo da seqüência do domínio PKRBD/ISDR da proteína NS5A. Seqüências de aminoácidos dos pacientes não respondedores. O tamanho da letra é proporcional a freqüência dos aminoácidos em cada posição.....83

FIGURA 26 Representação gráfica da distribuição dos aminoácidos ao longo da seqüência do domínio PKRBD/ISDR da proteína NS5A. Seqüências de aminoácidos dos pacientes respondedores. O tamanho da letra é proporcional a freqüência dos aminoácidos em cada posição.....84

FIGURA 27 Árvore filogenética, não enraizada, de 33 seqüências concatenadas (5' RNC-NS5A) construída através do programa MEGA v.3.1 utilizando o algoritmo Neighbor-joining. Na Figura estão representados os valores de bootstrap acima de 70. Estes valores foram calculados com 1000 réplicas para a verificação da sustentação de ramos nas topologias. NR - pacientes não respondedores e R - pacientes respondedores.....88

FIGURA 28 Rede de haplótipos (haplotypes network) de 33 seqüências concatenadas (5' RNC-NS5A) construída através do programa TCS v.1.21. Os pontos representam os haplótipos perdidos ou não amostrados. As elipses vazias e cheias representam pacientes do grupo não respondedor e respondedor, respectivamente.....89

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Distribuição dos pacientes de acordo com a cidade de origem.....	44
TABELA 2	Distribuição dos pacientes de acordo com a resposta ao tratamento.....	46
TABELA 3	Regiões genômicas, genótipos, seqüências dos iniciadores utilizados em cada amplificação da PCR aninhado e a posição destes no genoma do HCV.....	49
TABELA 4	Localizações das substituições na 5' NCR.....	64
TABELA 5	Variabilidade genética, testes de neutralidade e taxa de substituição de nucleotídeos da 5' RNC, NS5A e as duas regiões concatenadas de pacientes não respondedores e respondedores.....	86
TABELA 6	Análise de variância molecular (AMOVA) entre o grupo de pacientes não respondedores e respondedores utilizando a 5' RNC, NS5A e as duas regiões concatenadas.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl	Microlitros
°C	Graus
µg	Micrograma
aa	Aminoácidos
ALT	Alanina aminotransferase
APS	Persulfato de Amônio
ATP	adenosina trifosfato
CD	Cluster of differentiation ou grupo de diferenciação
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CO₂	Dióxido de Carbono
DMEM	Dulbeccos' s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Tri Fosfato
E	Região estrutural
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
eIF3	Fator de iniciação de eucariota
ELISA	Enzyme Linked Immuno Assay (Ensaio imunoenzimático)
ELM	Energia Livre Mínima
FLuc	Photinus pyralis
Fw	Forward
g	Gramas
GTP	Guanosina trifosfato
HCl	Ácido clorídrico
HIV	Human immunodeficiency virus
HNANB	Hepatites não-A e não-B
HVR	Região hipervariável
IFN-α	Interferon alfa
IFN-P	Interferon peguilado
IgG	Imunoglobulina G
IRES	Sítio de entrada interno do ribossomo

ISDR	Região determinante da suscetibilidade ao IFN
kDa	Quilo Dalton
L	Litro
LB	Luria – Bertani
LDL	Low density lipoprotein ou lipoproteínas de baixa densidade
LIPA	Line immuno probe assay
M	Molar
mA	MiliAmper
mg	Miligramas
MgCl₂	Cloreto de magnésio
Min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
ng	Nanogramas
nm	Nanômetros
NS	Região não estrutural
nt	Nucleotídeos
ORF	Open Reading Frame
p/v	Peso por volume
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PKR	Proteína quinase R
PKRBD	Domínio de ligação da proteína quinase R
Pmoles	Picomoles
PTB	Polypyrimidine tract-binding protein
q.s.p	Quantidade suficiente para
R	Respondedor
Rev	Reverse
RLuc	Renilla luciferase
RNC	Região não codificante
rpm	Rotações por minuto

rRNA	RNA ribossômico
RT-PCR	Transcrição reversa em reação de cadeia da polimerase
RVP	Resposta virológica precoce
RVS	Resposta virológica sustentada
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Duodecil sulfato de sódio
Seg	Segundos
SR-BI	Scavenger receptor class B type I
TBE	Tris Borato EDTA
TBS	Tris buffered saline
TEMED	N,N,N",N"-Tetrametiletileno-diamino
Tris	Tri-hidroximetil amino metano
U	Unidades
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UI	Unidades internacionais
v	Volts
v/v	Volume por volume
VHB	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C

RESUMO

Embora exibindo considerável variabilidade genética, a região 5' não codificante (5' RNC) do genoma viral é relativamente bem conservada entre todos os genótipos. Existem evidências da presença nestes domínios de um sítio de entrada interno do ribossomo (IRES) que permite a tradução cap-independente do RNA viral. A variabilidade na região da proteína não estrutural NS5A, designada “Região Determinante da Suscetibilidade ao Interferon” (ISDR), foi associada à resistência ou sensibilidade a terapia com interferon- α . A partir das seqüências obtidas, foram realizadas predições da estrutura secundária da 5' RNC pelos programas RNAfold, RNAdist e RNASHapes. Também foram realizados experimentos de transfecção in vivo a fim de testar a funcionalidade da 5' RNC. A correlação entre variações nas regiões 5' RNC e NS5A e resposta terapêutica, entre os grupos não respondedores e respondedores (NR e R) foram realizadas através de parâmetros de genética molecular. A Energia Livre Mínima (ELM) calculada através do RNAfold sofreu maior influência da posição do que com o número de substituições. Os resultados do RNASHapes mostraram diferenças na probabilidade de predição das shapes, reforçando a idéia de que as substituições alteram a estrutura secundária. Os resultados do RNAdist também mostraram que algumas substituições tem um impacto sobre a predição da estrutura secundária. A heterogeneidade da seqüência da 5' RNC conduziu importantes alterações na eficiência de tradução, implicando que as interações entre o RNA e fatores de tradução podem variar de acordo com o tipo de células. As regiões 5' RNC e NS5A apresentaram baixa variabilidade genética. Apenas a 5' RNC apresentou desvio da neutralidade e significativa variabilidade molecular nos dois grupos estudados (NR e R). A análise filogenética mostrou nenhuma correlação entre variações na seqüência e a resposta terapêutica.

ABSTRACT

Although displaying considerable genetic variability, the viral genomic 5' noncoding region (5' NCR) is relatively well conserved among all HCV genotypes. There are some evidences of the presence of internal ribosome entry site (IRES) in the 5' NCR domains, allowing a cap-independent RNA translation mechanism in this virus. The variability in the non-structural 5A protein (NS5A) also called Interferon Sensitivity-Determining Region (ISDR), is linked to resistance and sensibility to interferon- α based therapy. From of the HCV sequences obtained and using RNAfold, RNAshapes and RNAdist programs, the secondary structure of the 5' NCR was predicted. To test the 5' NCR functionality, in vivo transfection experiments were conducted. The correlation between sequence variations in 5' NCR and NS5A regions and therapeutic response, from two groups of patient's non-responders (NR) and responders (R), were carried out using molecular genetic parameters. The minimal free energy (MFE) calculated using RNAfold showed correlations with substitution position but not with its amount. Concerning to RNAshapes, it could be observed differences on the probabilities of the predicted shapes, reinforcing that substitutions should alter the secondary structures. The RNAdist results also indicate that some sets of substitutions have impact on the prediction secondary structure. Sequence heterogeneity on 5' NCR led to important changes in their translation efficiency, implying that interactions between RNA and transacting factors may vary according to cell type. The 5' NCR as well as the NS5A region showed low genetic variability. The 5' NCR showed deviations of neutrality and significant molecular variability in both patients groups (NR and R). Phylogenetic analysis showed no correlation between sequence variations and therapeutic responses.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vírus da Hepatite C

No início da década de 70 foram desenvolvidos testes de diagnósticos para identificar pacientes infectados com o vírus da hepatite A e B. Surpreendentemente, verificou-se que a maioria dos pacientes com hepatites pós-transfusional apresentaram diagnóstico negativo para ambos os vírus. Assim, foi sugerida a existência de um terceiro vírus e estes pacientes passaram a ser denominados portadores de hepatites Não-A e Não-B (HNANB) (Feinstone et al., 2001). Durante aproximadamente 15 anos, demonstrou-se que HNANB era transmitida através de transfusão de sangue, acarretando aos pacientes infecções crônicas que poderia evoluir para fibrose hepática, cirrose e carcinoma hepatocelular. Estudos experimentais em chimpanzés revelaram a presença de um agente infeccioso pequeno e envelopado. Somente em 1989, Choo et al. obtiveram um clone de cDNA a partir de um pool de plasma de paciente com hepatite Não-A e Não-B. Este clone era capaz de expressar um antígeno específico para HNANB e o primeiro teste de diagnóstico sorológico para detecção de anticorpos foi desenvolvido. Este patógeno passou a ser conhecido como vírus da hepatite C (HCV). A partir desta descoberta, não levou muito tempo para que fossem desenvolvidos os primeiros testes capazes de detectar anticorpos contra o HCV (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay). Com a subsequente introdução destes testes em bancos de sangue, os casos da até então denominada hepatite Não-A, Não-B diminuíram acentuadamente (Donahue et al., 1992).

O HCV pertence à família Flaviviridae, gênero Hepacivirus (Robertson et al., 1998), é um dos poucos vírus dessa família (que inclui o vírus da dengue, febre amarela e Nilo ocidental) que não é transmitido por artrópodes.

1.2 Epidemiologia e transmissão

A hepatite C tem distribuição mundial e representa um dos maiores desafios para a saúde pública no atual milênio. Até 1998, foram registrados aproximadamente 170 milhões de pessoas portadoras do HCV no mundo (WHO report, 1999), mas atualmente as cifras já superam esse valor. Assim, estimam-se em 200 milhões os portadores do HCV, ou cerca de 3% da população mundial esteja infectada por esse vírus (Wasley & Alter, 2000). Segundo Perz et al. (2006), 27% dos casos de cirrose e 25% dos casos de carcinoma hepatocelular que ocorrem no mundo estão relacionados com o HCV. Segundo a Organização Mundial de Saúde, o Brasil se enquadra entre os países com índice intermediário de infecção pelo HCV, entre 1 e 5% (Yen et al., 2003). No Brasil, ainda não existem estudos epidemiológicos abrangentes sobre a infecção do HCV, e sim estudos localizados com pequenos grupos da população e que não retratam índices reais de infecção. Focaccia et al. (1998) realizaram um estudo de base populacional na cidade de São Paulo e observaram 1,42% de prevalência de infecção. Em relação às regiões brasileiras, a menor prevalência foi observada na região Sul (0,65%), enquanto prevalências moderadas foram encontradas nas regiões Centro-oeste (1,04%), Nordeste (1,19%) e Sudeste (1,43%). Alta prevalência foi relatada na região Norte (2,12%).

Entre os hemofílicos já foi relatada uma prevalência maior que 60% (Barbosa et al., 2002; Yen et al., 2003) e entre os pacientes de hemodiálise a prevalência varia entre 11 a 45% entre os centros terapêuticos (Freitas et al., 2008). Estudos realizados por Carneiro et al. (2001) demonstraram um declínio da infecção do vírus em pacientes renais crônicos ratificando a importância das estratégias de saúde pública no controle da infecção nos centros de hemodiálise.

Existe ainda um risco relativamente alto para transfusões de sangue no país, tendo sido relatada uma prevalência entre doadores de 0,8 a 3,1%, dependendo do estudo (Busck et al., 2002).

A hepatite C representa aproximadamente 3% de todos os casos de hepatite no país (Wasley & Alter, 2000). O número de casos relatados, provavelmente uma subestimação, variou em torno de 3.500 a 4.000 entre 1999 e 2000 (Programa Nacional de Hepatites Virais, 2004). A falta de estudos na população em geral é preocupante, pois somente a partir de dados sobre a doença no presente poderão ser programadas ações coletivas que irão impedir o colapso do sistema de saúde no futuro.

De acordo com o Ministério da Saúde Brasileiro, o número de mortes devido à cirrose hepática foi de aproximadamente 13.400 no ano de 2000. Em um levantamento realizado no Ambulatório de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina de São Paulo, observou-se que o número de casos de hepatopatia crônica pelo HCV tem aumentado e atualmente corresponde a 48% das hepatopatias atendidas no centro (<http://portal.saude.gov.br/saude/>). Os portadores crônicos do HCV representam, na atualidade, quatro vezes a população acometida pelo HIV. Estima-se que o número anual de mortes causadas pelo HCV, por cirrose e carcinoma hepatocelular, poderá superar o número de mortes causadas pelo HIV (Seeff & Hoofnagle, 2003).

As duas principais fontes de infecção do HCV são o uso de drogas intravenosas e a administração de produtos derivados do sangue (Shepard et al., 2005). O risco de transmissão por transfusões sanguíneas foi drasticamente reduzido a partir de 1992, com a introdução dos testes sorológicos em bancos de sangue. Com a redução dos casos pós-transfusionais, os usuários de drogas tornaram o principal grupo de risco tanto nos países industrializados quanto nos países em desenvolvimento. O compartilhamento de

seringas e agulhas contaminadas foi identificado como a principal fonte de contaminação (Silva et al., 2005).

A transmissão sexual do HCV, diferentemente do vírus da hepatite B (VHB) e do vírus da imunodeficiência humana (HIV), é incomum. A prevalência da infecção do HCV mantém-se baixa entre os parceiros homossexuais estáveis ou entre os indivíduos heterossexuais, porém, se eleva na população com múltiplos parceiros (Terrault, 2002).

O risco de transmissão perinatal de mães portadoras do HCV é baixo (<6%). Entretanto, este risco aumenta em mães co-infectadas com o HIV (2,7-8,4%) (Yeung et al., 2001). Também foi relatada a transmissão nosocomial através da utilização de equipamentos ou instrumentos contaminados, especialmente em pacientes submetidos à hemodiálise (Medeiros et al., 2004).

Além dos mecanismos citados acima também podemos destacar a transmissão através do compartilhamento de objetos expostos a sangue contaminado ou através de práticas culturais ou religiosas, tais como: tatuagem, piercing, manicure e acupuntura (Haley & Fischer, 2003). Embora ainda não exista nenhum estudo epidemiológico estabelecendo a associação entre estas práticas, elas requerem vigilância por serem considerados meios de transmissão. Alguns autores demonstraram a presença de RNA do HCV em fluidos biológicos, como a saliva, entretanto o seu papel na transmissão ainda não está claro (Mastromatteo et al., 2001; Gonçalves et al., 2005).

1.3 História Natural

O curso natural da hepatite C é em sua maioria lento, mas progressivo. A cura espontânea ocorre em apenas 15% dos indivíduos infectados pelo HCV (Boyer & Marcellin, 2000). Um adicional de 25% dos pacientes apresenta um curso assintomático e enzimas hepáticas (aminotransferases) persistentemente normais. Aproximadamente

40% dos pacientes apresentam evolução histológica lenta e benigna. A maioria dos pacientes com evidência bioquímica de hepatite crônica evolui com atividade necroinflamatória leve ou moderada e fibrose hepática mínima, com evolução incerta e pouco conhecida (Powell et al., 2000). Muitos, provavelmente, não irão sucumbir de doença hepática. Entretanto, 20% dos pacientes com hepatite crônica pelo HCV desenvolvem cirrose e suas complicações após 10 a 30 anos de evolução. A evolução da cirrose está associada, entre outros co-fatores, à idade do paciente por ocasião da infecção. Em geral, os indivíduos que adquirem a doença em idade mais avançada apresentam evolução mais rápida para fibrose. O consumo de álcool é um importante co-fator na progressão da hepatite crônica para fibrose. A co-infecção com o vírus HIV ou HBV e o estado imunológico do indivíduo infectado são também fatores complicadores (Cheney et al., 2000).

O padrão bioquímico mais comumente observado na hepatite C crônica é o de flutuações das enzimas hepáticas intercalados com períodos de normalização bioquímica, ou de elevação persistente das aminotransferases. Entretanto, a infecção crônica pode apresentar grande variabilidade dos parâmetros laboratoriais, inclusive com dissociação bioquímico-virológica (Boyer & Marcellin, 2000). A existência de múltiplas variáveis associadas a fatores virais como a carga viral e o genótipo dificulta a inferência sobre a evolução da doença (Trepo, 2000).

1.4 Métodos de Diagnósticos

O diagnóstico da infecção pelo HCV é baseado na detecção de anticorpos no sangue periférico (anti-HCV) e confirmado com testes moleculares qualitativos que informam a presença do RNA viral na amostra (Pawlotsky, 2002). A vantagem de utilizar métodos moleculares consiste no fato de que o RNA viral torna-se detectável

uma a duas semanas após a infecção e, por isso pode ser útil no diagnóstico precoce da infecção, já que a sorologia pode permanecer negativa por mais de seis semanas após a infecção (Neng, 2001). Entre os testes sorológicos podem ser incluídos os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e as técnicas de imunoblot. O teste de ELISA detecta anticorpos contra vários epítopos das proteínas não estruturais NS3, NS4 e NS5 e do capsídeo, com especificidade de até 99% e sensibilidade acima de 97%, dependendo do estado imunológico do paciente (Jerome & Gretch, 2004). Quando são empregados ensaios imunoenzimáticos de 3º geração os anticorpos anti-HCV, em geral, podem ser detectados em média entre a 7ª e 8ª semana após a infecção (Erensoy, 2001). As técnicas de imunoblot que utilizam antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos geralmente são utilizadas para esclarecer os casos duvidosos de sorologia.

Os métodos de detecção de ácidos nucleicos são baseados na amplificação de regiões específicas do genoma viral. Sua determinação é importante para a seleção de pacientes candidatos ao tratamento antiviral e para posterior avaliação de sua eficácia, realizado ao final e seis meses após o tratamento. A reação em cadeia da polimerase (PCR) realizada após transcrição reversa (RT-PCR) do RNA viral tem limite de detecção de 50 UI/mL (Unidades Internacionais). Alguns métodos realizam um ciclo adicional de amplificação (nested-PCR), que aumenta significativamente a especificidade e a sensibilidade da técnica da PCR original (Cheney et al., 2000).

Diversos métodos de RT-PCR *in house* (desenvolvidos pelos próprios laboratórios de análise) foram descritos, dificultando a padronização da metodologia. Contudo, testes padronizados estão disponíveis comercialmente para a detecção qualitativa do RNA do HCV. O Amplicor (Roche Diagnostic) é um dos mais utilizados, com especificidade de 97 a 99% (Gretch, 1997). Existem ainda testes moleculares que detectam a quantidade de RNA viral do HCV (ou a carga viral) no soro ou no plasma,

sendo, portanto, uma estimativa das taxas de replicação viral ou da eliminação do vírus pelo hospedeiro. Atualmente, três técnicas estão sendo utilizadas para quantificar o HCV: a amplificação de DNA em cadeia ramificada, a amplificação seqüencial de ácidos nucleicos e o RT-PCR em tempo real (Gretch et al., 1995; Sarrazin et al., 2008).

Na hepatite crônica, um único exame negativo pode significar período intermitente de baixa replicação viral. Contudo, essa possibilidade fica mais remota a partir dos testes atuais de alta sensibilidade. Além de sua aplicação como teste confirmatório, os testes baseados na PCR poderão ser solicitados para confirmar ou excluir a presença do HCV na hepatite aguda ou fulminante, em recém-nascidos de mães portadoras de hepatite C e para diagnosticar a infecção em imunossuprimidos (Carithers et al., 2000).

1.5 Tratamento da Hepatite C

O tratamento da hepatite C visa eliminar o HCV com o objetivo de interromper o processo inflamatório e fibrótico do fígado e prevenir o desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular (Cheney et al., 2000). Nos últimos dez anos foram obtidos grandes avanços no tratamento da hepatite C crônica. Com o aumento da eficácia dos tratamentos atualmente disponíveis, vários estudos comprovaram os inequívocos benefícios do tratamento a curto e médio prazo (Cheney et al., 2000; Chopra & Graham, 2000; Poynard et al., 2000; Gramenzi et al., 2001).

Dois agentes, interferon alfa (IFN- α) ou interferon alfa peguilado (IFN-P) e ribavirina, são empregados no tratamento da hepatite C crônica (Pawlotsky, 2006). O IFN- α tem atividade antiviral e potente ação imunomoduladora (Vilcek & Feldmann, 2004; Theofilopoulos et al., 2005). A conjugação da molécula de polietileno glicol ao IFN- α através de uma ligação covalente (peguilação) produziu um IFN- α modificado,

com meia-vida e duração de ação mais prolongada do que o IFN- α convencional (Hadziyannis & Papatheodoridis, 2003; Saracco et al., 2003). A molécula peguilada é um polímero não tóxico, metabolizado primariamente pelo fígado e sua excreção não é afetada na insuficiência renal (Hadziyannis & Papatheodoridis, 2003). Esta modificação na farmacodinâmica permitiu otimizar tanto a absorção quanto a distribuição da droga, o que resultou em concentração sérica mais constante de IFN- α permitindo a administração semanal.

A ribavirina é um análogo guanosídeo sintético ao interferon que inibe a replicação de vírus RNA e DNA. Os mecanismos antivirais desta droga incluem a depleção intracelular de guanosina trifosfato (GTP), através da inibição direta da monofosfato de iosina desidrogenase, que leva a depleção de GTP necessário para a síntese de RNA mensageiro viral e da inibição direta da RNA polimerase viral (Craxi & Licata, 2003).

A resposta virológica precoce (RVP), definida como a queda de duas unidades logarítmicas na carga viral durante as primeiras 12 a 24 semanas de tratamento é preditiva de resposta virológica sustentada (RVS), ou seja, a negatificação do vírus seis meses após o término do tratamento (Mancuso et al., 2006). Foi relatado, em estudo clínico, que os pacientes que não apresentam RVP na 12^a ou 24^a semana de tratamento apresentam uma chance mínima de RVS, a despeito de continuarem a medicação por 48 semanas. Portanto, recomenda-se que o tratamento seja suspenso nestas condições. As dificuldades de se correlacionar a RVS com melhores índices de sobrevida, em função da necessidade do seguimento clínico mais prolongado dos pacientes tratados, a negatificação do vírus tem sido associada à melhora da fibrose hepática e aos menores índices de recidiva após quatro ou cinco anos do tratamento (Berg et al., 2003; Lipman & Cotler, 2003).

Ferenci et al. (2004) estabeleceram correlação positiva com a probabilidade de obter RVS quando o RNA viral não é detectado na 4ª semana de tratamento. A indução de clearance viral e manutenção de um estado não virêmico pode estar correlacionada com a expansão e circulação de células T citotóxicas com antígenos circulantes ao HCV (Morishima et al., 2003).

No Brasil, os protocolos em vigência estabelecem critérios para o tratamento de pessoas infectadas por HCV. Pacientes entre 12 e 70 anos de idade devem apresentar transaminases (alanina aminotransferase – ALT) acima de uma vez e meia do limite superior, evidência de atividade necroinflamatória e/ou fibrose de moderada a intensa e contagens de plaquetas e neutrófilos acima de 50.000/mm³ e 1.500/mm³ respectivamente, dentre outros critérios de inclusão e exclusão (Protocolo da Portaria nº.863 do Ministério da Saúde, 2002).

Embora o tratamento possa ser indicado para os pacientes com elevações de ALT e alterações inflamatórias mínimas ou leves na biópsia hepática, o risco de progressão da doença neste grupo é baixo e, portanto, pode-se optar pelo seguimento clínico com exames bioquímicos e biópsia hepática a cada 3-5 anos. Os indivíduos com níveis persistentemente normais de ALT e sem alterações na biópsia hepática têm excelente prognóstico sem tratamento (Alberti et al., 2005)

Os pacientes com cirrose hepática compensada têm menor chance de resposta virológica sustentada. Contudo, os estudos recentes sugerem que, mesmo sem erradicação viral completa, o tratamento pode diminuir o risco de descompensação e de carcinoma hepatocelular (Bassit et al., 1999; Morishima et al., 2003).

O tratamento combinado representa um alto custo para os sistemas de saúde especialmente nos países em desenvolvimento. Estudos de custo-benefício realizados nos países industrializados apresentam diferentes resultados segundo os subgrupos de

pacientes e as metodologias empregadas, porém todos demonstraram vantagens em termos de qualidade de vida da terapia combinada frente à monoterapia (Salomon et al., 2003). Além disso, a redução de casos de transplante faz do tratamento uma estratégia custo efetiva (Buti et al., 2005).

1.6 Variabilidade Genética do HCV

O HCV apresenta acentuada variabilidade genômica que parece estar associada, em parte, à baixa fidelidade da RNA polimerase (Bukh et al., 1995). Comparando-se seqüências de nucleotídeos de genomas de HCV isolados em diversas partes do mundo, foram observados diversos tipos do vírus que podem se diferenciar um do outro em até 31 a 33% de todo o seu genoma (Simmonds et al., 1993a; Simmonds et al., 1993b, Simmonds et al., 2005). Com base na similaridade das seqüências de nucleotídeos, o HCV foi classificado em seis grandes grupos genéticos, denominados genótipos, que são numerados com algarismos arábicos na ordem de sua descoberta (Simmonds et al., 1993a). Outros autores classificaram o HCV em mais grupos. Bukh et al. (1995) descreveram nove genótipos e pelo menos 30 subgrupos. Porém, os genótipos 1 a 6 são os mais freqüentemente encontrados sendo que alguns genótipos englobam vários subtipos relacionados 1a, 1b,2a,2b, etc (Forns et al., 1999) (Figura 1).

Basicamente, são três os métodos moleculares utilizados para a genotipagem do HCV. O RFLP (Restriction Fragment Length polymorphism) estuda a região conservada 5' RNC. Nesse método, uma enzima de restrição reconhece regiões específicas em um fragmento de DNA amplificado por PCR e o corta, gerando um padrão de fragmento genótipo específico (Davidson et al., 1995). O método LIPA (Line immuno probe assay), consiste numa técnica de hibridação genótipo específica que também estuda a região 5' RNC. Contudo o seqüenciamento do fragmento amplificado é

o mais informativo. A análise e a interpretação das seqüências permitem a identificação de substituições em posições específicas, permitindo posteriores análises filogenéticas e genômicas. A genotipagem é clinicamente importante na abordagem clínica dos pacientes portadores de hepatite C crônica, pois as distintas variantes genômicas do HCV apresentam diferentes respostas à terapia antiviral (Lau et al., 1995).

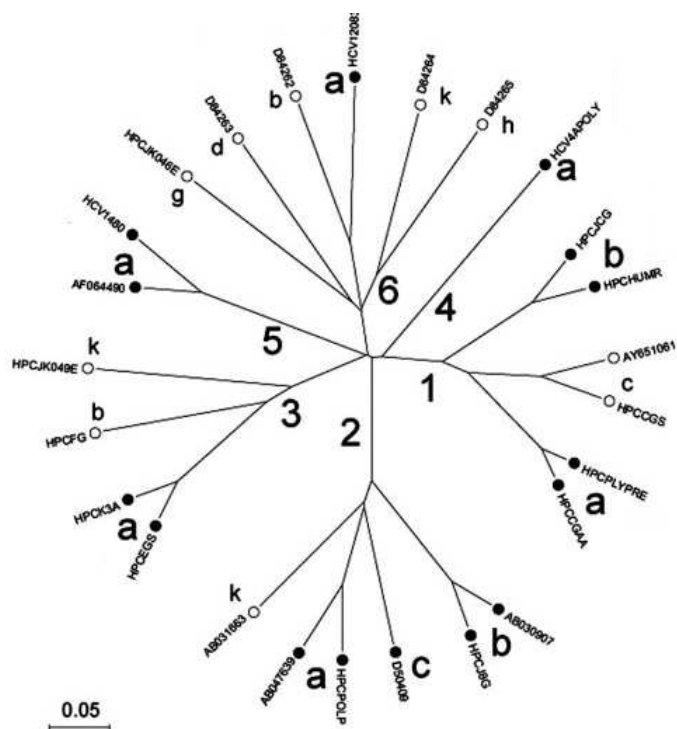


Figura 1: Árvore filogenética de seqüências do HCV. Os ramos maiores representam os genótipos e os ramos menores os subtipos. Os números representam os seis principais genótipos. Fonte: (Simmonds, 2005).

As cepas mais relacionadas dentro de cada genótipo (similaridade da seqüência de nucleotídeos entre 76,9% e 80,1%) foram denominadas subtipos que são indicados por letras. Dentro de cada subtipo foi observado um complexo de variantes genéticas que apresentam uma heterogeneidade da seqüência de nucleotídeos de 1,0% a 9,2%. Estas variantes foram denominadas quase-espécies e parecem resultar de mutações acumuladas durante a replicação viral no curso da infecção (Zein et al., 1996). A alta taxa de mutação esta relacionada com a ausência de atividade de reparos de erros da RNA polimerase viral. Estas novas variantes apresentam vantagens adaptativas que podem representar modificações no tropismo viral, na virulência e na resistência a drogas. A permanência do HCV em locais extra-hepáticos, que podem funcionar como reservatórios e/ou sítios de replicação dos vírus, também poderiam desempenhar um papel importante para a resistência da infecção (Hadziyannis, 1997).

Além disso, existe uma variação regional significativa na distribuição dos grandes genótipos do HCV (Mcmish et al., 1994). Apesar dos genótipos 1, 2 e 3 apresentarem distribuição mundial, a prevalência relativa destes varia de uma região geográfica para outra. Por exemplo, o genótipo 4 é encontrado principalmente no Egito e no Zaire, o 5 na África do Sul e o 6 na Ásia (Mellor et al., 1995; Nguyen et al., 2005).

No Brasil, o padrão de distribuição dos genótipos apresenta o genótipo 1 (65%) como o mais prevalente, seguido do 3 (30%) e 2 (4%) (Busek & Oliveira, 2003; Campiotto et al., 2005; Martins et al., 2006; da Silva et al., 2007). Esta situação também foi observada no Ambulatório de Hepatites Virais da Faculdade de Medicina Da Universidade Federal de Minas Gerais de onde os pacientes foram recrutados para este estudo. Neste ambulatório os genótipos do HCV mais freqüentemente observados foram: 1b: 39 (57%), 1a: 10 (15%), 3: 17 (25%) e 2 (3%) (Teixeira, R. comunicação

peçoal). Apesar do padrão descrito anteriormente, alguns casos de genótipos incomuns também já foram relatados, como os genótipos 4 e 5 (Levi et al., 2002).

No estado de Minas Gerais já foi pesquisada a distribuição genotípica do vírus em pacientes pertencentes a grupos de risco específicos. Em um grupo de 44 pacientes com doenças hematológicas (majoritariamente hemofílicos), foi encontrada alta prevalência do genótipo 1 (84,1%), seguido do 3 (13,6%) (Oliveira et al., 1999). Em outro estudo, 83 pacientes de hemodiálise da cidade de Belo Horizonte apresentaram 66,3% de prevalência para o genótipo 1, seguido pelo genótipo 2 com 24,1% e o 3 com 7,2% dos casos (Busek et al., 2002).

1.7 Estrutura e organização genômica

O HCV possui cadeia simples de RNA e genoma positivo constituído aproximadamente por 9.500 nucleotídeos. Sua principal janela de leitura aberta (Open Reading Frame - ORF) codifica uma poliproteína de que contém entre 3010-3037 aminoácidos (aa) que é processada por proteases celulares e virais para produzir proteínas estruturais e não estruturais (Houghton et al., 1991). Entre as proteínas estruturais e não estruturais é encontrado um peptídeo de membrana (p7) de 63 aa, que tem um papel importante na maturação e liberação das partículas virais (Sakai et al., 2003). A Figura 2 mostra um esquema que representa o genoma do HCV, as proteínas codificadas e as regiões não codificantes situadas nas extremidades 5' e 3' (RNC) do genoma viral.

Estrutura do Genoma do HCV

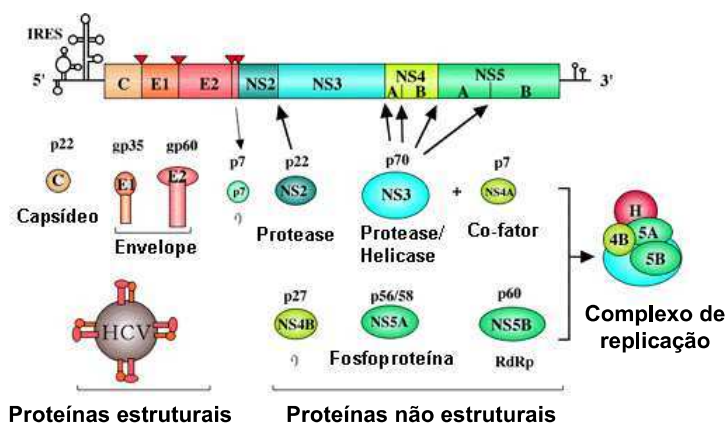


Figura 2: Organização genômica do vírus da hepatite C, apresentando as regiões não codificantes 5' e 3' (RNC); as proteínas estruturais, capsídeo (C), e do envelope (E1, E2) e as proteínas não estruturais NS2, NS3, NS4, NS5A e NS5B (Research Center for Emerging Infectious Diseases, Osaka, Japão).

As proteínas estruturais codificadas na região N-terminal incluem a proteína do Capsídeo (C), seguida por duas proteínas glicosiladas E1 e E2. O domínio não estrutural (NS) é codificado por 6 proteínas: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B.

A proteína do capsídeo do HCV, é uma proteína de aproximadamente 19 kDa constituída por 171 aa e altamente conservada entre os diferentes genótipos do HCV. Apresenta três domínios protéicos: N-terminal constituído por 120 aa denominado domínio D1, C-terminal constituído por 50 aa denominado domínio D2 e um peptídeo sinal situado na extremidade 3' constituído por 20 aa (Boulant et al., 2008). A caracterização parcial da estrutura e dos domínios do capsídeo, permitiu atribuir a esta proteína participação no ciclo celular, na regulação da apoptose (Ray et al., 1996), no

metabolismo de lipídeos (Yamaguchi et al., 2005) e na evasão da resposta imune (Yamanaka et al., 2002).

As glicoproteínas do envelope do vírus (E1 e E2) ancoradas através do domínio carboxi-terminal, são os principais componentes antigênicos encontrados na superfície do HCV (Lavillette et al., 2007). A glicoproteína E2 é responsável pela entrada da partícula viral na célula hospedeira através do reconhecimento de receptores específicos tais como: CD81 (Wakita et al., 2005), LDL (Agnello et al., 1999) e SR-BI (Lindenbach et al., 2005). Na proteína E2 foram identificadas duas regiões hipervariáveis HVR1, HVR2 (Weiner et al., 1991) e mais recentemente a HVR3 (Troesch et al., 2006). A HVR1 está localizada na porção N-terminal do domínio E2. É caracterizada por ser altamente variável, imunogênica (Farci et al., 2000) e com epítomos relacionados com a produção de anticorpos neutralizantes contra o HCV (Penin et al., 2004). A HVR2 está situada entre os resíduos conservados de cisteína localizados entre as posições 459 e 486 do genoma. Foi proposto que esta região modula a ligação da glicoproteína E2 a receptores (Roccasecca et al., 2003).

As funções das proteínas NS2 e NS4B ainda não são totalmente conhecidas. Existem evidências da interação de NS2 com proteínas celulares envolvidas na defesa celular contra a invasão viral (Erdtmann et al., 2003) e de NS4B no mecanismo de transcrição do genoma viral (He et al., 2003).

A NS3 é uma proteína hidrofílica de aproximadamente 70 kDa que apresenta 3 atividades enzimáticas: serina-proteinase, helicase e nucleotídeo-trifosfatase-dependente de ATP (Tai et al., 1996; Poliakov et al., 2002; Siavoshian et al., 2004).

A NS4A forma um complexo heterodinâmico com a NS3, agindo como um cofator necessário para a atividade proteinase da NS3 (Failla et al., 1995).

A proteína NS5A é uma fosfoproteína associada à membrana com 56 Kda fosforilada, principalmente em resíduos de serina e treonina, e que também faz parte do complexo de replicação. Existem evidências de que interaja com a regulação do crescimento celular, com vias de sinalização celular e com resistência ao interferon alfa (INF- α), especialmente pela sua interação com a proteína quinase R (PKR) no seu domínio de ligação (Tan & Katze, 2001).

A proteína NS5B apresenta atividade RNA polimerase e está envolvida na replicação da partícula viral. Entretanto, esta enzima não apresenta atividade de exonuclease (proofreading), o que faz com que ocorra uma alta taxa de incorporação de nucleotídeos errados duante a replicação do genoma viral (Behrens et al., 1996).

Por último, a região 3' RNC é formada por uma seqüência variável de nucleotídeos (nt), seguida por uma região poli U e uma região altamente conservada de 98 nt, que se mostrou indispensável na replicação do genoma viral (Imbert et al., 2003).

1.7.1 Tradução do Genoma Viral

A 5' RNC é formada por 385 nt e é conservada entre os diversos isolados do HCV apresentando estrutura secundária formada por 4 domínios I, II, III e IV (Brown et al., 1992; Honda, et al., 1996) (Figura 3).

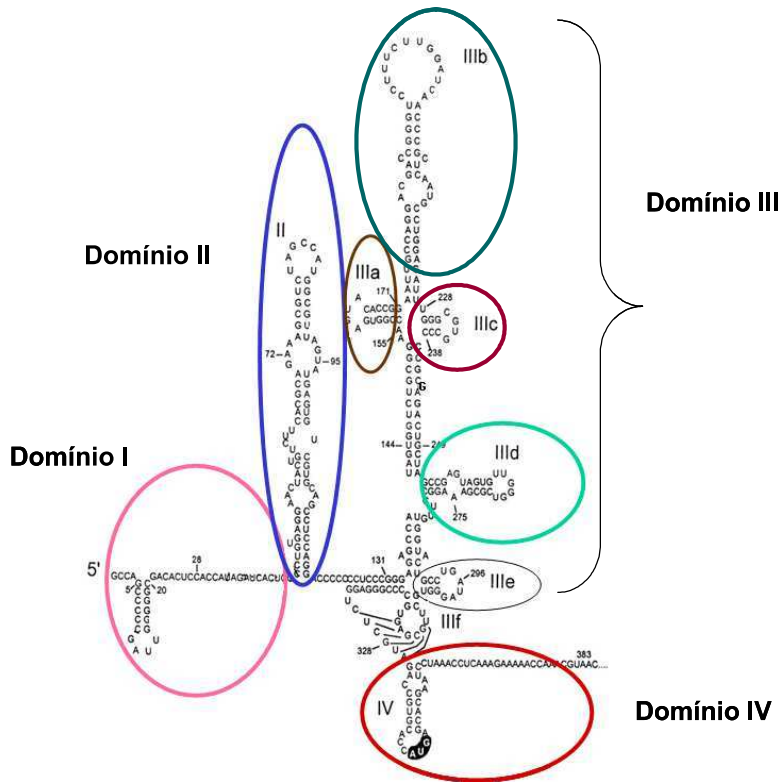


Figura 3: Esquema da estrutura secundária da 5' RNC do genoma do HCV mostrando os 4 domínios (I-IV). O sítio de entrada interno do ribossomo (IRES) é formado pelos domínios II-IV. O códon inicial é mostrado em preto na alça do domínio IV.

Existem evidências da presença nestes domínios de um sítio de entrada interno do ribossomo (IRES) que permite a tradução cap-independente do RNA viral (Gallego & Varani, 2002; He et al., 2003; Thelu et al., 2004). Durante a tradução cap-independente há o reconhecimento direto da subunidade 40S do ribossomo e do fator de iniciação de eucariota (eIF3) pelo IRES localizado nos domínios da região 5' RNC do

genoma viral. A integridade das estruturas e seqüências dos domínios II, III e IV é importante durante o processo de tradução.

O domínio I, apesar de não participar diretamente do IRES, tem a função de inibir a atividade de tradução (Rijnbrand et al., 1996). O domínio II é considerado essencial para a tradução do genoma viral, embora exista controvérsia a respeito de sua função durante o processo de tradução (Honda et al., 1996). O domínio III, o maior da região 5' RNC, é formado por 6 subdomínios IIIa, IIIb, IIIc, IIId, IIIe e IIIf. Tang et al. (1999) demonstraram que uma simples mutação nestes subdomínios poderia alterar a atividade de tradução das proteínas virais. Além disso, o domínio III é conservado entre diferentes genótipos do HCV, GB vírus B e entre os pestivirus (Honda et al., 1996). O domínio IV, onde se localiza o códon inicial (AUG), não é essencial para a atividade de tradução, entretanto sua estabilidade foi correlacionada com a eficiência da tradução viral (Brown et al., 1992; Honda et al., 1996).

Ainda não são conhecidas todas as proteínas celulares que regulam o processo de tradução do HCV. Dentre os vários fatores celulares que se ligam ao IRES destacamos: p52 (Ali et al., 2000), PTB (proteína envolvida na regulação da tradução do HCV) (Ito & Lai, 1999) e eIF3 (fator de iniciação de eucariota) (Sizova et al., 1998). Entretanto, as funções destes fatores ainda não são totalmente conhecidas.

A 5' RNC já foi estudada como um possível alvo para o desenvolvimento de novas drogas contra o HCV (Gallego & Varani, 2002; Pawlotsky & McHutchison, 2004). Moléculas que cortam o RNA ou desestabilizam a estrutura desta região poderiam impedir a tradução da poliproteína viral.

Até o momento poucos estudos visaram observar uma correlação entre a região 5' RNC e dados clínicos dos pacientes. Soler et al. (2002) verificaram que apesar de não ter sido observada nenhuma correlação entre a variabilidade de quase-espécies e o

tratamento com interferon- α , estas regiões poderiam estar envolvidas na regulação da replicação hepática e extra-hepática. Vários estudos mostraram que mudanças na região da IRES têm conseqüências na tradução do genoma viral (Laporte et al., 2000; Tang et al., 1999), porém ainda não existem estudos que correlacionam às conseqüências das variações encontradas com o tratamento (Thelu et al., 2004).

1.8 Implicações Clínicas da Variabilidade Genética do HCV

A marcante heterogeneidade genética do HCV apresenta algumas implicações clínicas que incluem: permitir ao HCV escapar da resposta imune do hospedeiro impedindo o estabelecimento de imunidade protetora e favorecendo a persistência do vírus (Forns et al., 1999); alterar a patogenicidade na doença hepática, uma vez que a infecção pelo genótipo 1 ou por múltiplas quase-espécies parece se correlacionar com maior gravidade (Zein et al., 1996); influenciar a resposta ao tratamento antiviral, já que os genótipos 1 e 4 são menos responsivos ao tratamento (Berg et al., 2003); necessidade de se utilizar regiões conservadas como alvo nos testes diagnósticos (Carithers et al., 2000) e dificuldade no desenvolvimento de vacinas, já que a resposta imune parece ser específica para um determinado tipo do vírus (Kimura & Maruyama, 1971).

Uma das maiores dificuldades no estudo do HCV deve-se à ausência de um modelo celular capaz de realizar uma replicação eficiente da partícula viral. O único modelo animal utilizado para a replicação de diferentes genótipos é o chimpanzé. Vários sistemas de cultura celular foram propostos baseados em infecções de culturas de células primárias e de pacientes infectados (Bartenschlager & Lohmann, 2000). Entretanto, todos demonstraram uma baixa reprodutibilidade e baixos níveis de replicação.

Os mecanismos envolvidos na falha da terapia em muitos casos são desconhecidos. Fatores virais e do hospedeiro foram correlacionados à falta de resposta à terapia entre pacientes infectados com genótipo 1 (Squadrito et al., 2002).

Vários grupos trabalham na identificação de fatores responsáveis pela resistência à terapia com IFN- α , focalizando a atenção na região genômica do HCV que tem habilidade de interferir com a proteína quinase dependente-RNA dupla fita (PKR), uma proteína celular induzida pelo IFN com importantes propriedades antivirais (Squadrito et al., 2002). A variabilidade na região da proteína não estrutural NS5A, designada “Região Determinante da Suscetibilidade ao IFN” (ISDR), foi associada à resistência ou sensibilidade a terapia com IFN (Nishiguchi et al., 2001; Schiappa et al., 2002).

Estudos *in vitro* mostraram que a proteína NS5A proveniente do HCV genótipo 1 resistente ao tratamento com IFN liga-se diretamente à proteína PKR e inibe sua atividade (Koev et al., 2002). Mutações dentro da ISDR na proteína NS5A previnem ligações com PKR e permitem aumento do efeito antiviral do IFN (Schiappa et al., 2002). A heterogeneidade de outra porção da proteína NS5A, designada região V3, foi indicada como um fator potencialmente capaz de interferir na capacidade do HCV abolir a atividade PKR (Squadrito et al., 2002). Porém, os relatos da literatura não esclareceram correlações entre variabilidade dessa região genômica e resposta à terapia com IFN (Schiappa et al., 2002). Vários estudos realizados no Japão sugerem que, pacientes do genótipo 1b com alta variabilidade na região ISDR podem apresentar uma resposta favorável ao tratamento com IFN associado com a carga viral (Squadrito et al., 2002). Durante et al. (2003) realizaram um estudo para verificar o padrão e a significância da heterogeneidade genética do HCV antes e durante o tratamento com IFN, utilizando a proteína NS5A e a região hipervariável 1 (HVR-1) para caracterização de quase-espécies. Os pacientes que responderam ao tratamento apresentaram maior

freqüência de mutações na região NS5A do que os pacientes que não responderam à terapia.

É importante salientar que, a compreensão de todos estes achados poderão no futuro contribuir para um maior conhecimento do mecanismo de replicação do HCV levando ao entendimento da natureza da hepatite C crônica (Watanabe et al., 2003). Tendo em vista a implicação da 5' RNC na replicação viral e da região NS5A na interação com fatores celulares que regulam a resposta protetora, este estudo tem como objetivo contribuir para a compreensão de como variações em ambas as regiões pode interferir na resposta à terapia antiviral.

2 JUSTIFICATIVA

Já foi previamente observada a existência de HCV com variações significativas na seqüência genômica da 5' RNC. O trabalho proposto visa verificar a relevância destas variações em vários níveis. Primeiramente verificar a implicação das substituições observadas na 5' NCR com a alteração na predição da estrutura secundária e em seguida, verificar a implicações destas substituições na capacidade de tradução do genoma viral. Ambas as implicações seriam uma tentativa de correlacionar possíveis mudanças na 5' RNC com a história natural da hepatite C nos pacientes infectados. Existem na literatura poucos trabalhos que correlacionam variações na 5' RNC com aspectos clínicos da doença. Entretanto, estes estudos foram realizados com um número reduzido de pacientes ou com grupos de pacientes os quais não foram bem definidos. Assim, neste trabalho foram selecionados pacientes através de critérios rígidos de inclusão e exclusão ao tratamento e com uma amostragem estatisticamente significativa. O trabalho ainda contribuirá para verificar a variabilidade genética na 5' RNC um alvo de novas drogas que estão sendo estudadas contra o HCV.

Este trabalho também irá contribuir para o esclarecimento da consequência de variações na região ISDR que associados aos marcadores virais terão um papel importante na correlação com a resposta virológica sustentada dos pacientes. Não existe até o momento nenhum estudo publicado com seqüências da região NS5A em amostras da população brasileira e sua relação com o tipo de resposta antiviral. Assim, decidimos realizar um estudo inicial desta região abrangendo as suas sub-regiões PKRBD e ISDR uma das mais analisadas na literatura.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar as variações nas 5' RNC e no gene que codifica a proteína não estrutural NS5A do HCV em pacientes com hepatite C crônica.

3.2 Objetivos Específicos

1- Analisar as seqüências de nucleotídeos e a estrutura secundária da 5' RNC e NS5A quanto a substituições de nucleotídeos encontradas.

2- Predizer e comparar as estruturas secundárias da 5' RNC com a estrutura padrão do HCV através dos programas de predição de estruturas secundárias.

3- Comparar a atividade de tradução de variantes da 5' RNC in vivo através do sistema luciferase.

4- Correlacionar as seqüências da 5' RNC e a atividade de tradução com a resposta clínica ao tratamento com IFN α -P.

5- Correlacionar variações nas seqüências da região ISDR com a resposta ao tratamento com IFN α -P.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cálculo da amostra

O estudo foi retrospectivo e apesar da literatura relatar que aproximadamente 80% dos pacientes apresentam resposta sustentada (Berg et al., 2003) a realidade do ambulatório é outra onde a frequência de resposta sustentada é de 40%. Foi realizado um cálculo da amostra levando-se em consideração a proporção de pacientes com resposta sustentada, grau de confiança de 95% e um erro admitido de 0,1. A amostra necessária calculada foi de 33 pacientes recrutados para o estudo. A Figura 4 mostra o fluxograma com todas as etapas a serem realizadas para alcançar os objetivos descritos.

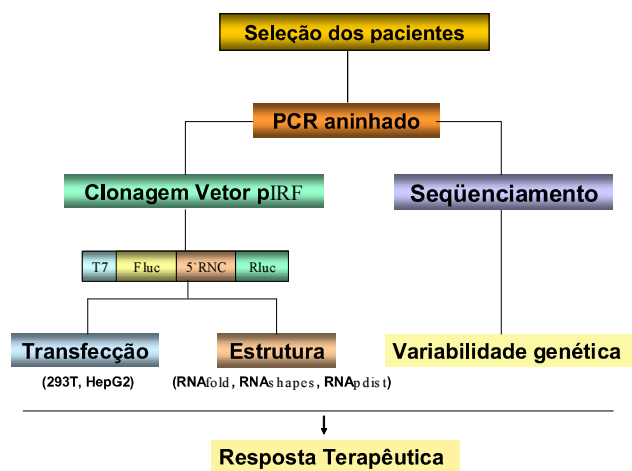


Figura 4: Fluxograma com as etapas a serem realizadas com as amostras de soro coletadas dos pacientes.

4.2 Pacientes

Para realizar este estudo, foram selecionados 33 pacientes atendidos no Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Estes pacientes pertencem a diferentes cidades do Estado de Minas Gerais (Tabela 1, Figura 4) e foram selecionados através de critérios rígidos de inclusão e exclusão para que as chances de observar diferenças significativas entre os pacientes fossem maximizadas. Estes critérios foram elaborados com base na literatura e incorporaram elementos de vários estudos a fim de tornar este trabalho mais robusto. Foram incluídos no estudo pacientes que ao diagnóstico apresentaram anti-HCV positivo, com biópsia hepática realizada, classificação Metavir entre I e II, sem história de alcoolismo, que não consumissem drogas endovenosas, não estivessem infectados pelo vírus da hepatite B ou HIV, que não fizessem uso de drogas hepatotóxicas, que não tivessem outra causa aparente para hepatite e pertencentes ao genótipo 1. Foram excluídos do estudo pacientes sem biópsia hepática ou anti-HCV negativo, com história de alcoolismo, que fizessem uso de drogas endovenosas, infectados pelo vírus da hepatite B ou HIV, que fizessem uso de drogas hepatotóxicas, com qualquer outra causa de hepatite e com genótipos diferentes de 1.

Este trabalho foi submetido e aprovado no CEP (Comitê de Ética em Pesquisa) da Faculdade de Medicina da UFMG.

Tabela 1: Distribuição dos pacientes de acordo com a cidade de origem

Cidades	Coordenadas Geográficas		Número de Pacientes
	Latitude (S)	Longitude (W)	
Belo Horizonte	19.06.15	43.56.15	20
Jequitibá	19.11.15	44.03.45	1
Cordisburgo	19.11.15	44.18.45	1
Dores do Indaiá	19.26.15	45.33.45	1
Carmo do Paraiba	19.03.45	46.18.45	1
Mariana	20.26.15	43.26.15	1
Ponte Nova	20.26.15	42.56.15	1
Conselheiro Lafaiete	20.41.15	43.48.45	1
Carangola	20.41.15	42.03.45	1
Jequeri	20.26.15	42.41.15	1
Vespasiano	19.41.15	43.53.15	1
Ubaporanga	19.41.15	42.03.45	1
Contagem	19.56.15	44.03.45	1
São José da Lapa	19.41.15	43.33.45	1

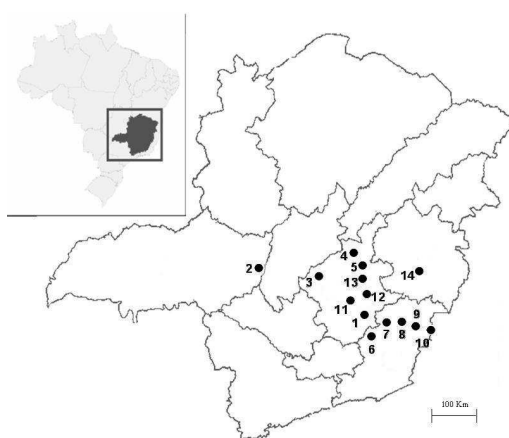


Figura 5: Distribuição geográfica dos pacientes de acordo com as coordenadas geográficas de sua cidade de origem no Estado de Minas Gerais: Belo Horizonte - 1; Carmo do Paraiba - 2; Dolores do Indaiá -3; Cordisburgo -4; São José da Lapa -5; Conselheiro Lafaiete -6; Mariana -7; Ponte Nova-8; Jequeri -9; Carangola -10; Contagem - 11; Vespasiano -12; Jequitibá -13; Ubaporanga -14.

4.3 Tratamento

Todos os pacientes foram tratados com interferon alfa peguilado e ribavirina por 48 semanas de acordo com o protocolo internacional de tratamento e pela Portaria 863/2002 do Ministério da Saúde. A resposta virológica precoce (RVP), definida como a queda de duas unidades logarítmicas na carga viral durante as primeiras 12 a 24 semanas de tratamento é preditiva de resposta virológica sustentada (RVS), ou seja, a negatificação do vírus C pelo método de PCR qualitativo (HCV RNA qualitative, Roche - com limite de detecção de 50 UI/mL) seis meses após o término do tratamento. Entretanto, pacientes que não apresentam RVP na 12^a ou 24^a semanas de tratamento apresentam uma chance mínima de RVS, a despeito de continuarem a medicação por 48 semanas (De araujo et al., 2007). Portanto, neste caso, o tratamento foi suspenso e estes pacientes foram considerados não respondedores. Dos 33 pacientes selecionados, 13 apresentaram RVS e 20 não responderam ao tratamento (NR). Neste estudo, os pacientes com resposta virológica sustentada foram classificados como respondedores (Tabela 2).

Tabela 2: Distribuição dos pacientes de acordo com a resposta ao tratamento

Número do Paciente	Genótipo 1	Resposta ao tratamento
2	a	
4	b	
5	b	
6	b	
7	b	
9	a	
11	b	
12	b	
13	b	
14	b	
15	b	Não respondedor
16	b	
19	b	
21	b	
23	b	
24	b	
25	b	
26	a	
27	a	
30	a	
1	a	
3	b	
8	b	
10	b	
17	a	
18	b	
20	b	Respondedor
22	b	
28	b	
29	b	
31	a	
32	b	
33	b	

4.4 Determinação da carga viral e genotipagem

A carga viral detectada por métodos moleculares (RT-PCR quantitativo) e a genotipagem (seqüenciamento direto) são testes rotineiros nos pacientes submetidos ao tratamento. Estes foram realizados de acordo com a rotina do tratamento pelo Núcleo de Pesquisa em Apoio Diagnóstico (NUPAD) da Faculdade de Medicina da UFMG. Os resultados obtidos fazem parte dos dados dos pacientes aos quais tivemos acesso.

4.5 Obtenção do RNA

Inicialmente, 140µl de soro, coletados antes do tratamento, foram utilizados na extração do RNA total através do QIAamp viral RNA kit (Qiagen). Foram adicionados 560µl de tampão de lise com carreador de RNA. Após incubação por 15 min à temperatura ambiente, foram adicionados 560µl de etanol a 100%. A mistura foi homogeneizada, colocada em coluna QIAamp e centrifugada a 8.000 rpm (Eppendorf 5417C) por 1 min. Esse procedimento foi repetido mais uma vez para que todo RNA liga-se à membrana de sílica-gel. Após descarte do sobrenadante, foram adicionados à coluna 500µl de tampão para lavagem da membrana e o tubo centrifugado a 14.000 rpm por 3 min. Posteriormente foram adicionados à coluna 60µl de água livre de RNase, pré-aquecida a 60°C, e o tubo centrifugado a 8.000 rpm por 1 min. O sobrenadante com o RNA viral foi em seguida armazenado a -70°C para posterior síntese de cDNA.

4.6 Síntese de cDNA da 5' RNC

A técnica de detecção viral foi realizada como descrita por Chan et al. (1992) e modificada por Oliveira et al. (1999). Para a síntese de cDNA foram utilizados 18µl de RNA e 10 pmoles do iniciador Quasi 3' (Tabela 3). O tubo com o RNA e o iniciador foi incubado a 70°C durante 10 min. Após a incubação, as amostras foram colocadas em banho de gelo e adicionados 6µl de tampão de síntese 5X (Invitrogen), 3µl de reagente desnaturante DTT a 0,1 M (Invitrogen) e 1µl de dNTPs a 10mM (Invitrogen). Em seguida, a mistura foi aquecida por 5 min a 42°C e, adicionados 1µl (200U) da enzima Superscript II (Invitrogen) para a realização da transcrição reversa da fita de RNA. O tubo foi incubado por mais 50 min a 42°C e posteriormente a 90°C por 5 min para inativar a transcriptase reversa.

4.7 Amplificação da 5' RNC

Para amplificar a 5' RNC, 2µl de cDNA foram adicionados a 2µl de tampão de PCR 10X (Invitrogen), 2µl de MgCl₂ a 50mM (Invitrogen), 1µl de dNTPs a 10mM (Invitrogen), 10 pmoles dos iniciadores Quasi 5' (2µl) e Quasi 3' (2µl) (Tabela 3) e 0,5µl da enzima Taq DNA polimerase (5U/µl) (Invitrogen). As amostras foram amplificadas em termociclador (Thermo hybrid - PCR Express), com aquecimento inicial a 94°C por 2 min, seguidos de 30 ciclos a 94°C por 1 min, 54°C por 1 min, 72°C por 1 min e uma incubação final a 72°C por mais 10 min. Cada reação foi acompanhada de um controle negativo, que consistiu na inclusão de todos os reagentes necessários à amplificação com exceção do DNA molde.

4.8 PCR aninhado da 5' RNC

Para melhorar a especificidade e a sensibilidade do teste, foi realizada uma segunda PCR, que amplificou um fragmento mais interno da 5' RNC. Esta etapa foi realizada como descrito anteriormente (4.7), substituindo pelos iniciadores IRES 5' e IRES 3' (Tabela 3).

4.9 Síntese de cDNA e amplificação da região NS5A

Para a síntese de cDNA foram utilizados os iniciadores 1A outer Rev (genótipo 1a) e 1B outer Rev (genótipo 1b) e para a amplificação os iniciadores 1A outer Rev e 1A outer Fw (genótipo 1a) e 1B outer Rev e 1B outer Fw (genótipo 1b). Em ambas as reações a metodologia empregada foi à mesma descrita anteriormente (4.7) com a substituição dos iniciadores (Tabela 3).

4.10 PCR aninhado da Região NS5A

A segunda etapa que amplificou um fragmento mais interno da região NS5A foi realizada utilizando a mesma metodologia descrita para o PCR aninhado (4.7) da 5' RNC com a substituição dos iniciadores. Nesta segunda amplificação foram utilizados os iniciadores 1A outer Rev e 1A outer Fw (genótipo 1a) e 1B outer Rev e 1B outer Fw (genótipo 1b) (Tabela 3).

Tabela 3: Regiões genômicas, genótipos, seqüências dos iniciadores utilizados em cada amplificação da PCR aninhado e a posição destes no genoma do HCV

Regiões	Genótipos	Amplificação	Iniciadores	Seqüências (5'-3')	Posição	Tamanho do fragmento
5' RNC	1a/1b	1 ^a	Quasi 5'	GCCAGCCCCCTGTTGGGGG ¹	1-18	
			Quasi 3'	AGTTCCCCGGGTGGCGGTC ¹	409-426	
		2 ^a	IRES 5'	<u>cgccgatcc</u> GCCAGCCCCCTGATG ^{1,*}	1-15	
			IRES 3'	<u>gcgcctgcag</u> TTTTCTTTGAGGTTTAGG ^{1,*}	353-371	350bp
NS5A	1a	1 ^a	1A outer F	GACTTCCACTACGTGACG GGTATGA ²	6633-6657	
			1A outer R	CTCGGCCAAGGCAGTAGATA ²	7360-7379	
		2 ^a	1A inner F	GAAGGTTGGCGAGGGATCAC ²	6904-6924	
			1A inner R	GGCCTGGGCGAATCTCCGAGA ²	7173-7193	290bp
	1b	1 ^a	1B outer F	GGGCATGACCACTGACAACGT ²	6638-6658	
			1B outer R	GCAATGGGCACCCGTGTACC ²	7259-7278	
		2 ^a	1B inner F	GCAGTGCTCACTCCATGCTCAC ²	6834-6856	
			1B inner R	GGACTCTAGCAGTGGAGGTTGTA ²	7206-7229	396bp

*As letras minúscula na seqüência dos iniciadores representam o sítio de clonagem e a região sublinhada o sítio de restrição. Seqüências dos iniciadores descrita segundo ¹Laporte et al. (2000) e ²Macquillan et al. (2004), respectivamente.

4.11 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Para visualizar o DNA amplificado, foram aplicados 5µl do produto da segunda PCR em gel de poliacrilamida a 8%. Na confecção do gel foram utilizados 10mL de acrilamida [2,67mL de Bis-acrilamida 30% (29:1) (Bio Rad), 2mL de TBE 5X (0,45M) (Pharmacia Biotech), 0,5M EDTA pH 8,0 (Pharmacia Biotech) e 5,33mL de H₂O bidestilada], 125µl de APS (Sigma) e 12,5µl de TEMED (Invitrogen). A eletroforese foi realizada no aparelho Mini-Protean II (Bio-Rad) a 50V (~15mA/gel) até a separação dos corantes, a tensão foi então elevada para 100v até o final da corrida. O gel foi corado em solução de 0,2% de nitrato de prata (Synth), revelado em solução de 0,75M de hidróxido de sódio (Synth) e fixado em solução de 10% álcool etílico e 0,5% ácido acético ambos da marca Merck.

4.12 Eletroforese em gel de agarose

Para visualizar o produto da segunda PCR foi realizada uma corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5%. Para confeccionar o gel, a agarose (Promega) foi fundida em tampão de corrida TBE 1X por aquecimento em forno de microondas. A solução foi resfriada a 60°C e aplicada na cuba de eletroforese BRL Horizontal Gel Electrophoresis Horizon 11.14 (Gibco) até sua solidificação. A eletroforese foi realizada a 100v em tampão de corrida TBE 1X. O gel foi corado com 0,5µg/mL de brometo de etídio (Sigma) e fotografado no aparelho Eagle Eye II (Stratagene)

4.13 Extração de DNA do gel de agarose

Para a extração da banda com o DNA de interesse foi utilizado o Kit QIAquick (Qiagen). A banda foi excisada do gel e transferida para um tubo eppendorf. Em seguida, foram adicionados 3 volumes (mg/µl de gel) de tampão QG de solubilização (Qiagen). O tubo foi incubado a 50°C por 10 min e posteriormente, foi adicionado 1 volume (mg/µl de

gel) de isopropanol. A amostra foi aplicada na coluna de purificação e centrifugada a 13.000 rpm por 1 min. Em seguida, a coluna foi lavada com 700µl de tampão PE (Qiagen) e centrifugada novamente a 13.000 rpm (Eppendorf 5417C) por 1 min. O DNA foi eluído em 20µl de H₂O bidestilada e armazenado a - 20°C.

4.14 Clonagem no vetor pIRF

O pIRF é um vetor bicistrônico constituído pelo promotor T7, pelo gene do *Photinus pyralis* (Fluc), pela 5' RNC do HCV e pelo gene da *Renilla luciferase* (Rluc) (Figura 5). A 5' RNC é flanqueada pelas endonucleases BamHI e PstI, respectivamente. Este vetor tem como vantagem utilizar a tradução do gene FLuc como controle interno nos experimentos de transfecção de células. Este vetor foi gentilmente cedido pelo Dra. Annie Cahour - Pesquisadora do CNRS CERVI (Virologia), Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris - França. Nos experimentos de transfecção também foi utilizado como controle o vetor pGL3 que contém apenas o gene do *Photinus pyralis* (Fluc).

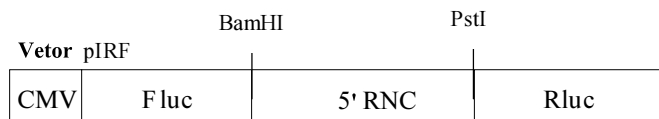


Figura 6: Esquema da estrutura do vetor pIRF mostrando a região promotora CMV, o gene da Firefly Luciferase (Fluc), a 5' RNC do HCV e o gene da Renilla Luciferase (Rluc). A posição relativa dos sítios de restrição BamHI e PstI está representada.

Para realizar a clonagem 150ng de fragmento da 5' RNC e 50ng do vetor foram digeridos com 10U de BamHI (Gibco) e PstI (Gibco). Os produtos digeridos foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose a 1%. Os fragmentos obtidos foram excisados e purificados juntos com o Kit QIAquick (Qiagen). Para realizar a ligação, foram

utilizados 22µl do produto purificado, 2,5µl de tampão T4 DNA ligase 10X (New England Biolabs) e 2U/µl de T4 ligase (New England Biolabs). Após a reação de ligação, 2µl do produto ligado foram transformados em 50µl de bactérias *Escherichia coli* quimicamente competentes da linhagem TOP 10F'. A transformação foi realizada por choque térmico a 42°C por 1 min seguido de incubação no gelo. Em seguida, foram adicionados 250µl de meio LB (5g NaCl, 2,5g extrato de levedura, 5g triptona, H₂O q.s.p 500mL, pH = 7,0) e os tubos agitados a 200 rpm (Shaker-Forma Scientific), a 37°C por 1 h. Após este período, as células foram semeadas em placa LB ágar com 100µg/mL de ampicilina (USB) e incubadas a 37°C por 16 h.

Para confirmar a presença do inserto, foi realizada uma PCR das colônias com iniciadores específicos. As colônias positivas foram cultivadas em 5mL de meio LB com 100µg/mL durante 16 h a 200 rpm (Shaker-Forma Scientific). Uma alíquota de 500µl foi retirada e criopreservada em glicerol a 50% e o restante utilizado na purificação do plasmídeo através do Kit mini-prep (Qiagen), conforme recomendações do fabricante. A concentração do plasmídeo (ng/µl) foi determinada a 260nm no Biofotômetro (Eppendorf).

4.15 Seqüenciamento

Para realizar o seqüenciamento foram utilizados 3 clones contendo o fragmento da 5 RNC de cada paciente. O seqüenciamento foi realizado no seqüenciador automático MegaBace 1000 DNA Analysis System (GE Healthcare). Foram realizadas três reações de seqüenciamento com cada iniciador IRES 5' e IRES 3'. Foram utilizados 200ng de DNA plasmidial, 4µl de kit dye terminator (GE Healthcare) e 3,3pmoles de iniciador para um volume final de 10µl. As amostras foram amplificadas utilizando 30 ciclos de 95°C por 20 seg, 50°C por 15 seg e 60°C por 1 min no termociclador (Mastercycler, Eppendorf). Os produtos amplificados foram precipitados em placas de 96 poços. A cada poço foram

adicionados 1µl de acetato de amônia (Amersham Biosciences) e 30mL de etanol 96% (Merck). A mistura foi homogeneizada e incubada por 20 min à temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi centrifugada a 4.000 rpm (Eppendorf centrifuge 5804R) a 7°C por 45 min e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 100mL de etanol 70% gelado a cada poço e a placa centrifugada novamente a 4.000 rpm a 7°C por 10 min. O sobrenadante foi descartado e a placa centrifugada invertida sobre um papel absorvente a 900 rpm por 1 seg. Após a precipitação, as amostras foram ressuspensas em 10µl de tampão de amostra (Amersham Biosciences), agitada no vortex por 2 min e sequenciadas no MegaBace. Foram utilizados os programas Phred (Ewing et al., 1998), para atribuir qualidade às seqüências e o Gene Tool (www.biotoools.com/products/genetool.html) para realizar o alinhamento dos nucleotídeos. As seqüências com valores de Phred abaixo de 40 foram descartadas e as discrepâncias entre elas editadas manualmente. Para a região NS5A foi realizado o seqüenciamento direto do cDNA utilizando os iniciadores 1A inner Rev e 1A inner Fw (genótipo 1a) e 1B inner Rev e 1B outer Fw (genótipo 1b) conforme metodologia descrita anteriormente.

4.16 Eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

O gel foi preparado a partir de 0,8% de N,N'- metileno-bisacrilamida e 30% de acrilamida (p/v) (Invitrogen). No gel de separação a 10% foi adicionado 1,5M de Tris-HCl pH 8,8 e 0,01% de SDS (Promega). Para polimerização foi adicionado persulfato de amônio a 10% em água destilada (0,5% v/v) e Temed (N,N,N',N' -tetrametil-etilenodiamina 0,05% v/v) (Invitrogen). Um gel de concentração a 4% foi preparado utilizando 0,5M Tris-HCl pH 6,8. Para eletroforese as amostras foram ressuspensas em tampão de amostra (SDS 10%, 0,5mM Tris-HCl pH 6,8, azul de bromofenol 1%, 2β-mercaptoetanol 5%, glicerol 10%), fervidas em banho-maria por 5 min e aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada a 50v no

gel de concentração e a 100v no gel de separação, em tampão de corrida (25mM de Tris-HCl, 192mM de glicina e 0,1% de SDS em pH 8,3). O gel foi corado com azul de Coomassie (azul de Coomassie brilhante R-250 0,25%, metanol 50% e ácido acético 10%) e descorado na solução de metanol a 10% e ácido acético a 5%.

4.17 Predição da estrutura secundária da 5' RNC

As estruturas secundárias da 5' RNC do HCV foram preditas e comparadas com o uso de três diferentes programas: RNAfold (Hofacker, 2003), RNAshapes (Steffen et al., 2006) e RNApdist (Bonhoeffer et al., 1993). Cada um destes programas permite comparar as possíveis estruturas secundárias sob diferentes aspectos. Enquanto o RNAfold compara apenas a estrutura ótima das seqüências, o RNAshapes e o RNApdist comparam o conjunto de possíveis estruturas das seqüências de interesse.

4.17.1 Análise da estrutura secundária utilizando o RNAfold

A partir de uma seqüência, o programa calcula a estrutura secundária termodinamicamente ótima, ou seja, aquela com Energia Livre Mínima (ELM) e juntamente com a estrutura fornece o valor desta energia. Assim, o RNAfold foi utilizado para calcular as estruturas secundárias de ELM da 5' RNC do genoma viral dos pacientes e do HCV padrão, a fim de que os valores de ELM fossem comparados. Essa comparação foi realizada entre a diferença de ELM da 5' RNC do genoma viral dos pacientes e do HCV padrão ($ELM_{\text{paciente}} - ELM_{\text{HCV}}$).

O RNAfold também permite impor restrições nas estruturas a serem preditas. Restrições são locais da estrutura secundária onde ocorre o pareamento de nucleotídeos para a formação das hélices. Assim, foram realizados dois tipos de análises. Inicialmente, as estruturas secundárias foram calculadas sem restrições. Em seguida, foram inseridas

restrições nas seqüências de maneira que as hélices preditas na 5' RNC do HCV padrão fossem mantidas na 5' RNC do genoma viral dos pacientes. A intenção deste último conjunto de análise foi verificar se as substituições na 5' RNC tornariam a estrutura do HCV padrão mais ou menos estável, ou seja, com ELM maior ou menor à ELM_{HCV} .

4.17.2 Análise da estrutura secundária utilizando o RNASHAPes

O RNASHAPes além de calcular a estrutura de menor ELM, também calcula todas as possíveis estruturas secundárias de uma seqüência. Considerando a contribuição energética de cada estrutura, foi possível definir uma distribuição de probabilidades sobre todo o espaço das estruturas. A partir de uma temperatura T, a probabilidade de cada estrutura S é dada pela fórmula:

$$P_s = \frac{\exp(-E_s/RT)}{Z(T)}$$

Onde: P_s : Probabilidade da estrutura S

E_s : Energia livre da estrutura S

R: Constante dos gases

T: Temperatura

Z(T): Função de partição, calculada através da fórmula:

$$Z(T) = \sum_s \exp(-E_s/RT)$$

Além da probabilidade, foi atribuída a cada estrutura uma shape que descreve seu formato. Uma shape é uma descrição do padrão de bifurcamento das hélices de uma estrutura secundária. Um exemplo de shape é o formato de “trevo” da estrutura secundária do RNA transportador.

O próximo passo do RNASHAPES foi particionar todo o conjunto de estruturas possíveis e agrupá-las de acordo com sua shape. A probabilidade de todas as estruturas com a mesma shape foi somada a fim de determinar sua probabilidade.

Devido ao alto custo computacional do RNASHAPES e às dificuldades de prever corretamente a estrutura secundária da 5' RNC de seqüências longas (Machado-Lima et al., 2008) tornou-se necessário realizar a predição por domínios. Para cada domínio da 5' RNC do HCV padrão foi determinada uma shape e comparada com aquelas previstas para os domínios da 5' RNC dos genomas virais, juntamente com suas probabilidades. O objetivo foi verificar se as substituições encontradas nos genomas virais alteram substancialmente a distribuição de probabilidades das shapes.

Nas análises da 5' RNC descritas nos resultados, as shapes foram numeradas de acordo com sua probabilidade na estrutura padrão da 5' RNC do HCV. Assim, a shape 1 foi aquela que apresentou maior probabilidade no HCV seguida da shape 2 e assim sucessivamente.

4.17.3 Análise da estrutura secundária utilizando o RNAPDIST

O RNAPDIST, da mesma forma que o RNASHAPES, leva em consideração todo o espaço de estruturas secundárias de uma seqüência. No entanto, este programa não realiza um particionamento deste espaço. O objetivo do RNAPDIST foi comparar os espaços de estruturas entre duas seqüências distintas. O espaço de cada estrutura é representado por um modelo probabilístico que leva em consideração as contribuições energéticas de cada estrutura do espaço. O valor fornecido pelo RNAPDIST é uma medida da distância entre os dois modelos probabilísticos, um de cada seqüência.

O RNAPDIST foi utilizado para comparar a seqüência da 5' RNC do HCV padrão e da 5' RNC do genoma viral dos pacientes. Desta forma, quanto maior o valor fornecido pelo

programa, maior a divergência entre os dois espaços de estruturas. Essa divergência é um indicativo do impacto das substituições presentes na região analisada na definição das estruturas secundárias.

4.18 Linhagens celulares

Neste estudo foram utilizadas as células HepG₂ (células de hepatoma humano) cedida pelo Prof. Dr. Maurício Resende – Laboratório de Virologia Comparada – UFMG e as células 293T (células epiteliais de rim de embrião humano) cedida pelo Dr. Aristóbolo Mendes da Silva – Departamento de Morfologia – UFMG.

4.19 Cultivo celular

Inicialmente, um tubo com as células criopreservadas foi retirado do nitrogênio líquido e colocado imediatamente no gelo. Em seguida, as células foram descongeladas a 37°C e transferidas para um tubo de fundo cônico. Foram adicionados ao tubo 5mL de meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-Invitrogen), suplementado com 10% soro bovino fetal (SBF-Invitrogen), 2mM de L-glutamina (Invitrogen), 20mg/mL de sulfato de gentamicina (Novafarma) e 5% de bicarbonato de sódio (Synth). As células foram centrifugadas a 800 rpm (Shaker-Forma Scientific) por 10 min a 37°C e o sobrenadante desprezado. O concentrado de células foi homogeneizado e transferido para uma garrafa de cultura de 25cm² contendo 4mL de meio DMEM suplementado conforme descrito anteriormente. As células foram cultivadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade. No dia seguinte, o meio de cultura foi trocado para retirar as células mortas e o resíduo de DMSO (Sigma). As garrafas cultivadas com as células HepG₂ e 293T foram repicadas semanalmente. Após a formação da monocamada, as células foram lavadas com 5mL de DMEM não suplementado e descoladas da superfície da garrafa com tripsina

(Invitrogen) a 0,034% diluída com EDTA (Invitrogen) a 0,1% pH 8,0. Em seguida, as células foram suspensas em 5mL de DMEM com 10% SBF e centrifugada a 800 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e as células suspensas novamente em 3mL de DMEM. Posteriormente, contou-se o número de células em câmara de Neubauer e $2,5 \times 10^3$ células foram semeadas nas garrafas para manutenção. A viabilidade das células após o tratamento com tripsina foi avaliada pela exclusão do azul de trypan.

4.20 Monitoramento da contaminação da cultura de células por Mycoplasma sp

Para monitorar a contaminação das células foram utilizados dois métodos de diagnósticos. O primeiro foi realizado pela observação de células coradas ao microscópio óptico de fluorescência. As células HepG₂ e 293T foram cultivadas em sistemas de lâminas com câmara de 8 poços (LabTek®). Foram adicionadas entre $8,0 \times 10^3$ a $5,0 \times 10^4$ células por poço em 200µL de meio de cultura DMEM suplementado. As câmaras foram incubadas a 37°C por 24 h para a adesão das células à lâmina. O meio de cultura foi retirado e os poços lavados 3X com PBS 1X. A lâmina foi fixada e corada com Hoechst (SIGMA®) na concentração de 5µg/mL por 30 min. Os poços foram lavados 1 vez com PBS. A câmara foi desmontada, seca, montada com lamínula e solução de montagem e preservada em papel alumínio. As células foram observadas ao microscópio óptico de fluorescência em aumento de 400X com filtro azul BG12 Zeiss e filtro de barreira n° 50.

O segundo método utilizado foi a PCR utilizando iniciadores descritos por Timenetsky et al. (2006) para amplificar parte do gene da unidade 16S do rRNA de qualquer espécie do gênero Mycoplasma sp. Aproximadamente 100µL de suspensão de células foram coletados e aquecidos a 70°C por 10 min. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 min e o sobrenadante conservado a -20°C. Para a PCR foi utilizado 1µl do lisado celular, 200µM de cada dNTP (dTTP, dATP, dCTP e dGTP), 10pmol dos iniciadores MGSO [TGC

ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC] e GPO3 [GGG AGC AAA CAG GAT AGA TAC CCT] em solução contendo Tris-HCl 10mM pH 8,0, KCl 50mM e MgCl₂ 1,5mM para um volume final de 10µL. As amostras foram amplificadas aquecendo a 94°C por 5 min, seguidos de 30 ciclos a 94°C por 30 seg, 55°C por 30 seg, 72°C por 30 seg e uma incubação final a 72°C por mais 5 min. O produto amplificado de 270pb foi observado após a separação eletroforética em gel de poliacrilamida a 6%, corado pela prata. A contaminação da PCR foi monitorada através da utilização de controles negativos da reação.

4.21 Transfecção de células

Um dia antes da transfecção, $2,0 \times 10^5$ células foram semeadas em placas de 24 poços com 500µl de DMEM suplementado sem antibiótico. Para aumentar a eficiência da transfecção foi necessário que as células apresentassem no dia da transfecção 90 a 95% de adesão sobre a superfície da garrafa. Para realizar a transfecção, 1µg do plasmídeo contendo a 5' RNC e 2µl de lipofectamina 2000 (Invitrogen) foram diluídos em tubos separados com 50µl de DMEM suplementado sem soro. Os tubos foram incubados por 5 min à temperatura ambiente. Em seguida, o DNA diluído foi adicionado ao tubo com a lipofectamina 2000 e a mistura incubada por 20 min. Foram adicionados 100µl do complexo formado DNA-lipofectamina à placa com as células a serem transfectadas. A placa foi homogeneizada e incubada a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade. Após 24 h o meio de cultura foi substituído e a placa incubada novamente. No dia seguinte, as células foram lisadas com tampão e o extrato celular armazenado a -70°C. Posteriormente, a atividade da luciferase foi quantificada no luminômetro utilizando o Kit Dual luciferase (Promega) conforme recomendações do fabricante.

4.22 Western Blot

Para determinar o nível de expressão do gene da Rluc e do Fluc foi realizado o Western blot a partir das proteínas totais extraídas dos extratos celulares. As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida-SDS-PAGE 10% e transferidas para membrana de nitrocelulose. Posteriormente, a membrana foi corada com Ponceau S (10% ácido acético e 1% de Ponceau S) para confirmar a transferência das proteínas. Após lavagem com água, a membrana foi bloqueada com TBS-Tween 0,05% com 5% de leite desnatado (Molico) por 1 h. Após lavagem em TBS-Tween, a membrana foi incubada com o anticorpo anti-luciferase (Invitrogen) diluído 1:1.000 por 1 h. A membrana foi lavada 3x com TBS-Tween 0,05% e incubada por 1 h com o anticorpo secundário anti-mouse IgG, conjugado com HRP (Invitrogen) diluído a 1:2.000. Em seguida, a membrana foi revelada com solução ECL para Western blot (Amersham Biosciences) por 2 min. O excesso de ECL foi retirado e a membrana exposta por 5 min ao filme Kodak (T-MAT G/RA Film). O filme foi revelado por 2 min em solução de revelação (Kodak), lavado em água e fixado por 2 min em solução fixadora (Kodak).

4.23 Genética de população e análise filogenética

As seqüências da 5' RNC, NS5A e as duas regiões concatenadas (5' RNC-NS5A) foram alinhadas com o programa Clustal X v.1.81 (Thompson et al. 1997) e utilizadas nas análises de genética de população e filogenia. Diferentes medidas de polimorfismo foram utilizadas para estimar a variabilidade genética das seqüências. O programa DnaSP v.4 (Rozas et al., 2003) foi utilizado para estimar o número de singletons (η_s), o número de haplótipos (H), a diversidade de nucleotídeos (π), a diversidade de haplótipos (h) e o número médio de diferenças de nucleotídeos (k). Também foi utilizado para calcular a neutralidade

das mutações através dos testes D de Tajima (1989) (Tajima, 1989) e D* e F* de Fu & Li (1993) (Fu & Li, 1993) e para calcular a razão (ω) entre as substituições não sinônimas (Ka) e sinônimas (Ks). Esta razão é um importante indicador de pressão seletiva em nível de proteína. Assim, quando a $\omega = Ka/Ks = 1$ é indicativo de evolução neutra, enquanto $\omega < 1$ indica uma seleção purificadora e $\omega > 1$ seleção diversificadora.

A análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) foi utilizada para avaliar a diferenciação genética entre e dentro dos grupos não respondedores (NR) e respondedores (R). Estas análises foram realizadas através do programa Arlequin v.3.1 (Excoffier et al., 2005).

A análise filogenética foi realizada com as regiões concatenadas. O dendograma foi construído com o programa MEGA v.3.1 (Kumar et al., 2004) através do algoritmo “neighbor-joining” (Saitou & Nei, 1987) baseado nas distâncias genéticas pareadas entre as populações. Também foi construído um “network” de haplótipos com as regiões concatenadas através do programa TCS v.1.21 utilizando o critério de 95% de parcimônia (Clement et al., 2000; Posada & Crandall, 2001).

5 RESULTADOS

5.1 Gênero e subtipo do HCV influenciam na resposta virológica sustentada ao tratamento

A idade dos pacientes variou de 25 a 75 anos nos grupos não respondedores (NR) e respondedor (R). No grupo NR, a mediana foi de 63 anos e no grupo R de 52 anos. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p = 0,0015$) (Figura 6).

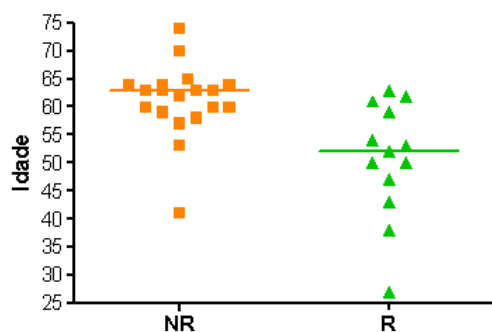


Figura 7: Resposta terapêutica segundo a idade dos pacientes. NR- paciente não respondedor e R - paciente respondedor.

Quanto à distribuição por gênero, 19 (57,5%) pacientes pertenciam ao sexo masculino e 14 (42,5%) ao sexo feminino. Com relação à resposta terapêutica, os resultados demonstram uma diferença significativa ($p = 0,016$) somente entre os pacientes do sexo feminino, em que foi observado um número significativamente maior de não respondedores (Figura 7).

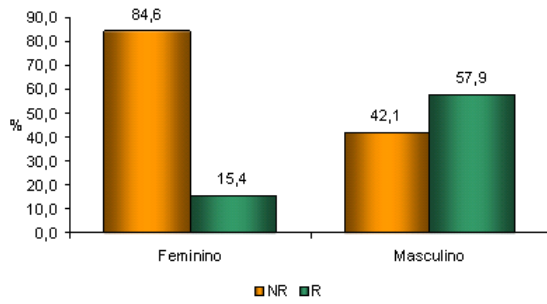


Figura 8: Resposta terapêutica segundo o gênero. NR- paciente não respondedor e R - paciente respondedor.

Com relação à resposta terapêutica por genótipos, os resultados mostram uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,022$) no grupo NR entre os pacientes do genótipo 1a e 1b (Figura 8).

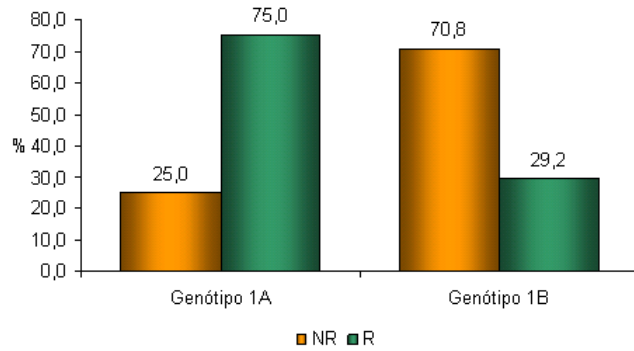


Figura 9: Resposta terapêutica entre os genótipos 1a e 1b do HCV. NR- paciente não respondedor e R - paciente respondedor.

5.2 Variações na 5' RNC do genoma do HCV

Dentre as 33 seqüências obtidas da 5' RNC, apenas a seqüência viral dos pacientes 28, 29, 30, 31, 32 e 33 não apresentaram substituições. O maior número de substituições foi observado na 5' RNC dos pacientes 10 e 6 com 8 e 7 substituições (Figura 9). Em todas as seqüências da 5' RNC foi observado na posição 204 uma substituição de citosina (C) por adenina (A), exceto na 5' RNC dos pacientes 10, 14, 15 e 19 (Tabela 4). A maioria das substituições foi observada em regiões não pareadas. Nenhuma substituição compensatória foi observada nas regiões de hélices. A Figura 10 mostra a localização de todas as substituições observadas nas seqüências da 5' RNC e a Figura 11 o resultado do alinhamento das seqüências.

Tabela 4: Localizações das substituições na 5' NCR

Número dos pacientes	Localizações das substituições						
6	42	57	66	162	204	284	318
	*C/A	A/G	A/C	*A/G	*C/A	T/C	G/A
7	204	353					
	*C/A	*A/G					
10	23	27	30	34	37	39	46 201
	*C/G	*C/T	*C/G	*A/G	*T/C	*A/G	T/C *G/C
14	103	144	209				
	*T/A	T/C	C/T				
15	268	301					
	*G/T	G/T					
18	21	126	311				
	*G/A	C/T	*G/A				
19	16	92					
	G/C	T/C					
22	26	166	204				
	*T/G	C/T	*C/A				
^a 1-5, 8, 9, 11-13, 16, 17, 20, 21, 23-27	204						
	*C/A						

^a Seqüências com apenas uma substituição de nucleotídeos

* Substituições de nucleotídeos em regiões não pareadas

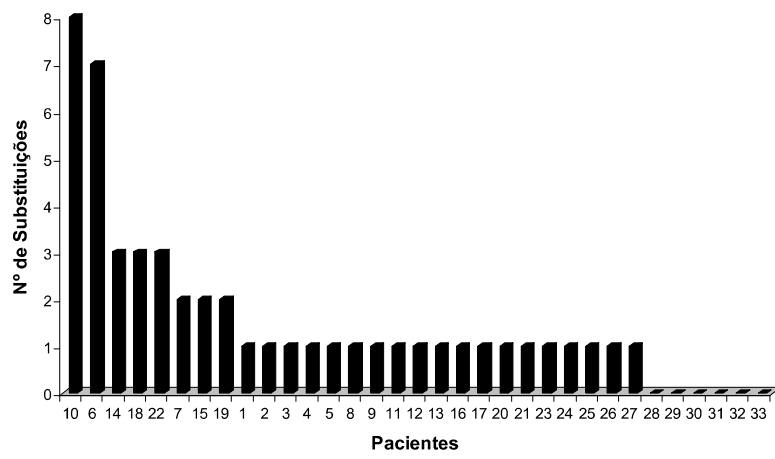


Figura 10: Número de substituições observadas na seqüência viral da 5' RNC dos 33 pacientes.

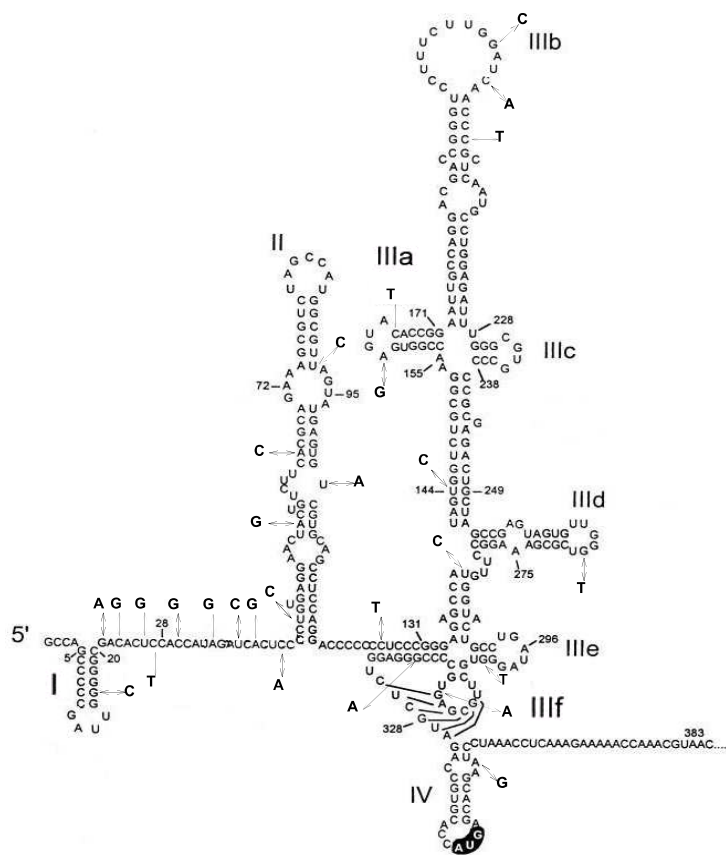


Figura 11: Representação esquemática da estrutura secundária da 5' RNC com as localizações das substituições (Honda et al., 1999).

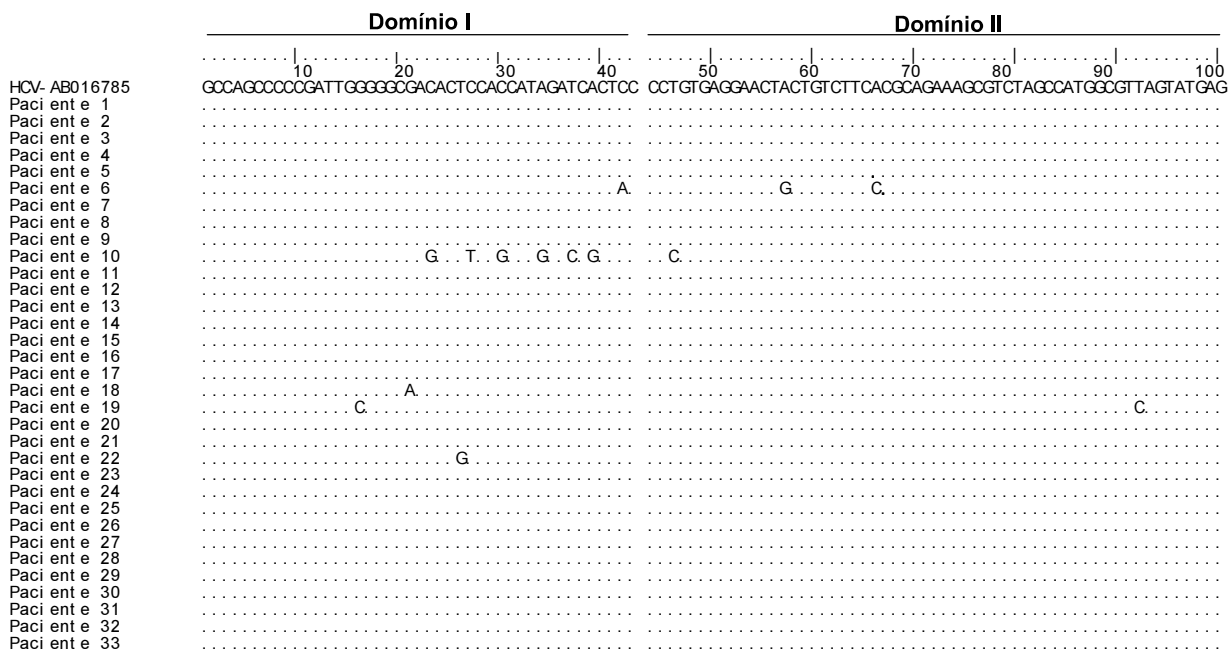


Figura 12: Alinhamento das 33 seqüências da 5' NCR do vírus da hepatite C.

	Domínio II	Domínio III
HCV- AB016785	TGTCGTGCAGCCTCCAGGACCC	CCTCCCGGAGAGCCATAGTGGTCTCCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGCCGGTCTTTCTTG
Paciente 1
Paciente 2
Paciente 3
Paciente 4
Paciente 5
Paciente 6G.....
Paciente 7
Paciente 8
Paciente 9
Paciente 10
Paciente 11
Paciente 12
Paciente 13
Paciente 14A.....C.....
Paciente 15
Paciente 16
Paciente 17
Paciente 18T.....
Paciente 19
Paciente 20
Paciente 21
Paciente 22T.....
Paciente 23
Paciente 24
Paciente 25
Paciente 26
Paciente 27
Paciente 28
Paciente 29
Paciente 30
Paciente 31
Paciente 32
Paciente 33

Figura 12: Continuação.

Domínio III

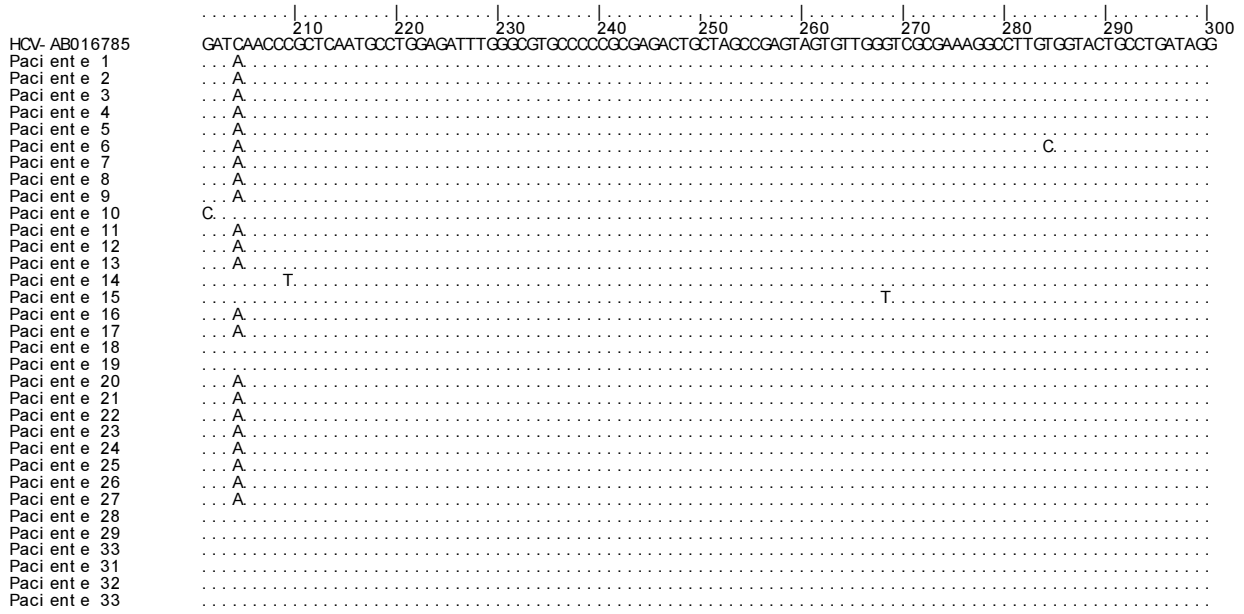


Figura 12: Continuação.

Domínio IV

	310	320	330	340	350	360	370	380
HCV- AB016785	GTGCTTGCGAGTGCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAACGT							
Paci ente 1							
Paci ente 2							
Paci ente 3							
Paci ente 4							
Paci ente 5							
Paci ente 6							
Paci ente 7							
Paci ente 8							
Paci ente 9							
Paci ente 10							
Paci ente 11							
Paci ente 12							
Paci ente 13							
Paci ente 14							
Paci ente 15							
Paci ente 16							
Paci ente 17							
Paci ente 18							
Paci ente 19							
Paci ente 20							
Paci ente 21							
Paci ente 22							
Paci ente 23							
Paci ente 24							
Paci ente 25							
Paci ente 26							
Paci ente 27							
Paci ente 28							
Paci ente 29							
Paci ente 30							
Paci ente 31							
Paci ente 32							
Paci ente 33							

Figura 12: Continuação.

5.3 Variações na seqüência da 5' RNC podem afetar a estrutura secundária do RNA viral

5.3.1 Análise da Energia Livre Mínima calculada pelo programa RNAfold

A Energia Livre Mínima (ELM) calculada com a seqüência padrão do HCV, sem e com restrições, foi de -146,6 kcal/mol e -126,7 kcal/mol, respectivamente (Figura 12 e 13). Apenas as seqüências da 5' RNC do genoma viral dos pacientes 6, 7, 10, 14, 15, 18, 19 e 22 apresentaram alterações nos valores de ELM quando comparada a ELM padrão do HCV (Figuras 12 e 13). A maior diferença de ELM foi observada com a 5' RNC do paciente 6 com e sem restrições. Este resultado mostra que as substituições presentes nesta seqüência promoveram as maiores alterações na predição da estrutura secundária.

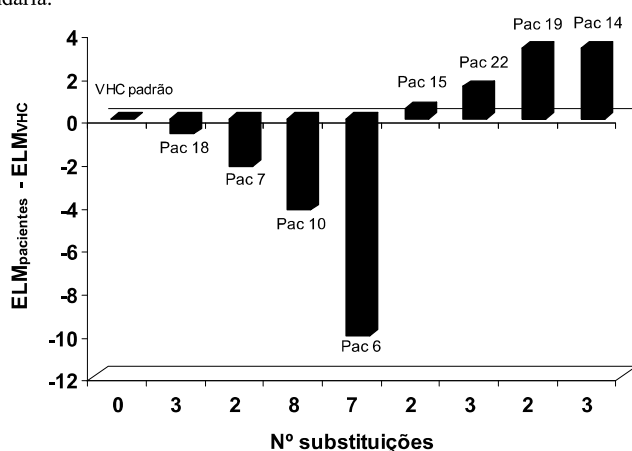


Figura 13: Diferenças entre a Energia Livre Mínima (ELM) da 5' RNC do genoma viral dos pacientes e do padrão do HCV ($ELM_{paciente} - ELM_{HCV}$) calculadas através do RNAfold sem o uso de restrições. Diferenças positivas indicam a perda de estabilidade da 5' RNC do genoma viral quando comparada com a estrutura padrão do HCV e diferenças negativas o ganho de estabilidade. ELM padrão HCV: -141,6 kcal/mol. Pac = paciente.

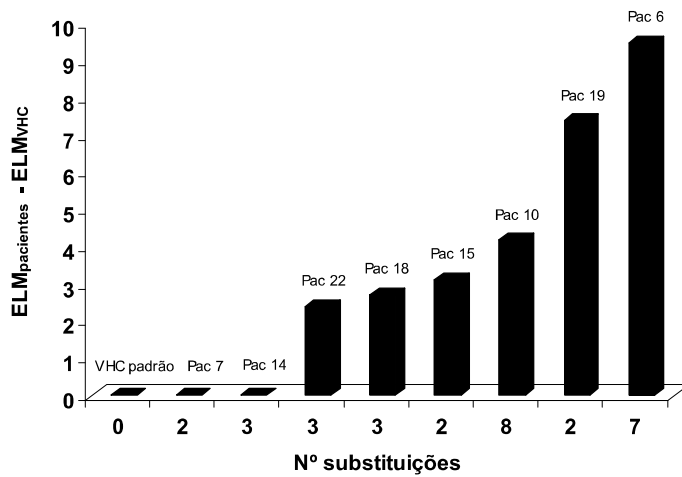


Figura 14: Diferenças entre os valores de Energia Livre Mínima (ELM) da 5' RNC do genoma viral dos pacientes e do padrão do HCV ($ELM_{paciente} - ELM_{HCV}$) calculados através do RNAfold com o uso de restrições. Diferenças positivas indicam a perda de estabilidade da 5' RNC do genoma viral quando comparada com a estrutura padrão do HCV. ELM padrão HCV: -126,7 kcal/mol. Pac = paciente.

5.3.2 Análise das shapes da estrutura secundária utilizando o programa RNASHapes

Nesta secção, as shapes foram preditas em ordem crescente de acordo com a probabilidade de predição da estrutura padrão do HCV. Assim, a shape 1 foi a mais predita seguida das shapes 2, 3, 4 e 5.

5.3.2.1. Análise do Domínio I

Para o domínio I, correspondendo aos nucleotídeos 1 a 43, foram preditas 3 shapes (Ver anexo I). Somente a 5' RNC dos genomas virais dos pacientes 6, 10, 18, 19 e 22 apresentaram substituições neste domínio (Figura 14). A shape 1 foi a mais predita,

exceto para a 5' RNC do paciente 10 que apresentou a shape 2 como a mais provável. Todas as 5' RNC do genoma viral dos pacientes apresentaram baixa probabilidade de predição para a shape 3 .

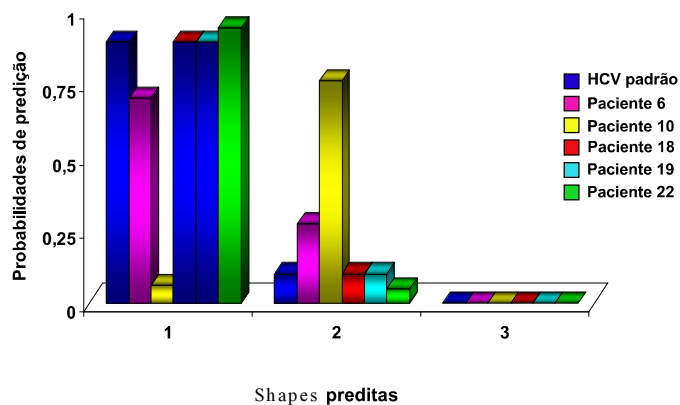


Figura 15: Probabilidades de predição das shapes para o domínio I da 5' RNC.

5.3.2.2 Análise do Domínio II

Para o domínio II, correspondendo aos nucleotídeos 44 a 124, foram preditas 5 shapes (Ver anexo I). Somente a 5' RNC dos genomas virais dos pacientes 6, 10, 14 e 19 apresentaram substituições neste domínio (Figura 15). A shape 1 apresentou a maior probabilidade de predição para a 5' RNC do genoma viral do paciente 6, seguida da shape 2 para o paciente 14, shape 3 para o paciente 19 e shape 5 para o paciente 10.

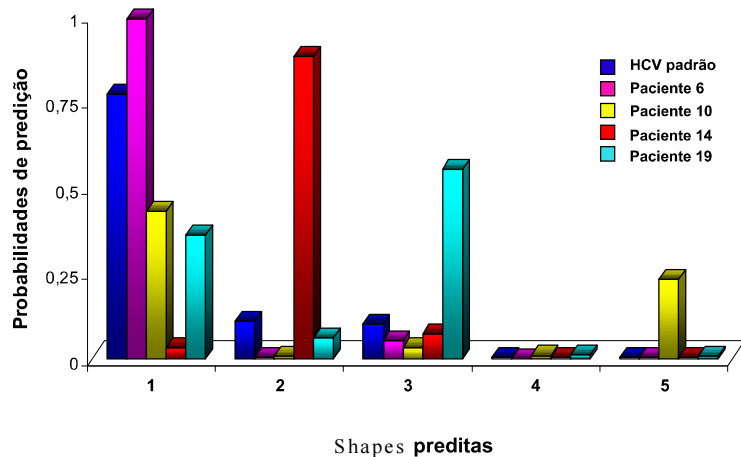


Figura 16: Probabilidades de predição das shapes para o domínio II da 5' RNC.

5.3.2.3 Análise do Domínio III e IV

Com relação ao domínio IIIa, IIIb e IIIc foram observadas substituições nas posições 162 , 166 , 204, 268 e 301 da 5' RNC do genoma viral dos pacientes. Entretanto, estas substituições não alteraram a predição destes domínios quando comparado com a estrutura padrão do HCV. Apenas a seqüência viral do paciente 15 apresentou substituições nos domínio IIIId e IIIe. Em ambos os domínios, a maior probabilidade de predição foi observada para a shape 1 (Figura 16 e 17). Somente a 5' RNC do genoma viral do paciente 18 apresentou substituição neste domínio, entretanto, este domínio não foi predito devido a dificuldade do programa RNASHAPES prever estruturas formadas por pseudonós.

Apenas a 5' RNC do genoma viral do paciente 7 apresentou substituição no domínio IV. Para este domínio foram preditas 4 shapes (Figura 18). A shape 1 apresentou a maior probabilidade de predição seguida das shapes 2 e 3.

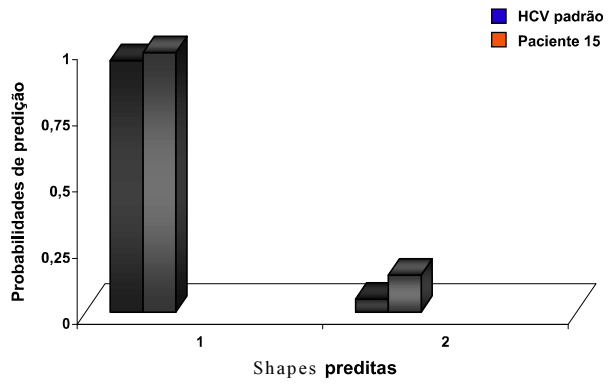


Figura 17: Probabilidades de predição das shapes para o domínio IIIId da 5' RNC .

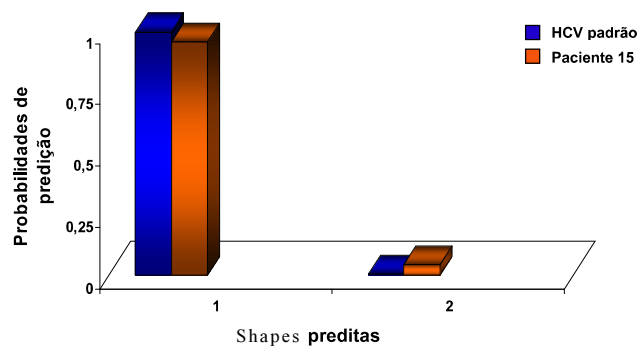


Figura 18: Probabilidades de predição de shapes para o domínio IIIe da 5' RNC.

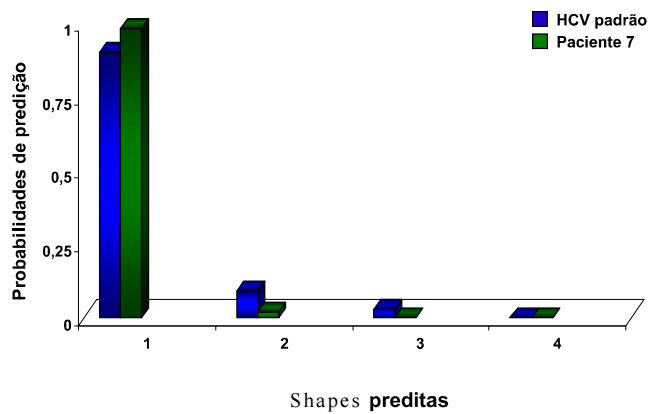


Figura 19: Probabilidades de predição das shapes para o domínio IV da 5' RNC .

5.3.3 Análise do espaço de estruturas utilizando o programa RNAdist

A distância entre os espaços das estruturas da 5' RNC do genoma viral dos pacientes 6, 7, 10, 14, 15, 18, 19 e 22 variou de 11,5 a 74 unidades quando comparada com a 5' RNC padrão do HCV (Figura 19). Estes resultados mostram que a localização das substituições influencia na distância entre as estruturas no espaço. Este resultado pode ser observado através dos valores do RNAdist calculado com a 5' RNC do genoma viral dos pacientes 10 e 14 com 8 e 3 substituições, respectivamente. A 5' RNC do genoma viral do paciente 14 apresentou maior distância da estrutura padrão do HCV quando comparado com a 5' RNC do genoma viral do paciente 10. Resultados semelhantes foram observados com a 5' RNC do genoma viral dos pacientes 14, 18 e 22 que apesar de apresentarem 3 substituições apresentaram diferentes valores de distância.

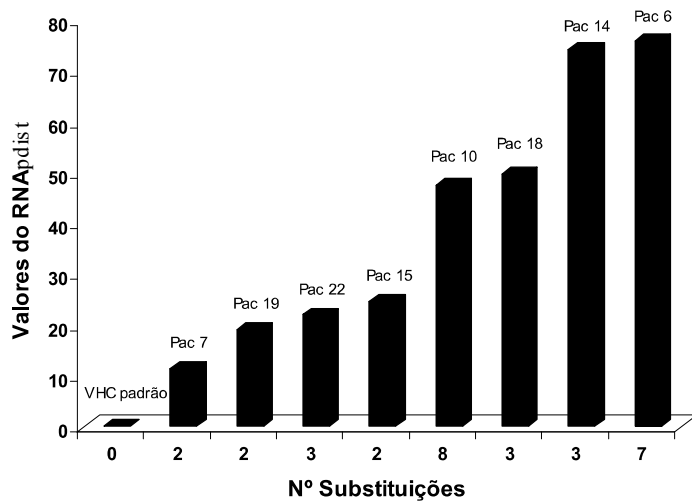


Figura 20: Valores de divergência entre a 5' RNC padrão do HCV e do genoma viral dos pacientes calculados através do RNAdist.

5.4 A 5' RNC é capaz de induzir a tradução de um gene repórter

Os experimentos de Western blot foram realizados com o intuito de testar a funcionalidade da 5' RNC. Neste experimento, foram utilizadas células 293T transfectadas com o vetor pIRF, como controle; o vetor pGL3, com o gene do *Photinus pyralis* e três construções da 5' RNC do genoma viral dos pacientes 8, 11 e 29 clonadas no vetor pIRF. Foram utilizadas apenas as construções destes pacientes porque foram os primeiros extratos a serem obtidos. O resultado mostra que o anticorpo anti-luciferase reconheceu em todas as construções duas proteínas uma de 37kDa (*Renilla reniformes*) e outra de 62kDa (*Photinus pyralis*), exceto nas células transfectadas com o vetor pGL3 que expressa apenas o gene do *Photinus pyralis* (Figura 19). Estes resultados

demonstraram a funcionalidade das 5' RNC que permitiu a expressão do gene da *Renilla reniformis* e nos propiciou a dar continuidade aos experimentos in vivo.

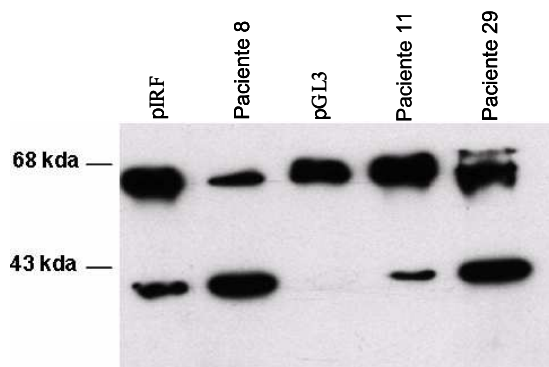


Figura 21: Resultado do Western blot realizado com extratos de células 293T transfectadas com diferentes construções. Neste experimento foi utilizados anticorpos anti-luciferase contra a proteína luciferase de *Renilla reniformis* e *Photinus pyralis*.

5.5 A 5' RNC é capaz de induzir a tradução de proteínas repórteres ativas de forma diferencial

Os experimentos de transfecção foram realizados com as células 293T e HepG₂. Nestes ensaios foram utilizadas as 5' RNC do genoma viral dos pacientes que apresentaram alterações na predição da estrutura secundária. Assim, as células foram cultivadas, lisadas e as atividades das enzimas luciferase da *Renilla reniformis* (Rluc) e de *Photinus pyralis* (Fluc) quantificada através do luminômetro. Durante os experimentos de transfecção foram utilizados como controle o vetor pGL3, que expressa somente o gene do *Photinus pyralis*, o vetor pRL-TK, que expressa somente o gene da *Renilla reniformis* e o vetor pIRF com a 5' RNC do HCV. Os resultados mostram que todas as 5' RNC dos genomas virais, exceto do paciente 10, apresentaram aumento na

atividade de tradução nas células HepG₂ quando comparado com o vetor pIRF (Figura 20). As maiores diferenças foram observadas com a 5' RNC dos genomas virais dos pacientes 6, 15 e 19 que apresentaram um aumento na atividade de tradução de 5,5; 5 e 3,5 vezes, respectivamente.

Com relação às células 293T, somente a 5' RNC do genoma viral do paciente 15 apresentou aumento na atividade de tradução quando comparado com o vetor pIRF. Em ambas as células, a redução mais drástica da expressão do gene da Renilla luciferase foi observada com a 5' RNC do genoma viral do paciente 10 (Figura 20).

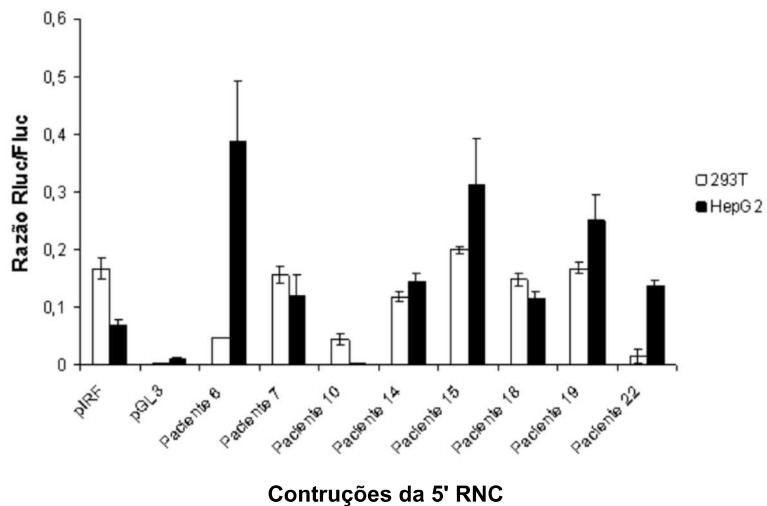


Figura 22: Eficiência de tradução da 5' RNC utilizando as células 293T e HepG₂. A eficiência de tradução foi quantificada pela razão da expressão da Rluc/Fluc. Este experimento foi realizado em triplicata e o desvio padrão calculado a partir dos dados obtidos.

5.6 Seqüenciamento do domínio PKRBD/ISDR da proteína NS5A

Foi seqüenciado o domínio PKRBD/ISDR da proteína do HCV de 25 pacientes do genótipo 1b e 8 do genótipo 1a. O número de substituições de aminoácidos observadas na Região de Ligação da Proteína Quinase Dependente-RNA Dupla Fita (PKRBD) variou de 4 a 11 nos pacientes não respondedores e de 4 a 13 nos pacientes respondedores do genótipo 1b. Já para o genótipo 1a o número de substituições variou de 4 a 9 e de 2 a 12 nos pacientes não respondedores e respondedores, respectivamente (Figura 22). Com relação à Região Determinante de Sensibilidade ao Interferon (ISDR) o número de substituições variou de 0 a 7 e de 1 a 6 nos pacientes não respondedores e respondedores do genótipo 1b e de 3 a 7 e de 2 a 6 nos pacientes não respondedores e respondedores do genótipo 1a, respectivamente (Figura 22 e 23). A Figura 24 e 25 ilustra a representação gráfica na forma de logo de aminoácidos do fragmento seqüenciado ao longo do domínio PKRBD/ISDR da proteína NS5A.

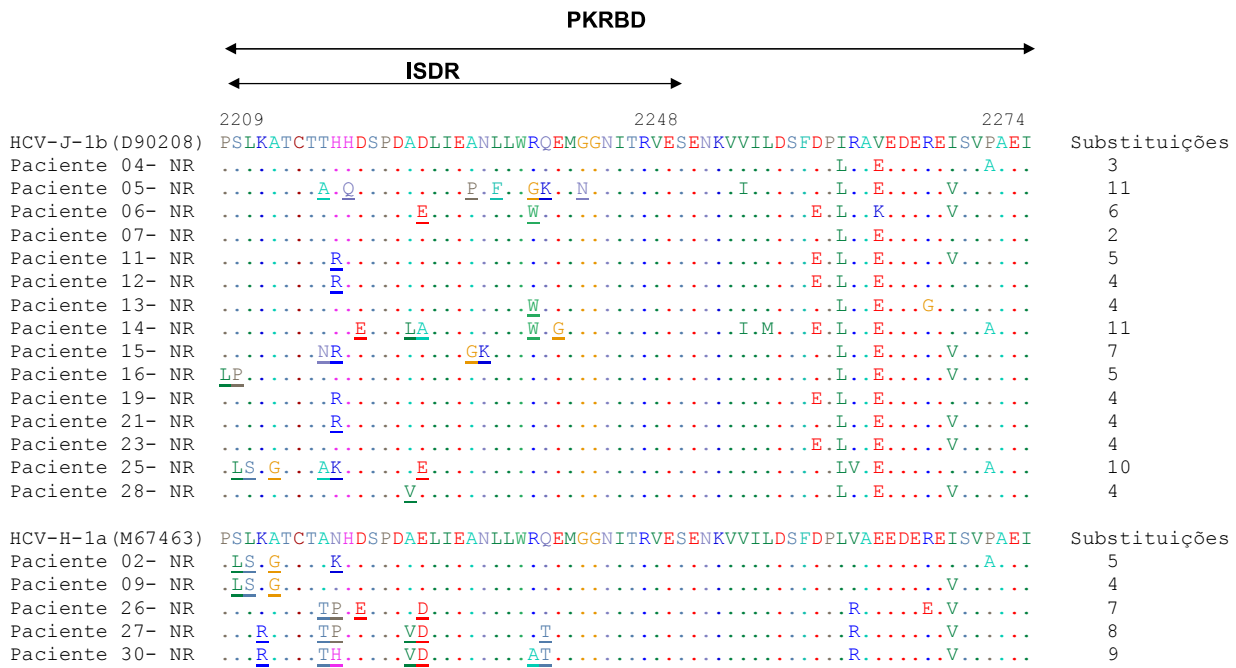


Figura 23: Alinhamento das seqüências de aminoácidos do domínio PKRBD/ISDR de 20 pacientes não respondedores do genótipo 1b e 8 do genótipo 1a. As substituições sublinhadas estão localizadas dentro do domínio ISDR da proteína NS5A.

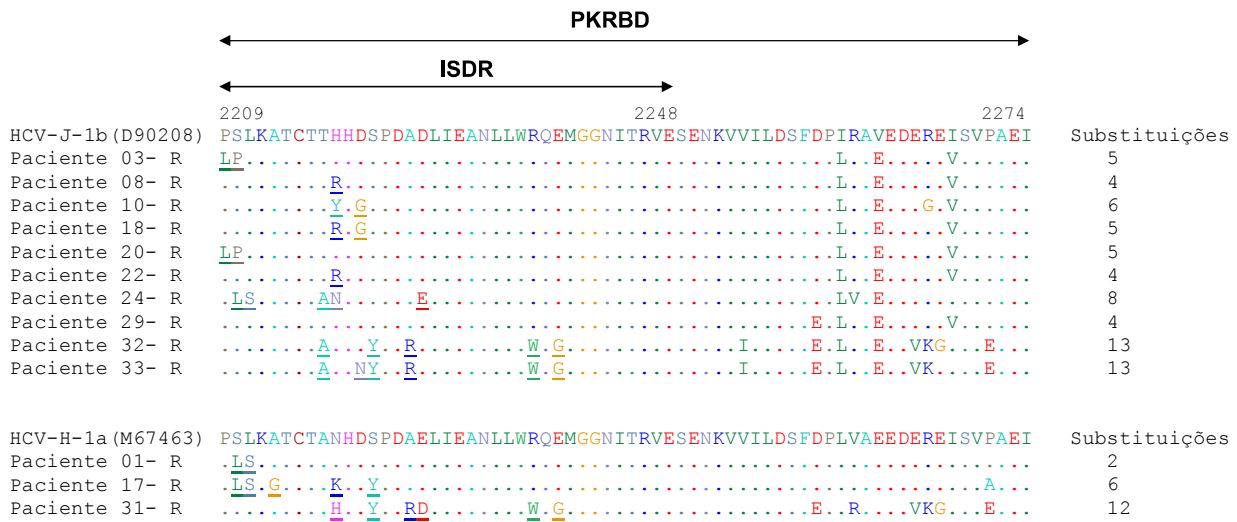


Figura 24: Alinhamento das seqüências de aminoácidos do domínio PKRBD/ISDR de 13 pacientes respondedores do genótipo 1b e 3 do genótipo 1a. As substituições sublinhadas estão localizadas dentro do domínio ISDR da proteína NS5A.

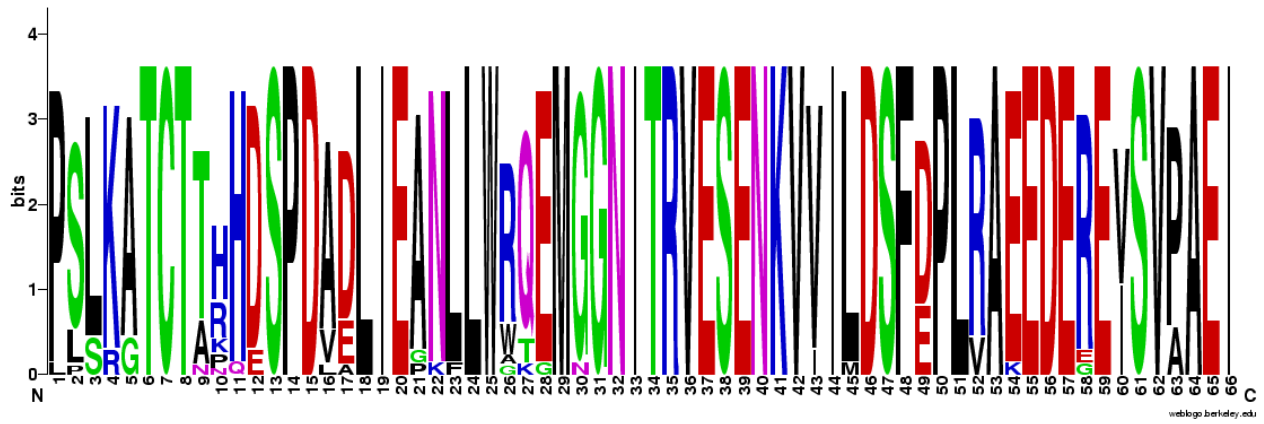


Figura 25: Representação gráfica da distribuição dos aminoácidos ao longo da sequência do domínio PKRBD/ISDR da proteína NS5A. Sequências de aminoácidos dos pacientes não respondedores. O tamanho da letra é proporcional a frequência dos aminoácidos em cada posição.

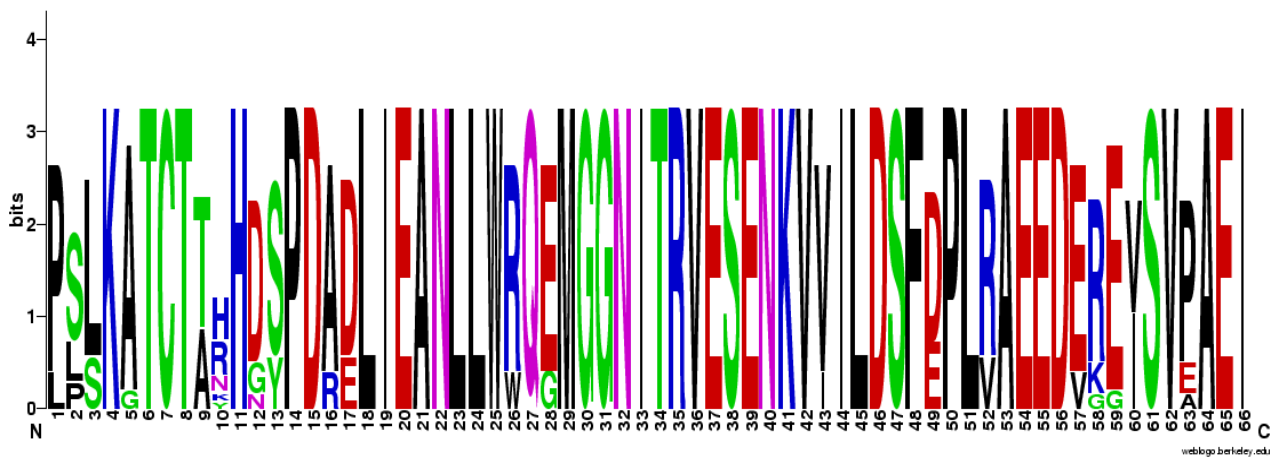


Figura 26: Representação gráfica da distribuição dos aminoácidos ao longo da sequência do domínio PKRBD/ISDR da proteína NS5A. Sequências de aminoácidos dos pacientes respondedores. O tamanho da letra é proporcional a frequência dos aminoácidos em cada posição.

5.7 Variabilidade e diferenciação genética

As análises de variabilidade e diferenciação genética foram realizadas com a 5' RNC, NS5A e com duas regiões concatenadas (5' RNC-NS5A). O grupo NR apresentou o maior número de haplótipos (n) e de singletons (η s) e como o grupo R, apresentaram baixos valores de diversidade de nucleotídeo (π) e número médio de diferença de nucleotídeos (K) para ambas as regiões. O grupo NR também apresentou um pequeno aumento na diversidade de haplótipos (h) para a região NS5A (Tabela 5).

Ambos os grupos (NR e R) apresentaram desvio da neutralidade para a 5' RNC. No entanto, não foram observados valores significativos de desvio para a região NS5A e 5' RNC-NS5A (Tabela 5).

Como a 5' RNC não é codificante, as taxas de substituições sinônimas e não sinônimas foram calculadas apenas para a região NS5A. Os resultados mostraram valores similares de K_a e K_s entre os grupos com uma taxa de substituição menor que 1 ($\omega = K_a/K_s < 1$) o que indica uma seleção purificadora (Tabela 5).

A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou uma variação entre os grupos de 11,94% e dentro deles de 88,06%, com um valor de $F_{st} = 0,12$ para a 5' RNC (Tabela 6). Nenhum valor significativo foi observado para a região NS5A

As análises filogenéticas realizadas através da construção de dendograma e da rede de haplótipos (haplotypes network) não demonstraram a formação de grupos isolados que pudessem ser relacionados com a resposta terapêutica (Figuras 26 e 27). Nestas análises foram utilizadas seqüências da região concatenada.

Tabela 5: Variabilidade genética, testes de neutralidade e taxa de substituição de nucleotídeos da 5' RNC, NS5A e as duas regiões concatenadas de pacientes não respondedores e respondedores

Variabilidade Genética	5' RNC		NS5A		Concatenadas	
	R	NR	R	NR	R	NR
η_s	14	15	16	35	30	50
n	5	7	12	19	13	20
h	0.731	0.584	0.987	0.995	1.000	1.000
π	0.007	0.005	0.153	0.143	0.053	0.050
K	2.692	1.837	28.167	26.521	30.859	28.358
Testes de Neutralidade						
D de Tajima	-1.850 ^a	-2.203 ^a	-0.131	-1.208	-0.401	-1.344
D* de Fu & Li	-2.522 ^a	-3.312 ^a	0.503	-0.797	0.030	-1.130
F* de Fu & Li	-2.676 ^a	-3.470 ^a	0.380	-1.076	0.030	-1.395
Substituição de nucleotídeos						
Ka/Ks	-	-	0.141	0.122	-	-

η_s : número de singletons; n: número de haplótipos; h: diversidade de haplótipos; π : diversidade de nucleotídeo; K: número médio de diferenças de nucleotídeos; Ka: Taxa de transição não sinônima; Ks: Taxa de transição sinônima. NR - pacientes não respondedores e R - pacientes respondedores. ^a $p < 0.05$ - valor estatisticamente significativo.

Tabela 6: Análise de variância molecular (AMOVA) entre o grupo de pacientes não respondedores e respondedores utilizando a 5' RNC, NS5A e as duas regiões concatenadas

Regiões genômicas	Categoria	% Variação	Índices de Fixação
5' RNC	Entre grupos (NR x R)	11.94	Fst = 0.11937*
	Entre pacientes (NR + R)	88.06	
NS5A	Entre grupos (NR x R)	-1.34	Fst = -0.01342
	Entre pacientes (NR + R)	101.34	
Concatenadas	Entre grupos (NR x R)	-0.50	Fst = -0.00503
	Entre pacientes (NR + R)	100.50	

*p < 0,05 - Valor estatisticamente significativo. NR - pacientes não respondedores; R - pacientes respondedores.

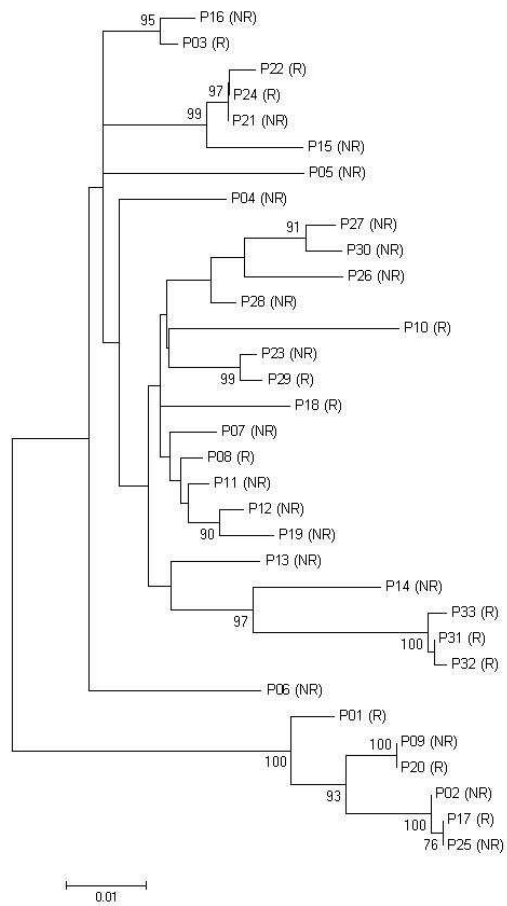


Figura 27: Árvore filogenética, não enraizada, de 33 seqüências concatenadas (5' RNC-NS5A) construída através do programa MEGA v.3.1 utilizando o algoritmo Neighbor-joining. Na Figura estão representados os valores de bootstrap acima de 70. Estes valores foram calculados com 1000 réplicas para a verificação da sustentação de ramos nas topologias. NR - pacientes não respondedores e R - pacientes respondedores.

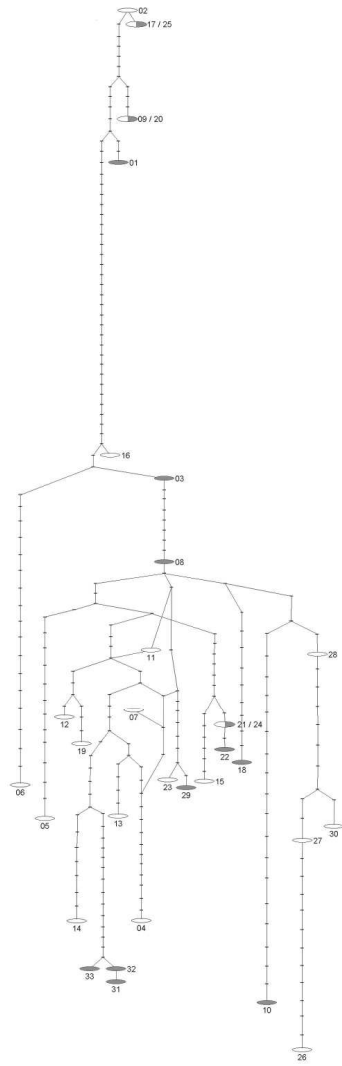


Figura 28: Rede de haplótipos (haplotypes network) de 33 seqüências concatenadas (5' RNC-NS5A) construída através do programa TCS v.1.21. Os pontos representam os haplótipos perdidos ou não amostrados. As elipses vazias e cheias representam pacientes do grupo não respondedor e respondedor, respectivamente.

6 DISCUSSÃO

No Brasil, importantes esforços têm sido realizados na área de monitoramento epidemiológico do HCV e no fornecimento de tratamento aos pacientes dentro da rede pública de saúde. Entretanto, como ocorre em outros países, o esquema terapêutico não tem alcançado o sucesso desejado (Chambers et al., 2005). Com relação ao genótipo, sabemos que o genótipo 1, o mais prevalente entre os brasileiros (Campiotto et al., 2005), é aquele que apresenta a pior resposta terapêutica. Estudos realizados em países industrializados mostraram taxas de resposta entre 42% e 56% à terapia combinada com interferon peguilado (Fried et al., 2002; Hadziyannis et al., 2004). No Brasil, um estudo de coorte realizado no Estado do Paraná com 87 pacientes, com infecções com genótipos diversos, mostrou que 32,1% apresentaram resposta ao tratamento realizado com interferon convencional e ribavirina. Entretanto, apenas 6 dos 36 infectados com o genótipo 1 responderam ao tratamento (Acras et al., 2004).

Já os genótipos 2 e 3, nos subtipos a ou b costumam apresentar boa resposta terapêutica ao uso do interferon assim como sua associação com ribavirina (Hnatyszyn 2005). Como os genótipos 4 e 6 mostram-se menos freqüentes, sua avaliação tornou-se mais difícil, podendo apresentar resultado diferente.

Para realizar este estudo, foram selecionados pacientes que fazem parte da população atendida no Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Dentre os 33 pacientes selecionados através de critérios rígidos de inclusão e exclusão, 13 (39%) apresentaram resposta ao tratamento e 20 (61%) foram considerados não respondedores. A taxa de resposta ao tratamento observada está de acordo com a descrita na literatura, em torno de 33% a 37% (Kjaergard et al., 2001). Entretanto, mesmo que o tratamento da hepatite crônica pelo sistema de saúde público brasileiro

acarrete no uso de interferons e ribavirinas de diferentes procedências e que inclua a possibilidade do uso alternado de dois tipos de interferons (convencional e peguilado), estas variáveis não afetaram os resultados obtidos.

Com relação à idade dos pacientes, foi observada uma variação entre 25 a 75 anos, com mediana de 63 anos para o grupo NR e de 52 anos para o grupo R. Estes resultados diferem dos apresentados por Poynard et al. (2000) que relataram a idade de 40 anos como um dos fatores determinantes da resposta terapêutica. Porém, este estudo não foi desenhado para abordar esta questão e pode não ter poder estatístico para tal.

Quanto à distribuição por sexo, 19 (57,5%) pertenciam ao sexo masculino e 14 (42,5%) ao sexo feminino. Os resultados mostraram uma diferença significativa com relação à resposta terapêutica somente entre pacientes do sexo feminino. Estes resultados estão de acordo com os trabalhos descritos na literatura que estabelece índices mais favoráveis de resposta para pacientes do sexo feminino (Poynard et al., 2000).

Vários estudos correlacionam o tipo de resposta à etnia (Reddy et al., 1999; Kinzie et al., 2001), indicando que populações brancas teriam uma melhor resposta ao tratamento. De acordo com o último censo demográfico brasileiro, negros e pardos são em média 45% da população, perfazendo um total de 80 milhões de pessoas. Neste estudo, apenas 3% dos pacientes eram negros, seguido de 37% de brancos e 60% de pardos de acordo com os dados constante no prontuário dos pacientes. Portanto, a nossa população de estudo não corresponde à proporção étnica da população brasileira. Por outro lado, considerando que em populações com fortes processos de miscigenação, como no caso brasileiro, se torna difícil chegar a alguma conclusão sem a realização de estudos genéticos populacionais (Rosenberg et al., 2002; Parra et al., 2003).

O tempo de infecção é outro fator que poderia influenciar na resposta ao tratamento. Entretanto, este parâmetro é de difícil determinação tanto nos estudos prospectivos como nos retrospectivos. O tempo de infecção é importante na sinalização da evolução da doença e do tipo de resposta imunológica. Alguns parâmetros como a quantificação do número de cópias de RNA, ou a determinação da infecção recente ou até mesmo a determinação exata de contaminação poderiam ajudar na identificação da evolução do quadro clínico, do tempo de infecção e na avaliação deste parâmetro em relação ao tratamento (Janssen et al., 1998; Kassutto et al., 2006).

Com relação a 5' RNC foram observadas substituições em todos os domínios, perfazendo um total de 28 substituições. A substituição de C por A na posição 204 no loop apical do domínio IIIb, foi a substituição mais observada em 20 dos 27 pacientes com substituições na 5' RNC. Sizova et al. (1998) e Laporte et al. (2003) também descreveram a presença desta substituição em seqüências de pacientes infectados com o genótipo 1 do HCV. As demais substituições encontradas na 5 RNC ainda não foram descritas na literatura.

Neste estudo, a influência das substituições na predição das estruturas secundárias da 5' NCR foi realizada pelos programas RNAfold, RNASHapes e RNAdist. Os resultados mostraram que as alterações nas estruturas estão mais relacionadas com a localização do que com o número de substituições. Estes resultados podem ser observados através da diferença de ELM calculado pelo RNAfold para a 5' RNC do genoma viral dos pacientes 10 e 6. A 5' RNC do paciente 10 com 8 substituições apresentou menor diferença de ELM do que o paciente 6 com 7 substituições, ou seja, a localização das substituições influenciou a estabilidade da estrutura secundária.

Os resultados do RNAfold também mostraram um aumento na diferença de ELM na estrutura com restrição quando comparado com a estrutura sem restrição do paciente 19. A substituição de T por C na posição 92 substituiu o pareamento canônico AT pelo não canônico AC. Esta substituição gerou uma instabilidade na hélice tornando a estrutura menos estável. Todas as estruturas com restrições apresentaram valores iguais ou superiores a ELM calculada para a estrutura padrão do HCV. Este resultado indica que as substituições diminuiriam a estabilidade da estrutura secundária atualmente conhecida para o HCV.

Devido à dificuldade do RNAsHapes prever corretamente a estrutura secundária da 5' NCR, tornou-se necessário realizar a predição por domínios. A probabilidade de predição das shapes foi inversamente proporcional ao número de substituições. Este resultado foi observado com a predição das shapes para o domínio I. A 5' RNC do genoma viral do paciente 10 com 6 substituições apresentou menor probabilidade de predição do que a shape 1 dos pacientes 18, 19 e 22 com 3, 2 e 3 substituições, respectivamente. Entretanto, este paciente apresentou a maior probabilidade de predição para a shape 2. As substituições presentes neste domínio favoreceram a formação de uma hélice extra que permitiu alterar a estrutura deste domínio (Ver anexo I).

Com relação ao domínio II, as shapes 1, 2, 3 e 5 apresentaram a maior probabilidade de predição para a 5' RNC dos pacientes 14, 6, 19 e 10, respectivamente. Com relação à shape 1, a substituição de U por A na posição 103 aumentou o tamanho da hélice através da formação de mais um pareamento canônico UA. Este pareamento estabilizou a hélice favorecendo a predição desta shape. Com relação às shapes 2, 3, e 5 não foi possível correlacionar as substituições observadas com a probabilidade de predição.

Apenas a 5' RNC do genoma viral do paciente 15 apresentou substituições nos domínios IIIId e IIIe, uma substituição de G por T na posição 268 e 301. A substituição de G por T na posição 301 alterou o pareamento canônico CG pelo não canônico CT. Esta substituição reduziu a probabilidade de predição da shape 1 quando comparada com a shape padrão do HCV.

Com relação ao domínio IV foram preditas 4 shapes. A shape 1 apresentou a maior probabilidade de predição. A substituição de A por G na posição 352 aumentou o tamanho da hélice com a formação do pareamento canônico CG. Este pareamento aumentou a estabilidade da hélice favorecendo a predição desta shape. Apenas a seqüência viral do paciente 7 apresentou substituição neste domínio. Este não foi o primeiro estudo que descreveu a importância da localização das substituições na predição da estrutura secundária do HCV, entretanto este foi o primeiro estudo que utilizou estes programas para realizar este tipo de predição. Collier et al. (1998) também descreveram a importância da localização das substituições na predição dos domínios da 5' RNC pertencentes a diferentes genótipos. Segundo estes autores a perda do pareamento canônico consiste em um dos fatores responsáveis pela alteração da predição da estrutura.

Segundo Hellen & Pestova (1999) e Thelu et al. (2004) a integridade da seqüência de nucleotídeos e a conformação da estrutura secundária da 5' NCR são importantes para a tradução das proteínas virais. Estudos realizados por Odreman-Macchioli et al. (2000) e Collier et al. (2002) observaram que substituições na 5' NCR podem influenciar a ligação de fatores celulares além de interferir na ligação da subunidade 40s do ribossomo e do fator de iniciação de eucariotos (IF3).

Para avaliar a eficiência de tradução da 5' NCR foram realizados experimentos de transfecção com as células 293T e HepG₂. Existem na literatura trabalhos que

descrevem a influência das substituições na eficiência de tradução, como o realizado por Zhang et al. (1999) que descreveram um aumento na atividade de tradução através de uma simples inserção de T na posição 207.

A 5' RNC do genoma viral do paciente 15 apresentou um aumento na atividade de tradução em ambas as células testadas. Foi observada na posição 268 do domínio IIIId uma substituição de G por T no triplete GGG. Segundo Jubin et al. (2000) e Soler et al. (2002) substituições nesta região são essenciais para a atividade de tradução da 5' NCR em estudos *in vitro* e *in vivo*. Kieft et al. (1999) demonstraram que uma simples substituição de G por C no domínio IIIId altera a estrutura do RNA o que resulta na perda de atividade da IRES. Odreman-Macchioli et al. (2000) também demonstraram a importância deste domínio na ligação da proteína ribossomal S9, uma das proteínas envolvidas na atividade de tradução desta região. Além desta substituição, também foi observado na posição 301 no domínio IIIIf uma substituição de G por A. Este domínio é um pseudonó e substituições nesta região têm sido consideradas críticas para a atividade de tradução (Fletcher & Jackson, 2002).

Um resultado interessante foi a perda da atividade de tradução da 5' NCR do genoma viral do paciente 10 nas duas células. As substituições nas posições 30, 34, 37 e 39 do domínio I estão localizadas no limite de ligação do ribossomo mapeado entre os nucleotídeos 29 a 46 (Honda et al., 1996). Estas substituições podem ter influenciado a ligação do ribossomo o que justificaria a perda da atividade de tradução desta região. Outro resultado que chamou a atenção, foi à predição realizada pelo RNAsHapes de uma hélice extra no final do domínio I, sem alterar a hélice original da estrutura padrão do HCV. Esta shape foi predita com alta probabilidade, conforme demonstrado pela shape 2. A formação desta hélice extra também poderia ter influenciado a ligação do ribossomo interferindo na atividade de tradução. Estes resultados estão de acordo com o

descrito por Rijnbrand et al. (1996) e Shimoike et al. (2006) que mostraram que o domínio I, embora não seja requerido para a atividade da 5' NCR, inibe a atividade de tradução o que sugere uma função regulatória deste domínio. Luo et al. (2003) também demonstraram através de experimento de mutagênese que a conservação da seqüência e da estrutura do domínio I (1 a 43) são importantes para a replicação do vírus. Estes resultados também estão de acordo com Laporte et al. (2000) que mostraram que a localização é mais importante para a atividade da 5' NCR do que o número de substituições.

Além da presença das substituições, também existe a possibilidade que fatores intrínsecos de cada célula poderiam ligar a 5' NCR e interferir na atividade de tradução *in vivo*. Este fato explicaria a diferença na atividade de tradução observada entre as células 293T e HepG₂. Estes resultados estão de acordo com os trabalhos de Collier et al. (1998) e Laporte et al. (2003) que também observaram diferenças na atividade de tradução dependendo do tipo de células. É importante ainda salientar que os resultados obtidos não poderiam ser atribuídos a diferenças na transfectabilidade das células, pois este fator foi descartado através da utilização do vetor bicistrônico. Estes resultados estão de acordo com os trabalhos de Laporte et al. (2000), Kassutto et al. (2006) e Motazakker et al. (2007) que também não observaram relação entre variações na estrutura secundária da 5' RNC e resposta ao tratamento.

Os resultados mostraram que a estrutura secundária, a seqüência do genoma viral e fatores intrínsecos presentes nas células influenciam a eficiência de tradução. Grassmann et al. (2005) também observaram diferença na atividade de tradução da 5' RNC do vírus da diarreia bovina e o HCV, apesar da similaridade da estrutura secundária da 5' RNC. A estrutura e a seqüência do domínio I do vírus da diarreia bovina foram decisivas para aumentar a atividade de tradução da 5' RNC.

O HCV apresentou uma baixa variabilidade genética para todas as regiões estudadas (5' RNC, NS5A e 5' RNC-NS5A). Entretanto, o grupo não respondedor apresentou um pequeno aumento na diversidade de haplótipos para a região NS5A. Este aumento pode estar relacionado à ocorrência de mecanismos de seleção específicos, relacionados com a evasão do sistema imune, atuando sobre esta região. A proteína NS5A além de fazer parte do complexo de replicação também está envolvida com outras atividades tais como: ligação e inativação da proteína quinase R (Gale, Jr. et al., 1997), bloqueio da via de apoptose através do seqüestro da proteína p53, modulação dos níveis de cálcio intracelular (Gong et al., 2001) e indução da secreção de IL-8 (Polyak et al., 2001).

Ambos os grupos (NR e R) apresentaram desvio da neutralidade para a 5' NCR. Entretanto, nenhum valor significativo foi observado para as regiões NS5A e concatenadas. Foram observados valores negativos para o teste D de Tajima. Valores negativos ocorrem em casos de expansão populacional (por exemplo, após um efeito “gargalo de garrafa”) e em casos de seleção purificadora (Hedrick 2005). Crandall et al. (1999) demonstraram que o efeito “gargalo de garrafa” reduz o progresso da infecção na fase aguda da doença. Os resultados da variabilidade genética da 5' RNC demonstraram que esta região ou está sobre pressão seletiva negativa ou a população viral sofreu um recente efeito “gargalo de garrafa” ou talvez ambas as proposições.

Por outro lado, valores negativos para os testes D^* e F^* de Fu & Li podem indicar a presença de novos haplótipos na população viral, evidenciando um processo de expansão populacional ou uma seleção balanceadora (Fu & Li, 1993). Entretanto, é difícil distinguir entre expansão ou seleção como causa dos valores negativos de D^* e F^* .

Com relação à região NS5A, foram observados valores similares de substituições não sinônimas (Ka) e sinônimas (Ks) para os grupos NR e R. Em ambos os grupos a razão de Ka/Ks foi menor que 1, indicando uma seleção purificadora. Neste contexto, as variações observadas nas amostras do HCV não demonstram seleção diversificadora positiva para ambos os grupos.

O teste de AMOVA mostrou uma variação de 11,94% entre os grupos e de 88,06% dentro dos grupos, com um valor de $F_{st} = 0,12$ para a 5' RNC. Os resultados de AMOVA e F_{st} demonstram que a população viral utilizada neste estudo apresentou uma diferenciação moderada. Nenhum valor significativo foi observado para a região NS5A.

As análises filogenéticas não demonstraram a formação de grupos isolados que pudessem ser relacionados com a resposta terapêutica. Estes resultados estão de acordo com os estudos realizados por Chambers et al. (2005) e Zekri et al. (2007) que também não observaram correlação entre seqüências da região HVR-1, NS5A/ISDR e 5' RNC com a resposta terapêutica em pacientes do genótipo 1.

A resposta virológica para o HCV é uma questão complexa (Enomoto et al., 1995, Hofgartner et al., 1997, Yamamoto et al., 1997), acredita-se que esteja mais relacionada a fatores do hospedeiro do que com a variabilidade genética do vírus. Entretanto, esta questão merece uma investigação mais detalhada, incluindo testes com outros marcadores virais e a varredura de todo o genoma viral

Com relação às implicações clínicas da região NS5A, Enomoto et al. (1995) descreveram uma relação entre resposta ao tratamento e número de substituições no domínio ISDR da proteína NS5A em pacientes japoneses portadores do genótipo 1b. Os autores observaram que a presença de 4 ou mais substituições no domínio ISDR indicava uma melhor resposta terapêutica. Sarrazin et al. (2000) também descreveram para o domínio PKRBD uma relação entre um maior número de substituições e resposta

ao tratamento. Em 2004, um estudo de meta-análise realizado com 1.230 pacientes deu suporte e validou o conceito de que substituições na região ISDR implicariam em uma melhor resposta terapêutica em pacientes do genótipo 1b (Pascu et al., 2004). Entretanto, esta correlação não foi observada em estudos realizados fora do Japão. Vários estudos têm apresentado resultados contraditórios ou por questões inerentes às características da população, do tratamento ou da metodologia empregada (Aslan et al., 2004 ; Chambers et al., 2005).

Não foi possível estabelecer uma correlação entre resposta ao tratamento e número de substituições encontradas nos domínios ISDR e PKRBD nos dois grupos estudados (Kmieciak et al., 2006). É importante salientar que, estudos realizados com quase-espécies têm demonstrado que o genótipo 1 apresenta a maior variabilidade no domínio ISDR. Este dado é importante porque pode servir no futuro como estratégia para aprofundar os estudos da região carboxi-terminal do NS5A incluindo o domínio V3 e as suas regiões circunvizinhas (Nousbam et al., 2000; Paterson et al., 2001).

Os genótipos e subtipos do HCV exibem um padrão epidemiológico complexo no que diz respeito à distribuição geográfica, prevalência, resposta ao tratamento e mecanismo de transmissão. O reconhecimento dos fatores responsáveis por este complexo epidemiológico é uma tarefa difícil, mas se resolvido, contribuirá para entender a dinâmica genética do HCV, que é um requisito básico para estabelecer estratégias preventivas de combate à doença (Jimenez-Hernandez et al., 2007).

É importante salientar, que este trabalho contribuiu para aprofundar o conhecimento nesta área através do estudo da variabilidade genética de duas regiões do genoma viral. Apesar de vários autores já terem descrito a 5' RNC, este trabalho propôs uma nova abordagem no estudo de predição da estrutura secundária. Este foi o primeiro estudo que realizou uma análise da estrutura da 5' RNC em pacientes com hepatite C

crônica utilizando os programas RNAfold, RNASHAPES e RNApdist. É bom salientar que apesar de não termos conseguido correlacionar a predição da estrutura secundária com a resposta clínica esta é uma questão importante que será resolvida em um futuro próximo.

7 CONCLUSÕES

- 1- A 5' RNC mostrou-se altamente conservada.
- 2- O valor da Energia Livre Mínima (ELM) calculada para as estruturas secundárias da 5' RNC sofrem maior influência da posição do que do número de substituições.
- 3- O polimorfismo do genoma viral associado a fatores intrínsecos das células influenciam a atividade de tradução da 5' RNC.
- 4- Não foi observada correlação entre variações na estruturas secundária da 5' RNC e resposta terapêutica.
- 5- Não foi observada correlação entre o número de substituições na região ISDR e resposta ao tratamento.
- 6- As regiões 5' RNC e NS5A apresentaram baixa variabilidade genética e apenas a 5' RNC apresentou desvio da neutralidade nos dois grupos estudados (NR e R).
- 7- Os grupos de NR e R mostraram significativa variabilidade molecular na 5' RNC.
- 8- A análise filogenética mostrou nenhuma correlação entre variações na seqüência da 5' RNC e NS5A e a resposta terapêutica.

VHC - Domínio I

<u>Seqüências</u>	<u>Estruturas</u>	<u>Shapes</u>	<u>Probabilidades</u>
<p>GCCA <u>G0000C</u> GATT <u>G3333C</u> GACTCTCACCATAGATCACTOC</p>		1	0.8957801
<p>GCCA <u>G0000C</u> GATT <u>G3333C</u> GACTCTCACCATA <u>GA</u> TCAC <u>TC</u> C</p>		2	0.1041934
<p>GCCA <u>G0000C</u> GATT <u>G3333C</u> <u>GA</u> CAC <u>TC</u> CACCATA <u>GA</u> TCAC <u>TC</u> C</p>		3	0.0000264

Paciente 6 - Domínio I

<u>Seqüências</u>	<u>Estruturas</u>	<u>Shapes</u>	<u>Probabilidades</u>
		1	0.7234562
		2	0.2764267
		3	0.0001152

Paciente 10 - Domínio I

<u>Seqüências</u>	<u>Estruturas</u>	<u>Shapes</u>	<u>Probabilidaes</u>
		2	0.7622377
		1	0.0590317
		3	0.0007097

Paciente 18 - Domínio I

<u>Seqüências</u>	<u>Estruturas</u>	<u>Shapes</u>	<u>Probabilidades</u>
<p style="text-align: center;"> </p> <p>G0CA G0000C GATT G3333C AACACTOCACCATAGATCACTOC</p>	<p style="text-align: center;"> </p>	1	0.8987437
<p style="text-align: center;"> </p> <p>G0CA G0000C GATT G3333C AACACTOCACCATA GA TCAC TC C</p>	<p style="text-align: center;"> </p>	2	0.1012563

Paciente 19 - Domínio I

<u>Seqüências</u>	<u>Estruturas</u>	<u>Shapes</u>	<u>Probabilidades</u>
<p> </p>		1	0.8952088
<p> </p>		2	0.1045624
<p> </p>		3	0.0000437

Paciente 22 - Domínio I

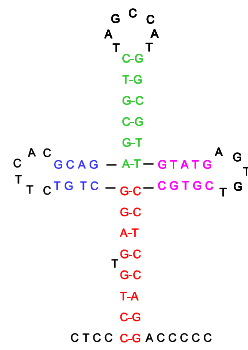
<u>Seqüências</u>	<u>Estruturas</u>	<u>Shapes</u>	<u>Probabilidades</u>
<p>GCCA <u>G0000C</u> GATT <u>G3333C</u> GACA0G0CACCATAGATCACTCC</p>		1	0.9437243
<p>GCCA <u>G0000C</u> GATT <u>G3333C</u> GACA0G0CACCATA <u>GA</u> TCAC <u>TC</u> C</p>		2	0.0562690
<p>GCCAG0C <u>00C</u> GATT <u>333</u> <u>000G</u> ACA <u>000C</u> ACCATA <u>GA</u> TCAC <u>TC</u> C</p>		3	0.0000042

VHC - Domínio II

Seqüência

CTCC OCTGTGAGG AACTA CTGT CTTCCAC GCAG AA AGCGTC TAGCCAT GCGTT A GTATG AGTGT CGTGC AG OCTCCAGG ACCCCC

Estrutura



→

Shape

1

→

Probabilidades

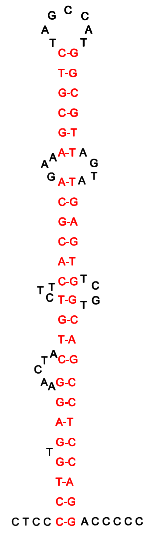
0.7781431

VHC - Domínio II

Seqüência

CTCC OCTGTGAGCAACTACTGTCTTCAAGCAGAAAGCGTC TAGCCAT GGGGTTAGTATGAGTGTGGTGCAGCCCTCCAGG ACCCCC

Estrutura



→

Shape

2

→

Probabilidades

0.1155652

VHC - Domínio II

Seqüência

CTCC OCTGTGAGG AA CTACTGTCT TC ACCG AGAAA GGGT CT AGCCATGG CGTTA GTATG AGTGT CGTGC AG OCTCCAGG ACCCC

Estrutura

```

      G A
      A A
      C-G
      G-C
      C-G
      C-A-T
      T-T-A
      T-C-G
      G-C
      T-A
      C
      T-G
      A C-G-G-T-A-T G
      A G-C-C-G-T-G C T
      G-C
      A-T
      G-C
      T
      T-A
      C-G
      CTCC C-G-A-CCCC
  
```

→ **Shape**
3

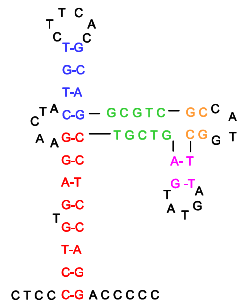
→ **Probabilidades**
0.017619

VHC - Domínio II

Seqüência

CTCC OCTGTGAGG AACTA CTGT CTTCAC GCAG AAA GCGTC TA CC CATG CC G TT AGTAT GA GT GTCGT GCAG OCTOCAGG ACCCCC

Estrutura



→ **Shape**
4

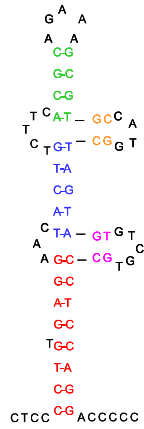
→ **Probabilidades**
0.0002603

VHC - Domínio II

Seqüência

CTCC CCTGTGAGG AAC TACTG TCITC ACCC AGAA GCGT CTA CC CATG CC GT TAGTA TGA GT GTCGT CC AG CCTCAGG ACCCCC

Estrutura



→ **Shape**

5

→ **Probabilidades**

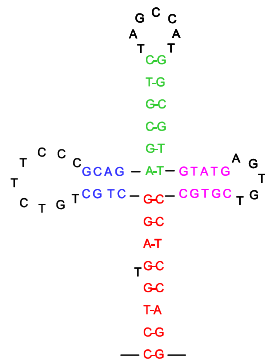
0.000103

Paciente 6 - Domínio II

Seqüência

CTAC CCTGTGAGG AA CTGC TGTCTTCCC GCAG AA ACGGTC TAGGCAT GGGGT A GTATG AGTGT CGTGC AG CCTCCAGG ACCCCC

Estrutura



→

Shape

1

→

Probabilidades

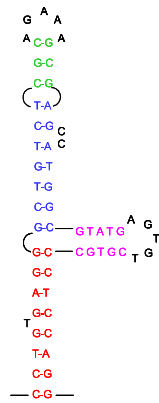
0.9947375

Paciente 6 - Domínio II

Seqüência

CTAC CCTGTGAGG AACT CCTGTCT TCC CGC AGAA GGG TCT ACCATGEC GTA GTATG AGTGT CGTGC AG CCTCCAGG ACCCCC

Estrutura



→ **Shape**
3

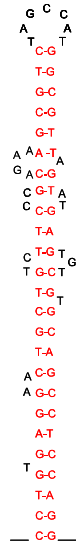
→ **Probabilidades**
0.0490892

Paciente 6 - Domínio II

Seqüência

CTAC CCTGTGAGGAACTGCTGTCTTCCCGAGAAAGGGTC TAGCCAT GGGGTTAGTATGAGTGTGGTGCAGCGCTCCAGG ACCCCC

Estrutura



→

Shape

2

→

Probabilidades

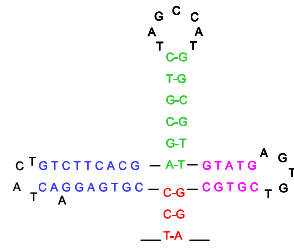
0.0049743

Paciente 10 - Domínio II

Seqüência

C **TCC** CC **CGTGAGCAAC** TACT **GTCCTCAAG** CAGAA **AGCGTC** TAGCCAT **GCGGT** A **GTATG** AGTGT **CGTGC** AGCCTOCA **GGA** CCCCC

Estrutura



→

Shape

1

→

Probabilidades

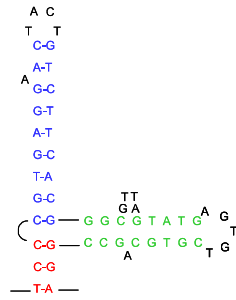
0.4273135

Paciente 10 - Domínio II

Seqüência

C TCC CC OGTGAGGAAC TACT GTCTTCAAG CAGAAAGCGTCTAGCCAT GGCGTTAGTATG AGTGT OGTGCAGGC TOCA GGA CCCCC

Estrutura



Shape

3

Probabilidades

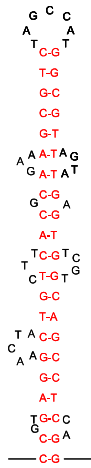
0.0343500

Paciente 10 - Domínio II

Seqüência

CTOCC COGTGAGGAACTACTGTGCTTCAOGCAGAAAGGTC TAGCCAT GGGITAGTATCAGTGTGTCAGGCTCCAGG AOOOCC

Estrutura



Shape

2



Probabilidades

0.0080424

Paciente 14 - Domínio II

Seqüência

CTCC OCTGTGAGCAACTACTGTCTTCA CCAGAAAGGGTC TAGCCAT GGGGTATGATGAGTGA CGTCAG OCTCCAGG ACCCCC

Estrutura



Shape

2

Probabilidades

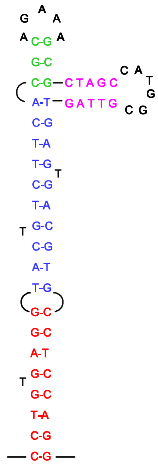
0.88699628

Paciente 14 - Domínio II

Seqüência

CTCC **OCTGTGAGG** AAC **TACTGTCTTCA** **GGG** AGAAA **GGG** T **CTAGC** CATGGC **GTTAG** TA **TGAGTGAOGTG** CAG **OCTCCAGG** ACCCCC

Estrutura



Shape

3



Probabilidades

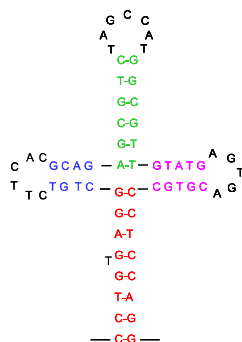
0.0777927

Paciente 14 - Domínio II

Seqüência

CTOC **OCTGTGAGG** AACTA **CTGT** CTTCAC **GCAG** AA **AGCGTC** TAGCCAT **GCGGTT** A **GTATG** AGTGA **CGTCC** AG **CCTOCAGG** ACCCCC

Estrutura



Shape

1

Probabilidades

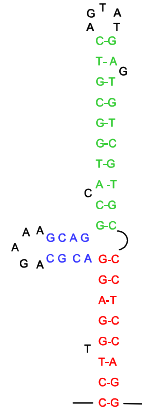
0.0347648

Paciente 19 - Domínio II

Seqüência

CTCC **OCTGTGAGG** AACTACTGTCCTC **AAGC** AGAAA **GCGT** CTA **GCCATGGGGTC** AGTAT **GAGTGTGGTGC** AG **OCTCCAGG** ACCCC

Estrutura



Shape

3

Probabilidades

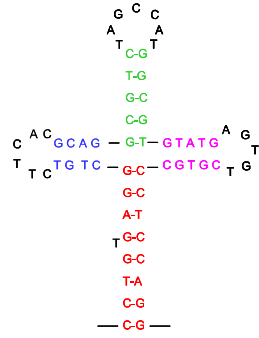
0.5593662

Paciente 19 - Domínio II

Seqüência

CTCC OCTGTGAGG AACTA CTGT CTTCAC GCAG AAA GCGTC TAGCCAT GCGGT CA GTATG AGTGT CGTGC AG OCTOCAGG AOOOOC

Estrutura



Shape

1



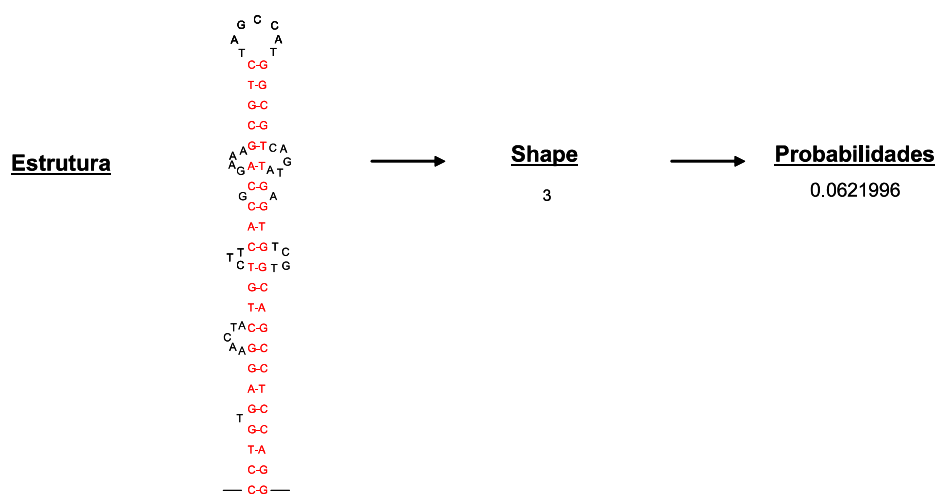
Probabilidades

0.3648171

Paciente 19 - Domínio II

Seqüência

CTCC **OCTGTGAGG**AACTACT**GTGTCTTCA**CC**CA**GA**AGGGTC** TAGCCAT **GGGTCAGTATCAGTGTGGTCCAG****CTCCAGG** ACCCC



9 REFERÊNCIAS

- Acra, RN, Pedrosa, ML, Caum, LC, Pisani, JC, Amarante, HM, and Carmes, ER. [The sustained response rates for chronic hepatitis C patients undergoing therapy with the several interferons and ribavirins supplied by Brazilians Health Ministry is comparable to those reported in the literature]. *Arq Gastroenterol.* 41[1], 3-9. 2004.
- Agnello, V, Abel, G, Elfahal, M, Knight, GB, and Zhang, QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96[22], 12766-12771. 1999.
- Alberti, A, Clumeck, N, and Collins, S. Short statement of the first European consensus conference on the treatment of chronic hepatitis B and C in HIV co-infected patients. *J Hepatol.* 42, 615-24. 2005
- Aslan, N, Bozdayi, AM, Centinkaya, H, Sarioglu, M, Turkay, C, Boskaya, H, Karayalcin, S, Yurtaydin, C and Uzunalimoglu, O. The mutation in ISDR of NS5A gene are not associated with response to interferon treatment in Turkish patients with chronic hepatitis C virus genotypes 1b infection. *Turk. J. Gastroenterol.* 15, 21-26. 2004.
- Ali, N, Pruijn, GJ, Kenan, DJ, Keene, JD, and Siddiqui, A. Human La antigen is required for the hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. *J.Biol.Chem.* 275[36], 27531-27540. 2000.
- Barbosa, AP, Martins, RM, Teles, SA, Silva, SA, Oliveira, JM, and Yoshida, CF. Prevalence of hepatitis C Virus infection among hemophiliacs in Central Brazil. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 97[5], 643-644. 2002.
- Bartenschlager, R and Lohmann, V. Replication of hepatitis C virus. *J.Gen.Virol.* 81, 1631-1648. 2000.
- Bassit, L, Ribeiro-dos-Santos, G, Da Silva, LC, Takei, K, Villaca, P, David-Neto, E, Chamone, D, and Saez-Alquezar, A. Genotype distributions of hepatitis C virus in Sao Paulo, Brazil: rare subtype found. *Hepatology* 29[3], 994-995. 1999.
- Behrens, SE, Tomei, L, and De Francesco, R. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J.* 15[1], 12-22. 1996.
- Berg, T, Sarrazin, C, Herrmann, E, Hinrichsen, H, Gerlach, T, Zachoval, R, Wiedenmann, B, Hopf, U, and Zeuzem, S. Prediction of treatment outcome in patients with chronic hepatitis C: significance of baseline parameters and viral dynamics during therapy. *Hepatology* 37[3], 600-609. 2003.
- Bonhoeffer, S, Mccaskill, JS, Stadler, PF, and Schuster, P. Rna Multistructure Landscapes - A Study Based on Temperature-Dependent Partition-Functions. *Eur.Biophys.J.* 22[1], 13-24. 1993.

- Boulant, S, Douglas, MW, Moody, L, Budkowska, A, Targett-Adams, P, and McLauchlan, J. Hepatitis C Virus Core Protein Induces Lipid Droplet Redistribution in a Microtubule- and Dynein-Dependent Manner. *Traffic*. 2008.
- Boyer, N and Marcellin, P. Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C. *J.Hepatol.* 32[1 Suppl], 98-112. 2000.
- Brown, EA, Zhang, HC, Ping, LH, and Lemon, SM. Secondary Structure of the 5' Nontranslated Regions of Hepatitis-C Virus and Pestivirus Genomic RNAs. *Nucleic Acids Res.* 20[19], 5041-5045. 1992.
- Bukh, J, Miller, RH, and Purcell, RH. Genetic heterogeneity of the hepatitis C virus. *Princess Takamatsu Symp.* 25, 75-91. 1995.
- Busek, S and Oliveira, G. Molecular epidemiology of the hepatitis C virus in Brazil. *Genet.Mol.Res.* 2[1], 117-123. 2003.
- Busek, SU, Baba, EH, Tavares Filho, HA, Pimenta, L, Salomao, A, Correa-Oliveira, R, and Oliveira, GC. Hepatitis C and hepatitis B virus infection in different hemodialysis units in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 97[6], 775-778. 2002.
- Buti, M, San Miguel, R, Brosa, M, Cabases, JM, Medina, M, Angel, CM, Fosbrook, L, and Esteban, R. Estimating the impact of hepatitis C virus therapy on future liver-related morbidity, mortality and costs related to chronic hepatitis C. *J.Hepatol.* 42[5], 639-645. 2005.
- Campiotto, S, Pinho, JR, Carrilho, FJ, Da Silva, LC, Souto, FJ, Spinelli, V, Pereira, LM, Coelho, HS, Silva, AO, Fonseca, JC, Rosa, H, Lacet, CM, and Bernardini, AP. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 38[1], 41-49. 2005.
- Carithers, RL, Jr., Marquardt, A, and Gretch, DR. Diagnostic testing for hepatitis C. *Semin.Liver Dis.* 20[2], 159-171. 2000.
- Carneiro, MA, Martins, RM, Teles, SA, Silva, SA, Lopes, CL, Cardoso, DD, Vanderborght, BO, and Yoshida, CF. Hepatitis C prevalence and risk factors in hemodialysis patients in Central Brazil: a survey by polymerase chain reaction and serological methods. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 96[6], 765-769. 2001.
- Chambers, TJ, Fan, X, Droll, DA, Hembrador, E, Slater, T, Nickells, MW, Dustin, LB, and Dibisceglie, AM. Quasispecies heterogeneity within the E1/E2 region as a pretreatment variable during pegylated interferon therapy of chronic hepatitis C virus infection. *J.Virol.* 79[5], 3071-3083. 2005.
- Chan, SW, Mcomish, F, Holmes, EC, Dow, B, Peutherer, JF, Follett, E, Yap, PL, and Simmonds, P. Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. *J.Gen.Virol.* 73 (Pt 5), 1131-1141. 1992.

- Cheney, CP, Chopra, S, and Graham, C. Hepatitis C. *Infect.Dis.Clin.North Am.* 14[3], 633-667. 2000.
- Choo, QL, Kuo, G, Weiner, AJ, Overby, LR, Bradley, DW, and Houghton, M. Isolation of A Cdna Clone Derived from A Blood-Borne Non-A, Non-B Viral-Hepatitis Genome. *Science* 244[4902], 359-362. 1989.
- Clement, M, Posada, D, and Crandall, KA. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol.Ecol.* 9[10], 1657-1659. 2000.
- Collier, AJ, Tang, SX, and Elliott, RM. Translation efficiencies of the 5' untranslated region from representatives of the six major genotypes of hepatitis C virus using a novel bicistronic reporter assay system. *J.Gen.Virol.* 79, 2359-2366. 1998.
- Crandall, KA, Vasco, DA, Posada, D, and Imamichi, H. Advances in understanding the evolution of HIV. *AIDS* 13 Suppl A, S39-S47. 1999.
- Craxi, A and Licata, A. Clinical trial results of peginterferons in combination with ribavirin. *Semin.Liver Dis.* 23 Suppl 1, 35-46. 2003.
- Davidson, F, Simmonds, P, Ferguson, JC, Jarvis, LM, Dow, BC, Follett, EA, Seed, CR, Krusius, T, Lin, C, and Medgyesi, GA. Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' non-coding region. *J.Gen.Virol.* 76 (Pt 5), 1197-1204. 1995.
- De araujo, ES, Mendonça, JS, Barone, AA, Junior, FL, Ferreira, MS, Focaccia, R, Pawlotskys, JM, and Brazilian Society of Infectious Diseases HCV Consensus Group. Consensus of the brazilian society of infectious diseases on the management and treatment of hepatitis C. *Braz. J. Infect. Dis.* 11, 446-450. 2007.
- Donahue, JG, Munoz, A, Ness, PM, Brown, DE, Jr., Yawn, DH, McAllister, HA, Jr., Reitz, BA, and Nelson, KE. The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. *N.Engl.J.Med.* 327[6], 369-373. 1992.
- Durante, ME, Forton, DM, Ruggiero, G, and Karayiannis, P. Hepatitis C virus E2 and NS5A region variability during sequential treatment with two interferon-alpha preparations. *J.Med.Virol.* 70[1], 62-73. 2003.
- Enomoto, N, Sakuma, I, Asahina, Y, Kurosaki, M, Murakami, T, Yamamoto, C, Izumi, N, Marumo, F, and Sato, C. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J.Clin.Invest.* 96[1], 224-230. 1995.
- Erdtmann, L, Franck, N, Lerat, H, Le Seyec, J, Gilot, D, Cannie, I, Gripon, P, Hibner, U, and Guguen-Guillouzo, C. The hepatitis C virus NS2 protein is an inhibitor of CIDE-B-induced apoptosis. *J.Biol.Chem.* 278[20], 18256-18264. 2003.
- Erensoy, S. Diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection and laboratory monitoring of its therapy. *J.Clin.Virol.* 21[3], 271-281. 2001.

- Ewing, B, Hillier, L, Wendl, MC, and Green, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8[3], 175-185. 1998.
- Excoffier, L, Lawlor, S, and Schneider, S. Arlequin ver 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. [3.0]. 2005.
- Excoffier, L, Smouse, PE, and Quattro, JM. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131[2], 479-491. 1992.
- Failla, C, Tomei, L, and DeFrancesco, R. An amino-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protease is essential for interaction with NS4A. *J. Virol.* 69, 1769-1777. 1995.
- Farci, P, Shimoda, A, Coiana, A, Diaz, G, Peddis, G, Melpolder, JC, Strazzera, A, Chien, DY, Munoz, SJ, Balestrieri, A, Purcell, RH, and Alter, HJ. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 288[5464], 339-344. 2000.
- Feinstone, SM, Kapikian, AZ, Purcell, RH, Alter, HJ, and Holland, PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. 1975. *Rev.Med.Virol.* 11[1], 3-8. 2001.
- Ferenci, P. Predicting the therapeutic response in patients with chronic hepatitis C: the role of viral kinetic studies. *J.Antimicrob.Chemother.* 53[1], 15-18. 2004.
- Fletcher, SP and Jackson, RJ. Pestivirus Internal Ribosome Entry Site (IRES) structure and function: Elements in the 5' untranslated region important for IRES function. *J.Virol.* 76[10], 5024-5033. 2002.
- Focaccia, R, da Conceicao, OJ, Sette, H, Jr., Sabino, E, Bassit, L, Nitrini, DR, Lomar, AV, Lorengo, R, Vieira, DS, Kiffer, CR, Santos, EB, Gonzales, MP, Saez-Alquezar, A, Riscal, JR, and Fischer, D. Estimated Prevalence of Viral Hepatitis in the General Population of the Municipality of Sao Paulo, Measured by a Serologic Survey of a Stratified, Randomized and Residence-Based Population. *Braz.J.Infect.Dis.* 2[6], 269-284. 1998.
- Forns, X, Purcell, RH, and Bukh, J. Quasispecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus. *Trends Microbiol.* 7[10], 402-410. 1999.
- Freitas SZ, Cunha RV, Martins RMB, Teles SA, Ibanhes ML, Motta-Castro ARC 2008. Prevalence, genotypes and risk factors associated with hepatitis C virus infection in hemodialysis patients in Campo Grande, MS, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 405-408.
- Fried, MW, Shiffman, ML, Reddy, KR, Smith, C, Marinos, G, Goncales, FL, Jr., Haussinger, D, Diago, M, Carosi, G, Dhumeaux, D, Craxi, A, Lin, A, Hoffman, J, and Yu, J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N.Engl.J.Med.* 347[13], 975-982. 2002.

- Fu, YX and Li, WH. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133[3], 693-709. 1993.
- Gale, MJ, Jr., Korth, MJ, Tang, NM, Tan, SL, Hopkins, DA, Dever, TE, Polyak, SJ, Gretch, DR, and Katze, MG. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 230[2], 217-227. 1997.
- Gallego, J and Varani, G. The hepatitis C virus internal ribosome-entry site: a new target for antiviral research. *Biochem.Soc.Trans.* 30[2], 140-145. 2002.
- Gong, G, Waris, G, Tanveer, R, and Siddiqui, A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 9599-9604. 2001.
- Gramenzi, A, Andreone, P, Fiorino, S, Camma, C, Giunta, M, Magalotti, D, Cursaro, C, Calabrese, C, Arienti, V, Rossi, C, Di Febo, G, Zoli, M, Craxi, A, Gasbarrini, G, and Bernardi, M. Impact of interferon therapy on the natural history of hepatitis C virus related cirrhosis. *Gut* 48[6], 843-848. 2001.
- Gretch, DR, Corazon dela Rosa, MT, Carithers Jr, RL, Wilson, RA, Williams, B and Corey L. Assessment of hepatitis C viremia using molecular amplification technologies: Correlations and clinical implications. *Ann Inter Med.* 123(5), 321-329. 1995.
- Gretch, DR. Use and interpretation of HCV diagnostic tests in the clinical setting. *Clin.Liver Dis.* 1[3], 543-57. 1997.
- Gonçalves, PL, Cunha, CB, Busek, SC, Oliveira, GC, Ribeiro-Rodrigues, R and Pereira, FE. Detection of hepatitis C virus RNA in saliva samples from patients with seric anti-HCV antibodies. *Braz. J. Infect. Dis.* 9[1], 28-34. 2005.
- Hadziyannis, SJ. The spectrum of extrahepatic manifestations in hepatitis C virus infection. *J.Viral Hepat.* 4[1], 9-28. 1997.
- Hadziyannis, SJ and Papatheodoridis, GV. Peginterferon-alpha2a (40 kDa) for chronic hepatitis C. *Expert.Opin.Pharmacother.* 4[4], 541-551. 2003.
- Hadziyannis, SJ, Sette, H, Jr., Morgan, TR, Balan, V, Diago, M, Marcellin, P, Ramadori, G, Bodenheimer, H, Jr., Bernstein, D, Rizzetto, M, Zeuzem, S, Pockros, PJ, Lin, A, and Ackrill, AM. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann.Intern.Med.* 140[5], 346-355. 2004.
- Haley, RW and Fischer, RP. The tattooing paradox: are studies of acute hepatitis adequate to identify routes of transmission of subclinical hepatitis C infection? *Arch.Intern.Med.* 163[9], 1095-1098. 2003.
- Hedrick, PW. *Genetics of Populations*, 3rd ed., Jones and Bartlett, Boston, 737 pp. 2005.

- He, YP, Yan, W, Coito, C, Li, Y, Gale, M, and Katze, MG. The regulation of hepatitis C virus (HCV) internal ribosome-entry site-mediated translation by HCV replicons and nonstructural proteins. *J.Gen.Virol.* 84, 535-543. 2003.
- Hellen, CU and Pestova, TV. Translation of hepatitis C virus RNA. *J.Viral Hepat.* 6[2], 79-87. 1999.
- Hnatyszyn, HJ. Chronic hepatitis C and genotyping: the clinical significance of determining HCV genotypes. *Antivir. Ther.* 10, 1-11. 2005.
- Hofacker, IL. Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Res.* 31[13], 3429-3431. 2003.
- Honda, M, Brown, EA, and Lemon, SM. Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA. *RNA* 2[10], 955-968. 1996.
- Honda, M, Ping, LH, Rijnbrand, RCA, Amphlett, E, Clarke, B, Rowlands, D, and Lemon, SM. Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. *Virology* 222[1], 31-42. 1996.
- Houghton, M, Weiner, A, Han, J, Kuo, G, and Choo, QL. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* 14[2], 381-388. 1991.
- Imbert, I, Dimitrova, M, Kien, F, Kieny, MP, and Schuster, C. Hepatitis C virus IRES efficiency is unaffected by the genomic RNA 3'NTR even in the presence of viral structural or non-structural proteins. *J.Gen.Virol.* 84[Pt 6], 1549-1557. 2003.
- Ito, T and Lai, MM. An internal polypyrimidine-tract-binding protein-binding site in the hepatitis C virus RNA attenuates translation, which is relieved by the 3'-untranslated sequence. *Virology* 254[2], 288-296. 1999.
- Janssen, RS, Satten, GA, Stramer, SL, Rawal, BD, O'Brien, TR, Weiblen, BJ, Hecht, FM, Jack, N, Cleghorn, FR, Kahn, JO, Chesney, MA, and Busch, MP. New testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimates and for clinical and prevention purposes. *JAMA* 280[1], 42-48. 1998.
- Jerome, KR and Gretch, DR. Laboratory approaches to the diagnosis of hepatitis C virus infection. *Minerva Gastroenterol.Dietol.* 50[1], 9-20. 2004.
- Jimenez-Hernandez, N, Torres-Puente, M, Bracho, MA, Garcia-Robles, I, Ortega, E, del Olmo, J, Carnicer, F, Gonzalez-Candelas, F, and Moya, A. Epidemic dynamics of two coexisting hepatitis C virus subtypes. *J.Gen.Virol.* 88[Pt 1], 123-133. 2007.
- Jubin, R, Vantuno, NE, Kieft, JS, Murray, MG, Doudna, JA, Lau, JYN, and Baroudy, BM. Hepatitis C virus internal ribosome entry site (IRES) stem loop IIIId contains a phylogenetically conserved GGG triplet essential for translation and IRES folding. *J.Virol.* 74[22], 10430-10437. 2000.

- Kassutto, S, Maghsoudi, K, Johnston, MN, Robbins, GK, Burgett, NC, Sax, PE, Cohen, D, Pae, E, Davis, B, Zachary, K, Basgoz, N, D'agata, EM, DeGruttola, V, Walker, BD, and Rosenberg, ES. Longitudinal analysis of clinical markers following antiretroviral therapy initiated during acute or early HIV type 1 infection. *Clin.Infect.Dis.* 42[7], 1024-1031. 2006.
- Kimura, M and Maruyama, T. Pattern of neutral polymorphism in a geographically structured population. *Genet.Res.* 18[2], 125-131. 1971.
- Kinzie, JL, Naylor, PH, Nathani, MG, Peleman, RR, Ehrinpreis, MN, Lybik, M, Turner, JR, Janisse, JJ, Massanari, M, and Mutchnick, MG. African Americans with genotype 1 treated with interferon for chronic hepatitis C have a lower end of treatment response than Caucasians. *J.Viral Hepat.* 8[4], 264-269. 2001.
- Kjaergard, LL, Krogsgaard, K, and Gluud, C. Interferon alfa with or without ribavirin for chronic hepatitis C: systematic review of randomised trials. *BMJ* 323[7322], 1151-1155. 2001.
- Kmieciak, D, Kruszyna, L, Migdalski, P, Lacinski, M, Juszczak, J and Trzeciak, WH. Mutations within protein kinase r-binding domain of NS5A protein of hepatitis C virus (HCV) and specificity of HCV antibodies in pretreatment sera of HCV chronically infected patients and their effect on the result of treatment. *J. Infect. Dis.* 59, 92-99. 2006.
- Koev, G, Duncan, RF, and Lai, MM. Hepatitis C virus IRES-dependent translation is insensitive to an eIF2 α -independent mechanism of inhibition by interferon in hepatocyte cell lines. *Virology* 297[2], 195-202. 2002.
- Kumar, S, Tamura, K, and Nei, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief.Bioinform.* 5[2], 150-163. 2004.
- Laporte, J, Malet, I, Andrieu, T, Thibault, V, Toulme, JJ, Wychowski, C, Pawlotsky, JM, Huraux, JM, Agut, H, and Cahour, A. Comparative analysis of translation efficiencies of hepatitis C virus 5' untranslated regions among intraindividual quasispecies present in chronic infection: opposite behaviors depending on cell type. *J.Virol.* 74[22], 10827-10833. 2000.
- Laporte, J, Bain, C, Maurel, P, Inchauspe, G, Agut, H, and Cahour, A. Differential distribution and internal translation efficiency of hepatitis C virus quasispecies present in dendritic and liver cells. *Blood* 101[1], 52-57. 2003.
- Lau, JY, Simmonds, P and Urdea, MS. Implications of variations of conserved regions of hepatitis C virus genome. *Lancet* 346[8972], 1189-1192. 1995.
- Lavillette, D, Pecheur, EI, Donot, P, Fresquet, J, Molle, J, Corbau, R, Dreux, M, Penin, F, and Cosset, FL. Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus. *J.Virol.* 81[16], 8752-8765. 2007.

- Levi, JE, Takaoka, DT, Garrini, RH, Fachini, RM, Focaccia, R, De Bortholi, SE, Mitre, HP, De Mendonca, JS, De Paula, CN, Barone, AA, and Wendel, S. Three cases of infection with hepatitis C virus genotype 5 among Brazilian hepatitis patients. *J.Clin.Microbiol.* 40[7], 2645-2647. 2002.
- Lindenbach, BD, Evans, MJ, Syder, AJ, Wolk, B, Tellinghuisen, TL, Liu, CC, Maruyama, T, Hynes, RO, Burton, DR, McKeating, JA, and Rice, CM. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309[5734], 623-626. 2005.
- Lipman, MM and Cotler, SJ. Antiviral Therapy for Hepatitis C. *Curr.Treat.Options.Gastroenterol.* 6[6], 445-453. 2003.
- Machado-Lima, A, del Portillo, HA, and Durham, AM. Computational methods in noncoding RNA research. *J.Math.Biol.* 56[1-2], 15-49. 2008.
- Macquillan, GC, Niu, X, Speers, D, English, S, Garas, G, Harnett, GB, Reed, WD, Allan, JE, and Jeffrey, GP. Does sequencing the PKRBD of hepatitis C virus NS5A predict therapeutic response to combination therapy in an Australian population? *J.Gastroenterol.Hepatol.* 19[5], 551-557. 2004.
- Mancuso, ME, Rumi, MG and Santagostino, E. High efficacy of combined therapy with pegylated interferon plus ribavirin in patients with hemophilia and chronic hepatitis C. *Haematologia* 91, 1367-71. 2006.
- Martins, RM, Teles, SA, Freitas, NR, Motta-Castro, AR, Souto, FJ, Mussi, A, Amorim, RM, and Martins, CR. Distribution of hepatitis C virus genotypes among blood donors from mid-west region of Brazil. *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo* 48[1], 53-55. 2006.
- Mastromatteo, AM, Rapaccini, GL, Pompili, M, Ursino, S, Romano-Spica, V, Gasbarrini, G, and Vanini, G. Hepatitis C virus infection: other biological fluids than blood may be responsible for intrafamilial spread. *Hepatogastroenterology* 48[37], 193-196. 2001.
- Mcomish, F, Yap, PL, Dow, BC, Follett, EA, Seed, C, Keller, AJ, Cobain, TJ, Krusius, T, Kolho, E, Naukkarinen, R, and . Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *J.Clin.Microbiol.* 32[4], 884-892. 1994.
- Medeiros, MT, Lima, JM, Lima, JW, Campos, HH, Medeiros, MM, and Coelho Filho, JM. [Prevalence and associated factors to hepatitis C in hemodialysis patients in Brazil]. *Rev.Saude Publica* 38[2], 187-193. 2004.
- Mellor, J, Holmes, E, C, Jarvis, L, M, Yap, P, L, and Simmonds, P. Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implications for virus classification. *J. Gen. Virol.* 76, 2493- 2507. 1995.
- Morishima, C, Musey, L, Elizaga, M, Gaba, K, Allison, M, Carithers, RL, Gretch, DR, and McElrath, MJ. Hepatitis C virus-specific cytolytic T cell responses after antiviral therapy. *Clin.Immunol.* 108[3], 211-220. 2003.

- Motazakker, M, Preikschat, P, Elliott, J, Smith, CA, Mills, PR, Oien, K, Spence, E, Elliott, RM, and McCrudden, EA. Translation efficiencies of the 5'-untranslated region of genotypes 1a and 3a in hepatitis C infected patients. *J.Med.Virol.* 79[3], 259-269. 2007.
- Neng, LK. Hepatitis C infection screening in hemodialysis units. *Am.J.Kidney Dis.* 38[1], 186-188. 2001.
- Nishiguchi, S, Ueda, T, Itoh, T, Enomoto, M, Tanaka, M, Tatsumi, N, Fukuda, K, Tamori, A, Habu, D, Takeda, T, Otani, S, and Shiomi, S. Method to detect substitutions in the interferon-sensitivity-determining region of hepatitis C virus 1b for prediction of response to interferon therapy. *Hepatology* 33[1], 241-247. 2001.
- Nousbam, JB, Polyak, SJ, Ray, SC, Sullivan, DG, Larson, AM, Carithers, RL and Gretch, DR. Prospective characterization of full-length hepatitis C virus NS5A quasispecies during induction and combination antiviral therapy. *J. Virol.* 74, 9028-9038. 2000.
- Odreman-Macchioli, FE, Tisminetzky, SG, Zotti, M, Baralle, FE, and Buratti, E. Influence of correct secondary and tertiary RNA folding on the binding of cellular factors to the HCV IRES. *Nucleic Acids Res.* 28[4], 875-885. 2000.
- Oliveira, GC, Carmo, RA, Rocha, MO, Silva, MO, Lima, AT, Guimaraes, MD, and Correa-Oliveira, R. Hepatitis C virus genotypes in hemophiliacs in the state of Minas Gerais, Brazil. *Transfusion* 39[11-12], 1194-1199. 1999.
- Parra, FC, Amado, RC, Lambertucci, JR, Rocha, J, Antunes, CM, and Pena, SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100[1], 177-182. 2003.
- Pascu, M, Martus, P, Hohne, M, Wiedenmann, B, Hopf, U, Schreier, E, and Berg, T. Sustained virological response in hepatitis C virus type 1b infected patients is predicted by the number of mutations within the NS5A-ISDR: a meta-analysis focused on geographical differences. *Gut* 53[9], 1345-1351. 2004.
- Paterson, M, Laxton, C, Goldin, RD, Ackrill, AM, and Foster, GR. Selection of HCV NS5A quasispecies during IFN therapy in patients with chronic HCV. *Dig.Dis.Sci.* 46[7], 1399-1408. 2001.
- Pawlotsky, JM. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology* 36[5 Suppl 1], S65-S73. 2002.
- Pawlotsky, JM and McHutchison, JG. Hepatitis C. Development of new drugs and clinical trials: promises and pitfalls. Summary of an AASLD hepatitis single topic conference, Chicago, IL, February 27-March 1, 2003. *Hepatology* 39[2], 554-567. 2004.
- Penin, F, Dubuisson, J, Rey, FA, Moradpour, D, and Pawlotsky, JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 39[1], 5-19. 2004.
- Pawlotsky, JM. Hepatitis C virus population dynamics during infection. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 299, 261-284. 2006.
- Perz, JF, Armstrong, GL, Farrington, LA, Hutin, YJ, and Bell, BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J.Hepatol.* 45[4], 529-538. 2006.

- Poliakov, A, Hubatsch, I, Shuman, CF, Stenberg, G, and Danielson, UH. Expression and purification of recombinant full-length NS3 protease-helicase from a new variant of Hepatitis C virus. *Protein Expr.Purif.* 25[3], 363-371. 2002.
- Polyak, SJ, Khabar, KS, Rezeiq, M, and Gretch, DR. Elevated levels of interleukin-8 in serum are associated with hepatitis C virus infection and resistance to interferon therapy. *J.Virol.* 75[13], 6209-6211. 2001.
- Posada, D and Crandall, KA. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends Ecol.Evol.* 16[1], 37-45. 2001.
- Powell, EE, Edwards-Smith, CJ, Hay, JL, Clouston, AD, Crawford, DH, Shorthouse, C, Purdie, DM, and Jonsson, JR. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 31[4], 828-833. 2000.
- Poynard, T, McHutchison, J, Davis, GL, Esteban-Mur, R, Goodman, Z, Bedossa, P, and Albrecht, J. Impact of interferon alfa-2b and ribavirin on progression of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 32[5], 1131-1137. 2000.
- Programa Nacional de Hepatites Virais 2004. Programa Nacional de Hepatites Virais 2004. 2004.
- Protocolo da Portaria n°863 do Ministério da Saúde. Protocolo de Tratamento da Hepatite C Secretaria de Assistência à Saúde, Portaria N° 863, de 4 de Novembro de 2002. 2002.
- Ray, RB, Meyer, K, and Ray, R. Suppression of apoptotic cell death by hepatitis C virus core protein. *Virology* 226[2], 176-182. 1996.
- Reddy, KR, Hoofnagle, JH, Tong, MJ, Lee, WM, Pockros, P, Heathcote, EJ, Albert, D, and Joh, T. Racial differences in responses to therapy with interferon in chronic hepatitis C. Consensus Interferon Study Group. *Hepatology* 30[3], 787-793. 1999.
- Rijnbrand, RCA, Abbink, TEM, Haasnoot, PCJ, Spaan, WJM, and Bredenbeek, PJ. The influence of AUG codons in the hepatitis C virus 5' nontranslated region on translation and mapping of the translation initiation window. *Virology* 226[1], 47-56. 1996.
- Robertson, B, Myers, G, Howard, C, Brettin, T, Bukh, J, Gaschen, B, Gojobori, T, Maertens, G, Mizokami, M, Nainan, O, Netesov, S, Nishioka, K, Shin i T, Simmonds, P, Smith, D, Stuyver, L, and Weiner, A. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. *Arch.Virol.* 143[12], 2493-2503. 1998.
- Roccasecca, R, Ansuini, H, Vitelli, A, Meola, A, Scarselli, E, Acali, S, Pezzanera, M, Ercole, BB, McKeating, J, Yagnik, A, Lahm, A, Tramontano, A, Cortese, R, and Nicosia, A. Binding of the hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 is strain specific and is modulated by a complex interplay between hypervariable regions 1 and 2. *J.Virol.* 77[3], 1856-1867. 2003.

- Rosenberg, NA, Pritchard, JK, Weber, JL, Cann, HM, Kidd, KK, Zhivotovsky, LA, and Feldman, MW. Genetic structure of human populations. *Science* 298[5602], 2381-2385. 2002.
- Rozas, J, Sanchez-DelBarrio, JC, Messeguer, X, and Rozas, R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19[18], 2496-2497. 2003.
- Saitou, N and Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol.Biol.Evol.* 4[4], 406-425. 1987.
- Sakai, A, Claire, MS, Faulk, K, Govindarajan, S, Emerson, SU, Purcell, RH, and Bukh, J. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100[20], 11646-11651. 2003.
- Salomon, JA, Weinstein, MC, Hammitt, JK, and Goldie, SJ. Cost-effectiveness of treatment for chronic hepatitis C infection in an evolving patient population. *JAMA* 290[2], 228-237. 2003.
- Saracco, G, Olivero, A, Ciancio, A, Carezzi, S, and Rizzetto, M. Therapy of chronic hepatitis C: a critical review. *Curr.Drug Targets.Infect.Disord.* 3[1], 25-32. 2003.
- Sarrazin, C, Kornetzky, I, Ruster, B, Lee, JH, Kronenberger, B, Bruch, K, Roth, WK, and Zeuzem, S. Mutations within the E2 and NS5A protein in patients infected with hepatitis C virus type 3a and correlation with treatment response. *Hepatology* 31[6], 1360-1370. 2000.
- Sarrazin, C, Dragan, A, Gärtner, BC, Forman, MS, Traver, S, Zeuzem, S and Valsamakis, A. Evaluation of an automated, highly sensitive, real-time PCR-based assay (COBAS Amplipreptrade mark/COBAS TaqMantrade mark) for quantification of HCV RNA. *J.Clin.Virol.* 43[2], 162-8. 2008.
- Schiappa, DA, Mittal, C, Brown, JA, and Mika, BP. Relationship of hepatitis C genotype 1 NS5A sequence mutations to early phase viral kinetics and interferon effectiveness. *J.Infect.Dis.* 185[7], 868-877. 2002.
- Seeff, LB and Hoofnagle, JH. Appendix: The National Institutes of Health Consensus Development Conference Management of Hepatitis C 2002. *Clin.Liver Dis.* 7[1], 261-287. 2003.
- Shepard, CW, Finelli, L, and Alter, MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect.Dis.* 5[9], 558-567. 2005.
- Shimoike, T, Koyama, C, Murakami, K, Suzuki, R, Matsuura, Y, Miyamura, T and Suzuki, T. Down-regulation of the internal ribosome entry site (IRES)-mediated translation of the hepatitis C virus: Critical role of binding of the stem-loop III_d domain of IRES and the viral core protein. 345, 434-445. 2006.

- Siavoshian, S, Abraham, JD, Kieny, MP, and Schuster, C. HCV core, NS3, NS5A and NS5B proteins modulate cell proliferation independently from p53 expression in hepatocarcinoma cell lines. *Arch.Virol.* 149[2], 323-336. 2004.
- Silva, GF, Nishimura, NF, Coelho, KI, and Soares, EC. Grading and staging chronic hepatitis C and its relation to genotypes and epidemiological factors in Brazilian blood donors. *Braz.J.Infect.Dis.* 9[2], 142-149. 2005.
- Silva, CM, Costi, C, Krug, LP, Ramos, AB, Grandi, T, Gandolfi, VL, Menezes, ME, Ocampos, M, Niel, C, and Rossetti, ML. High proportion of hepatitis C virus genotypes 1 and 3 in a large cohort of patients from Southern Brazil. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 102[7], 867-870. 2007.
- Simmonds, P, Holmes, EC, Cha, TA, Chan, SW, Mcomish, F, Irvine, B, Beall, E, Yap, PL, Kolberg, J, and Urdea, MS. Classification of Hepatitis-C Virus Into 6 Major Genotypes and A Series of Subtypes by Phylogenetic Analysis of the Ns-5 Region. *Journal of General Virology* 74, 2391-2399. 1993a.
- Simmonds, P, Mcomish, F, Yap, PL, Chan, SW, Lin, CK, Dusheiko, G, Saeed, AA, and Holmes, EC. Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis C virus: identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity. *J.Gen.Virol.* 74 (Pt 4), 661-668. 1993b.
- Simmonds, P. Virology of hepatitis C virus. *Clin.Ther.* 18 Suppl B, 9-36. 1996.
- Simmonds, P, Bukh, J, Combet, C, Del'eage, G, Enomoto, N, Feinstone, S, Halfon, P, Inchausp'e, G, Kuiken, C, Maertens,G, Mizokami, M, Murphy, D, Okamoto, H, Pawlotsky, JM, Penin, F, Sablon, E, Shin-I, T, Stuyver, LJ, Thiel, HJ, Viazov, S, Weiner, A, and Widell, A. Consensus Proposals for a Unified System of Nomenclature of Hepatitis C Virus Genotypes *HEPATOLOGY*, 42, No. 4, 2005
- Sizova, DV, Kolupaeva, VG, Pestova, TV, Shatsky, IN, and Hellen, CU. Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs. *J.Virol.* 72[6], 4775-4782. 1998.
- Soler, M, Pellerin, M, Malnou, CE, Dhumeaux, D, Kean, KM, and Pawlotsky, JM. Quasispecies heterogeneity and constraints on the evolution of the 5' noncoding region of hepatitis C virus (HCV): Relationship with HCV resistance to interferon-alpha therapy. *Virology* 298[1], 160-173. 2002.
- Squadrito, G, Raffa, G, Restuccia, T, Pollicino, T, Brancatelli, S, and Raimondo, G. Is investigation of hepatitis C virus NS5A gene heterogeneity a tool for predicting long-lasting response to interferon therapy in patients with HCV-1b chronic hepatitis? *J.Viral Hepat.* 9[5], 360-369. 2002.
- Steffen, P, Voss, B, Rehmsmeier, M, Reeder, J, and Giegerich, R. RNASHapes: an integrated RNA analysis package based on abstract shapes. *Bioinformatics* 22[4], 500-503. 2006.

- Tai, CL, Chi, WK, Chen, DS, and Hwang, LH. The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J.Virol.* 70[12], 8477-8484. 1996.
- Tajima, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123[3], 585-595. 1989.
- Tan, SL and Katze, MG. How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. *Virology* 284[1], 1-12. 2001.
- Tang, SX, Collier, AJ, and Elliott, RM. Alterations to both the primary and predicted secondary structure of stem-loop IIIc of the hepatitis C virus 5' untranslated region (5' UTR) lead to mutants severely defective in translation which cannot be complemented in trans by the wild-type 5' UTR sequence. *J.Virol.* 73[3], 2359-2364. 1999.
- Terrault, NA. Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. *Hepatology* 36[5 Suppl 1], S99-105. 2002.
- Thelu, MA, Drouet, E, Hilleret, MN, and Zarski, JP. Lack of clinical significance of variability in the internal ribosome entry site of hepatitis C virus. *J.Med.Virol.* 72[3], 396-405. 2004.
- Theofilopoulos, AN, Baccala, R, Beutler, B, and Kono, DH. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu.Rev.Immunol.* 23, 307-336. 2005.
- Timenetsky, J, Santos, LM, Buzinhan, M, and Mettifojo, E. Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 39[7], 907-914. 2006.
- Thompson, JD, Gibson, TJ, Plewniak, F, Jeanmougin, F and Higgins, DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25, 4876-4882. 1997.
- Trepo, C. Genotype and viral load as prognostic indicators in the treatment of hepatitis C. *J.Viral Hepat.* 7[4], 250-257. 2000.
- Troesch, M, Meunier, I, Lapierre, P, Lapointe, N, Alvarez, F, Boucher, M, and Soudeyans, H. Study of a novel hypervariable region in hepatitis C virus (HCV) E2 envelope glycoprotein. *Virology* 352[2], 357-367. 2006.
- Vilcek, J and Feldmann, M. Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. *Trends Pharmacol.Sci.* 25[4], 201-209. 2004.
- Wakita, T, Pietschmann, T, Kato, T, Date, T, Miyamoto, M, Zhao, Z, Murthy, K, Habermann, A, Krausslich, HG, Mizokami, M, Bartenschlager, R, and Liang, TJ. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat.Med.* 11[7], 791-796. 2005.
- Wasley, A and Alter, MJ. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin.Liver Dis.* 20[1], 1-16. 2000.

- Watanabe, H, Nagayama, K, Enomoto, N, Itakura, J, Tanabe, Y, Hamano, K, Izumi, N, Sato, C, and Watanabe, M. Sequence elements correlating with circulating viral load in genotype 1b hepatitis C virus infection. *Virology* 311[2], 376-383. 2003.
- Weiner, AJ, Brauer, MJ, Rosenblatt, J, Richman, KH, Tung, J, Crawford, K, Bonino, F, Saracco, G, Choo, QL, Houghton, M, and . Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* 180[2], 842-848. 1991.
- WHO report. Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *J.Viral Hepat.* 6[1], 35-47. 1999.
- Yamaguchi, A, Tazuma, S, Nishioka, T, Ohishi, W, Hyogo, H, Nomura, S, and Chayama, K. Hepatitis C virus core protein modulates fatty acid metabolism and thereby causes lipid accumulation in the liver. *Dig.Dis.Sci.* 50[7], 1361-1371. 2005.
- Yamanaka, T, Kodama, T, and Doi, T. Subcellular localization of HCV core protein regulates its ability for p53 activation and p21 suppression. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 294[3], 528-534. 2002.
- Yen, T, Keeffe, EB, and Ahmed, A. The epidemiology of hepatitis C virus infection. *J.Clin.Gastroenterol.* 36[1], 47-53. 2003.
- Yeung, LT, King, SM, and Roberts, EA. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *Hepatology* 34[2], 223-229. 2001.
- Zein, NN, Rakela, J, Krawitt, EL, Reddy, KR, Tominaga, T, and Persing, DH. Hepatitis C virus genotypes in the United States: epidemiology, pathogenicity, and response to interferon therapy. Collaborative Study Group. *Ann.Intern.Med.* 125[8], 634-639. 1996.
- Zekri, ARN, El-Din, HMA, Bahnassy, AA, Khaled, MM, Omar, A, Fouad, I, El-Hefnewi, M, Thakeb, F and El-Awady, M. Genetic distance and heterogeneity between quasispecies is a critical predictor to IFN response in Egyptian patients with HCV genotype-4. *Virology journal* 4[16], 1-12. 2007.
- Zhang, J, Yamada, O, Ito, T, Akiyama, M, Hashimoto, Y, Yoshida, H, Makino, R, Masago, A, Uemura, H, and Araki, H. A single nucleotide insertion in the 5'-untranslated region of hepatitis C virus leads to enhanced cap-independent translation. *Virology* 261[2], 263-270. 1999.