

P-657

TÍTULO: GENOTIPAGEM DO VHC ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO DA SUB-REGIÃO NS5B.

AUTOR(ES): CAMPOS, A. L. L. C.; SILVA FILHO, H. P.

CO-AUTOR(ES): SILVA, L. K.; REIS, M. G.

INSTITUIÇÃO: CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ/FIOCRUZ

Introdução: Os métodos de genotipagem têm contribuído amplamente para a compreensão da epidemiologia, evolução, patogênese e terapêutica da hepatite C. Devido à sua importância, esta metodologia deve ser fundamentada em métodos confiáveis e bem padronizados. A região 5'UTR tem sido amplamente utilizada para genotipagem do VHC, por ser constante e de fácil amplificação. No entanto, a genotipagem baseada nesta região apresenta limitações em subtipar adequadamente algumas variantes, tais como do genótipo 6, por serem muitos similares aos genótipos 1a e 1b na sequência da região 5' UTR, além do baixo poder discriminatório entre os genótipos 1a e 1b. A sub-região NS5b possui maior variabilidade genética e tem sido recomendada para genotipagem e subtipagem do VHC por apresentar resultados mais fidedignos do que os obtidos com a amplificação da região 5' UTR. No Brasil, poucos estudos empregaram o sequenciamento desta região para classificação de genótipos do VHC.

Métodos: Vinte e uma amostras providas de centros de referência de Salvador foram enviadas ao Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/Fiocruz foram submetidas a um *nested*-PCR para amplificação da sub-região NS5b. Os produtos amplificados foram sequenciados em ambas as direções e a análise seguiu-se utilizando os programas: DNASTar, ClustalX, GENEDOC, Mega3, PAUP e Treeview. Sequências de referência, depositadas no Genbank e Los Alamos, cujos genótipos já foram estabelecidos, foram incluídas na análise para permitir o reconhecimento dos genótipos e subtipos do VHC.

Resultados: Os resultados de genotipagem foram obtidos através da comparação direta das seqüências de amostras conhecidas do GeneBank tanto quanto pelo alinhamento e análise filogenética através dos programas ClustalX e Mega3. A árvore filogenética obtida apresentou grupos de genótipos bem distintos, confirmadas com a comparação direta com as seqüências referências. Nossas amostras foram bem caracterizadas como genótipos: 1 subtipo a e b, 2 subtipo b e 3 subtipo a. Utilizou-se a árvore de topologia radial para melhor visualização dos "clados" característicos dos diferentes genótipos testados.

Conclusão: Os resultados aqui apresentados demonstram que a sub-região NS5b apresenta uma maior variabilidade genômica, dados este confirmados pela literatura, o qual lhe permite ser mais informativo tanto para genotipagem e subtipagem quanto para análise filogenética. O fragmento utilizado neste estudo, 244 pares de base, é um fragmento pequeno para análise mais refinada e complexa do ponto de vista evolutivo, mas suficiente para uma boa discriminação entre os subtipos virais. Os genótipos detectados dessas amostras de Salvador, apontam uma prevalência dos genótipos 1a, 1b, 3a e 2b.