

FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DAS MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO
COM OS NOVOS ANTIVIRAIS DE AÇÃO DIRETA (DAA) EM
PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA**

LIZ SILVA ROCHA

**Salvador – Bahia
2019**

IGM

LIZ SILVA ROCHA

Avaliação das mutações de resistência ao tratamento com os novos antivirais de ação direta (DAA) em pacientes com Hepatite C crônica

2019

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**AVALIAÇÃO DAS MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO
COM OS NOVOS ANTIVIRAIS DE AÇÃO DIRETA (DAA) EM
PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA**

LIZ SILVA ROCHA

Orientador: Dr. Luciano Kalabric Silva

Dissertação apresentada ao Curso de Pós- Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção do grau de Mestre.

Salvador – Bahia

2019

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Rocha, Liz Silva

R672a Avaliação das mutações de resistência ao tratamento com os novos antivirais de ação direta (DAA) em pacientes com Hepatite C crônica / Liz Silva Rocha. Salvador. 2019.
102 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2019.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Kalabric Silva, Laboratório de Patologia e Biologia Molecular.

1. Vírus da hepatite C. 2. Mutações de Resistência. 3. Antivirais. I. Título.

CDU 616.36-002

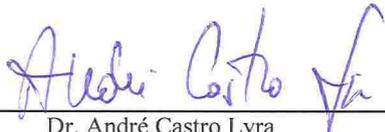
" AVALIAÇÃO DAS MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA DO VÍRUS DA HEPATITE C (VHC) AOS NOVOS ANTIVIRAIS DE AÇÃO DIRETA (DAA) EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA."

LIZ SILVA ROCHA

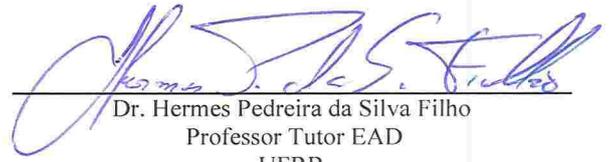
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 08 de agosto de 2019.

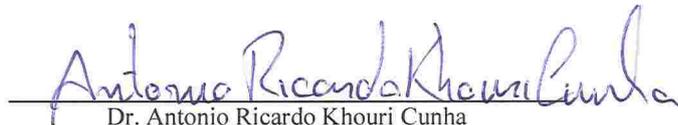
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. André Castro Lyra
Professor Permanente
UFBA



Dr. Hermes Pedreira da Silva Filho
Professor Tutor EAD
UFRB



Dr. Antonio Ricardo Khouri Cunha
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

Fundação de Amparo a Pesquisas do estado da Bahia (FAPESB), através do edital EDITAL FAPESB/PPSUS N. 003/2017, Pedido N. 5070/2017, e bolsa de mestrado.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

PIAP IGM/FIOCRUZ BA Nº 001/2017.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

À Deus. Aos meus familiares que me apoiaram, aconselharam e investiram esforços para a concretização de todas etapas que foram necessárias no desenvolvimento dessa pesquisa.

A todos os colaboradores desse trabalho que ajudaram com seus serviços e competências pelo objetivo comum dessa pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Ao meu professor de graduação Dr. Lucio Barbosa, responsável por incentivar a fazer o mestrado e apresentar-me ao meu orientador Dr. Luciano Kalabric Silva.

Ao meu orientador propriamente pela oportunidade de realização desta pesquisa e por compartilhar seus conhecimentos, habilidades e empenho para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao aluno de Iniciação Científica Lucas Lima, pois contribuiu muito na realização desse trabalho.

À equipe de colaboradores da Fiocruz/BA Dr. Mitermayer G. Reis, chefe do LPBM, a Biblioteca, e Silvana S. da Paz, responsável pela Plataforma de Sequenciamento, pelo apoio e disponibilidade.

À equipe do HUPES, Dr. Raymundo Paraná, Dra. Maria Isabel Schinoni, Dr. André Lyra, Dra. Simone Muniz, Dra. Sidelcina Rugieri, Maria São Pedro e ao SAME que disponibilizaram tempo e esforços para o recrutamento, coleta das amostras e revisão dos prontuários médicos dos participantes da pesquisa.

À equipe da HEMOBA, representada pela Dra. Nelma Santana que colaborou com o recrutamento dos participantes hemofílicos. Ao colega Robson de Jesus que disponibilizou seus dados e amostras para a complementação do estudo dos hemofílicos.

Aos colaboradores do Instituto de Medicina Tropical (IMT-USP), Dr. João Renato Pinho e Dra. Fernanda Malta pela parceria e contribuição nos experimentos moleculares.

A todos aqueles que direta ou indiretamente cooperaram para a realização desse trabalho.

*“Ter a consciência de que se é ignorante,
é um grande passo em direção à
sabedoria.”*

Aristóteles

ROCHA, Liz Silva. Avaliação das mutações de resistência ao tratamento com os novos antivirais de ação direta (DAA) em pacientes com Hepatite C crônica. 2019. 102 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

RESUMO

INTRODUÇÃO Os antivirais de ação direta (DAA) foram incorporadas para o tratamento da hepatite C crônica pelo Protocolo de Diretrizes Terapêuticas do Ministério da Saúde (PCDT-HepC) desde 2015. Devido à natureza quasispécies do vírus da hepatite C (VHC), tempo de infecção, genótipo, mutações de resistência aos antivirais podem emergir levando a falha no tratamento. **OBJETIVO** O presente estudo pretendeu rastrear e monitorar substituições associadas a resistência (RASs) aos DAAs em pacientes com hepatite C crônica. **MÉTODO** O estudo possui desenho descritivo de corte-transversal. Ao todo, 204 participantes foram recrutados, hemofílicos da Fundação HEMOBA (n = 23) e pacientes do Ambulatório de Hepatologia do Complexo HUPES (n = 181). **RESULTADOS** Após testes moleculares e análise das sequências, identificou-se prevalência total de RAS de 51% (94/184, 95% IC 44% - 59%): RAS NS3 45% (62/137, 95% IC 37% - 54%), RAS NS5A 27% (30/113, 95% IC 19% - 36%), RAS NS5B 2% (2/124, 95% IC 0% - 6%). Quando a predição da RAS incluiu apenas as drogas licenciadas e os genótipos do VHC circulantes no Brasil, 17 pacientes apresentaram variantes associadas a resistência (RAVs) para regiões NS3 e NS5A. Nenhum paciente apresentou RAV para a região NS5B. **CONCLUSÕES** A identificação precoce e rastreamento das mutações de resistência podem auxiliar na conduta clínica prevenindo a emergência de resistência e falha terapêutica.

Palavras Chave: Vírus da hepatite C, DAA, Mutações de Resistência, RAS, RAV.

ROCHA, Liz Silva. Evaluation of treatment resistance mutations with new direct-acting antivirals (DAAs) in patients with chronic hepatitis C. 2019. 102 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

ABSTRACT

INTRODUCTION Direct-acting antivirals (DAAs) have been incorporated into the treatment of chronic hepatitis C by the Ministry of Health Therapeutic Guidelines Protocol (PCDT-HepC) since 2015. Due to the quasi-species of the hepatitis C virus (HCV), infection time, genotype, antiviral resistance mutations may emerge leading to treatment failure. **OBJECTIVE** The present study aimed to track and monitor resistance-associated substitutions (RASs) to DAAs in patients with chronic hepatitis C. The study has descriptive cross-sectional design. **METHODS** A total of 204 participants were recruited, hemophiliacs from HEMOBA Foundation (n = 23) and patients from the Hepatology Clinic of HUPES Complex (n = 181). **RESULTS** After molecular testing and sequence analysis, a total prevalence of RAS of 51% (94/184, 95% CI 44% - 59%) was identified: RAS NS3 45% (62/137, 95% CI 37% - 54%), RAS NS5A 27% (30/113, 95% CI 19 - 36%), RAS NS5B 2% (2/124, 95% CI 0% - 6%). When the RAS prediction included only licensed drugs and HCV genotypes circulating in Brazil, 17 patients had resistance-associated variants (RAVs) for NS3 and NS5A regions. No patient presented RAV for the NS5B region. **CONCLUSION** Early identification and screening of resistance mutations may aid in clinical management preventing the emergence of resistance and therapeutic failure.

Keywords: Hepatitis C virus, DAA, Mutations of Resistance, RAV, RAS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Dissertação

Figura 1.	Esquema da organização genômica do VHC.	17
Figura 2.	Alvos terapêuticos do ciclo de replicação do VHC.	19
Quadro 1.	Substituições na NS3 associadas à resistência (NS3 RAS) ao Boceprevir, Telaprevir, Simeprevir, Glecaprevir e Grazoprevir. ..	25
Quadro 2.	Substituições na NS5A associadas à resistência (NS5A RAS) ao Daclatasvir, Ombitasvir, Velpatasvir, Ledipasvir, Pibrentasvir e Elbasvir por genótipo.	26
Quadro 3.	Substituições na NS5B associadas à resistência (NS5B RAS) ao Sofosbuvir e Dasabuvir por genótipo.	27

Artigo

Table 1.	Primers and condition used for PCR assays performed during this study.....	48
Table 2.	Demographic and socioeconomic characteristics of patients with chronic hepatitis C from HEMOBA and HUPES, 2016-18.	49
Table 3.	Clinical and laboratorial characteristics of patients with chronic hepatitis C from HEMOBA and HUPES, 2016-18.	50
Fig. 1.	A - Percentage of NS3 RAS.	51
Fig. 1.	B - Percentage of NS5A RAS and NS5B RAS.	51
Table 4.1.	Characteristics of patients with relevant NS3 RAVs.....	52
Table 4.2.	Characteristics of patients with relevant NS5A RAVs.	53
Supplement Fig. 1.	Time of prior treatment of experienced patients and therapeutic outcome, HUPES, 2018.....	54
Supplement Fig. 2.	Venn diagram showing the number of samples analyzed for resistance mutations by subgenomic region: NS3, NS5A and NS5B.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgHBs	antígeno de superfície do vírus da hepatite B
ALT	alanina aminotransferase
AN	análogos de núcleos(t)ídeos
Anti-HBc	anticorpos para HBcAg da hepatite B
Anti-VHC	anticorpo contra o vírus da hepatite C
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	aspartato aminotransferase
CD81	CD, (do inglês, <i>cluster of differentiation</i>)
CHC	carcinoma hepatocelular
CLDN1	Claudina 1
CPqGM	Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz
DAA	antiviral de ação direta (do inglês, <i>direct acting antiviral</i>)
DCV	Daclatasvir
DP	desvio padrão
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HEMOBA	Fundação de Hemoterapia e Hematologia do Estado da Bahia
GAG	glicosaminoglicanas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HTLV	Vírus Linfotrópico das Células T Humanas
HUPES	Hospital Universitário Prof. Edgar Santos
IC	intervalo de confiança
IFN	interferon
ISDR	região determinante de sensibilidade ao interferon (do inglês, <i>interferon sensitivity determining region</i>)
LD	domínio luminal (do inglês, <i>luminal domain</i>)
LDL-R	receptor de lipoproteína de baixa-densidade
NS3	região proteica não-estrutural
NS5A	região proteica não-estrutural
NS5B	região proteica não-estrutural
OCLN	Ocludina

OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	fase de leitura aberta (do inglês, <i>open read frame</i>)
PCDT	Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas
PCR	reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>)
PEG-INF	peg interferon alfa
pH	potencial Hidrogeniônico
PI	Inibidor de protease (do inglês, <i>protease inhibitor</i>)
Primer	oligonucleotídeo iniciador
RAS	substituições associadas a resistência (do inglês, <i>resistance-associated substitutions</i>)
RAV	variantes associadas a resistência (do inglês, <i>resistance-associated variants</i>)
RBV	Ribavirina
RdRP	RNA polimerase-RNA dependente
RE	retículo endoplasmático
RNA	ácido ribonucléico
RT	transcriptase reversa (do inglês, <i>reverse transcriptase</i>)
RVS	tesposta viral sustentada
SMV	Simeprevir
SOF	Sofosbuvir
SR-BI	receptor <i>scavenger</i> classe B tipo I
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
UDI	usuários de drogas ilícitas
UFBA	Universidade Federal do Estado da Bahia
VHC	vírus da hepatite C (do inglês, <i>hepatitis C virus</i> [HCV])
VHC-RNA	RNA do vírus da hepatite C
VIEKIRA PAK	medicamento composto por ombitasvir/veruprevir/ritonavir +dasabuvir.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	HEPATITE C.....	15
2.2	VIAS DE TRANSMISSÃO DO VHC	16
2.3	O VÍRUS DA HEPATITE C (VHC)	17
2.4	CICLO DE REPLICAÇÃO DO VHC	18
2.5	DIVERSIDADE GENÔMICA VIRAL E SUA APLICABILIDADE	21
2.6	TRATAMENTO ANTIVIRAL.....	22
2.7	MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA.....	24
3	OBJETIVO GERAL	29
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4	RESULTADOS	30
4.1	MANUSCRITO.....	30
5	DISCUSSÃO	56
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
	REFERÊNCIAS	65
	Apêndice I - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para adulto	74
	Apêndice II - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para os responsáveis dos menores	76
	Apêndice III - Termo de assentimento para menores de 18 anos de idade (TA)	78
	Apêndice IV - Questionário clínico-epidemiológico e revisão do prontuário	80
	Apêndice V – Regulamento de Biorrepositório	92
	Anexo I – Carta de apoio da HEMOBA.....	97
	Anexo II – Carta de apoio do LACEN-BA	99
	Anexo III – Carta de apoio do HUPES-UFBA	101

1 INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

A infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) é considerada um sério problema de saúde pública mundial, com um alto impacto pessoal, social e econômico. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a prevalência global é de 3%, variando conforme a região geográfica e em grupos populacionais sob risco. A infecção pelo VHC apresenta alta taxa de cronificação, entre 50% a 80%, que predispõe ao desenvolvimento de formas graves de doença de fígado, tais como cirrose e câncer hepatocelular (CHC). Atualmente, a hepatite C crônica é a principal causa de doença hepática atendida em ambulatórios especializados e de transplante de fígado.

A principal via de transmissão do VHC é a parenteral percutânea, tais como transfusão de sangue, seus componentes e derivados, e uso de drogas endovenosas ilícitas, muito embora situações não percutâneas, como a transmissão vertical sexual e perinatal podem ocorrer (THALER et al., 1991).

O VHC como outros vírus de genoma RNA é caracterizado por ter alto grau de heterogeneidade genética. A natureza quasispécie do VHC confere uma vantagem para sobrevivência do vírus, uma vez que a presença simultânea de múltiplas variantes genômicas e a alta taxa de replicação permitem rápida seleção dos mutantes melhor adaptados às novas condições no hospedeiro (MARTELL et al., 1992); (LAWAL et al., 1997); (FARCI et al., 2000).

Nos últimos anos houve importantes mudanças nos métodos terapêuticos da hepatite C crônica. Inicialmente, o tratamento convencional foi baseado na monoterapia com IFN, sendo substituído gradativamente pela terapia combinação IFN e RBV. Esses esquemas terapêuticos possibilitaram uma taxa de resposta virológica sustentada (RVS) de aproximadamente 40% a 50%, em pacientes infectados com genótipo 1, e de 60% a 80%, em pacientes infectados pelo genótipos 2 e 3 (BRASIL, 2015). A limitada ação imunomoduladora do IFN na RVS, o longo período de tratamento e os efeitos colaterais ocasionados, além dos avanços em biologia molecular do vírus, impulsionaram a pesquisa de novos antivirais de ação direta (DAA) sobre proteínas específicas que participam do ciclo de replicação do VHC.

No Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C (PCDT-HepC), aprovado pelo Ministério da Saúde, a partir do ano de 2015, estabelece as situações clínicas, indicação de tratamento e recomendações terapêuticas dos DAAs (BRASIL, 2015). Os princípios DAAs disponíveis no mercado brasileiro atualmente têm como

alvo as proteínas não-estruturais do VHC: protease NS3, complexo de replicação NS5A, polimerase viral NS5B. Para facilitar a nomenclatura das drogas, foi padronizado os sufixos "...previr", "...asvir" e "...buvir", respectivamente (BUTT; KANWAL, 2012); (PAN et al., 2012a).

O surgimento de isolados virais resistentes pode comprometer a eficácia e sucesso terapêutico com os novos DAAs. A natureza de quasiespécies do VHC, a alta taxa de replicação viral e o prolongado período de infecção fazem com que, no indivíduo infectado, novas variantes sejam geradas constantemente. Apesar das mutações serem estocásticas, sob seleção do tratamento antiviral, as variantes mais aptas sofrem um processo de seleção natural com o fenótipo de resistência.

São poucos os estudos no Brasil e na América Latina que tem avaliado e identificado mutações de resistência para esta classe de medicamentos. Os ensaios clínicos avaliam a RVS, porém não possuem dados sobre a falha primária, além das variantes que promovem a resistência antiviral. Dentro desse contexto, o presente projeto pretendeu rastrear e monitorar as mutações de resistência aos DAA em pacientes com hepatite C crônica em dois centros de referência em Salvador-BA: o Ambulatório Magalhães Neto do Complexo Hospitalar Professor Edgard Santos (HUPES-UFBA) e a Fundação Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA). A identificação de mutações em pacientes não experimentados pode auxiliar na escolha mais eficaz da conduta terapêutica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HEPATITE C

Hepatite é a inflamação do fígado e pode ser causada por infecção viral, pelo uso de medicamentos, álcool e outras drogas. Ademais, doenças autoimunes, metabólicas e genéticas também podem causar hepatite. Atualmente, pelo menos, cinco agentes virais diferentes causam hepatites: A, B, C, D e E. São vírus distintos e não demonstram qualquer homologia quanto à família e o ciclo evolutivo. Todos podem induzir hepatite aguda, mas somente o B, C, D e E, estes dois últimos em condições muito especiais, podem induzir a uma infecção crônica (HAAGSMA et al., 2008)(TURON-LAGOT et al., 2019). Na fase aguda, as hepatites virais são muito similares, não podendo ser confiavelmente distinguidas apenas por características clínicas ou pela histologia.

A hepatite C é uma doença lenta, porém progressiva, causada pelo vírus da hepatite C (VHC). A hepatite C geralmente cursa de forma assintomática, o que dificulta o diagnóstico e tratamento precoce. Quando os sintomas estão presentes, geralmente são inespecíficos: anorexia, astenia, mal-estar e dor abdominal ou em alguns casos com o aparecimento de icterícia e/ou escurecimento da urina. O diagnóstico diferencial é possível apenas com a realização de testes para detecção de anticorpos ou com detecção do genoma viral (VHC-RNA). Casos de hepatite fulminante e insuficiência hepática são raros. Após infecção aguda é possível que ocorra a eliminação viral espontânea (PRADAT; TRÉPO, 2000)(WAHEED et al., 2009) (FIGLEROWICZ et al., 2010).

A hepatite C crônica é confirmada por testes laboratoriais com a presença do anticorpo anti-VHC reagente, além de detecção do VHC-RNA por mais seis meses (BRASIL, 2019). As transaminases são enzimas presentes em células espalhadas pelo organismo humano, mas estão em grandes quantidades nos hepatócitos (células do fígado), sendo responsáveis pela metabolização de algumas proteínas. As duas principais são a aspartato amino transferase (AST/TGO) e a alanina amino transferase (ALT/TGP). Exames laboratoriais medem a concentração dessas transaminases circulantes no sangue e quando elevadas podem estar associadas a lesões hepáticas.

Alguns grupos populacionais foram exaustivamente estudados por apresentarem fatores de risco para infecção pelo VHC. Destacam-se usuários de

drogas e recebedores de sangue, seus componentes e derivados, anterior a 1993. Em Salvador, a prevalência de infecção pelo VHC variou entre 1,5% na população em geral e em doadores e 42% entre hemofílicos (SANTANA, 1995; SILVA, L. K. et al., 2005). Na última década, a prevalência tem reduzido significativamente mesmo na ausência de vacina. A prevalência do VHC em gestantes foi estimada em 0,3%, pacientes com anemia falciforme 4% e hemofílicos 21% (JESUS, 2016; PACHECO, 2010; PASSINI, 2012).

2.2 VIAS DE TRANSMISSÃO DO VHC

A principal via de transmissão do VHC é a parenteral percutânea, tais como transfusão de sangue, seus componentes e derivados, e uso de drogas endovenosas ilícitas, muito embora situações não percutâneas, como a transmissão vertical sexual e perinatal podem ocorrer (THALER et al., 1991). Alguns grupos sob risco são, portanto, bem conhecidos: transfundidos por sangue, seus componentes e derivados (SILVA, L. K. et al., 2005; VAN DER POEL, 1994), transplantados (WREGHITT et al., 1994), hemodialisados (SILVA, L. K. et al., 2006), usuários de drogas ilícitas (UDI) (MAJID et al., 1995; SILVA, M. B. S. et al., 2010), e trabalhadores do Setor de Saúde (IZOPET et al., 1999; SULOTTO et al., 2002). Tatuagens, piercing, uso de drogas inaladas, como a cocaína (por ulceração de mucosa e compartilhamento de canudo para aspiração), e compartilhamento de seringas na utilização de drogas, além de complexos vitamínicos e anabolizantes por atletas também são fatores de risco para a infecção pelo VHC (NISHIOKA et al., 2002).

Por outro lado, estudos também relatam que pode haver transmissão domiciliar, através do compartilhamento de utensílios perfuro-cortantes e de higiene (tesouras de unha, lâmina de depilar, escovas de dentes, etc.) sendo seus resultados ainda controversos (KEISERMAN et al., 2003).

As evidências acumuladas indicam que o VHC pode ser transmitido por contato sexual, mas em menor eficiência que outros vírus sexualmente transmissíveis, tais como o VHB e o HIV. Muitos investigadores demonstraram que existe uma baixa prevalência do anti-VHC em parceiros sexuais de indivíduos infectados pelo VHC com relação monogâmica estável (TENGAN et al., 2001; TERRAULT, 2002). O VHC-RNA foi detectado no sêmen de um terço dos pacientes infectados pelo VHC, o que reforça

a possibilidade de que o VHC possa ser infectante por esta via de transmissão (LERUEZ-VILLE et al., 2000).

2.3 O VÍRUS DA HEPATITE C (VHC)

O vírus da hepatite C (VHC) está classificado no gênero Hepacivirus, um gênero separado na família Flaviviridae, onde se encontram os gêneros Flavivirus (vírus da Dengue, vírus da Zika, vírus da Encefalite Japonesa, vírus do Oeste do Nilo, vírus da Febre Amarela entre outros), arbovírus típicos, e Pestivirus (vírus da Diarréia Viral Bovina e vírus da Peste Suína), além de outros de classificação incerta (vírus hepatotrópicos GBV-A e GBV-B, encontrados no sagüi, GBV-D no chimpanzé, e o GBV-C/VHG). O VHC possui um genoma RNA (VHC-RNA) de fita simples com polaridade positiva e tamanho de aproximadamente 10 quilobases (Kb).

O VHC-RNA é flanqueado por duas regiões não traduzidas (UTR do inglês, untranslated region) altamente conservadas que apresentam importante função na regulação da ativação e replicação viral denominadas 5'UTR e 3'UTR. Apresenta apenas uma fase de leitura aberta (ORF, do inglês open reading frame) capaz de codificar para uma poliproteína precursora com cerca de 3.000 aminoácidos (CHOO et al., 1989); (CHOO et al., 1991). Sob ação conjunta de proteinases do hospedeiro e codificadas pelo próprio vírus, a poliproteína é clivada em, pelo menos, 10 proteínas virais maduras, as quais estão arrumadas como segue (da terminação amino para carboxi): NH₂-C-E1-P7-E2-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH (CHOO et al., 1991) (Figura 1). Essas proteínas apresentam funções distintas: estruturais (C, E1 e E2) e não-estruturais (p7, NS2 a NS5) (CLARKE, 1997).



Figura 1. Esquema da organização genômica do VHC.

Fonte: Adaptado (CLARKE, 1997).

A proteína C corresponde a proteína do core, enquanto as proteínas E1 e E2 constituem as glicoproteínas do envelope viral. As proteínas não-estruturais NS3, NS5A e NS5B, por exemplo, têm função enzimática, protease viral e RNA polimerase,

respectivamente (KATO, 2001). Alguns dos genes do VHC foram associados à sua natureza quasispécie e escape do sistema imunológico do hospedeiro, cronificação da doença e resposta terapêutica (FARCI et al., 2000).

2.4 CICLO DE REPLICAÇÃO DO VHC

O VHC foi descoberto na era molecular e os estudos subsequentes basearam-se na análise genotípica do VHC-RNA, em parte porque a investigação do seu ciclo de replicação e patogênese serem complicados pela falta de um sistema de isolamento eficiente. Entretanto, avanços recentes utilizando um sistema de replicação com partículas infecciosas do VHC recombinantes permitiu conhecer melhor a replicação do VHC-RNA e a descoberta de drogas (BRASS; MORADPOUR; BLUM, 2006).

A Figura 2 ilustra as etapas do ciclo de replicação do VHC e indica os alvos dos novos antivirais de ação direta (DAA) que serão descritos posteriormente. Em linhas gerais, a replicação do VHC pode ser dividida nas seguintes etapas:

- Adsorção – Ligação vírus a um receptor presente na membrana plasmática da célula;
- Entrada/Penetração – entrada do vírion na célula;
- Desnudamento/descapsidação – liberação do RNA no citoplasma;
- Tradução – síntese da poliprotéina viral;
- Transcrição – replicação por síntese do RNA;
- Montagem/maturação – ligação do capsídeo ao RNA viral;
- Liberação – brotamento de novas partículas virais na superfície da célula hospedeira.

A adsorção muitas vezes está associada ao conceito de susceptibilidade porque a célula hospedeira que possui o receptor específico para entrada do vírus tem maior chance de ser infectada. O VHC circula pela corrente sanguínea através da ligação com lipoproteínas e é endocitado como um “cavalo de Tróia” quando em contato com a membrana basolateral dos hepatócitos. Durante a entrada e descapsidação do VHC na célula, as glicoproteínas do envelope viral (E1 e E2) participam dos processos de ligação, endocitose e fusão em pH ácido nos

endossomos. Algumas proteínas celulares foram envolvidas na entrada do VHC: glicosaminoglicanas (GaG) e o receptor de lipoproteína de baixa-densidade (LDL-R), seguido pelas proteínas CD81, receptor scavenger classe B tipo I (SR-BI), claudina 1 (CLDN1) e ocludina (OCLN) (WONG-STAAAL; SYDER; MCKELVY, 2010)

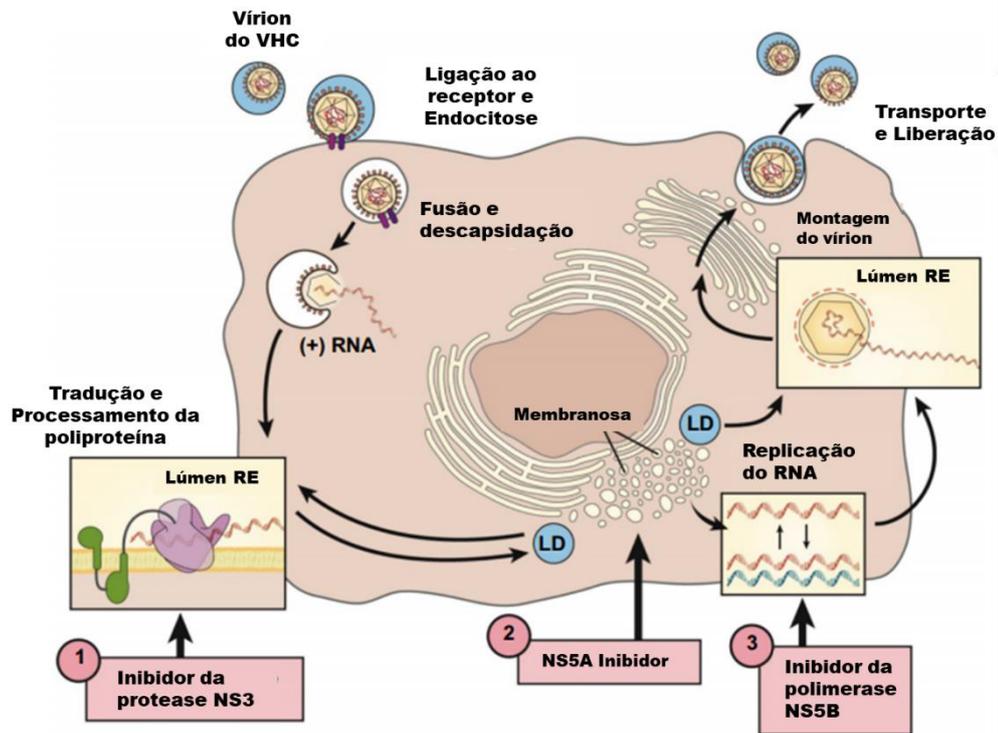


Figura 2. Alvos terapêuticos do ciclo de replicação do VHC.

RE – retículo endoplasmático; LD – do inglês, *luminal domain*.

Nota: O alvo das novas drogas de ação direta (DAAs) estão numerados de 1 a 3.

Fonte: Adaptado (SCHMIDT; KAYALI, 2014).

Após a penetração, o pH ácido do endossomo tardio induz rearranjo da glicoproteína E2 para revelar um peptídeo de fusão que dispara a fusão da membrana do vírus e do hospedeiro resultando na liberação do VHC-RNA no citoplasma da célula infectada. Por tratar-se de um genoma RNA positivo este age imediatamente como um RNAm e é diretamente traduzido mediante ligação do sítio de inserção ribossomal (IRES) localizado na 5'UTR do VHC-RNA com ribossomos aderidos ao retículo endoplasmático (RE). A tradução do genoma do VHC leva a síntese de uma poliprotéina precursora que é co- e pós-traducionalmente clivada por proteases da célula hospedeira e do vírus para produzir as proteínas estruturais (C-E1-P7-E2) e

não-estruturais (NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B) maduras no domínio luminal (LD) ou citoplasma da célula (BRASS; MORADPOUR; BLUM, 2006). O primeiro alvo dos DAAs é a protease NS3. O uso de um inibidor da NS3 é específico para o VHC e pode impedir a formação de novas subunidades proteicas virais.

O processo de replicação do RNA viral é dependente da ação conjunta das proteínas NS4B e NS5A que induzem alterações de membrana específicas, designadas redes membranosas, que servem como um suporte para a formação do complexo de replicação viral (EGGER et al., 2002). O segundo alvo dos DAAs é a NS5A. A NS5A é uma metaloproteína de zinco fosforilada de função desconhecida. A NS5A atraiu inicialmente interesse por apresentar uma região com mutações que foram associadas com RVS ao IFN, denominada ISDR (do inglês, *interferon sensitivity determining region*) (PASCU et al., 2004). Estes achados ainda são controversos. Entretanto, a fosforilação da NS5A tem impacto na eficiência da replicação do VHC e estas observações apoiam que a inibição da NS5A pode agir como um antiviral (APPEL; PIETSCHMANN; BARTENSCHLAGER, 2005). A proteína não-estrutural chave na replicação de novos genomas do VHC é a NS5B, que é uma RNA polimerase-RNA dependente (RdRP). Através da ação da NS5B o RNA positivo é transcrito para formar a fita RNA negativa (reversa), que serve como molde para a síntese de novas fitas de RNA positivas. O terceiro alvo dos DAAs é a NS5B. Os inibidores da NS5B podem ser de diferentes classes conforme a composição química e sítio de ação, como análogos de nucleosídeos. Estes compostos representam drogas bem conhecidas desenhados inicialmente para o tratamento de outros vírus, assim como para o VHC.

A última etapa do ciclo é a montagem e liberação dos vírions. Após a síntese das proteínas estruturais e do RNA positivo, novas partículas virais são formadas no RE. Esses novos vírions são maturados durante o processo de exocitose e adquirem menor densidade e são transportadas juntamente a lipoproteínas. Devido à localização citoplasmática da proteína C, a montagem envolve a associação do RNA viral com as proteínas do capsídeo. O VHC emerge através do brotamento para a luz do RE apropriando-se de membranas celulares ricas nas proteínas E1 e E2. A proteína p7 pode desempenhar um papel importante nesta etapa pela manutenção do pH da vesícula de secreção ou exocítica (LINDENBACH, 2013).

2.5 DIVERSIDADE GENÔMICA VIRAL E SUA APLICABILIDADE

Pela ausência de sistemas de cultivo e modelos experimentais acessíveis que permitissem estudar aspectos fenotípicos do VHC, recorreu-se amplamente ao estudo das variações genômicas. Através da análise filogenética das sequências dos diversos espécimes isolados em todo mundo, foi estabelecido um sistema de classificação dos genótipos (1 a 7) e subtipos (a, b, c ...) (SIMMONDS et al., 2005). A genotipagem do VHC tornou-se crucial para a definição do esquema terapêutico utilizando a terapia com interferon convencional (IFN) e seus derivados com ou sem Ribavirina (RBV), bem como, para o estudo da epidemiologia da doença (ROBERTSON et al., 1998); (MURPHY et al., 2015). Há também evidências que os genótipos do VHC estão relacionados com uma maior ou menor sensibilidade aos DAA, tendo em vista que cada subtipo apresenta singularidades que possibilitam ao surgimento de mutações primárias de resistência aos DAAs (PERES-DA-SILVA et al., 2010).

O VHC como outros vírus de genoma RNA é caracterizado por um alto grau de heterogeneidade genética. Isto é decorrente de erros provocados pela RNA polimerase durante a replicação viral (CLARKE, 1997). Além disso, muitos vírus RNA possuem a capacidade de tolerar a substituição de mais de 50% dos seus nucleotídeos sem perda de viabilidade. Estas características determinam a existência no sangue do hospedeiro de grupos heterogêneos proximamente relacionados denominados quasiespécies (MARTELL et al., 1992). A natureza quasiespécie do VHC confere uma vantagem para sobrevivência do vírus, uma vez que a presença simultânea de múltiplas variantes genômicas e a alta taxa de replicação permitem rápida seleção dos mutantes melhor adaptados às novas condições no hospedeiro (FARCI et al., 2000; LAWAL et al., 1997; MARTELL et al., 1992).

2.6 TRATAMENTO ANTIVIRAL

O Ministério da Saúde é responsável pela distribuição, informações e recomendações acerca das drogas para tratamento do VHC com a finalidade de obter resposta virológica sustentada (RVS), que se caracteriza pela ausência de VHC-RNA na 12^a ou 24^a semana após o término da terapia medicamentosa; evitar a progressão da infecção e suas consequências, tais como a cirrose, o câncer hepático e óbito; Melhorar e aumentar a qualidade e expectativa de vida do paciente; diminuir a incidência de novos casos e reduzir a transmissão da infecção pelo VHC.

Nos últimos anos houve importantes mudanças nos métodos terapêuticos da hepatite C crônica. Inicialmente, o tratamento convencional foi baseado na monoterapia com IFN, sendo substituído gradativamente pela terapia com Interferon peguilhado (Peg-IFN) combinado a RBV. Nesta primeira fase, os esquemas terapêuticos possibilitaram a obtenção de RVS em cerca de 65% dos pacientes infectados pelo genótipo 2 e 3, mas apenas 40% a 50%, nos pacientes infectados pelo genótipo 1 (INAMULLAH et al., 2011). Os indivíduos infectados pelos genótipos 1 e 4 apresentaram menor RVS quando comparados aos indivíduos infectados pelo genótipos 2, 3, 5 e 6. Portanto, variações genômicas do VHC têm associação com o esquema adotado e a resposta antiviral levando a esquemas terapêuticos genótipo-específicos (ASSELAH, Tarik et al., 2010; FRIED et al., 2002; HU et al., 2010). A limitada ação imunomoduladora do IFN na RVS, o longo período de tratamento e os efeitos colaterais ocasionados, além dos avanços em biologia molecular do vírus, impulsionaram a pesquisa de novas drogas de ação direta (DAAs) sobre proteínas não-estruturais envolvidas no ciclo de replicação do VHC.

Os medicamentos e demais tecnologias recomendadas no Protocolo Clínico de Diretriz Terapêutica (PCDT), são baseadas em evidências científicas levando em consideração eficácia, segurança ao paciente e o custo-efetividade. Estão relacionadas às diferentes fases evolutivas da doença, além disso oferecem também recomendações em casos específicos em quando houver perda de eficácia, contraindicação, surgimento de intolerância ou reação adversa relevante, provocadas pelo medicamento, produto ou procedimento de primeira escolha.

No PCDT-HepC aprovado pelo Ministério da Saúde, a partir do ano de 2015, estabelece as situações clínicas, indicação de tratamento e recomendações terapêuticas dos DAAs (BRASIL, 2015). Os princípios DAAs disponíveis no mercado

brasileiro atualmente têm como alvo as proteínas não-estruturais do VHC: protease NS3, complexo de replicação NS5A, polimerase viral NS5B. Para facilitar a nomenclatura das drogas, foi padronizado os sufixos "...previr", "...asvir" e "...buvir", respectivamente. A primeira classe de drogas introduzida na terapia da hepatite C foram os inibidores da protease, Boceprevir (BOC) e Telaprevir (TVR). Um desses inibidores foi incorporado no esquema de terapia tripla com o Peg-IFN e RBV. A inibição da protease NS3 do VHC interfere no ciclo de replicação viral, pois impede a clivagem da poliproteína viral nos precursores estruturais e não-estruturais (BUTT; KANWAL, 2012; PAN et al., 2012b; WILBY BSP ACPR et al., 2012).

Na avaliação da eficácia do BOC, a RVS foi atingida por 38% dos pacientes infectados pelo genótipo 1 do VHC, virgens de tratamento, tratados com Peg-IFN+RBV comparado com 66% tratados com a terapia tripla. Em pacientes recidivantes a taxa de RVS foi de 29% com Peg-IFN+RBV, e 75% com terapia tripla. Em pacientes parcialmente respondedores, a taxa de RVS foi de 7% para tratamento com Peg-IFN+RBV, e 52% no esquema triplo (BUTT; KANWAL, 2012; PAN et al., 2012b; WILBY BSP ACPR et al., 2012).

A eficácia da terapia tripla com TVR produziu RVS mais altas, alcançando 79%, quando comparadas com a terapia convencional 46% em virgens de tratamento. Em recidivantes, a RVS no esquema terapêutico duplo foi de 24%, enquanto que na terapia tripla alcançou-se 88%. Nos pacientes parcialmente respondedores, a RVS no esquema duplo foi de 15%, e na tripla 59%. Em respondedores nulos a RVS foi de 5% na terapia convencional, e 33% na tripla (BUTT; KANWAL, 2012; WILBY BSP ACPR et al., 2012). Entretanto, a utilização das drogas BOC e TVR foi associado com altas taxas de mutações de resistência (PERES-DA-SILVA, 2014).

Posteriormente, novos DAAs foram sendo licenciadas e incorporadas no PCDT-HepC, tais como: Simeprevir (SMV), inibidor da protease NS3 de segunda geração; Daclatasvir (DCV), inibidor do complexo de replicação NS5A; e Sofosbuvir (SOF), um análogo de nucleotídeo que inibe a polimerase viral NS5B. Mais recentemente, novos fármacos estão disponíveis individualmente Glecaprevir, Grazoprevir, Pibrentasvir, Velpatasvir, Ledipasvir e Elbasvir ou em conjunto, como por exemplo o ViekiraPak, que combina drogas com os mesmos mecanismos de ação citados acima em uma única formulação, o que elimina os chamados coquetéis de medicamentos. A RVS a partir da terapia com esses DAAs pode ocorrer em mais de

90% dos pacientes tratados (ASSELAH, T, 2014); (SUMMERS; BEAVERS; KLIBANOV, 2014).

Segundo o PCDT-HepC atualizado em 2019, o tratamento do VHC está indicado na constatação de infecção, seja na forma aguda ou crônica, independentemente do estadiamento da fibrose hepática. Entretanto, se faz necessária a informação se o paciente apresenta cirrose ou fibrose avançada, pois a confirmação desse diagnóstico poderá interferir na conduta clínica do paciente e escolha do esquema terapêutico.

2.7 MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA

O surgimento de isolados virais resistentes pode comprometer a eficácia e sucesso terapêutico com os novos DAAs. A natureza de quasiespécies do VHC, a alta taxa de replicação viral e o prolongado período de infecção fazem com que, no indivíduo infectado, novas variantes sejam geradas constantemente. Apesar das mutações serem estocásticas, sob seleção do tratamento antiviral, as variantes mais aptas sofrem um processo de seleção natural com o fenótipo de resistência.

Dessa forma, a dinâmica da população viral sofre alteração e variantes resistentes (RAVs, do inglês *resistance-associated variants*) podem se tornar a população predominante no indivíduo infectado. Esta dinâmica de alteração viral apresenta particular importância quando se considera o paciente virgem de tratamento aos DAAs, já que estas RAVs podem produzir falha genotípica primária ao tratamento (SUSSER et al., 2012). As mutações de resistência podem emergir espontaneamente, como mutações primárias que conferem mudança fenotípica do VHC possibilitando uma rápida seleção dos indivíduos em tratamento com DAAs (BARTELS et al., 2008).

Raramente, os pacientes apresentam RAVs (GÖTTE; FELD, 2016). Normalmente, o sequenciamento do VHC-RNA permite identificar a variante selvagem e uma substituição associada a resistência (RAS, do inglês *resistance-associated substitutions*). Essas RASs foram associadas a resistência em diversos estudos. Entretanto o perfil de resistência das RASs pode variar consideravelmente em relação ao genótipo do VHC de uma droga para outra (Quadros 1, 2 e 3).

Quadro 1. Substituições na NS3 associadas à resistência (NS3 RAS) ao Boceprevir, Telaprevir, Simeprevir, Glecaprevir e Grazoprevir.

Variante‡	DAA				
	BOC (GT 1)	TVR (GT 1)	SMV (GT 1,*)	ABT-493 (GT 1..6)	GZR (GT 1)
36A/G/L/M	A/L/M	A/G/M L	A/L/M	M	A(b)/L/M
43I/S/V	S/V	S	I/S/V		
54A/C/G/S	C/G/S A	A/S			
55A					
56H/F				H	H F
80R/H/K			K H/R		
122R					
155G/I/K/M/Q/S/T	G/I/K/M/T	G/K/M/T Q	G/K/Q/T		G(b)/Q(a)/ T(b) K (a)/L(b)/ S(a)
156F/N/G/S/T/V	S/T/V G	F/N/S/T/V	G/T/V	V	T
168A/E/G/H/I/N/Q/T/V/ Y	N/Y		A/E/H/I/Q/ T/V*/Y G/N	R/L A/K	A/E/G/ K(b)/N(a)/V(a)
170A/T/F	A/F T	A	T		
174F/S					

‡ Posição do aminoácido e substituição de resistência (Genbank# M62321). GT – genótipo; * GT 4. DAA: Boceprevir (BOC), Telaprevir (TVR), Simeprevir (SMV), Glecaprevir (ABT-493), Grazoprevir (GZR). Vermelho – resistência; Amarelo – susceptibilidade reduzida.

Fonte: <http://hcv.geno2pheno.org/index.php>

Quadro 2. Substituições na NS5A associadas à resistência (NS5A RAS) ao Daclatasvir, Ombitasvir, Velpatasvir, Ledipasvir, Pibrentasvir e Elbasvir por genótipo.

Variante [‡]	DAA																		
	DCV			ABT-267*		Velpatasvir			GS-5885			Pibrentasvir		MK-8742					
	1a	1b	3	1a	1b	1a	1b	3	1a	1b	3	1a	3	1a	1b	3			
28A/G/K/T/V	T	A		T	V	T	V		A/T				G/K	T					
28M/V+31F					28M/V+31F														
30D/E/G/H/K/R/Y	D/E/H/K/R		K	E/R		E/R		K	T	H	E/K/R	H	D	G/K/R	K	H/R	Y		K
30H/R+31M						30H/R+31M													
30H/R+93H						30H/R+93H							30R+93H	30K+93H					
31F/I/M/V	M/V	I/M/V	F/M/V	V	V/F	V		M	I/M/V		M		M		F/V/M	F/M	F		
31M+28M											31M+28M								
32L/del		L/del		del	del	L			L	del	del		del						
58D/C	D			D					D		D		C/D		D				
92K/T					T						K	T							
93C/H/N/R/S/W	C/H	H/N	H	C/H/N/S	H	H/N/R/W	S	H	H	C/H/N/T	H/S	H	N	H		C/H/N	H	H	

[‡]Posição do aminoácido e substituição de resistência (Genbank# M62321). DAA: Daclatasvir (DCV), Ombitasvir* (ABT-267), Ledipasvir (GS-5885), Elbasvir (MK-8742). * Viekirapak componente. Vermelho – resistência; Amarelo – susceptibilidade reduzida.

Fonte: <http://hcv.gen2pheno.org/index.php>

Quadro 3. Substituições na NS5B associadas à resistência (NS5B RAS) ao Sofosbuvir e Dasabuvir por genótipo.

Variante‡	DAA							
	SOF				ABT-333*			
	1a	1b	2	3	1a	1b		
282R/T	R	T	T	T (a)	T	T	T	
316Y								
368T								
411S								
414 I/T					I	T	I	T
448C/H					C/H	C/H	C/H	
553T/V					T/V	V	V	
554S								
556G/N/R					G/N/R	G	G	

‡Posição do aminoácido e substituição de resistência (Genbank# M62321). DAA: Sofosbuvir (SOF), Dasabuvir (ABT-333). *Viekirapak componente. Vermelho – resistência; Amarelo – susceptibilidade reduzida.

Fonte: <http://hcv.geno2pheno.org/index.php>

Alguns fatores podem influenciar no desenvolvimento de RASs: barreira genética e o fitness viral. Define-se barreira genética como o número e tipo de mutações para o desenvolvimento da resistência completa a um antiviral. Por sua vez, a fitness viral corresponde à capacidade replicativa do vírus. Quanto maior a fitness viral maior a capacidade da RAS em suplantar as variantes selvagens (SARRAZIN et al., 2007). Em comparação com as variantes selvagens, as RASs geralmente perdem fitness viral requerendo a ocorrência de mutações secundárias/compensatórias. As mutações secundárias/compensatórias potencializam as primárias, mas por si só não estão associadas com diminuição da sensibilidade aos DAAs. (CUBERO et al., 2008; RONG et al., 2010). Todavia, nem sempre isto é necessário. Estudos descrevendo a NS3 RAS R155K revelaram que esta RAS é frequente em pacientes virgens de terapia com inibidores da protease e que possuem fitness comparável à variante selvagem (COLSON et al., 2008).

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar mutações de resistência ao tratamento com os novos antivirais de ação direta (DAAs) em pacientes com hepatite C crônica.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar aspectos clínico laboratoriais de pacientes com hepatite C crônica experimentados e virgens de tratamento aos DAAs, em ambas unidades de saúde;
- Determinar a prevalência das mutações de resistência aos DAAs;
- Avaliar se há associação da frequência dessas mutações de resistência com histórico de tratamento, classe farmacológica do DAA, genótipo, carga viral e coinfeções.

4 RESULTADOS

4.1 MANUSCRITO

Artigo completo intitulado “Baseline hepatitis C virus resistance-associated substitutions (RAS) in treated and treatment-naïve patients with chronic hepatitis C in a northeastern area of Brazil”

a) Nome dos autores

Liz Silva Rocha¹; Lucas Lima da Silva¹; Fernanda de Mello Malta², Ana Moreira Salles²; Robson de Jesus¹; Nelma Pereira Santana⁵; Sidelcina Rugieri Pacheco⁴; André Castro Lyra³; Maria Isabel Schinoni⁴; Simone Muniz Cunha⁴; Mitermayer Galvão dos Reis¹; Raymundo Paraná Ferreira Filho⁴; João Renato Rebello Pinho²; Luciano K. Silva¹

b) Instituições de afiliação

¹ Instituto Gonçalo Moniz (IGM), Fiocruz / BA

² Department of Gastroenterology, Institute of Tropical Medicine (USP)

³ Foundation of Hematology and Hemotherapy of Bahia (HEMOBA)

⁴ Clinical Trials Nucleus of Bahia (NECBA), Complex HUPES-UFBA

⁵ Hepatology outpatient clinic, HUPES-UFBA Complex

c) Situação: Em revisão

d) Revista pretendida: Journal of General Virology (Medicina II - Qualis A2)

Cover letter

Salvador-BA/Brazil, June 27th, 2019.

To: Journal of General Virology
 From: Luciano Kalabric Silva.

Dear Editor,

I (we) submit the manuscript titled "Baseline hepatitis C virus (HCV) resistance-associated substitutions (RAS) in treated and treatment-naïve patients with chronic hepatitis C in a northeastern area of Brazil" for publication in your journal as an original research paper. This study is important because it tracks RAS in patients with chronic hepatitis C in region of Brazil where this information is absent. RAS may occur naturally in the different drug targets of HCV. In this study, we identified a high rate of RAS in the HCV NS3 subgenomic region when compared with other studies. It was not possible to associate RAS with patient characteristics such as hemophilia, age (≥ 45 years), high viral load ($\geq 5,000,000$ copies / mL), history of treatment and use of DAAs and co-infections. However, RAS were differentially frequent in genotype 1b when compared to 1a and 3. This may have implications on the genetic barrier for resistance and impact on therapeutic response. It is to be noted that this manuscript is an original paper and has not already been published, and will not be submitted for publication elsewhere so long as it is under consideration by the Journal of General Virology. I (we) certify that there is **no conflict of interest** with any relationships or support. All contributing authors have signed this letter to confirm that they have participated in this study and concur with the submission and subsequent revisions submitted by the corresponding author.

Yours sincerely,

Luciano Kalabric Silva *

Contribution Authors:

Liz Silva Rocha

André Castro Lyra

Lucas Lima da Silva

Maria Isabel Schinoni

Fernanda de Mello Malta

Simone Muniz Cunha

Ana Moreira Salles

Mitermayer Galvão dos Reis

Robson de Jesus

Raymundo Paraná Ferreira Filho

Nelma Pereira Santana

João Renato Rebello Pinho

Sidelcina Rugieri Pacheco

* Corresponding Author.

Running title

RAS among treated and treatment-naïve patients

Title

Baseline hepatitis C virus resistance-associated substitutions (RAS) in treated and treatment-naïve patients with chronic hepatitis C in a northeastern area of Brazil

Author names

Liz Silva Rocha¹; Lucas Lima da Silva¹; Fernanda de Mello Malta², Ana Moreira Salles²; Robson de Jesus¹; Nelma Pereira Santana⁵; Sidelcina Rugieri Pacheco⁴; André Lyra³; Maria Isabel Schinoni⁴; Simone Muniz Cunha⁴; Mitermayer Galvão dos Reis¹; Raymundo Paraná Ferreira Filho⁴; João Renato Rebello Pinho²; Luciano K. Silva¹

Institutional affiliations

¹ Instituto Gonçalo Moniz (IGM), Fiocruz / BA

² Department of Gastroenterology, Institute of Tropical Medicine (USP)

³ Foundation of Hematology and Hemotherapy of Bahia (HEMOBA)

⁴ Clinical Trials Nucleus of Bahia (NECBA), Complex HUPES-UFBA

⁵ Hepatology outpatient clinic, HUPES-UFBA Complex

Corresponding author

Luciano Kalabric Silva

Institution: Pathology and Molecular Biology lab at Gonçalo Moniz Research Centre, FIOCRUZ-BA. Address: R. Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador-BA, Brazil, 40296-710. Telephone: +55 (71) 3176-2354. E-mail: luciano.kalabric@fiocruz.br

Abstract

Direct-acting antivirals (DAAs) have been incorporated into the treatment of chronic hepatitis C by the Ministry of Health Therapeutic Guidelines Protocol (PCDT-HepC) since 2015. Due to the quasispecies of the hepatitis C virus (HCV), infection time and genotype, antiviral resistance mutations may emerge leading to treatment failure. The present study aimed to track and monitor resistance-associated substitutions (RASs) to DAAs in patients with chronic hepatitis C. The study has descriptive cross-sectional design. A total of 204 participants were recruited, hemophiliacs from HEMOBA Foundation (n = 23) and patients from the Hepatology Clinic of HUPES Complex (n = 181). After molecular testing and sequence analysis, a total prevalence of RAS of 51% (94/184, 95% CI 44% - 59%) was identified: RAS NS3 45% (62/137, 95% CI 37% - 54%), RAS NS5A 27% (30/113, 95% CI 19 - 36%), RAS NS5B 2% (2/124, 95% CI 0% - 6%). When the RAS prediction included only licensed drugs and HCV genotypes circulating in Brazil, 17 patients had resistance-associated variants (RAVs) for NS3 and NS5A regions. No patient presented RAV for the NS5B region. Early identification and screening of resistance mutations may aid in clinical management preventing the emergence of resistance and therapeutic failure.

Keywords: Hepatitis C virus, DAA, Resistance mutations, RAS, RAV.

Introduction

Hepatitis C virus (HCV) infection is considered a serious public health problem worldwide, with a high personal, social and economic impact. According to the World Health Organization (WHO), the overall prevalence is 3%, varying according to geographical region and population groups at risk. HCV infection has a high chronification rate, ranging from 50% to 80%, which predisposes to the development of severe forms of liver disease, such as cirrhosis and hepatocellular cancer (HCC). Currently, chronic hepatitis C is the leading cause of liver disease treated in specialized outpatient clinics and liver transplantation (oral communication). The main route of transmission of HCV is

percutaneous, such as transfusion of blood, its components and derivatives, use of intravenous drugs, although non-percutaneous situations, such as vertical sexual and perinatal transmission may occur [1].

HCV as other RNA genome viruses is characterized by having high mutation rate which leads to genetic heterogeneity and the formation of quasispecies within its host [2]. High HCV quasispecies diversity and viral replication rate confer an advantage for the virus survival. The high quasispecies diversity along with the high viral replication rate confer an advantage for virus survival, either by facilitating the escape from the host immune system or by resisting to antiviral treatment [3, 4] .

In recent years there have been important changes in the therapeutics of chronic hepatitis C. Conventional treatment was based on interferon (IFN) in monotherapy and gradually was replaced by pegylated version of IFN (Peg-IFN) and ribavirin (RBV) combination therapy. In this first phase, the therapeutic regimens made it possible to obtain sustained virological response (SVR) in approximately 65% of patients infected with genotype 2 and 3, but only 40% to 50%, in patients infected with genotype 1 [5]. The limited immunomodulatory action of IFN in SVR, the long treatment period and the side effects caused, as well as the advances in molecular biology of the virus, have promoted the research of new direct-acting drugs (DAAs) on non-structural proteins involved in the virus.

Despite the high rate of SVR and excellent tolerability for DAAs, real world experience shows that failure to achieve SVR was mainly observed among patients with at least one negative predictor of response: cirrhosis and/or genotypes 1a or 3 [6]. Also, the emergence of resistant-associated substitutions (RASs) may compromise efficacy and therapeutic success with new DAAs. Although mutations are stochastic events and may occur naturally, under the selection pressure of antiviral treatment, there is always the possibility that resistance-associated variants (RAVs) may produce the resistance phenotype.

There are few studies in Brazil and Latin America that have evaluated and identified RAVs for the currently licensed drugs. Clinical trials evaluate SVR, but do not have data on primary failure, in addition to variants that promote antiviral resistance. In this context, the present study aimed to track and monitor the

resistance mutations to DAAs in patients with chronic hepatitis C, determining the prevalence of resistance mutations, characterizing clinical aspects of chronic hepatitis C patients experienced and treatment naive to DAA, in both health units. In addition to evaluating possible associations of the frequency of these resistance mutations with treatment history, pharmacological class of DAA, genotype, viral load and coinfections. The identification of mutations in untested patients may aid in the more effective choice of therapeutic approach.

Methods

Study design and location

This descriptive study was conducted at the Gonçalo Moniz Research Center (IGM-FIOCRUZ-BA), located in Salvador, Bahia-Brazil, in collaboration with the Hepatology Service of the Magalhães Neto Outpatient Clinic, Prof. Edgar Santos University Hospital Complex, Federal University of Bahia (HUPES-UFBA), and the Hematology and Hemotherapy Foundation of Bahia (HEMOBA). Both HUPES and HEMOBA are reference units for chronic hepatitis C diagnosis and treatment. In addition, HEMOBA provides hemotherapy for sickle cell anemia and hemophiliac patients, as well as guarantees the quality of blood products in the state of Bahia.

Sample size calculation

Assuming a frequency of resistance-associated substitutions (RAS) of 3%-5% together with the approximately 900 patients seen for chronic hepatitis C treatment at both HUPES and HEMOBA reference units, the minimum sample size for the study was calculated at 166 participants. Accordingly, the number of patients recruited (204) was sufficiently powerful to estimate prevalence of RAS.

Patients, medical history and sample collection

After approval by the appropriate institutional review boards, 181 patients with chronic hepatitis C, consisting of both naïve and treated individuals, were recruited from HUPES, in addition to 23 hemophiliac patients from HEMOBA. All recruited participants signed a written term of informed consent. All patients with positive HCV-RNA were included, while those demonstrating mental confusion and psychiatric disorders were excluded. Participants were surveyed and interviewed using a coded sociodemographic questionnaire, and all consented to the review of their medical records to collect clinical-laboratory data, medical history and treatment outcome results. All obtained information was recorded using REDCap data management software (Vanderbilt University).

Blood samples were collected for HCV-RNA detection, amplification and sequencing. HCV-RNA sequences were analyzed to identify RAS and predict phenotypic resistance to last-generation DAAs.

Molecular Testing

All tests described below were conducted at the Institute of Tropical Medicine (IMT/USP), a reference laboratory for RAS identification:

- Viral RNA Extraction

HCV-RNA was extracted from 140 µL of serum using the QIAamp® Viral RNA Kit (Qiagen, Hilden, Germany) in accordance with the manufacturer's instructions.

- cDNA Synthesis and amplification of the HCV NS3, NS5A and NS5B regions by PCR

After extraction, viral RNA was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction in a single tube (SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq High Fidelity DNA Polymerase, Invitrogen, Thermo Fisher Brand, Carlsbad, USA) using different degenerate primers and strategies (Table 1). The entire NS3 protease domain and the NS5B region of the HCV genome were amplified by a second (“nested”) PCR using Platinum Taq (Invitrogen, Thermo Fisher Brand, Carlsbad, USA) prior to the sequencing reaction [7, 8]. An optimized One-Step RT-PCR method was used to amplify

each genotype (1a, 1b and 3) to NS3 region, while the amplification of NS5A and NS5B regions were pan-genotypic [9].

PCR products were subjected to electrophoresis and visualized on 2% agarose gel with the addition of 10 μ L SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). Amplified bands were identified in the samples and compared using the Low DNA Mass Ladder (Invitrogen™, Thermo Fisher Brand, Carlsbad, CA, USA).

- DNA Sequencing

Amplified samples were purified with the ExoSAP-IT enzyme (USB, Cleveland Ohio) by following the manufacturer's guidelines. Subsequently, Sanger DNA sequencing of both strands were performed using the dideoxynucleotide chain terminators (ddNTPs) with fluorescent dyes contained in the ABI Prism BigDye™ Terminator kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Brand, Foster City, CA, USA). After the sequencing reaction, all samples were purified with Ethanol / EDTA for the removal of any ddNTP residues not incorporated into DNA before capillary electrophoresis.

- Sequence analysis

The obtained sequences (sense and antisense) were initially analyzed using Electropherogram quality analysis software freely available at <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>. This tool allows for the evaluation of sequence quality and also permits the assembly of a consensus sequence. Only those sequences presenting > 100 bases with quality value > 20 were included in the analysis of viral genetic diversity.

The consensus sequences pertaining to each sample were first aligned and then translated into amino acid sequences using MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 10.1) software. Reference sequences were used to trace RAS in the HCV NS3 protease (NS3 RAS) at amino acid positions 36, 41, 43, 54, 55, 56, 80, 117, 122, 155, 156, 168, 170, 174; in the HCV NS5A replication complex (NS5A RAS) at amino acid positions 28, 30, 31, 32, 58, 92 and 93; and in the HCV NS5B polymerase (NS5B RAS) at amino acid positions 282 and 316. For validation purposes, all consensus sequences were re-submitted to the Geno2pheno [hcv] 0.92 (<https://hcv.geno2pheno.org/>) [10] web-based tool for the prediction of phenotypic resistance to last-generation DAAs. The distribution of RAS according to subgenomic region was

analyzed with respect to the HCV genotypes circulating in Brazil associated with licensed drugs.

Statistical analysis

All data was recorded using REDCap data management software (Vanderbilt University) and analyzed by EpiInfo 7.0.8.3 software (CDC, Atlanta, GE, USA). Baseline characteristics of the participants and RAS prevalence were expressed as percentages or by the average \pm standard deviation (minimum – maximum). Odds ratios (OR) accompanied by 95% confidence intervals were used to measure associations. To compare proportions, the chi-squared test (corrected by Yates) or Fisher's exact test were used where appropriate. Logistic regression was used for multivariate analysis. A significance level of 5% ($p < 0.05$) was adopted for all statistical tests.

Results

Patient demographics

A total of 204 patients with chronic hepatitis C agreed to participate in the study, 181 of whom were followed at the HUPES-UFBA hepatology clinic, while 23 hemophiliacs were followed at HEMOBA. Some demographic characteristics were markedly different between the groups: among the HEMOBA hemophiliacs, most were male (96%) with a mean age of 44.0 ± 12.4 (range: 19-68 years), predominantly resided in the state's interior (61%) and all were classified as B-C under the economic classification system (Critério de Classificação Econômica Brasil [CCEB], 2019). Among the patients who were followed at HUPES-UFBA, most were male (51%) with a mean age of 55.7 ± 11.1 (range: 31-84 years), predominantly resided in Salvador (66%) and presented a greater diversity of CCEB economic classification (B-C-D-E). Overall, the majority of patients self-identified skin color as brown or black according to the Brazilian Institute of Geography and Statistics (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [IBGE]) classification and most had completed primary schooling (Table 2).

Both groups of patients exhibited high rates of HBV co-infection: 5% in the hemophiliac group and 2% in the HUPES-UFBA group. The patients followed at HUPES-UFBA also presented co-infection with HIV (3%) and HTLV (18%). In general, ALT and AST liver transaminases were below reference values, yet hepatic enzymes were higher in the hemophiliacs than in the HUPES patients. Biopsy data was infrequently recorded among the HUPES patients, and absent in the clinical records of hemophiliacs. Accordingly, the assessment of necroinflammatory activity was restricted to 57 HUPES patients, all presenting Metavir scores between A0-A2. Hepatic fibrosis was evaluated by biopsy and/or elastography in 122 patients, with Metavir scores ranging from F0-F2 (84%) and F3-F4 (16%). Mean viral load was 5.7 ± 1.1 (0.8 - 8.6) IU / mL, with no significant differences seen between the groups (Table 3).

Only 19% of patients had a history of treatment, and most (78%, 29/37) were treated with IFN and/or RBV based therapy. In a small group of HUPES patients, clinical records indicated the recent introduction of new DAA drugs over the last three years (Supplemental Fig. 1). Beginning in 2014, DAA drugs came to be administrated as first-choice treatment or rescue therapy, either as triple therapy in combination with IFN+RBV, or as double therapy involving RBV alone. A few patients were treated with IFN-free therapy involving first-generation HCV protease inhibitors (PI), such as Boceprevir and Telaprevir (BOC or TLV) or polymerase complex inhibitors Daclatasvir and Sofobusvir (DCV and SOF, Supplemental Fig. 1).

Of the 204 included patients, 90% (184/204) of the samples were successfully amplified and sequenced. RAS was identified in 51% (94/184, 95% CI 44% -59 %) of the sequences in at least one of the NS3, NS5A or NS5B regions. Due to reduced viral load, sample availability and quality, especially variability in subgenomic regions, gene amplification was unequal. NS3 RAS prevalence was estimated to be 45% (62/137, 95% CI 37% - 54%), NS5A RAS was 27% (30/113, 95% CI 19% - 36%) and RAS NS5B was 2% (2/124, 95% CI 0% - 6%) (Table 3).

Previously described NS3 RAS were detected either as single or multiple mutations. The total number of NS3 RAS was 95 with variable frequency (range: 1-4 per patient), as 34 patients presented a profile with a single RAS

and 24 patients had double RAS. Three patients had triple RAS, while just one patient presented quadruple RAS. The total number of NS5A RAS was 31, ranging from 1 to 2 per patient, with 29 patients presenting a single RAS and one patient with double RAS. The total number of NS5B RAS was two, with each patient presenting a single RAS (316N). In addition, 8% (14/184) of the participants presented substitutions conferring resistance to more than one class of DAA drug (data not shown). NS3 RAS were observed at amino acid positions 36, 41, 54, 55, 56, 80, 117, 122, 155, 170 and 174; NS5A RAS were found at positions 30, 31, 58, 92 and 93; NS5B RAS was at 316. Virtually all RAS were preferentially distributed according to one of the HCV genotypes: 1a, 1b or 3. RAS were not analyzed for HCV genotype 2 samples (Fig. 1 A and B).

Relevant resistance-associated variants (RAV) were identified in 10 (9 from HUPES and 1 from HEMOBA) participants in the NS3 region, seven (all from HUPES) in the NS5A region and three in both regions. No RAVs in NS5B were identified. Pertinent characteristics of cases presenting RAVs in NS3 and NS5A are listed in Table 4.1 and Table 4.2, respectively. Nine distinct patterns of NS3 RAVs were found: R155K, T54S, Q80K, Q80L+V170I+S174F, T54S+V170I, V36L+Q41H, V55A, T54S+V55I+Q80L and T54S. The most frequent (20%, 2/10) NS3 RAV profile was V36L+Q41H. Five participants had multiple profiles with double and triple RAS. All of these patients were treatment-naïve and just one presented a marker for HBV coinfection. Some of the RAV profiles exhibited resistance to a single drug (e.g. V55A for BOC), while others showed resistance to multiple drugs (e.g. R155K) (Table 4.1). Three distinct NS5A RAVs were found: Y93H, A30K and A30M+Y93H. The most frequent NS5A RAV was Y93H, at 80% (8/10). Two patients with a history of treatment also exhibited markers for HBV and HTLV coinfection (Table 4.2).

An association analysis was carried out to investigate risk factors associated with the occurrence of RAS (hemophilia, age as a proxy of time of infection, viral load, genotype, history of treatment, coinfection). Unfortunately, not all regions of every sample were successfully sequenced, which substantially reduced the power of this analysis. Nonetheless, genotype 1 was found to be significantly associated with RAS in general ($p < 0.05$), and genotype 1b was notably associated with NS3 RAS ($p < 0.01$) both under univariate and multivariate logistic analysis (Fig. 1 A and B).

Discussion

Hemophiliacs with chronic hepatitis C present peculiar sociodemographic characteristics due to the underlying bleeding disorder. In hemophilia, as the pattern of sex-recessive inheritance affects the X chromosome, the disease is more common in men than women. Since women have two X chromosomes, this sex is only affected in homozygosity; men, who are hemizygous and have only one X chromosome, will manifest this condition provided they carry the affected X chromosome. The chance of a woman having two affected X chromosomes is remote, which is why women are almost exclusively carriers [11, 12]. In this study, 96% (22/23) of the male hemophiliacs presented HCV infection, versus just 4% in females (1/23), with age ranging from 19 to 68 years: mean age of 44 years. Compared with the HEMOBA group, the HUPES-UFBA outpatients presented the same frequency of males and females, aged between 31 and 84 years, with a mean age of 55 years. The lower mean age of the hemophiliac group is probably due to the occurrence of infection at an early age, as well as the reduced life expectancy in patients with this disease. According to the World Federation of Hemophilia (WFH), it is estimated that this disorder decreases life expectancy by ten years [12].

The majority of participants in both groups self-reported skin color as brown or black and belong to CCEB economic classes B and C, which is consistent with the admixed population of the state of Bahia and the profile of patients who habitually use SUS health services [13]. A similar patient profile was reported by in a study performed at HEMOBA in a group of sickle cell anemia patients [14]. With regard to location of residence, the data reflect that hemophiliacs generally reside in the interior of the state, highlighting deficiencies in specialized care in regions distant from urban centers, resulting in hemophiliac patients traveling to the state capital to receive specific treatment, e.g. blood and hemoderivatives.

The frequency of coinfection by agents with a similar route of transmission as HCV was high. Although the objective of this study was not to determine the prevalence of these agents, we found a surprisingly high rate of HBV coinfection in both hemophiliacs (5%) and HUPES patients (2%), despite the availability of vaccination and treatment. The synergism of these viruses can

result in liver disease that progresses more rapidly and is associated with a worse outcome [15]. Thus, prioritizing the treatment of viral hepatitis for these groups of patient is essential. However, coinfection with HIV (3%) and HTLV (18%) were found to be exclusive to HUPES patients. Prior to 1992, hemophiliacs were considered to face a high risk of infection by HIV and other blood-borne agents. However, following the AIDS crisis in the 1980s and 1990s, safety efforts intensified with regard to blood and hemoderivatives. Due to the small number of hepatitis C cases among the hemophiliacs, it was not possible to estimate co-infection with HIV and HTLV herein, although a recent study reported this ranged from 0.6% to 1.3% in 2013 [16]. On the other hand, the high prevalence of HTLV in the North and Northeast regions of Brazil has caused the state of Bahia to be featured in research focused on this infection. Indeed, Salvador, the state capital, is considered an epicenter of HTLV infection [17].

Among the HUPES patients, 33 had received treatment: 25 (76%) received conventional IFN-based treatment, while the four hemophiliacs who were found to be treated all received this same therapy (Supplemental Fig. 1). A review of medical records allowed for the establishment of a follow-up and treatment timeframe. In 2014, some patients began to receive DAAs (e.g. triple therapy IFN + RBV + BOC). In 2016, the Brazilian Ministry of Health issued new recommendations (PCDT-HepC) on the use of DAAs for HCV treatment [18] and, from 2016 on, treatment regimens essentially involved IFN-free therapies including a second wave of PI and other classes of DAAs, such as NS5A and NS5B inhibitors [19]. In response to the expectation of high rates of SVR, patients who presented therapeutic failure, as well as those with more severe disease, were prioritized in regimes involving newer DAAs. Unfortunately, highly detailed information on the patients who received treatment was not present in their medical records.

The importance of RAS has been debated, since these can occur naturally in both treatment-naive and experienced patients [20]. Regrettably, the RAS screening is not provided by SUS and few governmental laboratories are qualified for this purpose. This service has often been provided through research collaborations between public health services units and research centers in Brazil. Herein, a high prevalence of RAS (51%) was found, with

prevalence varying according to the subgenomic region investigated: NS3 RAS was 45%, NS5A RAS was 27% and NS5B RAS was 2%. RAS were detected alone, or in combinations ranging from two to four mutations in a single patient. RAS were also found to be associated with more than one class of drugs in one patient. Some substitutions could potentially disrupt the three-dimensional structure of the HCV non-structural proteins NS3, NS5A and NS5B targeted by DAAs, thereby causing treatment failure [20].

The resistance profile of each RAS can be predicted in accordance with the circulating genotypes and drugs licensed in Brazil. DAA failure is a relatively rare event that can occur in patients infected with any HCV genotype, as well as in a variety of clinical situations, being often associated with the presence of RAVs. In theory, failure occurs when RAVs replace the wild virus due to selective drug pressure, enabling a virologic rebound. The most predominant NS3 RAVs were 54S (4%), 55A (6%) and 80K (7%), all of which were more frequent in genotype 1a. The frequency of RAS 54S was higher compared to that described in another study in HIV-coinfected HCV patients (T54S 2.4%, V55A 8%) [21]. RAS 54S and 55A confer a resistance mutation to Simeprevir (SMV), as well as the 80K variant. Another study found the latter in cirrhotic patients infected with HCV genotype 1a who were treated with SMV + SOF for 12 weeks. In these patients, a lower SVR (74%) was detected in comparison to another group that did not present the Q80K substitution (92%SVR) [22].

NS3 RAVs were also identified in codons 36 (2%), 155 (1%) and 174 (3%), which were also more frequently found in genotype 1a. In a study conducted in the metropolitan region of São Paulo, RAV 36L was found in patients with HCV genotypes 1a and 1b, with a higher frequency (2.6%) in the group with genotype 1a [23]. On the other hand, Peres da Silva et al. identified a higher prevalence of variant 36L (5.6%) exclusively in patients with genotype 1b from Rio de Janeiro. Variant 36L is associated with BOC resistance. In the São Paulo study, RAV 155K was also found at a low frequency and only identified in patients with genotype 1a (0.5%), which is similar to our study (1%) [24]. This variant is notable due to its association with resistance to multiple drugs: BOC, TVL and SMV. For the first time in Brazil, RAV 174F (3%) was described herein. The distribution of this variant, which was associated with BOC resistance, seems to be restricted, as it has only been identified in studies

conducted in Germany and Romania [25], [26]. Monotherapy involving BOC or TLV resulted in a progressive selection of RAVs, which consequently led to the emergence of resistance in HCV patients. Thus, the need for the incorporation of second Generation DAAs was identified [27].

In the NS5 region, 3 profiles of NS5A RAVs were found, 93H variant being the most frequent (26%), with distribution among all genotypes 1a, 1b and 3. This RAV is worthy of mention, since it confers resistance mutation to all drugs whose target is the NS5A polymerase complex, with the exception of Pibrentasvir. In the study carried out at the Hospital das Clínicas in São Paulo with HCV monoinfected patients and coinfecting with HCV + HIV, this variant was also present in all genotypes [28]. In a study with genotype 3 samples from North America, Australia, and Europe, a mean global prevalence of 8.6% of variant 93H was found, with a varied distribution among the different countries studied [29]. The second most prevalent variant was 30K (6%) that confers resistance to multiple drugs, Daclatasvir (DCV), Ledipasvir (GS-5885) and Elbasvir (EBR), especially in patients infected with genotypes 1a and 3. In our study, this RAV was found exclusively in genotype 3 samples, with a similar frequency (6.3%) as described by HERNANDEZ et al. (2013). Finally, RAV 311 was identified in a patient genotype 1b. No RAV was found for the NS5B region.

In this study, we did not find an association between the occurrence of RAS with characteristics of the patients such as hemophilia, age (≥ 45 years), high viral load ($\geq 500,000$ copies / mL), history of treatment and use of DAAs and co-infections. In part, this may be related to the number of samples amplified so far, the low frequency of some RAS and also the lack of some data in medical records. From the total of 204 samples, amplification of the NS3, NS5a and NS5B regions was successful in 137, 114 and 124 samples, respectively (Supplemental Fig. 2). Some samples are still being repeated or amplified by other methods for data recovery. However, it was clearly observed association between NS3 RAS with genotype type 1, especially 1b. It is well known that genetic variability of HCV has an impact on the genetic barrier to resistance to DAAs [30]. Kieffer et al. (2007) described the occurrence of variants V36M and R155K / T in patients with genotype 1a related to the low genetic barrier; these substitutions require only 1 mutation in the respective codons when compared to genotype 1b that depends on 2 mutations [31].

There are few studies in Brazil and Latin America that have evaluated and identified resistance mutations for these classes of drugs. In addition, new DAAs have been licensed in Brazil in an accelerated manner to ensure the therapeutic success of hepatitis C. Data on the primary failure, identification of variants that promote antiviral resistance, and the therapeutic consequences of these variants still need to be further explored. Within this context, the present study aimed to track and monitor the resistance mutations to DAAs in patients with chronic hepatitis C treated at two reference centers in Salvador-BA: the Magalhães Neto outpatient clinic at the Hospital Edgar Santos Complex (HUPES-UFBA) and the Hematology and Hemotherapy Foundation of Bahia (HEMOBA). The results evidenced the presence of RAS in both experienced and untreated patients in the three target regions of the AAS: NS3, NS5A and NS5B. RAS was more frequent in the NS3 region when compared to the NS5 region, and also well above that expected when compared to other studies (Dinu et al. 2018; Moreira et al. 2018). The reason for the high prevalence of NS3 RAS is still uncertain, however the occurrence of these mutations was associated with genotype 1b. This may have implications on the genetic barrier for resistance and impact on the therapeutic response. Sequencing of a larger number of isolates would be desirable. Screening for resistance mutations at least among patients with primary failure and relapse can guide treatment in ways that maximize public resources in a developing country such as Brazil.

References

1. **Thaler MM, Park CK, Landers D V, Wara DW, Houghton M, et al.** Vertical transmission of hepatitis C virus. *Lancet* 1991;338:17–18.
2. **Martell M, Esteban JI, Quer J, Genesca J, Weiner A, et al.** Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992;66:3225–3229.
3. **Lawal Z, Petrik J, Wong VS, Alexander GJ, Allain JP.** Hepatitis C virus genomic variability in untreated and immunosuppressed patients. *Virology* 1997;228:107–111.
4. **Farci P, Shimoda A, Coiana A, Diaz G, Peddis G, et al.** The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science (80-)* 2000;288:339–344.
5. **Inamullah, Idrees M, Ahmed H, Sajid-ul-ghafoor, Ali M, et al.** Hepatitis C virus genotypes circulating in district Swat of Khyber Pakhtoonkhaw, Pakistan. *Virology* 2011;8:16.
6. **Sette-Jr H, Cheinquer H, Wolff FH, de Araujo A, Coelho-Borges S, et al.** Treatment of Chronic HCV Infection with the New Direct Acting Antivirals (DAA): First Report of a Real World Experience in Southern Brazil. *Ann Hepatol* 2017;16:727–733.
7. **Peres-da-Silva A, de Almeida AJ, Lampe E.** Genetic diversity of NS3 protease from Brazilian HCV isolates and possible implications for therapy with direct-acting antiviral drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Epub ahead of print 2012. DOI: 10.1590/S0074-02762012000200016.
8. **Sandres-Sauné K, Deny P, Pasquier C, Thibaut V, Duverlie G, et al.** Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of the NS5b region. *J Virol Methods* 2003;109:187–193.
9. **Andre-Garnier E, Besse B, Rodallec A, Ribeyrol O, Ferre V, et al.** An NS5A single optimized method to determine genotype, subtype and resistance profiles of Hepatitis C strains. *PLoS One*. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0179562.
10. **Kalaghatgi P, Sikorski AM, Knops E, Rupp D, Sierra S, et al.** Geno2pheno[HCV] - A Web-based Interpretation System to Support Hepatitis C Treatment Decisions in the Era of Direct-Acting Antiviral Agents. *PLoS One* 2016;11:e0155869.
11. **Pio SF, Oliveira GC de, Rezende SM.** As bases moleculares da hemofilia A. *Rev Assoc Med Bras* 2009;55:213–219.
12. **WFH.** What is hemofilia?
13. **KAMAKURA W, MAZZON JA, KAMAKURA W, MAZZON JA.** CRITÉRIOS DE ESTRATIFICAÇÃO E COMPARAÇÃO DE CLASSIFICADORES SOCIOECONÔMICOS NO BRASIL. *Rev Adm Empres* 2016;56:55–70.
14. **PACHECO SR.** *Prevalência de infecção pelo vírus da hepatite c (VHC) em afetados pela anemia falciforme (HbSS) e interação entre a hepatite viral e a gravidade da doença de base.* Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/BA - CPqGM, Salvador.; 2010.
15. **Strauss E.** Hepatite C. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001;34:69–82.
16. **Jesus R.** *Prevalência de infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) em hemofílicos e portadores de outras coagulopatias congênitas.* Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador; 2016.
17. **Pereira FM, Almeida M da CC de, Santos FLN, Carreiro RP, Regis-Silva CG, et al.** Evidence of New Endemic Clusters of Human T-Cell Leukemia Virus (HTLV) Infection in Bahia, Brazil. *Front Microbiol* 2019;10:1002.
18. **BRASIL M da S.** Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfeções | Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, HIV/Aids e Hepatites Virais. <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2017/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-hepatite-c-e-coinfeccoes> (accessed 4 January 2019).
19. **Feld JJ, Foster GR.** *Second generation direct-acting antivirals – Do we expect major improvements?* Epub ahead of print 2016. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.07.007.
20. **Sorbo MC, Cento V, Di Maio VC, Howe AYM, Garcia F, et al.** Hepatitis C virus drug resistance associated substitutions and their clinical relevance: Update 2018. *Drug Resist Updat* 2018;37:17–39.
21. **Lisboa Neto G, Malta FM, Gomes-Gouvêa MS, Noble CF, Romano CM, et al.** Characterization of clinical predictors of naturally occurring NS3/NS4A protease polymorphism in genotype 1 hepatitis C virus mono and HIV co-infected patients. *J Med*

- Virology* 2017;89:2249–2254.
22. **Kwo P, Gitlin N, Nahass R, Bernstein D, Etkorn K, et al.** Simeprevir plus sofosbuvir (12 and 8 weeks) in hepatitis C virus genotype 1-infected patients without cirrhosis: OPTIMIST-1, a phase 3, randomized study. *Hepatology* 2016;64:370–380.
 23. **Moreira RC, de Torres Santos AP, Lisboa-Neto G, Mendes-Corrêa MCJ, Lemos MF, et al.** Prevalence of naturally occurring amino acid substitutions associated with resistance to hepatitis C virus NS3/NS4A protease inhibitors in São Paulo state. *Arch Virol* 2018;163:2757–2764.
 24. **Moreira RC, de Torres Santos AP, Lisboa-Neto G, Mendes-Corrêa MCJ, Lemos MF, et al.** Prevalence of naturally occurring amino acid substitutions associated with resistance to hepatitis C virus NS3/NS4A protease inhibitors in São Paulo state. *Arch Virol* 2018;163:2757–2764.
 25. **Dinu S, Țârdei G, Ceaușu E, Florescu SA, Micu L, et al.** Detection of anti-protease inhibitors resistance mutations in HCV strains infecting treatment-naïve chronic patients from Romania. *Rev Rom Med Lab* 2018;26:443–449.
 26. **Susser S, Schelhorn SE, Lange CM, Welsch C, Vermehren J, et al.** Ultratiefe Pyrosequenz-Analyse (UDPS) von neu beschriebenen seltenen Resistenzvarianten der Hepatitis C Virus NS3 Protease bei Patienten, die mit Telaprevir oder Boceprevir behandelt wurden. *Z Gastroenterol*;50. Epub ahead of print 2012. DOI: 10.1055/s-0032-1323987.
 27. **Peres-da-Silva A.** MUTAÇÕES NOS GENES NÃO ESTRUTURAIS DO VÍRUS DA HEPATITE C ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA AOS NOVOS ANTIVIRAIS. 2014.
 28. **Malta F, Gaspareto KV, Lisboa-Neto G, Carrilho FJ, Mendes-Correa MC, et al.** Prevalence of naturally occurring NS5A resistance-associated substitutions in patients infected with hepatitis C virus subtype 1a, 1b, and 3a, co-infected or not with HIV in Brazil. *BMC Infect Dis*;17. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.1186/S12879-017-2817-7.
 29. **Hernandez D, Zhou N, Ueland J, Monikowski A, McPhee F.** Natural prevalence of NS5A polymorphisms in subjects infected with hepatitis C virus genotype 3 and their effects on the antiviral activity of NS5A inhibitors. *J Clin Virol* 2013;57:13–18.
 30. **Kliemann DA, Tovo CV, Gorini da Veiga AB, Machado AL, West J.** Genetic Barrier to Direct Acting Antivirals in HCV Sequences Deposited in the European Databank. *PLoS One* 2016;11:e0159924.
 31. **Kieffer TL, Sarrazin C, Miller JS, Welker MW, Forestier N, et al.** Telaprevir and pegylated interferon-alpha-2a inhibit wild-type and resistant genotype 1 hepatitis C virus replication in patients. *Hepatology* 2007;46:631–639.

Table 1. Primers and condition used for PCR assays performed during this study.

Locus	Target genotype	Purpose	Primer	Sequence (5'→3')	Genome position†	Size (pb)	Annealing temp (C°)	Reference
NS3	1a	One Step RT-PCR	P1aF1	CTTYTCCCRRATGGAGACCAA	3266-3286	828	56	[7]
			P1aR1	ACCTTATAGCCCTGRGCYGC	4093-4074			[7]
		Nested PCR	P1aF2	CTCATCACGTGGGGGGCRGA	3288-3307	751	60	[7]
	1b	One Step RT-PCR	P1aR2	TTGGTGCTCTTRCCGCTGCC	4057-4038	834	56	[7]
			P1bF1	GCCCGTCRTCTTCTCTGACATGG	3257-3279			[7]
		Nested PCR	P1bR1	TTGTACCCTTGGGCTGCATA	4090-4071	766	60	[7]
	P1bF2	TCATCACCTGGGGGGCAGAC	3289..3308	[7]				
	3a	One Step RT-PCR	P1bR2	GTGCTCTTGCCGCTGCCAGT	4054..4035	828	56	[7]
			P3aF1	TAATATTTAGTCCCATGGAA	3262-3281			[7]
Nested PCR		P3aR1	TATATCCTTGTGCTACATAA	4089-4070	766	60	[7]	
P3aF2	TCATCACCTGGGGTGCGRAT	3289-3308	[7]					
P3aR2	GTGCTCTTACCGCTGCCGGT	4054-4035	[7]					
NS5A	1 - 3	One Step RT-PCR	NS5A-2F	GGIGARGGIGCIGTICARTGGATGAA	6066-6091	817	48§	[9]
	1 - 3		NS5A-R	TRTGRGAIGGRTCIGTIARCATIGA	6882-6858			[9]
	1 - 3		NS5A-3R	TRTGRGAIGGRTCICTIARCATIGA	6882-6858			[9]
NS5B	1 - 3	One Step RT-PCR	Pr1	TGGGGATCCCGTATGATACCCGCTGCTTTGA	8245-8275	401	63	[8]
	1 - 3		Pr2	GGCGGAATTCCTGGTCATAGCCTCCGTGAA	8645-8616			[8]
	1 - 3	Nested PCR	Pr3	TATGAYACCCGCTGYTTTGACTC	8256-8278	381	55	[8]
	1 - 3		Pr5	GCTAGTCATAGCCTCCGT	8636-8619			[8]

†Genome positions for each primer used to target Hepatitis C virus (HCV) subgenomic regions (GenBank accession number M62321). §Annealing temperatures were incrementally increased by 0.3°C every cycle.

Table 2. Demographic and socioeconomic characteristics of patients with chronic hepatitis C followed at HEMOBA or HUPES-UFBA, 2016-18.

Characteristics	HEMOBA		HUPES-UFBA		TOTAL	
	n*, (%) or Avg. ± SD (Min. - Max.)		m*, (%) or Avg. ± SD (Min. - Max.)		n+m*, (%) or Avg. ± SD (Min. - Max.)	
Total	23		181		204	
Sex						
Male	22	96%	93	51%	115	56%
Female	1	4%	88	49%	89	44%
Years of age	44.0 ± 12.4 (19 – 68)		55.7 ± 11.1 (31 - 84)		54.4 ± 11.8 (19 - 84)	
Skin color (IBGE) †						
White	2	9%	23	13%	25	12%
Brown	10	45%	94	52%	104	51%
Black	9	41%	60	33%	69	34%
Yellow/Amerindian	1	5%	4	2%	5	2%
City of residence						
Salvador	9	39%	119	66%	128	63%
Other cities	14	61%	62	34%	76	37%
Education						
Illiterate / Primary school incomplete	2	9%	34	20%	36	18%
Primary school complete / Middle school incomplete	9	39%	43	24%	52	25%
Middle school complete / High school incomplete	6	26%	21	12%	27	13%
High school complete / University incomplete	6	26%	63	32%	69	34%
Undergraduate university degree	0	0%	20	11%	20	10%
Economic class (CCEB) ‡						
A	0	0%	1	0%	1	0%
B	9	39%	28	15%	37	18%
C	14	61%	93	52%	107	53%
D-E	0	0%	58	32%	58	29%

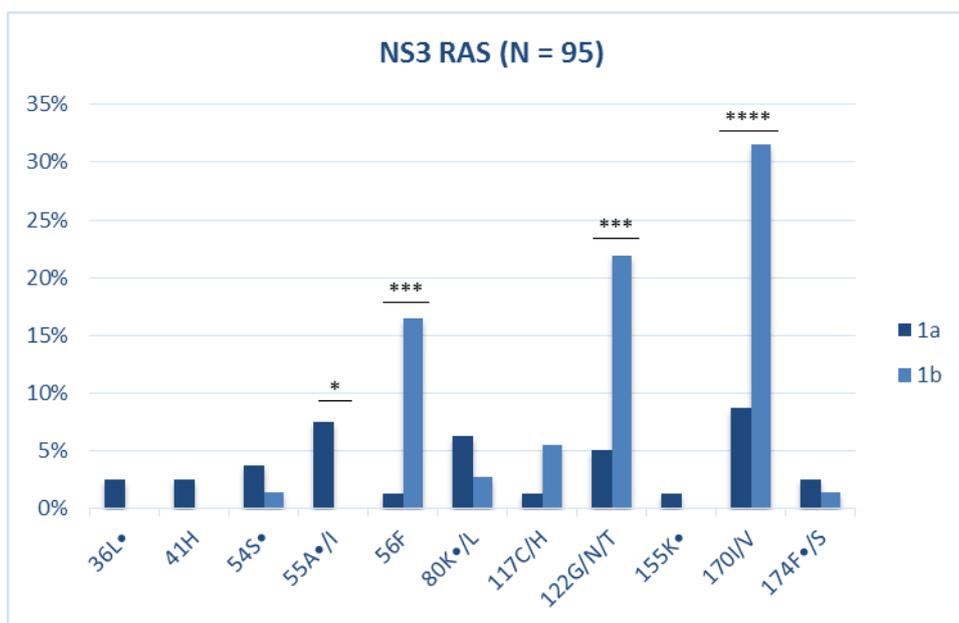
* Total varies according to the availability of data. † IBGE classification (Brazilian Institute of Geography and Statistics). ‡ CCEB economic classification system (2019).

Table 3. Clinical and laboratorial characteristics of patients with chronic hepatitis C followed at HEMOBA or HUPES-UFBA, 2016-18.

Characteristics	HEMOBA			HUPES			Total		
	n*	% or Avg. ± SD (Min. - Max.)		m*	% or Avg. ± SD (Min. - Max.)		n+m*	% or Avg. ± SD (Min. - Max.)	
Total	23			181			204		
Serology pos.									
AgHBs	22	1	5%	106	2	2%	128	3	2%
anti-HIV	22	0	0%	90	3	3%	112	3	3%
anti-HTLV I/II	22	0	0%	72	13	18%	94	13	14%
ALT > RV = 41 UI/dL	18	8	44%	168	64	38%	186	72	39%
AST > RV = 37 UI/dL	19	9	47%	169	58	34%	188	67	36%
Necroinflammatory activity**									
A0-A2	-	-		57		100%	57	0	100%
A3-A4	-	-		0		0%	0	0	0%
Hepatic fibrosis**									
F0-F2	-	-		103		84%	103	0	84%
F3-F4	-	-		19		16%	19	0	16%
HCV genotype									
1a	11		55%	61		43%	72	0	44%
1b	6		30%	51		36%	57		35%
2	1		5%	2		1%	3	0	2%
3	2		10%	26		18%	28	0	17%
Mix	0		0%	2		1%	2	0	1%
Viral load (log IU/ml)	23		5.4 ± 1.4 (1.1 - 6.6)	124		5.7 ± 1.1 (0.8 - 8.6)	147	0	5.7 ± 1.1 (0.8 - 8.6)
History of treatment	17	4	24%	181	33	18%	198	37	19%
RAS***									
NS3	8	4	50%	129	58	45%	137	62	45%
NS5A	6	1	17%	107	29	27%	113	30	27%
NS5B	10	0	0%	114	2	2%	124	2	2%

SD - standard deviation; RV - reference value; RAV - resistance-associated variant. * Total varies according to the availability of data. SD - standard deviation. RV - reference value. ** Biopsy or elastography. *** RAS – resistance-associated substitution for HCV genotype and drugs licensed in Brazil.

A



B

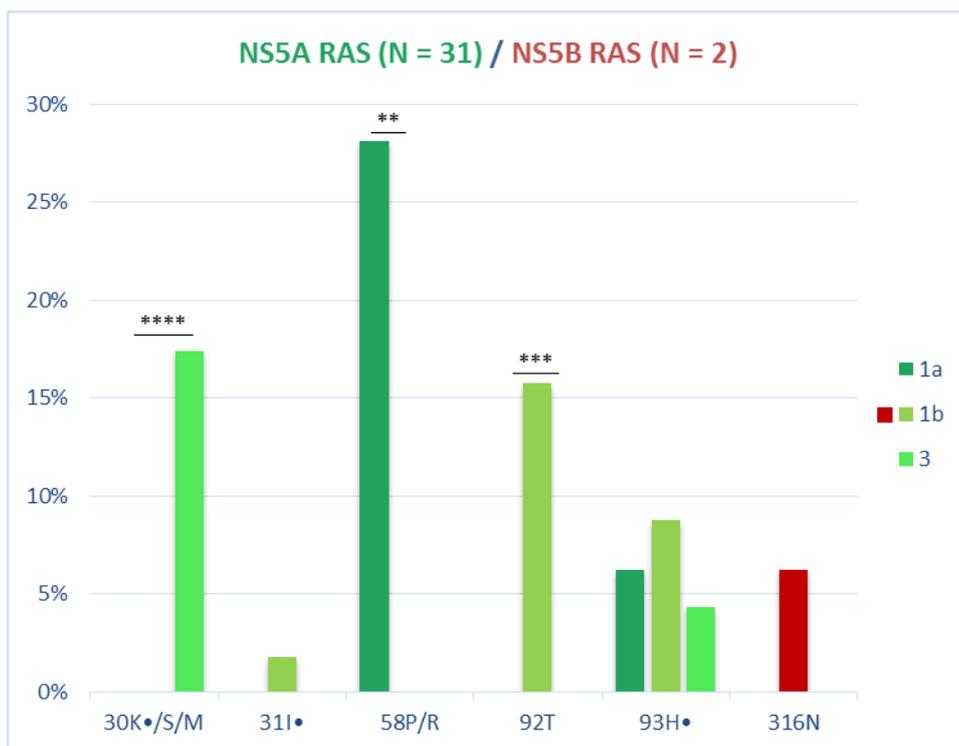


Fig. 1. A - Percentage of NS3 RAS; B - Percentage of NS5A and NS5B RAS.

• Relevant resistance-associated variants (RAV) in patients with HCV infection associated with drugs licensed in Brazil. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Table 4.1. Characteristics of patients with relevant NS3 RAVs.

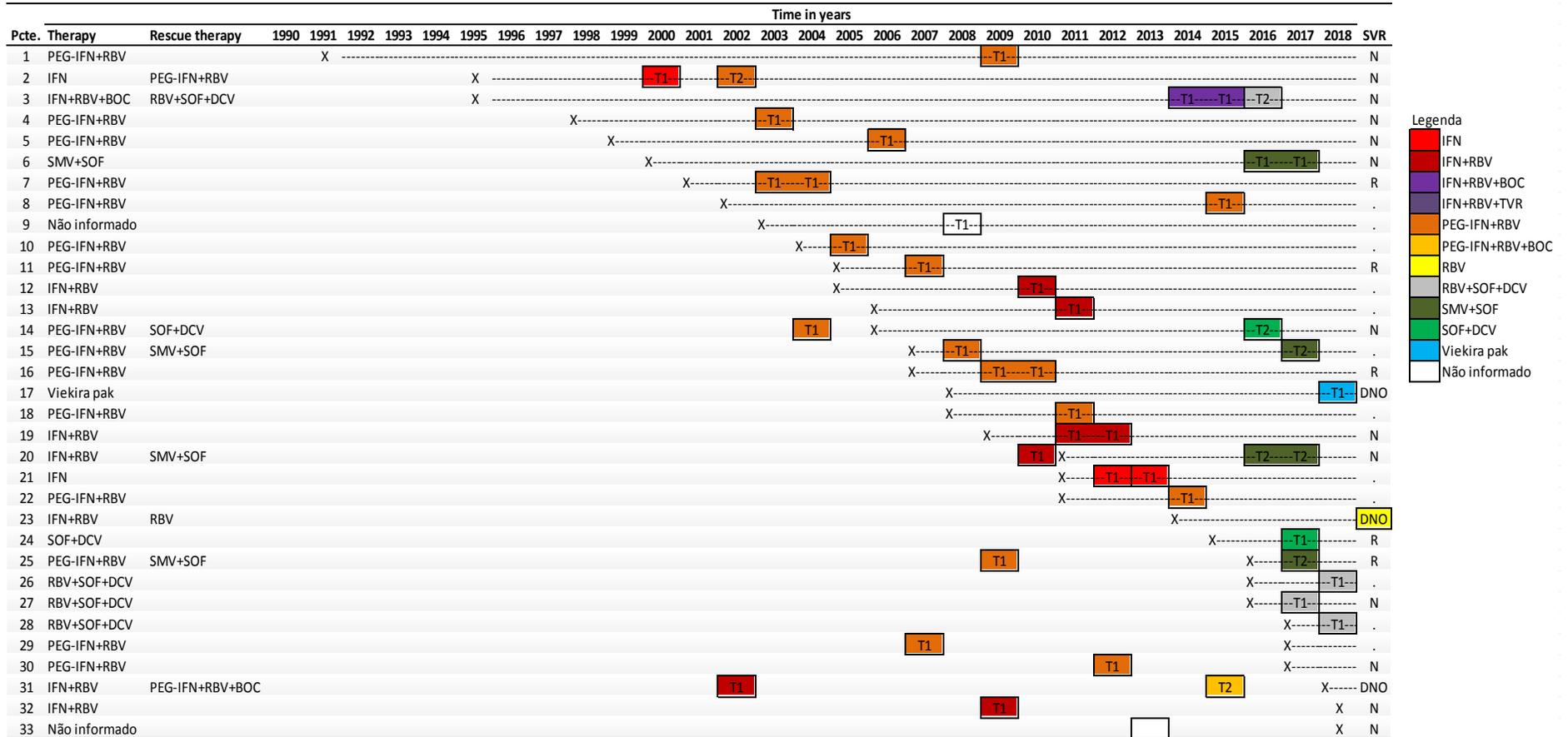
Patient	Age	Sex	Viral load (log IU/ml)	Genotype	Co- infection	History of treatment	RAV NS3	Resistance profile					
								BOC	TVR	SMV	ABT- 493	GZR	Veruprevir*
1	45	M	nd	1a	N	N	R155K	R	R	R	-	RS	-
2	46	M	5.46	1a	nd	nd	T54S	R	R	R	-	-	-
3	45	M	5.93	1a	N	N	Q80K	-	-	R	-	-	-
4*	71	M	nd	1b	N	N	Q80L+V170I+S174F	R	RS	-	-	-	-
5*	53	M	5.74	1b	Anti-HBS	N	T54S+V170I	R	RS	-	-	-	-
6	54	M	6.04	1a	N	N	V36L+Q41H	R	RS	R	RS	-	-
7	52	F	6.29	1a	N	N	V36L+Q41H	R	RS	R	RS	-	-
8	57	F	5.93	1a	N	N	V55A	R	RS	-	-	-	-
9*	55	M	nd	1a	N	N	T54S+V55I+Q80L	R	RS	-	-	-	-
HE.1	47	M	nd	1a	N	N	T54S	R	R	R	RS	-	-

HE - HEMOBA; nd - not determined; Y - Yes / N - No; BOC - Boceprevir; TVR - Telaprevir; SMV - Simeprevir; ABT-493 - Glecaprevir; GZR - Grazoprevir. R - Resistant; RS - reduced-susceptibility; S - susceptible; "-" - unknown.

Table 4.2. Characteristics of patients with relevant NS5A RAVs.

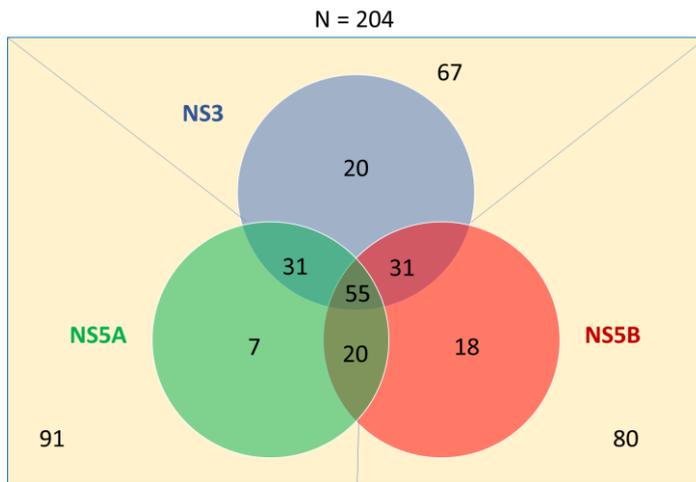
Patient	Age	Sex	Viral load (log IU/ml)	Genotype	Co- infection	History of treatment	RAV NS5A	Resistance profile					
								DCV	Ombitasvir*	Velpatasvir	GS- 5885	EBR	Pibrentasvir
4*	71	M	nd	1b	N	N	Y93H	R	R	R	R	R	RS
5*	53	M	5.74	1b	N	N	Y93H	R	R	R	R	R	RS
9*	55	M	nd	1a	N	N	Y93H	R	R	R	R	R	RS
10	48	F	5.11	1b	N	N	Y93H	R	R	R	R	R	RS
11	67	M	5.36	3a	Anti-Hbc	Peg+IFN+RBV	A30K	R	-	RS	R	R	RS
12	56	M	6.68	3a	N	N	A30M+Y93H	R	R	-	-	-	-
13	61	M	5.23	1a	Anti-HTLV	IFN+RBV+BOC	Y93H	R	R	R	R	R	RS
14	41	M	nd	1b	N	nd	Y93H	R	R	R	R	R	RS
15	63	F	5.84	1b	N	N	Y93H	R	R	R	R	R	RS
16	69	M	5.51	3a	N	N	A30K	R	-	RS	R	R	RS

nd - not determined; DCV - Daclatasvir; * VIEKIRA PAK component; GS-5885 - Ledipasvir; EBR - Elbasvir. R - Resistant; RS - reduced-susceptibility; S - susceptible; "-" - unknown.



Supplement Fig. 1. Time of prior treatment of experienced patients and therapeutic outcome, HUPES, 2018.

"X" = Admission; "-" = Follow up; "T1" = Treatment; "T2" = Rescue therapy; DNO = data not obtained; "." = Abandoned; "N" = No, failed; "R" = Relapse; "S" = Yes; Sustained virological response (SVR).



Supplement Fig. 2. Venn diagram showing the number of samples analyzed for resistance mutations by subgenomic region: NS3, NS5A and NS5B.

5 DISCUSSÃO

As hepatites virais são doenças de notificação compulsória no Brasil desde o ano de 1996. Vários estudos epidemiológicos além dos dados registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) demonstraram que a hepatite C foi considerada uma “epidemia silenciosa” com aumento de casos a partir da disponibilização dos métodos diagnósticos (STRAUSS, 2001). O tratamento da hepatite C foi introduzido no Sistema Único de Saúde (SUS) no início dos anos 2000. Ao longo dos 19 anos de combate da hepatite C no SUS, houve uma constante atualização dos esquemas de tratamento objetivando atingir maior eficácia, sempre apoiados pelas melhores evidências científicas. Em 2002, a primeira guia brasileira denominado Protocolo Clínico de Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e coinfeções (PCDT-HepC) foi disponibilizado pelo Ministério da Saúde.

A revisão constante do PCDT-HepC permitiu um cenário favorável, pois novos DAAs foram licenciadas no Brasil com a promessa de elevar a RVS a um nível de cura superior a 90% (BRASIL, 2019). Alinhado a melhorias no sistema de saúde e a implantação da Política Nacional de Sangue e Hemoderivados, houve uma redução gradual da prevalência da infecção pelo VHC em vários grupos considerados de risco, mesmo na ausência de uma vacina. Apesar de nem todos os indivíduos infectados pelo VHC terem acesso aos medicamentos, a diminuição da prevalência reflete numa proteção individual através da cura da doença, e também coletiva pela redução da transmissão do VHC (ANDRADE et al., 2001; FERREIRA; SILVEIRA, 2004; MARTINS; NARCISO-SCHIAVON; SCHIAVON, 2011). A Assembleia Mundial da Saúde, no ano de 2016, propôs a eliminação da infecção pelo vírus da hepatite C até o ano de 2030.

Alguns grupos populacionais foram amplamente estudados por apresentarem fatores de risco para infecção pelo VHC. Destacam-se usuários de drogas e recebedores de sangue, seus componentes e derivados, anterior a 1993. Em Salvador, a prevalência de infecção pelo VHC variou consideravelmente conforme o grupo populacional: 1,5% na população em geral e em doadores, 12,1% em pacientes com anemia falciforme, 35,6% em UDI e 42% entre hemofílicos (PACHECO, 2010; SANTANA, 1995; SILVA, L. K. et al., 2005; SILVA, 2010b). Na última década, a prevalência tem reduzido significativamente. Em um estudo com gestantes, a

prevalência já foi de 0,3%, em falciforme 6,4% e hemofílicos 21% (JESUS, 2016; PACHECO, 2010; PASSINI, 2012). Somente não temos conhecimento de dados atualizados entre os UDI.

A Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado da Bahia (Hemoba), criada pela Lei Estadual 5.183 em 1989, é uma unidade de saúde que capta sangue e processa seus componentes e derivados para o tratamento de pacientes que necessitam de transfusão, portadores de doenças hematológicas benignas, tais como Hemofilia e Doença Falciforme, entre outras. A HEMOBA possui um ambulatório para atendimento de pacientes com doença de base hematológica e que também são portadores da hepatite C crônica (HEMOBA, 2019)

Os hemofílicos com hepatite C crônica possuem características sociodemográficas peculiares devido à doença de base. A hemofilia tem um padrão de herança recessivo ligado ao sexo que afeta o cromossoma X. Há maior manifestação da doença em homens do que em mulheres. Isso ocorre porque as mulheres têm dois cromossomos X e a doença só se expressa em homozigose, enquanto os homens têm apenas um cromossomo X, de modo que se manifesta em todos os homens que carregam o cromossoma X afetado (hemizigose). A chance de uma mulher ter duas cópias defeituosas do gene é muito remota, razão pela qual as mulheres são quase exclusivamente portadoras (PIO; OLIVEIRA; REZENDE, 2009; WFH, 2019). E em nossa casuística, sexo masculino ocorreu em 96% (22/23) e feminino 4% (1/23), com faixa etária entre 19 a 68 anos, média 44 anos. No estudo anterior com os portadores de coagulopatias congênitas foi identificado 42% de soroprevalência de infecção pelo VHC (JESUS, 2016).

O ambulatório Magalhães Neto, do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (HUPES) é considerado um centro referência nacional para o tratamento das hepatites virais, atuando há mais de 20 anos no acompanhamento, monitoramento e tratamento dos pacientes com hepatite C crônica. Trata-se de um ambulatório especializado para avaliação e prestação de assistência à saúde da população na área de gastroenterologia e hepatologia; a formação de recursos humanos com médicos, enfermeiros, nutricionistas e vários técnicos de nível médio, além de contribuição à pesquisa científica.

Em comparação com o grupo dos pacientes HEMOBA, os pacientes em atendimento ambulatorial HUPES apresentaram igual frequência de sexo masculino e feminino, faixa etária entre 31 e 84 anos, média 55 anos, predominantemente residentes de Salvador. Os hemofílicos apresentaram uma faixa etária menor. Isso pode ser explicado pela expectativa de vida reduzida nos pacientes acometidos com essa doença. Segundo a Federação Mundial de Hemofilia, estima-se que diminua em dez anos a expectativa de vida nos portadores dessa desordem (WFH, 2019).

A predominância da cor da pele auto referida parda e negra e a distribuição por classe social em ambos grupos estão em acordo com a alta miscigenação racial dos habitantes do estado da Bahia e a clientela que habitualmente frequenta o SUS. O mesmo resultado foi encontrado em um estudo realizado na HEMOBA com o grupo de pacientes falcêmicos (PACHECO, 2010). Quanto a moradia, os dados demonstraram que no geral os hemofílicos residem no interior do estado, refletindo a deficiência no atendimento especializado em algumas regiões, o que ocasiona no deslocamento dessas pessoas para atendimento especializado na Capital.

A frequência de coinfeções por agentes que compartilham a mesma via de transmissão do VHC foi elevada. Apesar do objetivo desse estudo não ser determinar a prevalência destes agentes, encontramos uma alta taxa de coinfeção pelo VHB tanto em hemofílicos (5%) quanto pacientes do HUPES (2%), um agente para o qual existe vacina e tratamento. O sinergismo destes vírus pode produzir uma doença hepática de progressão mais rápida e de pior desfecho (STRAUSS, 2001). Isso reitera que é essencial a priorização do tratamento das hepatites virais para esses grupos de pacientes. Todavia, a coinfeção pelo HIV (3%) e HTLV (18%) foram exclusivas aos pacientes do HUPES. Antes de 1992, os hemofílicos foram considerados de alto risco para infecção por HIV e outros agentes de transmissão sanguínea. Entretanto, com a crise provocada pela AIDS nos anos 1980s e 1990s, o controle da qualidade do sangue e hemoderivados foi intensificado. Devido ao número pequeno de casos de hepatite C entre os hemofílicos, não foi possível estimar a coinfeção por estes vírus que varia entre 0,6% e 1,3% (JESUS, 2016). Por outro lado, a Bahia tem tido destaque na pesquisa do HTLV devido a sua elevada prevalência nas regiões Norte e Nordeste. Segundo pesquisas recentes, Salvador está localizada no epicentro da infecção por HTLV (PEREIRA et al., 2019)

Em 2012, o Ministério da Saúde incorporou, no âmbito do SUS, o uso das novas drogas de antivirais de ação direta (DAAs) para tratamento da hepatite C crônica: Boceprevir e Telaprevir, os primeiros inibidores da protease NS3. A partir de 2015, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) registrou os demais: Sofosbuvir, Simeprevir, Daclatasvir e Ombistavir/Veruprevir/Ritonavir +Dasabuvir (Viekira Pak®), que constituíram o arsenal terapêutico até os dias atuais. Um mutirão de tratamento da hepatite C foi montado no ambulatório no HUPES, a fim de tratar os pacientes segundo as novas guias (comunicação oral). A princípio, os pacientes com o grau de fibrose mais altos (F3-F4) foram convocados para comparecerem as consultas e aderiram ao tratamento. Na segunda etapa, a partir das atualizações no PCDT-HepC de 2018, os pacientes (F0-F1) foram solicitados a comparecer no ambulatório. Como o recrutamento dos pacientes para essa pesquisa teve início na segunda etapa do mutirão, houve um viés na seleção dos participantes da pesquisa que pode justificar algumas características clínico-laboratoriais encontradas no estudo, tais como, doença leve, níveis séricos das transaminases hepáticas (ALT e AST) abaixo dos valores de referência, baixa atividade necroinflamatória e baixo grau de fibrose na maioria dos participantes. Além disso, a maioria dos participantes foram pacientes virgens de tratamento, e uma parcela menor representada por pacientes experimentados não-respondedores. Os pacientes experimentados com RVS não foram incluídos, pois a negatificação do VCH-RNA não permite análise das sequências virais.

Quatro hemofílicos foram experimentados, todos com terapia baseada no IFN. Entre os pacientes do HUPES, 33 realizaram tratamento. Destes, 25 (76%) também foram experimentados com terapia baseada no IFN. Através das revisões de prontuário foi possível estabelecer a linha do tempo de acompanhamento e tratamento. Pode-se evidenciar que a partir de 2014 alguns pacientes começaram ser tratados com DAAs (exemplo, terapia tripla IFN+RBV+BOC) (Figura suplementar 1, Artigo). Em 2016 em diante, os esquemas de tratamento já incluíam os novos DAAs e quase todos os pacientes foram experimentados com terapias livres de IFN. Este achado é corroborado com as recomendações do PCDT-HepC de 2016 sobre o uso de DAAs para tratamento do VHC (BRASIL, 2016). Infelizmente, entre os experimentados com DAAs estudados, todos apresentaram falha terapêutica, alguns

por abandono ao tratamento, não resposta ou recidiva. Informações detalhadas dos casos não foram localizadas na revisão de prontuário.

A importância das mutações de resistência também conhecidas como substituições associadas à resistência (RAS) tem sido debatida (SORBO et al., 2018), visto que elas podem ocorrer naturalmente em pacientes virgens de tratamento e experimentados. Entretanto, o rastreamento das mutações de resistência não está disponível no SUS e poucos laboratórios estão capacitados para este fim. Este serviço, muitas vezes tem sido prestado através de colaborações de pesquisa entre as unidades de saúde e centro de pesquisa no Brasil. Neste estudo, encontramos uma alta prevalência de RAS (51%), sendo que a prevalência varia conforme a região subgenômica pesquisada: NS3 RAS foi 45%, NS5A RAS foi 27% e NS5B RAS foi 2%. As RAS das diferentes foram detectadas sozinhas ou combinadas de duas até quatro mutações num mesmo paciente. Também foram encontrados RAS para mais de uma classe de drogas em um mesmo paciente.

Conforme os genótipos circulantes e as drogas licenciadas no Brasil, pode-se prever o perfil de resistência de cada RAS. Falha aos DAAs é um evento relativamente raro que pode ocorrer em pacientes infectados por qualquer genótipo do VHC e em uma variedade de situações clínicas, e está frequentemente associado à presença de variantes do vírus associados com resistência (RAVs). Em teoria, a falha ocorre quando as RAVs suplantam o vírus selvagem sob a pressão seletiva da droga e reestabelecem a carga viral. As NS3 RAVs mais predominantemente encontradas foram 54S (4%), 55A (6%) e 80K (7%), todas mais frequentes no genótipo 1a. A frequência da RAS 54S foi mais alta quando comparada com a descrita em outro estudo em pacientes VHC coinfectados com HIV (T54S 2.4%, V55A 8%; (LISBOA NETO et al., 2017). As RAS 54S e 55A estão associadas à resistência ao Boceprevir (BOC). A variante 80K confere mutação de resistência relacionada ao Simeprevir (SMV) em pacientes cirróticos infectados com o genótipo 1a do VHC e tratados com SMV+SOF por 12 semanas tiveram uma RVS menor (74%) quando comparados com o grupo que não apresentava a substituição do Q80K, RVS (92%) (KWO et al., 2016).

NS3 RAV também foram identificadas nos códons 36 (2%), 155 (1%) e 174 (3%), também mais frequentes no genótipo 1a. Em um estudo na região metropolitana de São Paulo, a RAV 36L foi encontrada em pacientes com genótipo 1a e 1b, sendo que a frequência dessa variante foi maior no grupo com genótipo 1a com 2,6%

(MOREIRA et al., 2018). Por sua vez, Peres da Silva e colaboradores identificaram uma maior prevalência da variante 36L (5,6%) exclusivamente em pacientes com genótipo 1b. A variante 36L está associada à resistência ao BOC. No estudo paulista, a RAV 155K também apresentou baixa frequência e foi identificada apenas em pacientes com genótipo 1a (0,5%), semelhante ao nosso estudo (1%) (MOREIRA et al., 2018). Essa variante se destaca por estar relacionada com a resistência a múltiplas drogas BOC, TVL e SMV. A variante 174F (3%) foi descrita pela primeira vez no Brasil neste estudo e sua distribuição parece ser restrita, uma vez que foi identificada apenas em estudos publicados na Alemanha e Romênia (DINU et al., 2018). A variante 174F foi associada à resistência ao BOC (SUSSER et al., 2012).

Ademais, com a identificação das mutações de resistência ao BOC e TLV pelos pesquisadores. O tratamento monoterápico a partir do BOC ou TLV ocasionou em uma progressiva seleção de variantes de resistência, conseqüentemente houve aumento da carga viral nesses pacientes. Dessa forma, identificou-se então a necessidade da incorporação dos DAA de segunda Geração (PERES-DA-SILVA, 2014).

Na região NS5, foram encontrados 3 perfis de NS5A RAVs sendo a variante 93H a mais frequente (26%), com distribuição entre todos os genótipos 1a, 1b e 3. Essa RAV merece destaque, já que confere mutação de resistência a todas as drogas cujo alvo é o complexo da polimerase NS5A, com exceção do Pibrentasvir. Na pesquisa feita no Hospital das Clínicas em São Paulo com pacientes mono infectados VHC e co infectados com VHC+HIV, essa variante também esteve presente em todos os genótipos (MALTA et al., 2017). Em um estudo com amostras de genótipo 3 provenientes da América do Norte, Austrália e Europa, encontrou-se uma prevalência global média de 8.6% da variante 93H, com distribuição variada entre os diferentes países estudados (HERNANDEZ et al., 2013). A segunda variante mais predominante foi a 30K (6%) que confere resistência a múltiplas drogas, Daclatasvir (DCV), Ledipasvir (GS-5885) e Elbasvir (EBR), sobretudo em pacientes infectados pelos genótipos 1a e 3. Em nosso estudo, essa RAV foi encontrada exclusivamente em amostras genótipo 3, com frequência similar (6.3%) à descrita por HERNANDEZ e cols. (2013). Finalmente, a RAV 31I foi identificada em um paciente genótipo 1b. Nenhuma RAV foi encontrada para região NS5B.

Neste estudo não encontramos associação da ocorrência de RAS com características dos pacientes tais como: hemofilia, idade (≥ 45 anos), carga viral elevada (≥ 500.000 cópias/mL), histórico de tratamento e uso de DAAs e co-infecções. Em parte, isso pode estar relacionado com o número de amostras amplificadas até o momento, a baixa frequência de algumas RAS e também a falta de alguns dados nos prontuários médicos. Do total de 204 amostras, a amplificação das regiões NS3, NS5a e NS5B foi bem sucedida em 137, 113 e 123 amostra, respectivamente. Algumas amostras ainda estão sendo repetidas ou amplificadas por outros métodos para recuperação dos dados. Todavia, foi observado claramente, associação de RAS, especialmente NS3 RAS, com o genótipo tipo 1b. É bem conhecido que a variabilidade genética do VHC tem impacto na barreira genética para resistência aos DAAs (KLIEMANN et al., 2016). Kieffer e cols. (2007) descreveram sobre ocorrência das variantes V36M e R155K/T em pacientes com genótipo 1a relacionado com a baixa barreira genética; essas substituições requerem apenas 1 mutação nos respectivos códons quando comparado com o genótipo 1b que depende de 2 mutações (KIEFFER et al., 2007).

São poucos os estudos no Brasil e na América Latina que tem avaliado e identificado às mutações de resistência para estas classes de drogas. Além disso, novos DAAs tem sido licenciados no Brasil de forma acelerada com a finalidade de garantir o sucesso terapêutico da hepatite C. Dados sobre a falha primária, identificação das variantes que promovem a resistência antiviral, e as consequências terapêuticas dessas variantes ainda precisam ser mais exploradas. Dentro desse contexto, o presente estudo pretendeu rastrear e monitorar as mutações de resistência aos DAA em pacientes com hepatite C crônica atendidos em dois centros de referência em Salvador-BA: o Ambulatório Magalhães Neto do Complexo Hospitalar Professor Edgard Santos (HUPES-UFBA) e a Fundação Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA). Os resultados evidenciaram a presença de RAS tanto em pacientes experimentados quanto em virgens de tratamento nas três regiões alvo dos DAAs: NS3, NS5A e NS5B. As RAS foram mais frequentes na região NS3 quando comparada com a região NS5, e também bem acima do esperado quando comparado com outros estudos(DINU et al., 2018; MOREIRA et al., 2018). A razão para a alta prevalência de RAS NS3/4 ainda é incerta, todavia a ocorrência destes mutações foi associada ao genótipo 1b. Isso pode ter implicações sobre a barreira

genética para resistência e impacto na resposta terapêutica. O sequenciamento de um número maior de isolados seria desejável. O rastreamento de mutações de resistência pelo menos entre os pacientes com falha primária e recidiva podem guiar o tratamento de forma a maximizar os recursos públicos em um país em desenvolvimento como o Brasil.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A partir de entrevistas e revisão de prontuário foi possível obter as principais características socioeconômicas, demográfica e clínico-laboratoriais dos pacientes com hepatite C crônica atendido na HEMOBA e HUPES participantes deste estudo. Entretanto, muitos dados foram faltantes nos prontuários médicos que podem ter comprometido a pesquisa sobre a clínica e a resposta terapêutica;
- RAS foram identificadas tanto em pacientes experimentados quanto em virgens de tratamento nas três regiões alvo dos DAAs: NS3, NS5A e NS5B. As RAS foram mais frequentes na região NS3 quando comparada com a região NS5;
- Até o momento só foi possível associar RAS com a frequência do genótipo do vírus. Isso pode ter implicações sobre a barreira genética para resistência e impacto na resposta terapêutica.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, T. *et al.* The Opening of South America's first needle exchange program and an epidemic of crack use in Salvador, Bahia-Brazil. **AIDS and Behavior**, v. 5, n. 1, p. 51–64, 2001. Disponível em:

<http://link.springer.com/10.1023/A:1009559405477>. Acesso em: 26 jun. 2019.

APPEL, N.; PIETSCHMANN, T.; BARTENSCHLAGER, R. Mutational analysis of hepatitis c virus nonstructural protein 5a: potential role of differential phosphorylation in rna replication and identification of a genetically flexible domain. **Journal of Virology**, v. 79, n. 5, p. 3187–3194, 2005. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15709040>. Acesso em: 26 ago. 2019.

ASSELAH, T. Daclatasvir plus sofosbuvir for HCV infection: an oral combination therapy with high antiviral efficacy. **Journal of Hepatology**, v. 61, n. 2, p. 435–438, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24816173>.

ASSELAH, T. *et al.* Hepatitis C: viral and host factors associated with non-response to pegylated interferon plus ribavirin. **Liver international**, v. 30, n. 9, p. 1259–69, out. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20633102>. Acesso em: 26 jun. 2019.

BARTELS, D. J. *et al.* Natural prevalence of hepatitis C virus variants with decreased sensitivity to NS3.4A protease inhibitors in treatment-naive subjects. **Journal of Infectious Diseases**, v. 198, n. 6, p. 800–807, 2008. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18637752>.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) para Hepatite C e Coinfecções**. [s.l.], 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) para Hepatite C e Coinfecções**. [s.l.], 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções (PCDT)**. [S.l: s.n.], 2019.

BRASS, V.; MORADPOUR, D.; BLUM, H. E. Molecular Virology of Hepatitis C Virus (HCV): 2006 Update. **International Journal Medical Science**, p. 3, 2006.

Disponível em: www.medsci.org. Acesso em: 23 ago. 2019.

BUTT, A. A.; KANWAL, F. Boceprevir and Telaprevir in the Management of Hepatitis C Virus-Infected Patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 1, p. 96–104, 2012. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/cir774>. Acesso em: 26 jun. 2019.

CHOO, Q. L. *et al.* Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. **Proceedings National Academy Science USA**, v. 88, n. 6, p. 2451–2455, 1991. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1848704>.

CHOO, Q. L. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, n. 4902, p. 359–362, 1989. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2523562>.

CLARKE, B. Molecular virology of hepatitis C virus. **Journal of General Virology**, v. 78, Pt 10, p. 2397–2410, 1997. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9349458>.

COLSON, P. *et al.* Natural presence of substitution R155K within hepatitis C virus NS3 protease from a treatment-naïve chronically infected patient. **Hepatology**, v. 47, n. 2, p. 766–767, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18220300>.

CUBERO, M. *et al.* Naturally occurring NS3-protease-inhibitor resistant mutant A156T in the liver of an untreated chronic hepatitis C patient. **Virology**, v. 370, n. 2, p. 237–245, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18006035>.

DINU, S. *et al.* Detection of anti-protease inhibitors resistance mutations in HCV strains infecting treatment-naïve chronic patients from Romania. **Revista Romana de Medicina de Laboratório**, v. 26, n. 4, p. 443–449, 1 out. 2018. Disponível em: <https://content.sciendo.com/view/journals/rmlm/26/4/article-p443.xml>. Acesso em: 17 jun. 2019.

EGGER, D. *et al.* Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. **Journal of Virology**, v. 76, n. 12, p. 5974–84, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12021330>. Acesso em: 26 ago. 2019.

FARCI, P. *et al.* The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. **Science**, v. 288, n. 5464, p. 339–344, 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10764648>.

FERREIRA, C. T.; SILVEIRA, T. R. da. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 4, p. 473–487, dez. 2004. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-

790X2004000400010&lng=pt&tlng=pt. Acesso em: 26 jun. 2019.

FIGLEROWICZ, M. *et al.* Hepatitis C virus quasispecies in chronically infected children subjected to interferon–ribavirin therapy. **Archives of Virology**, v. 155, n. 12, p. 1977–1987, 15 dez. 2010. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00705-010-0789-7>. Acesso em: 26 jun. 2019.

FRIED, M. W. *et al.* Peginterferon Alfa-2a plus Ribavirin for Chronic Hepatitis C Virus Infection. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 13, p. 975–982, 2002. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa020047>. Acesso em: 3 jun. 2019.

GÖTTE, M.; FELD, J. J. Direct-acting antiviral agents for hepatitis C: structural and mechanistic insights. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 13, n. 6, p. 338–351, 2016. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrgastro.2016.60>. Acesso em: 4 jan. 2019.

HAAGSMA, E. B. *et al.* Chronic hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. **Liver Transplantation**, v. 14, n. 4, p. 547–553, 1 abr. 2008. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/lt.2148>. Acesso em: 13 set. 2018.

HEMOBA. **Rede HEMOBA**.

HERNANDEZ, D. *et al.* Natural prevalence of NS5A polymorphisms in subjects infected with hepatitis C virus genotype 3 and their effects on the antiviral activity of NS5A inhibitors. **Journal of Clinical Virology**, v. 57, n. 1, p. 13–18, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386653213000073?via%3Dihub>. Acesso em: 27 jun. 2019.

HU, J. *et al.* Treatment of hepatitis C in children: a systematic review. **PloS One**, v. 5, n. 7, p. e11542, 13 jul. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20644626>. Acesso em: 26 jun. 2019.

INAMULLAH *et al.* Hepatitis C virus genotypes circulating in district Swat of Khyber Pakhtoonkhaw, Pakistan. **Virology Journal**, v. 8, p. 16, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21235746>. Acesso em: 26 jun. 2019.

IZOPET, J. *et al.* Molecular evidence for nosocomial transmission of hepatitis C virus in a French hemodialysis unit. **Journal Medical Virology**, v. 58, n. 2, p. 139–144, 1999. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10335861>.

JESUS, R. **Prevalência de infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) em hemofílicos e portadores de outras coagulopatias congênitas**. 2016. 83 f. Centro

de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2016.

KATO, N. Molecular virology of hepatitis C virus. **Acta Medica Okayama**, v. 55, n. 3, p. 133–159, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11434427>.

KEISERMAN, D. R. *et al.* Intrafamilial transmission of hepatitis C virus in patients with hepatitis C and human immunodeficiency virus coinfection. **American Journal Gastroenterology**, v. 98, n. 4, p. 878–883, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12738471>.

KIEFFER, T. L. *et al.* Telaprevir and pegylated interferon-alpha-2a inhibit wild-type and resistant genotype 1 hepatitis C virus replication in patients. **Hepatology**, v. 46, n. 3, p. 631–639, 2007. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.21781>. Acesso em: 18 jun. 2019.

KLIEMANN, D. A. *et al.* Genetic Barrier to Direct Acting Antivirals in HCV Sequences Deposited in the European Databank. **PloS One**, v. 11, n. 8, p. e0159924, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27504952>. Acesso em: 18 jun. 2019.

KWO, P. *et al.* Simeprevir plus sofosbuvir (12 and 8 weeks) in hepatitis C virus genotype 1-infected patients without cirrhosis: OPTIMIST-1, a phase 3, randomized study. **Hepatology**, v. 64, n. 2, p. 370–380, 2016. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.28467>. Acesso em: 4 jun. 2019.

LAWAL, Z. *et al.* Hepatitis C virus genomic variability in untreated and immunosuppressed patients. **Virology**, v. 228, n. 1, p. 107–111, 1997. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9024815>.

LERUEZ-VILLE, M. *et al.* Detection of hepatitis C virus in the semen of infected men. **Lancet**, v. 356, n. 9223, p. 42–43, 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10892766>.

LINDENBACH, B. D. Virion assembly and release. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 369, p. 199–218, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23463202>. Acesso em: 26 ago. 2019.

LISBOA NETO, G. *et al.* Characterization of clinical predictors of naturally occurring NS3/NS4A protease polymorphism in genotype 1 hepatitis C virus mono and HIV co-infected patients. **Journal of Medical Virology**, v. 89, n. 12, p. 2249–2254, 2017. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/jmv.24900>. Acesso em: 29 abr. 2019.

MAJID, A. *et al.* Molecular epidemiology of hepatitis C virus infection amongst intravenous drug users in rural communities. **Journal Medical Virology**, v. 46, n. 1,

p. 48–51, 1995. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7542693>.

MALTA, F. *et al.* Prevalence of naturally occurring NS5A resistance-associated substitutions in patients infected with hepatitis C virus subtype 1a, 1b, and 3a, co-infected or not with HIV in Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5683373/>. Acesso em: 24 abr. 2019.

MARTELL, M. *et al.* Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. **Journal Virology**, v. 66, n. 5, p. 3225–3229, 1992. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1313927>.

MARTINS, T.; NARCISO-SCHIAVON, J. L.; SCHIAVON, L. de L. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 1, p. 107–112, 2011. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0104423011703013>. Acesso em: 26 jun. 2019.

MOREIRA, R. C. *et al.* Prevalence of naturally occurring amino acid substitutions associated with resistance to hepatitis C virus NS3/NS4A protease inhibitors in São Paulo state. **Archives of Virology**, v. 163, n. 10, p. 2757–2764, 2018. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00705-018-3920-9>. Acesso em: 24 abr. 2019.

MURPHY, D. G. *et al.* Hepatitis C Virus Genotype 7, a New Genotype Originating from Central Africa. 2015. Disponível em: <http://hcv.lanl.gov>. Acesso em: 3 jun. 2019.

NISHIOKA, S. . A. *et al.* Tattooing and risk for transfusion-transmitted diseases: the role of the type, number and design of the tattoos, and the conditions in which they were performed. **Epidemiology Infection**, v. 128, n. 1, p. 63–71, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11895092>.

PACHECO, S. R. **Prevalência de infecção pelo vírus da hepatite c (VHC) em afetados pela anemia falciforme (HbSS) e interação entre a hepatite viral e a gravidade da doença de base.** 2010. 72 f. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador., 2010.

PAN, Q. *et al.* Telaprevir/boceprevir era: from bench to bed and back. **World journal of gastroenterology**, v. 18, n. 43, p. 6183–6188, 2012a. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23180937>. Acesso em: 26 jun. 2019.

PAN, Q. *et al.* Telaprevir/boceprevir era: From bench to bed and back INVITED COMMENTARY ON HOT ARTICLES. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 43, p. 6183–6188, 2012b. Disponível em:

<http://www.wjgnet.com/esps/wjg@wjgnet.comdoi:10.3748/wjg.v18.i43.6183><http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v18/i43/6183.htm>DOI:<http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v18.i43.6183>. Acesso em: 3 jun. 2019.

PASCU, M. PAN, Q. *et al.* Sustained virological response in hepatitis C virus type 1b infected patients is predicted by the number of mutations within the NS5A-ISDR: a meta-analysis focused on geographical differences. **Gut**, v. 53, n. 9, p. 1345–51, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15306598>. Acesso em: 26 ago. 2019.

PEREIRA, F. M. PAN, Q. *et al.* Evidence of New Endemic Clusters of Human T-Cell Leukemia Virus (HTLV) Infection in Bahia, Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1002, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.01002/full>. Acesso em: 26 jun. 2019.

PERES-DA-SILVA, A. **Mutações nos genes não estruturais do vírus da Hepatite C associadas à resistência aos novos antivirais**. 2014.

PERES-DA-SILVA, A.; DE ALMEIDA, A. J.; LAMPE, E. Mutations in hepatitis C virus NS3 protease domain associated with resistance to specific protease inhibitors in antiviral therapy naïve patients. **Archives of Virology**, v. 155, n. 5, p. 807–811, 2010. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00705-010-0642-z>. Acesso em: 28 set. 2018.

PIO, S. F.; OLIVEIRA, G. C. de; REZENDE, S. M. As bases moleculares da hemofilia A. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55, n. 2, p. 213–219, 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302009000200029&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 26 jun. 2019.

PRADAT, P.; TRÉPO, C. HCV: epidemiology, modes of transmission and prevention of spread. **Bailliere's Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology**, v. 14, n. 2, p. 201–10, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10890316>. Acesso em: 3 jun. 2019.

ROBERTSON, B. PAN, Q. *et al.* Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. **Archives of Virology**, v. 143, n. 12, p. 2493–2503, 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9930205>.

RONG, L. PAN, Q. *et al.* Rapid emergence of protease inhibitor resistance in hepatitis C virus. **Science Transl Medicine**, v. 2, n. 30, p. 30ra32, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20445200>.

SANTANA, N. P. DE. **Significado da anti-vhc em doares de sangue na cidade do Salvador, Bahia**. 1995. 74 f. Universidade Federal da Bahia, 1995.

SARRAZIN, C. PAN, Q. *et al.* Dynamic hepatitis C virus genotypic and phenotypic changes in patients treated with the protease inhibitor telaprevir. **Gastroenterology**, v. 132, n. 5, p. 1767–1777, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17484874>.

SCHMIDT, W.; KAYALI, Z. Finally sofosbuvir: an oral anti-HCV drug with wide performance capability. **Pharmacogenomics and Personalized Medicine**, v. 7, p. 387, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25540594>. Acesso em: 23 ago. 2019.

SILVA, L. K. *et al.* Prevalence of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV genotypes of hemodialysis patients in Salvador, Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 5, p. 595–602, 2006.

SILVA, L. K. *et al.* Prevalence of hepatitis C virus infection and HCV genotypes among hemophiliacs in the State of Bahia, Northeastern Brazil: analysis of serological and virological parameters. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 6, p. 496–502, 2005.

SILVA, M. B. S. SILVA, L. K. *et al.* Prevalence and genotypes of hepatitis C virus among injecting drug users from Salvador-BA, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 3, p. 299–303, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762010000300009&lng=en&tIng=en. Acesso em: 26 jun. 2019.

SIMMONDS, P. SILVA, L. K. *et al.* Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, v. 42, n. 4, p. 962–973, 2005. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.20819>. Acesso em: 27 maio 2019.

SIONE SOUZA SANTOS PASSINI. **Prevalência de infecção pelo vírus da Hepatite C (VHC) em gestantes e transmissão materno-infantil**. 2012. 89 f. Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2012.

SORBO, M. C. *et al.* Hepatitis C virus drug resistance associated substitutions and their clinical relevance: Update 2018. **Drug Resistance Updates**, v. 37, p. 17–39, 1 mar. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1368764618300128?via%3Dihub>. Acesso em: 4 jan. 2019.

STRAUSS, E. Hepatite C. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 1, p. 69–82, fev. 2001. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822001000100011&lng=pt&tlng=pt. Acesso em: 17 jun. 2019.

SULOTTO, F. *et al.* Degree of hepatitis C infection risk in the health care setting. **Med Lav**, v. 93, n. 1, p. 34–42, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11987500>.

SUMMERS, B. B.; BEAVERS, J. W.; KLIBANOV, O. M. Sofosbuvir, a novel nucleotide analogue inhibitor used for the treatment of hepatitis C virus. **Journal Pharmacy Pharmacology**, v. 66, n. 12, p. 1653–1666, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25175944>.

SUSSER, S SILVA, L. K. *et al.* Ultratiefe Pyrosequenz-Analyse (UDPS) von neu beschriebenen seltenen Resistenzvarianten der Hepatitis C Virus NS3 Protease bei Patienten, die mit Telaprevir oder Boceprevir behandelt wurden. **Zeitschrift für Gastroenterologie**, v. 50, 2012. Disponível em: <https://www.thieme-connect.de/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0032-1323987>.

TENGAN, F. M. SILVA, L. K. *et al.* Sexual transmission of hepatitis C virus. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 3, p. 133–137, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11452320>.

TERRAULT, N. A. Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. **Hepatology**, v. 36, n. 5 Suppl 1, p. S99-105, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12407582>.

THALER, M. M. *et al.* Vertical transmission of hepatitis C virus. **Lancet**, v. 338, n. 8758, p. 17–18, 1991. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1676085>.

TURON-LAGOT, V. *et al.* Virus de l'hépatite D : cycle viral et nouvelles stratégies thérapeutiques. **Virologie**, v. 23, n. 3, p. 149–159, 1 maio 2019. Disponível em: https://www.jle.com/fr/revues/vir/e-docs/virus_de_lhepatite_d_cycle_viral_et_nouvelles_strategies_therapeutiques_314738/article.phtml. Acesso em: 26 jun. 2019.

VAN DER POEL, C. L. Hepatitis C virus infection from blood and blood products. **FEMS Microbiology Review**, v. 14, n. 3, p. 241–246, 1994. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7522022>.

WAHEED, Y. SILVA, L. K. *et al.* Hepatitis C virus in Pakistan: A systematic review of prevalence, genotypes and risk factors. **wjg@wjgnet.com World Journal of**

Gastroenterology, v. 15, n. 45, p. 5647–5653, 2009. Disponível em: www.wjgnet.comurl:<http://www.wjgnet.com/1007-9327/15/5647.asp>DOI:<http://dx.doi.org/10.3748/wjg.15.5647>. Acesso em: 3 jun. 2019.

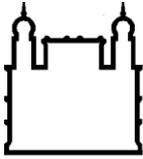
WFH. **What is hemofilia?**

WILBY, B.S.P. SILVA, L. K. *et al.* Review of boceprevir and telaprevir for the treatment of chronic hepatitis C. **Canadian Journal Gastroenterology**, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3354889/pdf/cjg26205.pdf>. Acesso em: 3 jun. 2019.

WONG-STAAAL, F.; SYDER, A. J.; MCKELVY, J. F. Targeting HCV entry for development of therapeutics. **Viruses**, v. 2, n. 8, p. 1718–1733, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21994703>. Acesso em: 26 ago. 2019.

WREGHITT, T. G. SILVA, L. K. *et al.* Transmission of hepatitis C virus by organ transplantation in the United Kingdom. **J Hepatol**, v. 20, n. 6, p. 768–772, 1994. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7523483>.

Apêndice I - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para adulto



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

Título do Projeto: Avaliação das mutações de resistência ao tratamento com os novos antivirais de ação direta (DAA) em pacientes com hepatite C crônica.

Coordenador: Dr Luciano Kalabric Silva

Você está sendo convidado a participar do estudo intitulado, “AVALIAÇÃO DAS MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO COM OS NOVOS ANTIVIRAIS DE AÇÃO DIRETA (DAA) EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA”. O objetivo deste estudo é estabelecer a metodologia para rastrear e monitorar as mutações de resistência ao tratamento com os novos DAAs em pacientes com hepatite C crônica, atendidos pelo HEMOBA e HUPES-UFBA.

Para participar você deve (1) assinar duas vias deste termo de consentimento (uma via ficará com você e a outra com o pesquisador); (2) autorizar a revisão do seu prontuário para obtermos informações sobre o histórico clínico e os resultados dos seus exames sorológicos anuais sobre a infecção pelo HIV, Hepatite B, Hepatite C, Sífilis, Doença de Chagas e HTLVI/II; (3) responder a um questionário com perguntas sociodemográficas; e (4) permitir a coleta de dois tubos de 10 mL de sangue (equivalente a 4 colheres de chá) para pesquisa do VHC.

Esta é uma pesquisa de risco mínimo. Entretanto, a coleta de sangue pode ocasionar pequena mancha roxa, reação ou dor local. A fim de proteger os participantes do estudo, as coletas serão realizadas por profissionais bem treinados da unidade de saúde. Com essa pesquisa pretendemos (1) saber se você têm ou não variantes resistentes que possam ocasionar falha terapêutica aos novos DAAs; (2) conhecer a existência de mutantes do VHC associados à resistência. Os resultados tem como finalidade a pesquisa científica e não serão utilizados para fins de diagnóstico. Caso você queira, uma cópia poderá ser solicitada por você a qualquer tempo.

É importante destacar que seu nome e identificação serão mantidos em sigilo. Além disso, você é livre para recusar em participar do estudo ou dele retirar seu consentimento a qualquer momento sem qualquer transtorno ou interrupção de seu atendimento médico. Você não será responsável por nenhuma despesa, incluindo os exames laboratoriais realizados neste estudo. Você não receberá compensação financeira para participar do estudo. Caso você sofra algum tipo de dano resultante de sua participação na pesquisa, nós lhe prestaremos assistência imediata. Você tem direito a requerer indenização caso sofra qualquer tipo de dano decorrente de sua participação na pesquisa, nos termos da lei. Em caso de dúvidas, você poderá esclarecê-las entrando em contato com o pesquisador, Dr. Luciano Kalabric, através dos contatos descritos ao final deste termo. Caso precise de outros esclarecimentos poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CEP-CPqGM), que aprovou o estudo. Os contatos do CEP também estão ao final deste termo.

Eu, _____, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu atendimento médico. Sei que meu nome não será divulgado e que não terei despesas. Eu recebi uma cópia do termo de esclarecimento. Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

- () concordo em participar deste projeto de pesquisa, pois fui informado, de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos riscos, desconfortos e benefícios todos acima descritos;
- () autorizo, também, que o material biológico e os dados coletados através da entrevista e revisão de meus registros médicos (prontuário) sejam armazenados para pesquisas futuras, e;
- () autorizo o descarte das amostras após a conclusão da pesquisa.

Salvador-BA, _____/_____/_____



Impressão digital do voluntário, pais ou responsáveis legais (caso necessário)

Nome do participante _____

Assinatura do participante _____

Assinatura do pesquisador _____

Assinatura de testemunhas: _____

Contatos:

Pesquisador:

Dr. Luciano Kalabric Silva

Tel.: 71-3176-2354

E-mail: kalabric@bahia.fiocruz.br

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA

R. Waldemar Falcão, 121, Candeal de Brotas

Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-CPqGM):

Dra. Theolis Bessa (Coordenadora)

Tel.: 71-3176-2285

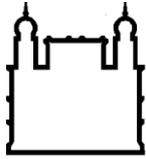
E-mail: cep@bahia.fiocruz.br

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA

R. Waldemar Falcão, 121, Candeal de Brotas

Horário de funcionamento: Segunda a sexta das 13h às 17h

Apêndice II - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para os responsáveis dos menores



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

Título do Projeto: Avaliação das mutações de resistência ao tratamento com os novos antivirais de ação direta (DAA) em pacientes com hepatite C crônica.

Coordenador: Dr Luciano Kalabric Silva

Seu(a) filho(a) está sendo convidado(a) a participar do estudo intitulado, “AVALIAÇÃO DAS MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO COM OS NOVOS ANTIVIRAIS DE AÇÃO DIRETA (DAA) EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA”. O objetivo deste estudo é estabelecer a metodologia para rastrear e monitorar as mutações de resistência ao tratamento com os novos DAAs em pacientes com hepatite C crônica, atendidos pelo HEMOBA e HUPES-UFBA.

Para que o menor participe do estudo, o senhor(a) deve (1) assinar duas vias deste termo de consentimento (uma *vía* fica com você e a outra com o pesquisador; (2) autorizar a revisão de prontuário do menor para obtermos informações sobre o histórico clínico e os resultados dos seus exames sorológicos anuais sobre a infecção pelo HIV, Hepatite B, Hepatite C, Sífilis, Doença de Chagas e HTLV/II; (3) responder junto ao menor um questionário com perguntas sociodemográficas; e (4) permitir a coleta de dois tubos de 10 mL de sangue (equivalente a 4 colheres de chá) do menor para pesquisa do VHC.

Esta é uma pesquisa de risco mínimo. Entretanto, a coleta de sangue pode ocasionar pequena mancha roxa, reação ou dor local. A fim de proteger os participantes do estudo, as coletas serão realizadas por profissionais bem treinados da unidade de saúde. Com essa pesquisa pretendemos: (1) saber se ele(a) têm ou não variantes resistentes que possam ocasionar falha terapêutica aos novos DAAs; (2) conhecer a existência de mutantes do VHC associados à resistência. Os resultados tem como finalidade a pesquisa científica e não serão utilizados para fins de diagnóstico. Caso você queira, uma cópia poderá ser solicitada por você a qualquer tempo.

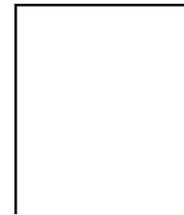
É importante destacar que o nome e identificação do menor serão mantidos em sigilo. Além disso, você é livre para recusar a participação do menor no estudo ou dele retirar seu consentimento a qualquer momento sem qualquer transtorno ou interrupção do atendimento médico ao menor. Vocês não serão responsáveis por nenhuma despesa, incluindo os exames laboratoriais realizados neste estudo. Vocês não receberão compensação financeira para participar do estudo. Caso você sofra algum tipo de dano resultante de sua participação na pesquisa, nós lhe prestaremos assistência imediata. Você tem direito a requerer indenização caso sofra qualquer tipo de dano decorrente de sua participação na pesquisa, nos termos da lei. Em caso de dúvidas, você poderá esclarecê-las entrando em contato com o pesquisador, Dr. Luciano Kalabric, através dos contatos descritos ao final deste termo. Caso precise de outros esclarecimentos poderá também entrar em contato com

o Comitê de Ética do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CEP-CPqGM), que aprovou o estudo. Os contatos do CEP também estão ao final deste termo.

Eu, _____, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo. Eu entendi que sou livre para interromper participação do menor a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará o atendimento médico dele(a). Sei que o nome do menor não será divulgado e que não terei despesas. Eu recebi uma cópia do termo de esclarecimento. Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

- () concordo que o menor participe deste projeto de pesquisa, pois fui informado, de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos riscos, desconfortos e benefícios todos acima descritos;
- () autorizo, também, que o material biológico e os dados coletados através da entrevista e revisão dos registros médicos (prontuário) do menor sejam armazenados para pesquisas futuras, e;
- () autorizo o descarte das amostras do menor após a conclusão da pesquisa.

Salvador-BA, _____/_____/_____



Impressão digital do voluntário, pais ou responsáveis legais (caso necessário)

Nome do menor: _____

Nome do pai ou responsável legal: _____

Assinatura de um dos pais ou responsáveis legais: _____

Assinatura do pesquisador _____

Assinatura de testemunhas: _____

Contatos:

Pesquisador:

Dr. Luciano Kalabric Silva

Tel.: 71-3176-2354

E-mail: kalabric@bahia.fiocruz.br

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA

R. Waldemar Falcão, 121, Candeal de Brotas

Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-CPqGM):

Dra. Theolis Bessa (Coordenadora)

Tel.: 71-3176-2285

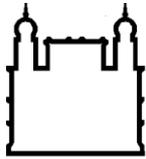
E-mail: cep@bahia.fiocruz.br

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA

R. Waldemar Falcão, 121, Candeal de Brotas

Horário de funcionamento: Segunda a sexta das 13h às 17h

Apêndice III - Termo de assentimento para menores de 18 anos de idade (TA)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

Título do Projeto: Avaliação das mutações de resistência ao tratamento com os novos antivirais de ação direta (DAA) em pacientes com hepatite C crônica.

Coordenador: Dr Luciano Kalabric Silva

Você está sendo convidado a participar do estudo intitulado, “AVALIAÇÃO DAS MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO COM OS NOVOS ANTIVIRAIS DE AÇÃO DIRETA (DAA) EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA”. O objetivo deste estudo é identificar mutações no vírus da C da hepatite (VHC) que possam torna-lo resistente aos novos antivirais utilizado no seu tratamento.

Para participar deste estudo, o responsável por você deverá autorizar sua participação na pesquisa e assinatura de um termo de consentimento. Neste termo, é informado que iremos revisar seus dados médicos para obtermos informações sobre o histórico clínico e os resultados dos seus exames sorológicos anuais sobre a infecção pelo HIV, Hepatite B, Hepatite C, Sífilis, Doença de Chagas e HTLVI/II; você necessitará responder a um questionário com perguntas sociodemográficas; e também permitir a coleta de duas amostras de 10 mL de sangue (equivalente a 4 colheres de chá) para pesquisa do VHC.

Você ou seu responsável não terão qualquer custo, nem receberão qualquer vantagem financeira. Você pode solicitar esclarecimentos sobre qualquer aspecto da pesquisa. Você está livre para participar ou dele recusar-se a qualquer tempo bastando solicitar a retirada de seu assentimento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação do seu atendimento médico. O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Você não será identificado em nenhuma publicação. Em caso de dúvidas, você poderá esclarecê-las entrando em contato com o pesquisador, Dr. Luciano Kalabric, através dos contatos descritos no final deste termo.

Esta é uma pesquisa de risco mínimo. Entretanto, a coleta de sangue pode ocasionar pequeno desconforto, mancha roxa, reação ou dor local. A fim de proteger os participantes do estudo, as coletas serão realizadas por profissionais bem treinados da unidade de saúde. Com essa pesquisa pretendemos (1) saber se você têm ou não variantes resistentes que possam ocasionar falha terapêutica aos novos DAAs; (2) conhecer a existência de mutantes do VHC associados à resistência. Os resultados tem como finalidade a pesquisa científica e não serão utilizados para fins de diagnóstico. Caso você queira, uma cópia poderá ser solicitada por você a qualquer tempo. Caso precise de outros esclarecimentos poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CEP-CPqGM), que aprovou o estudo. Os contatos do CEP também estão ao final deste termo.

Eu, _____, portador(a) do documento de Identidade _____, fui informado(a) dos objetivos do

presente estudo de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações, e o meu responsável poderá modificar a decisão de participar se assim o desejar. Tendo o consentimento do meu responsável já assinado, declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo assentimento e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

SALVADOR-BA, ____/____/____

Assinatura do(a) menor

Assinatura do pesquisador

Contatos:

Pesquisador:

Dr. Luciano Kalabric Silva
Tel.: 71-3176-2354
E-mail: kalabric@bahia.fiocruz.br
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA
R. Waldemar Falcão, 121, Candeal de Brotas

Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-CPqGM):

Dra. Theolis Bessa (Coordenadora)
Tel.: 71-3176-2285
E-mail: cep@bahia.fiocruz.br
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA
R. Waldemar Falcão, 121, Candeal de Brotas
Horário de funcionamento: Segunda a sexta das
13h às 17h

Apêndice IV - Questionário clínico-epidemiológico e revisão do prontuário

Identificação (RESHCV-id)

REGISTRO:

Número de identificação _____

REGISTRO

Unidade de atendimento

- HEMOBA
 HUPES-UFBA

N. prontuário: _____

Data da entrevista _____

IDENTIFICAÇÃO:

Nome completo _____

Iniciais _____

Endereço _____
((rua, número e complemento))Bairro _____
((-1=NSI/NSA))

Cidade _____

Estado _____

CEP _____
(xxxxx-xxx (-1=NSI/NSA))Telefone residencial _____
((xx) xxxx-xxxx)Telefone celular _____
((xx) xxxx-xxxx)Telefone trabalho _____
((xx) xxxx-xxxx)

N. Cartão do SUS _____

Observação _____

Epidemiológico (RESHCV-ep)

REGISTRO:

Número de identificação _____

Respondeu questionário epidemiológico?

1 - Sim

2 - Não

Data da entrevista _____

DADOS DEMOGRÁFICOS:

Cor

Branco

Pardo

Negro

Amarelo/Indígena

Ignorado

Data de Nascimento _____

Idade _____

(anos / 01, se menor que 12 meses (-1=NSI/NSA))

Sexo

feminino

masculino

Naturalidade

Salvador-BA

Outra localidade

Qual? _____

((-1=NSI/NSA))

Cidade de residência?

Salvador - Bahia

Outro município

Qual? _____

((-1=NSI/NSA))

Estado civil

Solteiro

Casado/união estável

Separado

Divorciado

Viúvo

NSI/A

Ocupação _____

((-1=NSI/NSA))

Risco ocupacional

Sim

Não

NSI/A

CRITÉRIOS BRASIL DE CLASSIFICAÇÃO SOCIAL:

Qual a escolaridade do chefe da família:

- Analfabeto/ Fundamental / II Incompleto
- Fundamental I Completo/ Fundamental II Incompleto
- Fundamental II Completo/ Médio Incompleto
- Médio Completo/ Superior Incompleto
- Superior Completo

VARIÁVEIS NO DOMICÍLIO

Banheiro

- 0
- 1
- 2
- 3
- 4 ou +

Empregados domésticos

- 0
- 1
- 2
- 3
- 4 ou +

Automóveis

- 0
- 1
- 2
- 3
- 4 ou +

Microcomputador

- 0
- 1
- 2
- 3
- 4 ou +

Lava louça

- 0
- 1
- 2 ou +

Geladeira

- 0
- 1
- 2
- 3 ou +

Freezer

- 0
- 1
- 2
- 3 ou +

Lava Roupa

- 0
- 1
- 2
- 3 ou +

DVD

- 0
- 1
- 2
- 3
- 4 ou +

- Micro-ondas 0
 1
 2 ou +
- Motocicleta 0
 1
 2 ou +
- Secadora roupa 0
 1 ou +

ACESSO SERVIÇOS PÚBLICOS

- Água Encanada Sim
 Não
- Rua Pavimentada Sim
 Não

CLASSIFICAÇÃO DOS DOMICÍLIOS

- Pontos _____
(Fonte: <http://www.abep.org/criterio-brasil>)
- Classe social _____
(Fonte: <http://www.abep.org/criterio-brasil>)

DADOS EPIDEMIOLÓGICOS:

- Sabe informar sobre o diagnóstico da hepatite C? Sim
 Não
 NSI/A
- Quando foi diagnosticado? _____
- Motivo do diagnóstico? Ambulatório
 Check Up/ Exame de rotina
 Aparecimento de sintomas
 Exame pré-natal
 NSI/A
- Se sabe, qual o genótipo do vírus? _____
- Histórico de hepatite C na família Sim
 Não
 NSI/A
- Quem: Cônjuge
 Mãe
 Pai
 Irmãos
 Filhos
 Outros
 NSI/A

OUTRAS INFEÇÕES

Tem/Teve HTLV: Pos
 Neg
 NSI/A

Tem/Teve Vírus delta da hepatite (VHD) Pos
 Neg
 NSI/A

Tem/Teve Hepatite B (VHB): Pos
 Neg
 NSI/A

Tem/Teve HIV: Pos
 Neg
 NSI/A

Se HIV ou HBV, fez/faz uso de ARV para profilaxia: Sim
 Não
 NSI/A

Data do início do uso de ARV para profilaxia: _____

HISTÓRICO DE TRATAMENTO ANTIVIRAL:

Fez/Faz uso de antivirais para a Hepatite C: Sim
 Não
 NSI/A

Esquema 1: Que medicamentos utilizou? IFN
 PEG-IFN
 RBV
 BOC
 TVR
 SMV
 SOF
 DCV

Outras drogas: _____

Início: _____

Tempo de tratamento (meses): _____

Adesão ao Medicamento: Sim
 Não
 NSI/A

Se negativo, motivo: _____

Resposta Viroológica Sustentada (RVS): _____

Esquema 2: Que medicamentos utilizou?

- IFN
- PEG-IFN
- RBV
- BOC
- TVR
- SMV
- SOF
- DCV

Outras drogas: _____

Início: _____

Tempo de tratamento (meses): _____

Adesão ao Medicamento:

- Sim
- Não
- NSI/A

Se negativo, motivo: _____

Resposta Viroológica Sustentada (RVS): _____

Esquema 3: Que medicamentos utilizou?

- IFN
- PEG-IFN
- RBV
- BOC
- TVR
- SMV
- SOF
- DCV

Outras drogas: _____

Início: _____

Tempo de tratamento (meses): _____

Adesão ao Medicamento:

- Sim
- Não
- NSI/A

Se negativo, motivo: _____

Resposta Viroológica Sustentada (RVS): _____

N°. de esquemas terapêuticos (total): _____

((-1=NSI/NSA))

Revisão de prontuário (RESHCV-rp)

REGISTRO:

Número de identificação _____

Realizou revisão de prontuário?

 1 - Sim 2 - Não

Data da revisão _____

Data de admissão _____

Tempo de acompanhamento _____

(anos da entrevista/revisão dos protuários)

SOROLOGIA (DADOS MAIS RECENTES)

AgHBs

 Positivo Negativo NSI/A

Anti-HBc

 Pos Neg NSI/A

anti-HCV

 Pos Neg NSI/A

HCV-RNA

 Pos Neg NSI/A

Genótipo e subtipo HCV-RNA

((NT=ñ tipável e NR=ñ realizado))

Carga Viral (UI/mL)

Carga Viral (log)

BIOQUÍMICA (DADOS MAIS RECENTES)

ALT (UI/dL)

(Valor de referencia: 41 UI/dL (-1=NSI/NSA))

Nível de ALT

 Normal Elevado NSI/A

(Valor de referencia: 41 UI/dL)

AST (UI/dL)

(Valor de referencia: 37 UI/dL (-1=NSI/NSA))

Nível de AST

- Normal
 Elevado
 NSI/A
(Valor de referencia: 37 UI/dL)

EXAMES HISTOPATOLÓGICOS

Biópsia hepática

- 1 - Sim
 2 - Não

Data de realização da biópsia

Escala Metavir (fibrose hepática)

- F0
 F1
 F2
 F3
 F4
 NSI/A

Atividade Necroinflamatória

- A0
 A1
 A2
 A3
 A4
 NSI/A

Elastografia

- F3 ou F4
 Demais estágios (F0-F2)
 NSI/A

Data de realização da elastografia

FORMAS GRAVES

Cirrose

- Sim
 Não
 NSI/A

Classificação de Child-Pugh

- A
 B
 C
 NSI/A

Esteatose

- Sim
 Não
 NSI/A

HISTÓRICO DE TRATAMENTO ANTIVIRAL:

Histórico de tratamento

- Sim
 Não
 NSI/A

Situação atual do tratamento

- Em curso
 Prévio

Esquema 1

- IFN
- PEG-IFN
- RBV
- BOC
- TVR
- SMV
- SOF
- DCV

Dose do tratamento

(Medicamento 1 (mg/dia))

Data de início Esquema 1

Término do tratamento?

- Yes
- No

Data encerramento/mudança esquema 1

Duração do esquema 1

Se encerrou/mudou o Esquema 1, motivo?

- Falha terapeutica primária
- Falha terapeutica secundária
- Falha bioquímica
- Falha genotípica
- Intolerância aos medicamentos
- Indisponibilidade dos medicamentos
- Resposta virológica sustentada
- NSI/A

Esquema 2

- IFN
- PEG-IFN
- RBV
- BOC
- TVR
- SMV
- SOF
- DCV

Dose do tratamento

(Medicamento 1 (mg/dia))

Data de início Esquema 2

Término do tratamento?

- Yes
- No

Data encerramento/mudança esquema 2

Se encerrou/mudou o Esquema 2, motivo?

- Falha terapeutica primária
- Falha terapeutica secundária
- Falha bioquímica
- Falha genotípica
- Intolerância aos medicamentos
- Indisponibilidade dos medicamentos
- Resposta virológica sustentada
- NSI/A

Esquema 3

- IFN
- PEG-IFN
- RBV
- BOC
- TVR
- SMV
- SOF
- DCV

Dose do tratamento

 (Medicamento 1 (mg/dia))

Data de início Esquema 3

Término do tratamento?

- Yes
- No

Data encerramento/mudança esquema 3

Se encerrou/mudou o Esquema 3, motivo?

- Falha terapeutica primária
- Falha terapeutica secundária
- Falha bioquímica
- Falha genotípica
- Intolerância aos medicamentos
- Indisponibilidade dos medicamentos
- Resposta virológica sustentada
- NSI/A

Esquema 4

- IFN
- PEG-IFN
- RBV
- BOC
- TVR
- SMV
- SOF
- DCV

Dose do tratamento

 (Medicamento 1 (mg/dia))

Data de início Esquema 4

Término do tratamento?

- Yes
- No

Data encerramento/mudança esquema 4

Se encerrou/mudou o Esquema 4, motivo?

- Falha terapeutica primária
- Falha terapeutica secundária
- Falha bioquímica
- Falha genotípica
- Intolerância aos medicamentos
- Indisponibilidade dos medicamentos
- Resposta virológica sustentada
- NSI/A

Esquema 5

- IFN
- PEG-IFN
- RBV
- BOC
- TVR
- SMV
- SOF
- DCV

Dose do tratamento

 (Medicamento 1 (mg/dia))

Data de início Esquema 5

Término do tratamento?

- Yes
- No

Data encerramento/mudança esquema 5

Se encerrou/mudou o Esquema 5, motivo?

- Falha terapeutica primária
- Falha terapeutica secundária
- Falha bioquímica
- Falha genotípica
- Intolerância aos medicamentos
- Indisponibilidade dos medicamentos
- Resposta virológica sustentada
- NSI/A

Esquema 6

- IFN
- PEG-IFN
- RBV
- BOC
- TVR
- SMV
- SOF
- DCV

Dose do tratamento

 (Medicamento 1 (mg/dia))

Data de início Esquema 6

Término do tratamento?

- Yes
- No

Data encerramento/mudança esquema 6

Se encerrou/mudou o Esquema 6, motivo?

- Falha terapeutica primária
- Falha terapeutica secundária
- Falha bioquímica
- Falha genotípica
- Intolerância aos medicamentos
- Indisponibilidade dos medicamentos
- Resposta virológica sustentada
- NSI/A

Número de esquemas terapêuticos (total)

Observação:

Apêndice V – Regulamento de Biorrepositório

Modelo de Regulamento para Biorrepositórios

(Segundo Portaria MS 2.201/2011, *biorrepositório* é uma coleção de material biológico humano, coletado e armazenado ao longo da execução de um projeto de pesquisa específico, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade institucional e sob gerenciamento do pesquisador, sem fins comerciais.)

Dados Gerais

Projeto: AVALIAÇÃO DAS MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO COM OS NOVOS ANTIVIRAIS DE AÇÃO DIRETA (DAA) EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA
Vigência: Dois anos a partir da data de aprovação no CEP
Instituição responsável/depositária: FIOCRUZ-BA
Pesquisador gestor: Luciano Kalabric Silva
Instituição proponente: FIOCRUZ-BA
Instituição co-participante* () Não (X) Sim Qual(is)? Ambulatório Magalhães Neto do Complexo Hospitalar Professor Edgard Santos (HUPES-UFBA), Fundação Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA) e Laboratório Central de Saúde Pública Profº Gonçalo Moniz (LACEN-BA).
Participação estrangeira (X) Não () Sim Qual(is)?

Do armazenamento de amostras biológicas humanas

AMOSTRA No. 1
Tipo: Soro/Plasma
Número previsto: 300
Forma de acondicionamento/ armazenamento: A amostra de sangue coletada pelo serviço será centrifugada para serapação do soro/plasma e alíquotada em dois tubos de criopreservação (1,5 mL). Estes serão congelados em freezer -20°C e transportados em gelo seco semanalmente à FIOCRUZ-BA. Uma vez na FIOCRUZ-BA, as alíquotas serão armazenadas em freezer -70°C até o uso. Cada alíquota não será descongelada mais de duas vezes.
Período do armazenamento: até o final do estudo.

Informações associadas às amostras

As amostras apresentam cadastro? () Não (X) Sim - Anexar formulário padrão a este documento
--

Em caso afirmativo, há dissociação completa dos dados do paciente?

Sim Não

Têm acesso restrito?

Não

Sim. Como ocorre? Após a coleta e identificação da amostra, o material será encaminhado diretamente ao laboratório. Os dados pessoais dos participantes, bem como os resultados laboratoriais, serão lançados em um sistema de banco de dados protegido por senha e com acesso restrito. Os dados completos do participante somente serão acessíveis pelos membros da pesquisa.

Do Consentimento do paciente

Apresenta Termo de Consentimento assinado pelo paciente/sujeito da pesquisa para armazenamento e utilização das amostras?

Não

Sim

Existe autorização para uso em pesquisas futuras? Sim Não

Apresenta autorização para descarte do material? Sim Não

Sobre o descarte das amostras biológicas humanas

Ao final do projeto, qual será o destino das amostras biológicas humanas armazenadas?

Previsão de transferência a outro biorrepositório

Previsão de transferência para um biobanco

Descarte das amostras, respeitando a legislação vigente

Permanecer armazenado se em conformidade com as normas do CNS vigentes

Das responsabilidades (segurança, sigilo, conservação etc)

Do coordenador:

- Treinar a equipe de laboratório para manipular as amostras de forma segura;
- Gerenciar a utilização das amostras;
- Garantir a sigilo dos dados.

Da Instituição responsável/depositária:

Prover a infraestrutura ideal para armazenamento, conservação e descarte das amostras.

Formulário de cadastro de amostras

Confidencial

“Avaliação das mutações de resistência ao tratamento com os novos antivirais de ação direta (DAA) em pacientes com hepatite C crônica”.

REGISTRO:

Número de identificação _____

DADOS DA COLETA

Data da coleta _____

Local da coleta

FIOCRUZ () HUPES() LACEN () HEMOBA ()

Tipo de amostra soro/plasma

Armazenar em freezer -70°C

Número de alíquotas _____

(Mínimo recomendável: 2 (1 estoque + 1 de trabalho))

ALÍQUOTA DE TRABALHO

Local de armazenamento

(Freezer_Prateleira_Fila_Caixa (FxPxFxCxx))

Volume estimado (uL) _____

Data do último uso

(Manter atualizado)

Número de descongelamentos

(Manter atualizado)

Volume residual (uL)

(Manter atualizado)

ALIQUOTA ESTOQUE

Local de armazenamento

(Freezer_Prateleira_Fila_Caixa (FxPxFxCxx))

Volume estimado (uL)

(Manter atualizado)

Data do último uso

(Manter atualizado)

Número de descongelamentos

(Manter atualizado)

Volume residual

(Manter atualizado)

Anexo I – Carta de apoio da HEMOBA

Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia – HEMOBA

Salvador, 17 de Abril de 2017

CARTA DE ANUÊNCIA

A Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia, representada pelo Diretor Geral Dr. Marinho Marques da Silva Neto, está ciente dos termos do trabalho e concorda com a realização da pesquisa intitulada: **“Avaliação das mutações de resistência ao tratamento com os novos antivirais de ação direta (DAA) em pacientes com hepatite C crônica”**, desenvolvido por Liz Silva Rocha, aluna de mestrado do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, e pelo professor orientador e coordenador do projeto Dr. Luciano Kalabric, tecnologista em Saúde, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz –FIOCRUZ-BA.

**MARINHO MARQUES DA SILVA NETO**

Diretor Geral

Anexo II – Carta de apoio do LACEN-BA

O Laboratório Central de Saúde Pública do Estado da Bahia – LACEN, unidade integrante do Sistema Único de Saúde (SUS) e de referência estadual, vem por meio desta informar o interesse em participar do Projeto intitulado "**Avaliação das Mutações da Resistência ao Tratamento com os Novos Antivirais de Ação Direta (DAA) em Pacientes com Hepatite C Crônica**", desenvolvido pela Fundação Oswaldo Cruz, coordenado por Dr Luciano Kalabric Silva.

Na oportunidade, informamos que o LACEN/BA designará o técnico do setor de Biologia Molecular, cujo nome deverá constar nas publicações e que somente poderão iniciar as atividades após a aprovação do Projeto junto ao Comitê de Ética em Pesquisa.

Salvador, 30 de maio de 2017


Zuinara Pereira Gusmão Maia
Diretora LACEN/BA

Anexo III – Carta de apoio do HUPES-UFBA



Complexo
HUPES

EBSERH
HOSPITAIS UNIVERSITÁRIOS FEDERAIS

Salvador, 20 de setembro de 2017.

DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA

Declaramos que o protocolo de pesquisa intitulado "*Avaliação das mutações de resistência do HCV aos novos antivirais de ação direta (DAA)*", coordenado pelo (a) Prof.Dr. Luciano Kalabric Silva, da FIOCRUZ-Fundação Oswaldo Cruz/Bahia , está adequado às condições institucionais e que o Prof Dr. Raymundo Paraná Ferreira Filho é o pesquisador responsável pela execução do referido protocolo no Complexo HUPES, após aprovação do mesmo no CEP HUPES. A participação do referido profissional não deverá trazer prejuízo às suas atividades funcionais no hospital.

Atenciosamente,


Lilia Kátia Andrade Nunes
Gerente Administrativa
EBSERH/HUPES

Prof. Dr. Antônio Carlos Moreira Lemos
Superintendente do Complexo HUPES/UFBA