



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
LABORATÓRIO DE VIROLOGIA



VICTÓRIA RIQUENA GROSCHE

**MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA A INIBIDORES DE NS5B DE HEPACIVÍRUS
C EM PACIENTES CRONICAMENTE INFECTADOS**

UBERLÂNDIA – MG

2019

VICTÓRIA RIQUENA GROSCHE

**MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA A INIBIDORES DE NS5B DE HEPACIVÍRUS
C EM PACIENTES CRONICAMENTE INFECTADOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina na Universidade
Federal de Uberlândia.

Orientador(a): Profa. Dra Ana Carolina
Gomes Jardim

Co-Orientador: Prof. Dr. Diego Pandeló José

UBERLÂNDIA – MG

2019

**MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA A INIBIDORES DE NS5B DE HEPACIVÍRUS
C EM PACIENTES CRONICAMENTE INFECTADOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina na Universidade
Federal de Uberlândia.

Orientador(a): Profa. Dra Ana Carolina
Gomes Jardim

Co-Orientador: Prof. Dr. Diego Pandeló José

Uberlândia, 19 de julho de 2019.

Profa. Dra. Ana Carolina Gomes Jardim

Dra. Jamile de Oliveira Pascoal

Dra. Caroline Martins Mota

*Dedico este trabalho a minha avó Vilma Lopes Grosche,
que me incentivou desde pequena e insistentemente me falava:*

“Estuda menina!”

*Obrigada por todos os domingos à noite, antes das provas de segunda,
quando ao telefone me dizia para ficar firme e me esforçar que tudo
daria certo, que iria orar por mim... E veja, vó, tudo deu!*

Em suas palavras:

*“Eu fico mais feliz quando uma menina se forma, porque eu quis
estudar mas não pude. Os homens sempre tiveram essas oportunidades,
mas para nós, mulheres, isso nem sempre foi possível.*

Fama e dinheiro jamais se comparam ao que o estudo pode nos proporcionar:

Conhecimento.”

AGRADECIMENTOS

“Assim brilhe também a luz de vocês diante dos outros, para que vejam as boas obras que vocês fazem e glorifiquem o Pai de vocês, que está nos céus” Mateus 5:16

Agradeço, sempre em primeiro lugar, a Deus, pelo seu Amor que me alcançou e salvou, pela sua Graça, a qual eu não mereço, mas me sustenta todos os dias, e pela Fé, que não vem de mim, mas me faz lembrar que somente em Ti somos livres e novas pessoas. Agradeço por te servir, ser sua filha e amiga, Pai. Por ter paciência comigo, e me dado oportunidade de viver esta aventura incrível, obrigada Senhor!

Agradeço aos meus pais Walter e Márcia por todo cuidado e carinho, por não me deixar lutar sozinha, mas estar sempre presente e vencer comigo! Sou grata a Deus por ter me colocado na nossa família! Obrigada, mãe, por todas as orações, por todos os conselhos, pelas horas no telefone e por todos os abraços quentinhos. Obrigada, pai, por todo cuidado, pelas palavras sábias inspiradas por Deus e por sempre ouvir (e tentar fazer) minhas ideias malucas. Eu jamais chegaria aqui sem o suporte de vocês.

Agradeço à minha família por todo apoio! À minha avó Nena, por todo amor e cuidado, pelos beijinhos carinhosos e pela feijoada maravilhosa: um beijão na ponta do seu narizão! À minha avó Vilma, a quem dediquei este trabalho, por todo suporte e incentivo, e, claro, pelas lasanhas e pudim dos anjos! Ao meu avô João, pelo carinho e orgulho. Aos meus tios Marcos e Cristina, Mariza e Alersom, Marcelo, Vélma, Vagner e Sabrina. Aos meus primos Cássia, Isabella, Rebecca, Pedro, Lucas e João. Obrigada pelo amor, comunhão e suporte, por ouvirem pacientemente (algumas vezes não) as minhas explicações das brincadeiras do Natal todos os anos!

Agradeço à minha família em Valparaíso! Sim, família. A todos que acolheram aos meus pais e a mim, e cuidam de nós há mais de vinte anos. Aos nossos irmãos metodistas, da O Brasil para Cristo e todos os vizinhos: vocês são minha família.

Agradeço à pastora Sueli e Adalberto que me acolheram durante várias vezes quando eu prestava vestibular, obrigada pelas orações e cuidado, por terem me apoiado durante esse tempo. E também à Regina que sempre esteve conosco, obrigada por todo carinho.

Agradeço aos irmãos da igreja Sal da Terra Umuarama que me acolheram como filha, talvez eu nem consiga expressar o quanto sou grata pela vida de todos vocês, cada um é muito especial para mim. Aos meus pastores Junior e Lígia, eu amo muito a vida de vocês, Deus

cuidou de cada detalhe quando colocou a sua família na minha vida, ou melhor, a nossa família, porque felizmente já sou parte dela! À Mildes e o João, por terem me adotado, pelo cuidado nos mínimos detalhes, por todo caldo feito com o maior carinho: obrigada, eu amo vocês! Aos pastores José Divino e Marlene, por cuidarem de mim, e Silas e Geralda, pelo carinho.

Agradeço à minha irmã Karoll, que à este ponto já me conhece melhor do que eu mesma. Obrigada por todo amor e cuidado, por ter (quase sempre) paciência comigo e embarcar nas minhas loucuras. Obrigada pelo carinho da sua família, por todos os “mimos” e todas as comidas maravilhosas. Obrigada pelas tretas, por entender as minhas indiretas e por ter compartilhado momentos incríveis, e até sobrenaturais, já que você não é deste mundo! Sou grata a Deus por ter colocado sua amizade na minha vida, amo você!

Agradeço à Najúlia, por todo amor e carinho, pelas loucuras e maratonas de Friends, amiga, obrigada! Agradeço por fazer parte da minha história, por toda a paciência e amizade, eu te amo muito, I'll be there for you, 'cause you're there for me too!

Agradeço ao Grupinho Fechado, meu Deus como eu amo vocês! A todos, Karoll, Igor, Mandis, Patos, Sthefany, Natasha e Denise, meu MUITO OBRIGADA: você são incríveis! Eu desejo todo sucesso e amor do mundo para vocês, obrigada por todas as risadas e cuidado, pelo Spotify, Netflix e Telecine compartilhados (sim, isso precisa ser registrado aqui). Por todas as vezes que eu estava perdida, não sabia qual era a sala, era final de semestre, não aguentava mais os relatórios, pelas pessoas que tretaram com a gente (porque a gente mesmo não treta com ninguém), por todas as conquistas e trabalhos, vocês fizeram o curso valer a pena. Por todas as fotos no sofá, almoços porque era flango no RU, macarrões, estrogonofes e fricassês, eu sou grata. E sim, sempre vai ser o almoço na “casa da Denise”, mesmo quando não for mais “casa da Denise”, o Ap 101 tem muita historia, RIP luz verde!

Agradeço aos amigos e professores que trabalharam comigo. À Professora Benvinda Santos por ter me ajudado em tudo o que precisei. Ao Professor Roberto Bernardino Jr pelo carinho. Aos integrantes do Jornal da Biomedicina, projeto que é como um filho para mim. Aos professores Ana Paula Balbi e Alberto Moraes, de Fisiologia e Embriologia, obrigada pelas melhores aulas da minha vida, eu aprendi muito com vocês. E não posso deixar de agradecer àquele que faz este curso funcionar, que teve mais fé em mim do que eu mesma nessas últimas semanas, obrigada ao nosso secretário Filipe Alves por toda a paciência e eficiência!

Agradeço a todos do Team Nilo, do Laboratório de Virologia da UFU, minha vida científica seria um caos sem vocês! À Jacque que desde o meu primeiro PCR sempre me lembra da importância de respirar, obrigada por toda ajuda, conselhos e ensinamentos. À Debinha por todo amor, cuidado e amizade, obrigada por sempre estar ali por mim. Ao Dani e a Giu por toda ajuda, conselhos e, acima de tudo, por todas as risadas. À Mandis, aqui Xuxu, e Igor, que sorte a minha poder trabalhar com os meus melhores amigos, Grupinho Fechado sempre representando! Obrigada por todo companheirismo e cuidado! À Sussu, que mesmo estando longe eu tenho um grande apreço, obrigada por toda ajuda nos meus primeiros semestres. À Thelma por toda ajuda e ensinamentos. Agradeço ao professor Diego Pandeló por toda a paciência e ensinamentos, obrigada por ter aceitado me ajudar mesmo estando longe!

Agradeço imensamente à minha orientadora Carol Jardim! Obrigada por ter topado entrar nesta loucura comigo, apesar de todos os pesares, do prazo, das condições, obrigada por ter me ouvido e ter tido paciência comigo. Obrigada por todos os ensinamentos, não somente acadêmicos, mas para a vida! Eu agradeço por esta oportunidade e acredito que o nosso trabalho ainda dará muitos frutos.

Uma amiga uma vez me disse que toda vez que conhecemos alguém, essa pessoa sempre deixa uma pequena marca nas nossas vidas. Vocês deixaram muitas!

À todos que fizeram parte da minha história, obrigada.

THERE'S MORE
VIRUS
ON EARTH THAN
STARS
IN THE UNIVERSE

(CROHMER AND EDWARDS, 2002)



TEAM NILO - UFU

RESUMO

O hepacivírus C (HCV) é responsável pela infecção de mais de 150 milhões de indivíduos no mundo, sendo que 71 milhões desses evoluem para a forma crônica da infecção. Por não possuir atividade corretiva na sua RNA-polimerase dependente de RNA (*RdRp*) (NS5B), o HCV apresenta uma alta taxa de substituições de nucleotídeos no genoma durante a replicação, o que pode conferir ao vírus uma variabilidade de quasispécies e variantes resistentes aos tratamentos. A terapia anti-HCV era inicialmente realizada com interferon e ribavirina, o que trazia uma alta taxa de efeitos colaterais aos pacientes. A partir de 2015 foi aprovada no Brasil a administração dos Antivirais de Ação Direta (DAAs), que são direcionados a etapas específicas do ciclo replicativo. No entanto, devido à alta taxa de mutação, substituições de associadas à resistência (RAS) foram descritas nas variantes resistentes. O presente trabalho teve como objetivo analisar a variabilidade genética do domínio da palma da NS5B do HCV em indivíduos infectados cronicamente. Para isso, foram analisadas as variantes virais provenientes de amostras de soro de 53 pacientes cronicamente infectados com genótipos 1a, 1b ou 3a, residentes região noroeste paulista, submetidos ou não a protocolos terapêuticos baseados em interferon e ribavirina (INF+RBV) ou DAAs. As sequências que compreendiam a região do domínio da palma da NS5B dos vírus de cada amostra foram alinhadas, editadas e analisadas quanto à presença de RAS previamente descritas para esta região da NS5B. Adicionalmente, as sequências foram utilizadas para a reconstrução filogenética. Dentre os resultados, 67% dos pacientes que usaram INF+RBV previamente não responderam ao tratamento inicial e foram submetidos ao retratamento com DAAs, e desses 83,3% não responderam ao tratamento e 16,7% recidivaram. A análise das sequências demonstrou que as RAS C316N/Y e Q309R foram detectadas nas amostras de 3 pacientes do genótipo 1b, e a RAS C316Y foi identificada na amostra de um paciente HCV 1a, porém, estes pacientes responderam ao tratamento com DAAs. As análises filogenéticas demonstraram que os 3 pacientes HCV 1b que apresentaram as RAS foram agrupados em um mesmo ramo monofilético, demonstrando alta similaridade entre as variantes virais desses pacientes. Assim, conclui-se que o tratamento prévio com interferon e ribavirina pode ser um fator que colabora para a não resposta a um segundo protocolo terapêutico com DAAs. Além disso, a combinação das RAS C316N e Q309R não implica, necessariamente, em resistência ao tratamento com antivirais, porém o estudo das variantes virais circulantes na região é importante para a determinação da rota de transmissão.

Palavras-chave: Hepacivirus C; NS5B; DAAs; inibidores de NS5B; interferon; ribavirina; RAS; variantes resistentes.

ABSTRACT

Hepacivirus C (HCV) is responsible for the infection of over 150 million individuals worldwide, with 71 million of these evolving to the chronic form of the infection. Lacking corrective activity on its NS5B RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) polymerase, HCV has a high rate of nucleotide substitutions in the genome during replication, which may give the virus a variability of quasispecies and resistant variants. to treatments. Anti-HCV therapy was initially performed with interferon and ribavirin, which brought a high rate of side effects to patients. From 2015, the administration of Direct Action Antivirals (DAAs) was approved in Brazil, which are directed to specific stages of the replicative cycle. However, due to the high mutation rate, resistance-associated substitutions (RAS) have been described in the resistant variants. The present work aimed to analyze the genetic variability of HCV NS5B palm domain in chronically infected individuals. For this purpose, viral variants from serum samples from 53 chronically infected patients with genotypes 1a, 1b or 3a, residents of the northwestern region of São Paulo, submitted or not to interferon and ribavirin (INF + RBV) or DAAs based therapeutic protocols were analyzed. The sequences comprising the NS5B palm domain region of the viruses from each sample were aligned, edited and analyzed for the presence of RAS previously described for this NS5B region. Additionally, the sequences were used for phylogenetic reconstruction. Among the results, 67% of patients who had previously used INF + RBV did not respond to initial treatment and underwent AED retreatment, and of these 83.3% did not respond to treatment and 16.7% relapsed. Sequence analysis showed that RAS C316N / Y and Q309R were detected in the samples of 3 patients of genotype 1b, and the RAS C316Y was identified in the sample of one HCV 1a patient, but these patients responded to treatment with AADs. Phylogenetic analyzes showed that the 3 HCV 1b patients who presented the RAS were grouped in the same monophyletic branch, showing high similarity between the viral variants of these patients. Thus, it can be concluded that previous treatment with interferon and ribavirin may be a contributing factor to non-response to a second therapeutic protocol with AADs. In addition, the combination of RAS C316N and Q309R does not necessarily imply resistance to antiviral treatment, but the study of circulating viral variants in the region is important for determining the route of transmission.

Keywords: Hepacivirus C; NS5B; DAAs; NS5B inhibitors; interferon; ribavirin; RAS; resistant viral variants; viral resistance.

LISTA DR FIGURAS

Figura 1 - Esquema global da prevalência do HCV e do total de indivíduos infectados por país.....	16
Figura 2 - Relação entre os casos de hepatite C notificados no Brasil, durante os anos de 2007 a 2017, e a provável fonte de infecção.....	17
Figura 3 - Estrutura da partícula viral do HCV.....	18
Figura 4 - Representação esquemática do Genoma do HCV e a sua Poliproteína.....	19
Figura 5 – Representação esquemática da replicação do HCV dentro de um hepatócito.....	21
Figura 6 – Prevalência relativa de cada genótipo de HCV mundialmente.....	22
Figura 7 - Estrutura da cristalográfica da NS5B do HCV.....	26
Figura 8 – Características da população de estudo.....	40
Figura 9 – Pacientes distribuídos por porcentagem de acordo com a cidade na região noroeste paulista.....	41
Figura 10 – Alinhamento das sequências dos pacientes com RAS descritas.....	42
Figura 11 – Árvore filogenética não enraizada com 53 sequências de 308 nucleotídeos da região NS5B provenientes de amostras de pacientes infectados com HCV genótipos 1a, 1b e 3a.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação da região de interesse da NS5B do HCV.....	32
Tabela 2 – Sequências referência usadas no Alinhamento de acordo com o genótipo da amostra.....	33
Tabela 3 – Mutações de substituição na região da palma da polimerase NS5B relacionadas à resistência aos antivirais de ação direta.....	34
Tabela 4 - Informações clínicas dos pacientes analisados.....	37

SUMÁRIO

1. Introdução.....	14
1.1. Descoberta do Agente Viral e Patogenia.....	14
1.2. Epidemiologia e Transmissão.....	15
1.2.1. Prevalência Global.....	16
1.2.2. Prevalência e Transmissão no Brasil.....	17
1.3. O Vírus da Hepatite C.....	18
1.3.1. Estrutura e Ciclo Replicativo.....	18
1.3.2. Variabilidade Genética e Quasispécies do HCV.....	21
1.4. Terapias Antivirais.....	23
1.4.1. Primeiras Abordagens Terapêuticas Anti-HCV.....	23
1.4.2. Novos Fármacos de Ação Direta.....	24
1.4.3. Resistência aos Antivirais: Substituições de Aminoácidos.....	24
1.4.4. Resistência aos Inibidores da NS5B.....	25
2. Objetivos.....	29
2.1. Objetivo Geral.....	29
2.2. Objetivos Específicos.....	29
3. Metodologia.....	31
3.1. População e Amostra.....	31
3.2. Amplificação e Sequenciamento da NS5B.....	31
3.3. Análise das Sequências.....	32
3.4. Análise Filogenética.....	34
3.5. Análise Estatística dos Dados Clínicos.....	34
4. Resultados.....	36
4.1. Características dos Pacientes do Estudo.....	36
4.2. Análise da Variabilidade Genética das Sequências e Investigação das RAS.....	42
4.3. Análise Filogenética.....	43
5. Discussão.....	46
6. Conclusão.....	50
7. Referências Bibliográficas.....	52

INTRODUÇÃO

1. Introdução

A hepatite C é uma doença infecciosa viral que afeta mais de 150 milhões de indivíduos no mundo todo (MESSINA *et al.*, 2015; RAO *et al.*, 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). A infecção se inicia de maneira aguda podendo evoluir para a forma crônica em 50 a 80% dos pacientes (MANNS, MICHAEL P. *et al.*, 2017). A hepatite C crônica atinge cerca de 71 milhões de indivíduos (PUCHADES RENAU; BERENGUER, 2018; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018) e pode levar à fibrose hepática, cirrose, carcinoma hepatocelular e até a morte (MANNS, MICHAEL P. *et al.*, 2017; STANAWAY *et al.*, 2016). Atualmente, pacientes com hepatite C são a maior causa para indicação de transplante de fígado em vários países (GOWER *et al.*, 2014a; MOHD HANAFIAH *et al.*, 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

1.1. Descoberta do Agente Viral e Patogenia

O hepacivírus C (HCV) foi isolado na década de 80 do soro de um chipanzé infectado cronicamente, e identificado como o agente causador de 90% dos casos das hepatites não-A e não-B (CHOO *et al.*, 1989, 1990; FEINSTONE *et al.*, 1975). Desde então, este vírus é um dos principais causadores de doenças hepáticas no mundo, e, apesar das diversas abordagens terapêuticas, apresenta número significativo de indivíduos infectados cronicamente ou que apresentam resistência aos tratamentos (DIETZ *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2012; LONTOK *et al.*, 2017; RAO *et al.*, 2015).

É um vírus é hepatotrófico, portanto o fígado é o primeiro alvo da infecção. No entanto, o HCV também pode afetar os rins, pele, glândulas salivares, olhos, tireoide, articulações, sistema nervoso e o imune (CACOUB *et al.*, 1999, 2016; PUCHADES RENAU; BERENGUER, 2018).

A fase de infecção aguda acontece nos primeiros meses após o contato com o vírus, e o diagnóstico é comprometido pela falta de sintomas característicos (DIAS; PIPA; MOTA, 2018). Na fase crônica, os sintomas clínicos envolvem desconforto abdominal, fadiga, dor muscular e perda de peso (MANNS, MICHAEL P. *et al.*, 2017). O HCV desencadeia um processo inflamatório crônico, culminando no surgimento de quadros mais graves, como fibrose, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (CHC) (MANNS, MICHAEL P. *et al.*, 2017; STANAWAY *et al.*, 2016). Em 2015, o CHC foi causa da morte de 48% dos pacientes cronicamente infectados pelo HCV (MANNS, MICHAEL P. *et al.*, 2017). Dados da Organização Mundial de Saúde

(OMS) demonstram que aproximadamente 399.000 pessoas infectadas com HCV morrem todos os anos, por causa das complicações como cirrose e o carcinoma hepatocelular (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Além disso, este vírus também está envolvido na origem de doenças como a crioglobulinemia e linfoma não-Hodgkin em hepatopatas (ALFALEH *et al.*, 2015; GANE *et al.*, 2015). Os infectados cronicamente com HCV apresentam maior probabilidade de óbito pelo efeito da infecção do vírus no organismo, se comparados aos que estão na fase aguda da infecção (LEE *et al.*, 2012; PUCHADES RENAU; BERENGUER, 2018).

1.2. Epidemiologia e Transmissão

O vírus da hepatite C circula pela corrente sanguínea. Assim, o modo mais comum de contaminação é através da exposição percutânea ao sangue infectado. Atualmente, a principal via de transmissão é por meio do uso de drogas injetáveis. Porém, ainda hoje, a contaminação com o vírus também ocorre por transfusões de sangue e hemoderivados, hemodiálise ou materiais médicos mal esterilizados (GOWER *et al.*, 2014b; MANNS, MICHAEL P. *et al.*, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

A transmissão sexual do vírus ainda é controversa, já que o contato sexual é considerado um modo ineficiente de disseminação pelas baixas taxas de transmissão sexual em parceiros sorodiscordantes ao HCV (CHAN *et al.*, 2016). No entanto, apesar desta divergência, a transmissão sexual ainda é considerada um importante fator de risco de infecção para os órgãos de saúde. No Brasil, por exemplo, segundo o Ministério da Saúde, a transmissão sexual do hepacivírus C é considerada o terceiro maior fator de risco da doença, ficando a trás das transfusões de sangue e abuso de drogas injetáveis ou inaláveis (BRASIL, 2018). Entretanto, é importante considerar que parceiros sexuais também podem compartilhar outros utensílios pessoais, como alicates de unha, escovas de dentes e prestobarbas, que são fontes mais prováveis de infecção (CHAN *et al.*, 2016). Mesmo sendo incomum, o vírus também pode ser transmitido diretamente da mãe para o bebê (PUCHADES RENAU; BERENGUER, 2018).

A epidemiologia do HCV está mudando devido ao melhoramento das técnicas sanitárias em geral (BALAGOPAL; THIO, 2015). Deste modo, a triagem para transfusão de sangue, a utilização de seringas e equipamentos descartáveis, treinamento dos profissionais da área da saúde e promoção do uso de preservativos, por exemplo, são medidas que estão mudando o

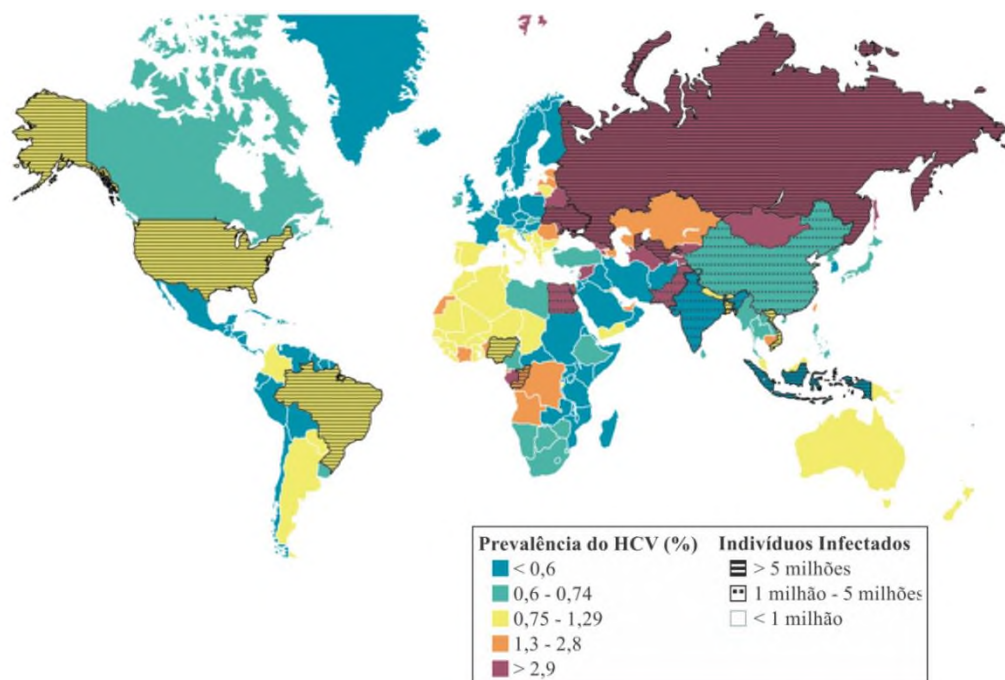
perfil de transmissão do vírus (PUCHADES RENAU; BERENGUER, 2018; STASI *et al.*, 2016).

No entanto, o panorama de transmissão depende da região global analisada. A precariedade da triagem para as técnicas hospitalares invasivas e a reutilização de seringas para procedimentos médicos é uma realidade ainda em alguns países. No Paquistão, por exemplo, este último é o principal fator de risco da doença (GOWER *et al.*, 2014a; MANNS, MICHAEL P. *et al.*, 2017; RAZAVI *et al.*, 2014).

1.2.1. Prevalência Global

A prevalência do HCV no mundo é variável. A África e o Oriente Médio apresentam os maiores números, entretanto, a discrepância é grande quando comparados com as Américas, Austrália e Europa (ALFALEH *et al.*, 2015; HAJARIZADEH; GREBELY; DORE, 2013). No oriente, China, Paquistão, Nigéria, Egito, Índia e Rússia juntos representaram mais da metade do número total de infecções por HCV (GOWER *et al.*, 2014a). Nos países como Camarões, Gabão, Geórgia, Mongólia e Uzbequistão, a população adulta tem prevalência de anticorpos anti-HCV maior que 5%, e a infecção iatrogênica, ou seja, aquelas que são derivadas de efeitos adversos ou complicações do tratamento, também é um fator de risco (Figura 1) (MANNS, MICHAEL P. *et al.*, 2017).

Figura 1 - Esquema global da prevalência do HCV e do total de indivíduos infectados por país.
Fonte: Adaptado de (MANNS, MICHAEL P. *et al.*, 2017).

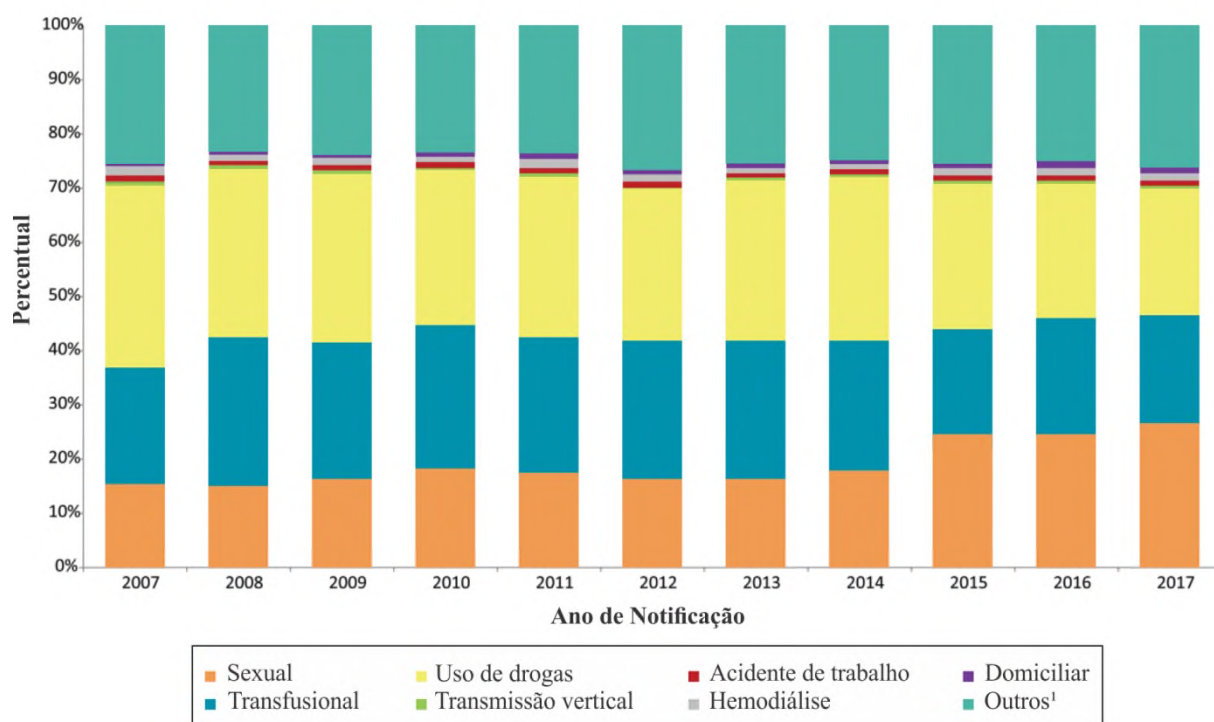


1.2.2. Prevalência e Transmissão no Brasil

Segundo o Ministério da Saúde, foram notificados 331.855 casos de hepatite C de 1999 a 2017 no Brasil, sendo que 63,2% destes ocorreram no Sudeste e 25,2% no Sul. Em 2017, a taxa de infectados com HCV na região Sul foi o maior do país, com 24,3 casos para cada 100 mil habitantes, seguida pelo Sudeste, com 15,6 casos (BRASIL, 2018). Entre 2000 e 2015, 46.314 óbitos foram relacionados à hepatite C no Brasil (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Com relação à fonte de infecção, o uso de drogas injetáveis é responsável por 13,2% dos casos, seguido de transfusão sanguínea com 11,4%, e de relação sexual desprotegida com 8,9% (Figura 2) (BRASIL, 2018). O HCV ainda é transmitido no Brasil por outras vias, como procedimentos de manicure e pedicure, piercings e tatuagens, tratamentos odontológicos, uso de seringas de vidro e endoscopia digestiva, porém esse número vem caindo gradativamente (BRANDÃO; COSTA FUCHS, 2002; MARTINS; NARCISO-SCHIAVON; SCHIAVON, 2011).

Figura 2 - Relação entre os casos de hepatite C notificados no Brasil, durante os anos de 2007 a 2017, e a provável fonte de infecção. Fonte: Adaptado de (BRASIL, 2018).



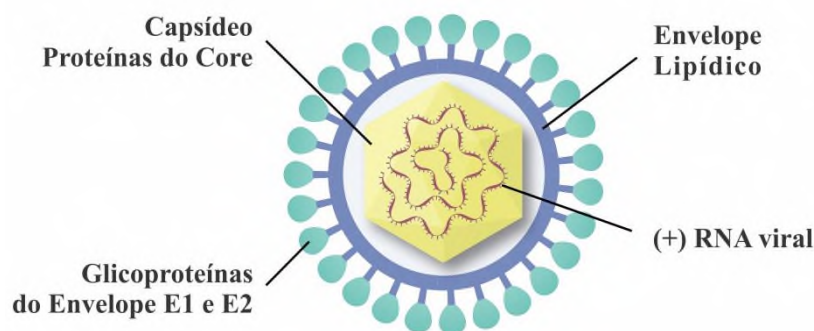
Nota FIGURA 2 - (1) Outros: tratamento cirúrgico + tratamento dentário + pessoa/pessoa + outras formas

1.3. O Vírus da Hepatite C

1.3.1. Estrutura e Ciclo Replicativo

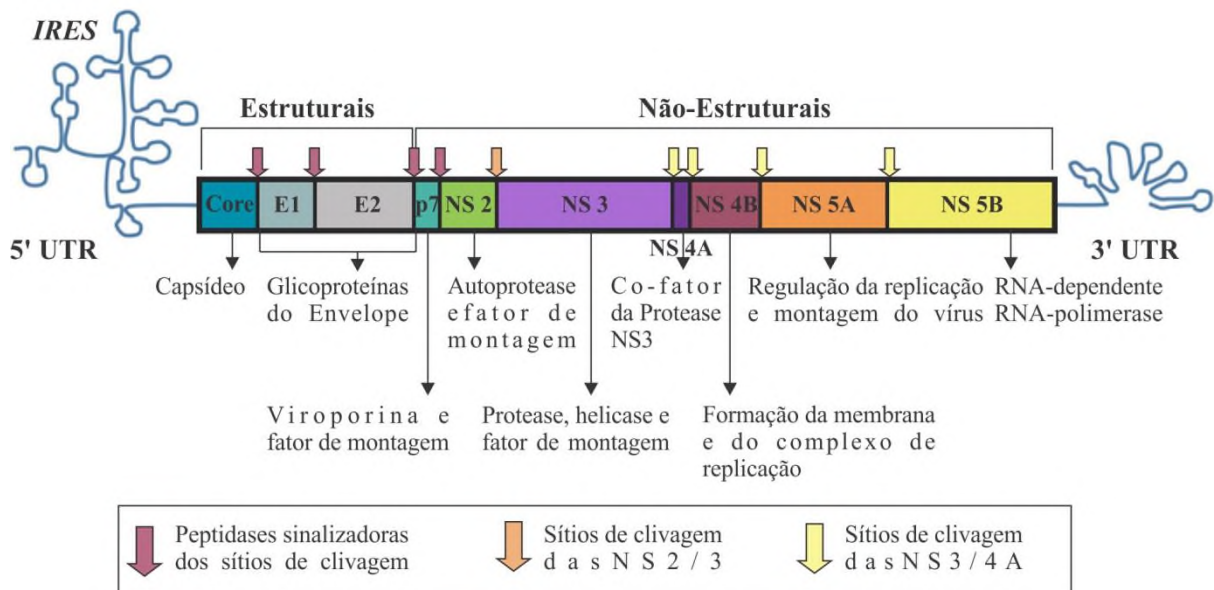
O HCV pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivirus* (TSUKIYAMA-KOHARA; KOHARA, 2018). A partícula viral, de aproximadamente 50 nm de diâmetro, possui como material genético uma fita simples de RNA de polaridade positiva (FOURATI; PAWLOTSKY, 2015). Com um genoma de quase 9.600 nucleotídeos, o HCV é envolto por um capsídeo proteico icosaédrico formado por proteínas do core e um envelope lipídico proveniente da membrana celular hospedeira (DIETZ *et al.*, 2018; MANNS, MICHAEL P. *et al.*, 2017; PENIN *et al.*, 2004). Em cada partícula viral estão ancoradas as glicoproteínas estruturais no envelope viral (Figura 3) (RICE, 2014; TSUKIYAMA-KOHARA; KOHARA, 2018).

Figura 3 - Estrutura da partícula viral do HCV. Fonte: Adaptado de (STROSBURG *et al.*, 2010)



O genoma do vírus possui uma região aberta de leitura (“*open reading frame*” – ORF), que é flanqueada por regiões não traduzidas (“*untranslated region*” - UTR) posicionadas nas extremidades 5’ e 3’ da fita, com aproximadamente 340 e 230 nucleotídeos cada. Na região 5’UTR encontram-se estruturas em formato de alça (*stem loop*) que compõe o sítio interno de entrada do ribossomo (“*internal ribosomal entry site*” – IRES), importante na tradução do RNA viral. Já a região 3’UTR, composta de aproximadamente 235 nucleotídeos, apresenta outra sequência de alças, estrutura que é essencial para a replicação e montagem do capsídeo. É composta por uma sequência variável, seguida de uma região poli U (polipirimidina), e por uma sequência de 98 nucleotídeos que é bem conservada (Figura 4) (ABDEL-HAKEEM; SHOUKRY, 2014; TANG; GRISÉ, 2009; TSUKIYAMA-KOHARA; KOHARA, 2018).

Figura 4 - Representação esquemática do Genoma do HCV e a sua Poliproteína. Fonte: Adaptado de (ABDEL-HAKEEM; SHOUKRY, 2014).



O RNA viral é traduzido em uma “poliproteína precursora” com cerca de 3.000 aminoácidos, que será clivada por proteases em sítios específicos, originando as proteínas virais (Figura 4). No seu primeiro terço, encontram-se as proteínas do core e as glicoproteínas do envelope, a E1 e E2. Estas e a p7, proteína de canal iônico na região de transição entre as proteínas estruturais e não estruturais, têm função ligada à entrada do vírus na célula do hospedeiro (LOHMANN, 2019).

Os últimos dois terços dão origem às proteínas não estruturais NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B, as quais estão envolvidas nos processos intracelulares do ciclo de replicação viral. As proteínas NS2 e NS3 são, respectivamente, cisteíno-protease e serino-protease, sendo ambas fatores de montagem do vírus. A NS4A é cofator da NS3 e a NS4B é responsável pela indução da malha membranosa (ABDEL-HAKEEM; SHOUKRY, 2014; LOHMANN, 2019; TANG; GRISÉ, 2009).

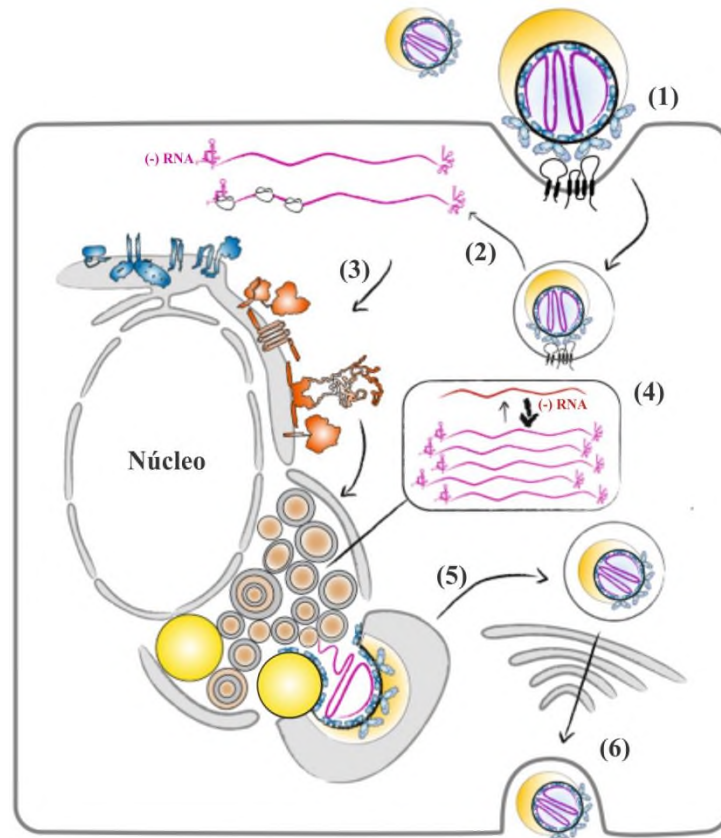
A proteína multifuncional NS5A tem importante função de regulação da replicação viral e montagem da partícula viral. Por último, a NS5B é uma RNA polimerase dependente de RNA (*RdRp*) responsável por catalisar o processo de replicação, porém, não possui atividade corretiva, resultando em uma taxa de mutação viral alta, especialmente para incompatibilidades (*mismatches*) G: U / U: G (POWDRILL *et al.*, 2011; TSUKIYAMA-KOHARA; KOHARA, 2018).

O ciclo replicativo dos vírus cujo material genético é uma fita simples e positiva de RNA é comumente citoplasmático, e a síntese do RNA viral é dependente da fita complementar simples e negativa do RNA (LOHMANN, 2019). A replicação do HCV ocorre primariamente nos hepatócitos. As proteínas E1 e E2 do envelope viral interagem com receptores de membrana específicos na célula hospedeira. Os primeiros receptores descritos foram o CD81 (*Cluster of Differentiation 81*), uma proteína de superfície, e o SR-B1 (*Scavenger Receptor class B type 1*), seguidos dos OCLN e CLDN1, proteínas de junção celular, e ocludina e claudina 1, que funcionam, respectivamente, como receptores e co-receptores do HCV na membrana (ABDEL-HAKEEM; SHOUKRY, 2014; EVANS *et al.*, 2007; MANNS, MICHAEL P. *et al.*, 2017; PILERI, 1998; PLOSS *et al.*, 2009; SCARSELLI *et al.*, 2002).

Depois da interação com a membrana plasmática, ocorre adsorção da partícula viral, e a penetração do vírus na célula acontece pelo processo de endocitose mediada por clatrina. Em seguida, há a fusão entre membranas virais e endossômicas, que leva à liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. Após o capsídeo viral ser desmontado, o RNA do HCV é desnudado e liberado no citoplasma, funcionando como um RNA mensageiro (mRNA) dentro da célula hospedeira. O sítio de entrada interna do ribossomo (IRES), na extremidade 5' do genoma viral, promove a produção da poliproteína precursora. Esta será clivada pelas proteases da célula hospedeira formando as três proteínas virais estruturais. As duas proteases virais (NS2 e NS3/4A) estão envolvidas no processamento das sete proteínas não estruturais do vírus (Figura 4) (HONDA *et al.*, 1999; MANNS, MICHAEL P. *et al.*, 2017; NIEPMANN, 2013).

A produção de RNA viral é um processo mediado pela RNA polimerase dependente de RNA, a proteína NS5B. O processo envolve a fita primária do RNA do vírus, que serve como molde para fita complementar de sentido negativo. Esta fita simples de RNA negativo dá origem a outras fitas de sentido positivo do RNA viral que, junto com as proteínas não estruturais, funcionam como uma maquinaria para um sistema de replicação viral contínua. Para finalizar a atividade do vírus na célula, suas proteínas estruturais se organizam para a montagem e liberação dos vírions, e este processo depende da produção de lipídios da célula hospedeira (Figura 5) (KAO; YI; HUANG, 2016; LOHMANN, 2019; MANNS, MICHAEL P. *et al.*, 2017)

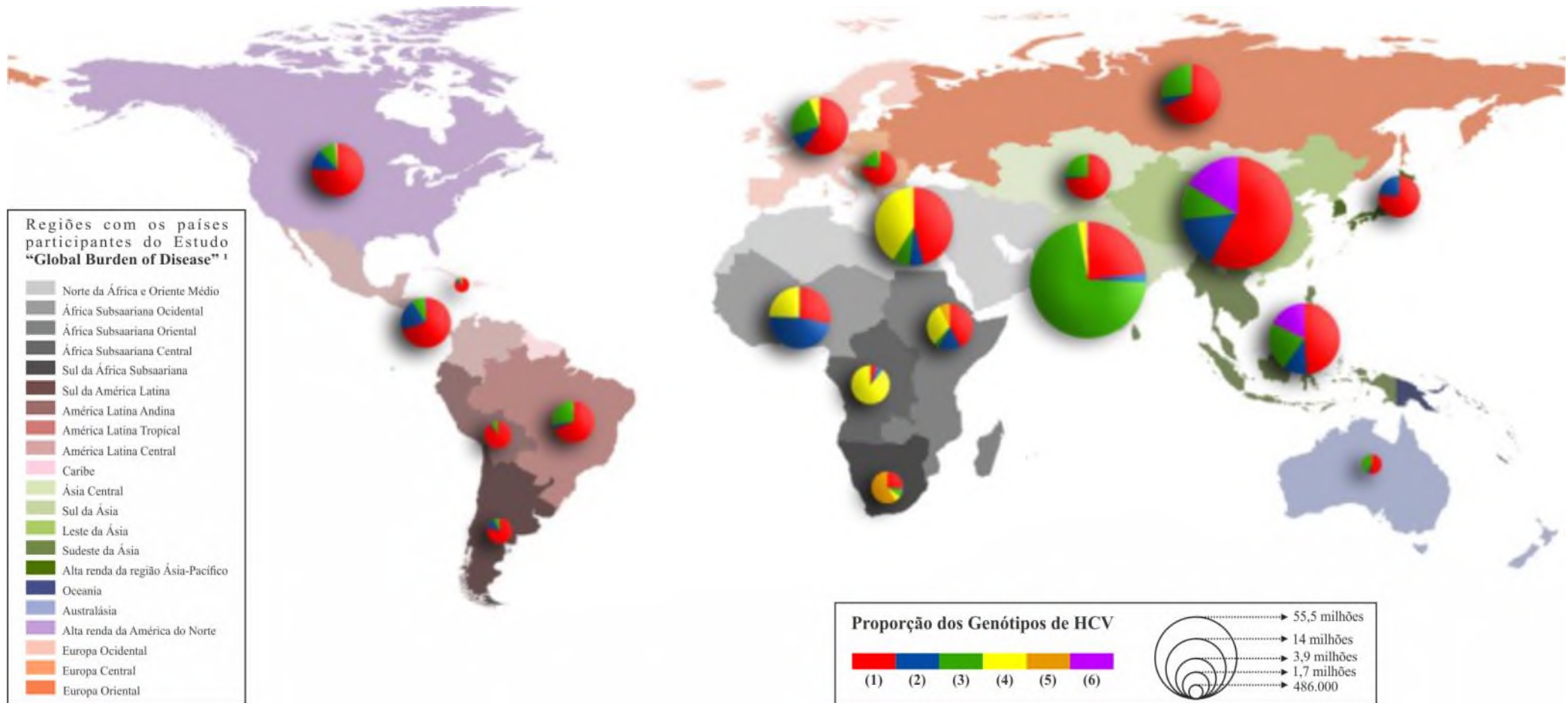
Figura 5 - Representação esquemática da replicação do HCV dentro de um hepatócito. Adsorção e penetração (1), desnudamento (2), tradução do RNA e clivagem da poliproteína (3), replicação do RNA (4), montagem (5) e liberação (6). Fonte: Adaptado de (LOHMANN, 2019).



1.3.2. Variabilidade Genética e Quasispécies do HCV

Análises filogenéticas de diferentes cepas isoladas no mundo resultaram na distinção de sete genótipos principais de HCV, designados de 1 a 7, e pelo menos 67 subgenótipos, identificados por letras minúsculas (1a, 1b etc.) (MANNNS, MICHAEL P. *et al.*, 2017; PENIN *et al.*, 2004; SIMMONDS, 2013; TSUKIYAMA-KOHARA; KOHARA, 2018). Os genótipos 1 e 3 são os mais frequentes na relação dos infectados globalmente, compreendendo 46% e 30% de todas as infecções, respectivamente (MESSINA *et al.*, 2015; TSUKIYAMA-KOHARA; KOHARA, 2018). Também são os mais prevalentes no Brasil (Figura 6), sendo então destaques na busca por regiões de resistência aos tratamentos com antivirais (CAMPIOTTO *et al.*, 2005; LAMPE *et al.*, 2013; LOPES *et al.*, 2009).

Figura 6 - Prevalência relativa de cada genótipo de HCV mundialmente. Fonte: Adaptado de (MESSINA *et al.*, 2015).



Nota FIGURA 6 - (1) "Global Burden of Disease": Esforço científico sistemático para quantificar a magnitude da perda de saúde devido a doenças, lesões e fatores de risco por idade, sexo, localidades geográficas com dados comparáveis, ajustados, padronizados, estimativas Globais, Nacionais e por Unidades Federativas.

Como outros vírus de RNA, o HCV existe em um hospedeiro como um conjunto de variantes distintas geneticamente, mas altamente relacionadas, que são referidas como quasispécies. (MARTELL *et al.*, 1992; TSUKIYAMA-KOHARA; KOHARA, 2018). Estas diferem em sítios nucleotídicos no genoma viral em menos de 10%. Múltiplas variantes genômicas presentes simultaneamente e a alta taxa em que novas variantes são geradas, estão relacionadas à falta de atividade corretiva da NS5B RdRp durante a replicação do genoma viral e a abundância de vírions que são produzidos (LONTOK *et al.*, 2017; PAWLOTSKY, J. M., 2006; ZHOU *et al.*, 2007). A variabilidade das quasispécies e a dinâmica da infecção viral no organismo do hospedeiro influi na progressão dos tratamentos com antivirais, podendo corroborar para a evolução de mutações virais, promovendo a disseminação de cepas resistentes aos medicamentos (PERALES *et al.*, 2015; TSUKIYAMA-KOHARA; KOHARA, 2018).

1.4. Terapias Antivirais

1.4.1. Primeiras Abordagens Terapêuticas Anti-HCV

Inicialmente, as terapias utilizadas com pacientes infectados pelo HCV eram feitas a base de interferons (INF), citocinas produzidas por leucócitos e fibroblastos que interferem na replicação viral estimulando a atividade de defesa de outras células. Entretanto, o tratamento com INF-alfa resultava em muitos efeitos colaterais, como fadiga, variação de humor e erupções cutâneas, fazendo que seu uso fosse contraindicado para várias pessoas (BALAGOPAL; THIO, 2015; DAVIS *et al.*, 1989; PUCHADES RENAU; BERENGUER, 2018).

Posteriormente, a terapia combinada de interferon alfa peguilado (PegINFa) e ribavirina (RBV), um análogo sintético de nucleotídeos que inibe seletivamente a síntese de material genético em células hospedeiras infectadas foi utilizada. Apesar de não interferir diretamente nos efeitos colaterais do tratamento, esta combinação proporcionou um aumento significativo na taxa de resposta virológica sustentada (RVS) (PUCHADES RENAU; BERENGUER, 2018). Esta é definida quando os níveis de RNA viral são indetectáveis no sangue em 24 semanas ou, mais recentemente, 12 semanas após o final da terapia (MANNS, M. P. *et al.*, 2013; SWAIN *et al.*, 2010). Este tipo de terapia foi amplamente usado até 2011, proporcionando uma RVS de 40 a 50% em indivíduos infectados pelo HCV genótipo 1, e de 60 a 80% em indivíduos infectados pelos genótipos 2 e 3 (HADZIYANNIS, 2004).

1.4.2. Fármacos de Ação Direta

Em 2015, foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), a agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, a utilização de agentes antivirais de ação direta (DAAs), livres de interferons, no tratamento contra o HCV crônico (ASSELAH *et al.*, 2016). Monoterapias com DAAs apresentaram aumento significativo na RVS na infecção crônica por HCV na maioria dos pacientes, mesmo os que têm complicações, como a co-infecção com HIV ou insuficiência renal, por exemplo (MANNS, MICHAEL P. *et al.*, 2017; MANNS, MICHAEL P.; VON HAHN, 2013).

A combinação dos tratamentos com os DAAs têm a expectativa de SVR muito alta, em média de 90%, contribuindo para o controle de epidemias de HCV (PAWLOTSKY, J.-M., 2015; PAWLOTSKY, J., 2014). Além disso, o mecanismo direto em pontos específicos do ciclo do vírus na célula hospedeira diminui consideravelmente os efeitos colaterais, melhorando, portanto, a qualidade de vida dos pacientes (MANNS, MICHAEL P. *et al.*, 2017).

Os DAAs disponíveis atualmente contra HCV são classificados em três categorias, levando em consideração o alvo molecular e o mecanismo de ação de cada um. São inibidores de protease NS3/4A, inibidores do complexo de replicação viral NS5A ou inibidores de polimerase NS5B. Esta última categoria se divide em inibidores análogos de nucleosídeos (NI – *nucleoside inhibitor*), que não são específicos do genótipo, e inibidores não-nucleosídeos de RdRp (NNI – *non-nucleoside inhibitor*), que inibem a função enzimática mudando a estrutura tridimensional da enzima, mas não se ligando a ela (MANNS, MICHAEL P. *et al.*, 2017). Dentre DAAs de primeira geração licenciados estão o Boceprevir, inibidores de protease NS3/4A, o Daclatasvir, inibidor da NS5A, e o Sofosbuvir, inibidor da polimerase NS5B (PUCHADES RENAULT; BERENGUER, 2018).

1.4.3. Resistência aos Antivirais: Substituições de Aminoácidos

Devido à biologia do HCV, as resistências ao tratamento associadas às substituições de aminoácidos no RNA viral (RAS) são a base molecular para falhas das abordagens terapêuticas baseadas em DAAs, uma vez que as mutações são frequentemente observadas em regiões genômicas que expressam proteínas virais inibidas pelos fármacos anti-HCV, podendo conferir resistência à classe do DAA ou à substância específica, dependendo do tratamento (MANNS, MICHAEL P. *et al.*, 2017).

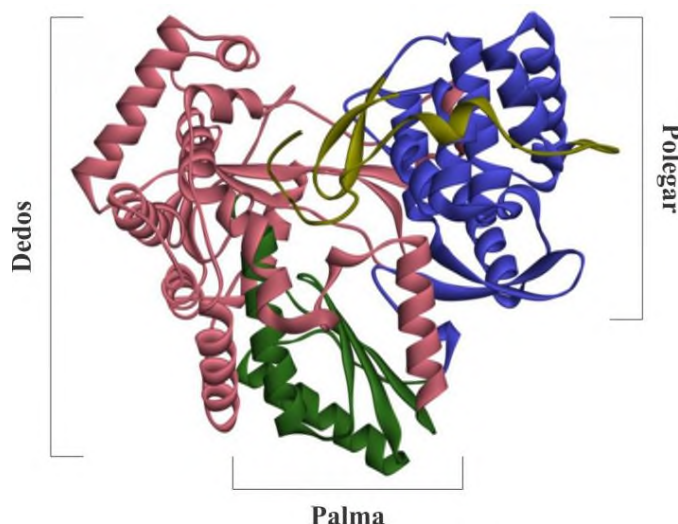
O termo “variantes associadas à resistência” (RAV) foi previamente utilizado para designar inespecificamente substituições nas variantes virais que levavam à diminuição da sensibilidade aos DAAs específicos, ou à sua classe. Atualmente, as substituições de aminoácidos na cadeia são chamadas de Resistência Associada à Substituição (RAS), e as variantes que carregam esta mutação são designadas “variantes resistentes” (LONTOK *et al.*, 2015, 2017; MANNS, MICHAEL P. *et al.*, 2017).

Neste contexto, devido às quasispécies do vírus, as populações sensíveis podem ser rapidamente eliminadas, enquanto variantes resistentes são selecionadas. A recidiva aos tratamentos atuais é determinada quando há a detecção do vírus no sangue após o término do tratamento e os pacientes são identificados como respondedores ao final do tratamento (RFT). Quando não há resposta aos fármacos ainda durante a terapia, os pacientes são classificados como não respondedores (NR) (MANNS, M. P. *et al.*, 2013; MANNS, MICHAEL P. *et al.*, 2017).

1.4.4. Resistência aos Inibidores da NS5B

O ciclo replicativo do HCV depende essencialmente da NS5B para a produção de RNA viral e, portanto, para a manutenção da infecção e produção de novos vírions. Portanto, a proteína NS5B é um importante alvo de fármacos de ação direta dos antivirais (CHOI, 2012). A estrutura tridimensional da polimerase viral é associada à figura de uma mão direita no formato de uma concha contendo três domínios, a palma (*Palm*), os dedos (*Fingers*) e o polegar (*Thumb*). A região da palma é a mais conservada entre as diferentes polimerases, e onde se localiza o sítio ativo da enzima, sendo então o alvo de alguns DAAs (Figura 7) (ELTAHLA *et al.*, 2015; MEMBRENO; LAWITZ, 2011).

Figura 7 - Estrutura da cristalográfica da NS5B do HCV. Regiões dos dedos (*Fingers*) em vermelho, e do polegar (*Thumb*) em azul, envolvendo o sítio ativo dentro do domínio da palma (*Palm*), em verde. A polimerase foi cristalizada na conformação “fechada”, representada na figura. Acredita-se que sua atividade RpRd está ligada ao “grampo β ”, em amarelo, entre o domínio do polegar e o “ligante” C-terminal que se estende até a palma. Fonte: Adaptado de (ELTAHLA *et al.*, 2015).



O Sofosbuvir, um dos DAAs mais usados por pacientes com HCV crônico, faz parte da classe dos NIs que simulam substratos naturais e ligam-se diretamente no sítio ativo da enzima, atuando como terminadores de cadeia. Esses antivirais são capazes de atuar em diferentes genótipos do HCV, tendo uma atividade mais efetiva e resistência ao surgimento de RAS. Porém, estes fármacos também podem afetar o sítio enzimático das polimerases do hospedeiro já que ambas polimerases, viral e celular, compartilham características semelhantes (DONALDSON *et al.*, 2014; LONTOK *et al.*, 2015; PUCHADES RENAULT; BERENGUER, 2018).

Com relação às RAS mais comuns que interferem na atividade dos inibidores de NS5B podemos citar L159F, D244N, S282T, Q309R, D310N, C316H/N/Y, L320F, V321A/I, S326G e A333E (CASTILHO1 *et al.*, 2011; DONALDSON *et al.*, 2014; LONTOK *et al.*, 2015, 2017; NOBLE *et al.*, 2017). Análises estruturais da NS5B e do seu sítio ativo no domínio da palma demonstraram que próximo à tríade catalítica da polimerase NS5B do HCV, composta pelos aminoácidos D220, D318 e D319, ocorreram substituições que interferiram na eficácia dos antivirais NI. Os aminoácidos C316 e V321, por exemplo, são alvo de RAS conhecidas que podem configurar variantes resistentes (DONALDSON *et al.*, 2014).

O acompanhamento da evolução e mecanismo de ação das RAS na NS5B do HCV ainda é recente e, portanto, deve ser realizado. Além disso, apesar dos DAAs apresentarem uma ação específica e pontual efeitos colaterais reduzidos, comparados aos tratamentos prévios com interferon e ribavirina, a variabilidade genética característica do HCV resulta em substituições na cadeia de aminoácidos durante os ciclos de replicação viral, podendo conferir resistência aos medicamentos. Desta maneira, avaliar a variabilidade viral dentro das populações infectadas e submetidas ao tratamento com DAAs é importante para rastrear RAS específicos.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Analisar a variabilidade genética do domínio da palma da NS5B do HCV em pacientes cronicamente infectados com genótipos 1a, 1b ou 3a.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a variabilidade genética de sequências de pacientes cronicamente infectados, por meio de amplificação da região de interesse, sequenciamento e alinhamento das sequências;
- Comparar a variabilidade genética viral e a resposta ao tratamento de pacientes tratados previamente com interferon e ribavirina, ou de pacientes que apresentaram o tratamento com DAAs como primeira abordagem terapêutica;
- Investigar a presença de RAS específicos associados aos inibidores da NS5B nos genótipos 1a, 1b ou 3a do HCV;
- Analisar as relações filogenéticas entre as variantes virais isoladas de diferentes pacientes do estudo;
- Analisar conjuntamente informações moleculares e dados clínicos para um melhor entendimento das RAS dentro população deste estudo.

3. Metodologia

3.1. População e Amostra

A população estudada foi composta por 53 pacientes cronicamente infectados com HCV dos genótipos 1a, 1b ou 3, submetidos ou não ao tratamento por 12 semanas com DAAs. Os pacientes foram acompanhados em ambulatórios ou hospitais respectivos a cada localidade, onde realizaram coletas de amostras antes e após o tratamento, quando pertinente. Os pacientes submetidos a terapia com DAAs apresentaram três padrões distintos de resposta ao tratamento, sendo classificados com resposta virológica sustentada (RVS), não-respondedores (NR) ou respondedores ao final do tratamento (RFT).

Os dados referentes aos pacientes do estudo como idade, etnia, gênero e localidade, bem como dados clínicos, foram obtidos durante a coleta das amostras. Para que todos os direitos e liberdades dos indivíduos que participaram deste estudo fossem respeitados, o projeto foi submetido ao comitê de ética em pesquisa do Instituto Adolfo Lutz e está de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde sendo aprovado com parecer nº 290.504, demonstrando respeito às regras éticas.

3.2 Amplificação e Sequenciamento da NS5B

As amostras de soro dos pacientes infectados com HCV foram coletadas pelo Laboratório de Biologia Molecular dos Vírus HCV, HBV e HIV, do Instituto Adolfo Lutz na cidade de São José do Rio Preto, e armazenadas a -80 °C. O processamento das amostras para obtenção de sequências de NS5B foi realizada em estudo prévio, no Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Uberlândia, UFU. Posteriormente, as sequências de NS5B geradas foram editadas e utilizadas para as análises no presente projeto.

Para a amplificação das amostras, a Extração do RNA viral foi feita através do kit *QIAamp MiniElute* (QIAGEN, Hilden, Alemanha) com 140µL de soro eluídos em 60 µL de tampão do kit, de acordo com o protocolo do fabricante. O cDNA foi gerado a partir de 20 µL de RNA extraído da amostra, usando o kit *RNA to cDNA EcoDry Premix, Random Hexamers* (Takara Bio Inc., TBUSA, Estados Unidos), incubando-se por 1 h a 42 °C e 10 min a 70 °C. As reações de PCR e *nested* PCR foram realizadas no volume total de 20 µL usando o kit com a enzima *Qiagen HotStarTaq* (QIAGEN, Hilden, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante. Foram adicionados às reações 2µL do cDNA, produzido a partir das amostras, e os

primers na concentração de 5 pmoles (Tabela 1). As condições das reações de amplificação foram: 94 °C por 15min para ativação inicial da enzima; 55 ciclos de desnaturação à 95 °C por 20s, seguido de anelamento à 55 °C por 20s e extensão à 72 °C por 2min; e extensão final à 72 °C por 10min.

Tabela 1 - Sequência dos *primers* utilizados para a amplificação da região de interesse da NS5B do HCV.

Reação	Primers	Sequência	Posição no genoma do HCV
1ª PCR (externa)	qHCV_NCRf ¹	5' – GCGCAACCGGTGAGTACA – 3'	7679–7696
	qHCV_NCRr ¹	5' – ACTCGCAAGCACCCCTATCAG – 3'	9162–9181
Nested PCR	Sn755 ²	5' – TATGAYACCCGCTGYTTTGACTC – 3'	7915–7937
	Asn1121 ²	5' – GCNGARTAYCTVGTTCATAGCCTC – 3'	8281–8303

Nota TABELA 1 – Referências: (1) (VERCAUTEREN *et al.*, 2016); (2) (LORTHOLARY *et al.*, 2001)

Após a amplificação, a presença do *amplicon* de 388 pares de bases (pb) foi confirmada através da eletroforese em gel de agarose a 2% e a purificação e o sequenciamento foram realizados através do *Sanger Sequencing Services* (Source BioScience, Nottingham, Reino Unido).

3.3. Análise das Sequências

As sequências da NS5B geradas foram analisadas com o algoritmo BLAST (*National Centre for Biotechnology Information* - NCBI) (JOHNSON *et al.*, 2008) e comparadas com sequências disponíveis do HCV nos bancos de dados do GenBank e Los Alamos (*Los Alamos National Lab* – LANL) (KUIKEN *et al.*, 2012), para a confirmação da região sequenciada e dos genótipos.

Para a análise da diversidade genética viral, as sequências foram agrupadas em *datasets* de acordo com os genótipos 1a, 1b e 3a, e alinhadas usando o Clustal W dentro do programa BioEdit (versão 7.0.5.3) (LARKIN *et al.*, 2007; PHILLIPS; GNANAKARAN, 2015). As sequências de referência utilizadas no alinhamento estão listadas na tabela 2.

Tabela 2 – Sequências referência usadas no Alinhamento de acordo com o genótipo da amostra.

Genótipo	Sequência Referência	Número de Acesso GenBank
1a	H77	NC_004102
	CYHCV025	HQ537007
	1003	EF407457
	V2518	HQ850279
	5003	EF407419
	HCV-1	M62321
	LTD6-2-XF224	AF511950
1b	HCV-J	D90208
	L801	EU781827
	TN28	EU781828
	HCV-BK	M58335
	BR1427_P1_10-7-03	EF032892
	AY587016	AY587016
	JT	D11355
3a	NZL1	D17763
	K3A	D28917
	RASILBS2-SR-PO	JN714194
	HCVCENS1	X76918
	CB	AF046866

As sequências de nucleotídeos já alinhadas foram traduzidas usando o programa BioEdit e, a partir das sequências de aminoácidos referentes a cada amostra, foi realizado o rastreamento de RAS aos inibidores de NS5B. A região traduzida compreendia um fragmento entre os aminoácidos 240 e 342 da polimerase, que compreende o sítio ativo da enzima no domínio da palma, entre as posições 287 e 371 (MOSLEY *et al.*, 2012). As RAS investigadas foram selecionadas por meio de levantamento bibliográfico com base nas substituições descritas na literatura na região genômica no domínio palma da NS5B, fragmento amplificado neste estudo (Tabela 3).

Tabela 3 – Mutações de substituição na região da palma da polimerase NS5B relacionadas à resistência aos antivirais de ação direta.

Genótipo	RAS	Referência
1, 3	L159F	(ASAHINA <i>et al.</i> , 2005;
	D244N	CASTILHO1 <i>et al.</i> , 2011; DIETZ
	S282T/R	<i>et al.</i> , 2018; DONALDSON <i>et al.</i> ,
	Q309R	2014; GANE <i>et al.</i> , 2015;
	D310N	HAMANO <i>et al.</i> , 2005; HEZODE
	C316H/N/Y	<i>et al.</i> , 2018; LONTOK <i>et al.</i> ,
	L320F	2017; NOBLE <i>et al.</i> , 2017;
	V321A/I	PERES-DA-SILVA; BRANDÃO-
	S326G	MELLO; LAMPE, 2017; S. <i>et al.</i> ,
	A333E	2013; SARRAZIN <i>et al.</i> , 2016;
		SVAROVSKAIA <i>et al.</i> , 2014,
		2016; TONG <i>et al.</i> , 2014)

3.4. Análise Filogenética

Após o alinhamento e a edição das sequências de NS5B do HCV referente aos diferentes pacientes, as análises de filogenia molecular foram realizadas utilizando-se do programa Mega X (KUMAR *et al.*, 2018). O método usado para a análise evolucionária foi o de Máxima Verossimilhança, ou *Maximum Likelihood*, e as análises foram feitas a partir de *bootstraps* com 1.000 réplicas, confirmando as topologias das árvores.

3.5. Análise Estatística dos Dados Clínicos

Para análises estatísticas e criação dos gráficos com os dados clínicos, foi usado o programa GraphPad Prism (versão 8.0.1 244) (BERKMAN; ROSCOE; BOURRET, 2019), a escolha dos métodos foi realizada de acordo com a natureza das variáveis.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Características dos Pacientes do Estudo

As características da população de estudo como idade, etnia, gênero e localidade, bem como os dados clínicos como genótipo do HCV, data e tipo de tratamento/retratamento (quando pertinente), fator de risco de infecção, grau de dano hepático, resposta clínica ao tratamento (quando pertinente) e presença de RAS são apresentados na tabela 4. Para uma melhor análise dos dados, a tabela foi dividida em (A), (B) e (C), de acordo com os genótipos 1a, 1b e 3a, respectivamente.

Com relação ao perfil de tratamento dos pacientes, 34% das amostras analisadas eram de pacientes *naïve*, ou seja, não foram submetidos a nenhum tipo de tratamento prévio contra o HCV. Quinze por cento dos indivíduos foram tratados previamente com interferon e ribavirina, destes, 67% não responderam ao tratamento inicial e foram submetidos ao retratamento com DAAs. Do total de pacientes que utilizaram sofosbuvir e daclatasvir como segunda abordagem terapêutica, 83,3% não responderam ao tratamento e 16,7% foram RFT, ou seja, pacientes que só responderam durante a administração dos medicamentos, e após o término do tratamento houve recidiva. Portanto, a terapia com DAAs se mostrou ineficaz para os pacientes do estudo que foram previamente tratados com terapia combinada de interferon e ribavirina. Os pacientes que receberam DAAs como primeira abordagem terapêutica representaram 28,3% dos pacientes, apresentando uma taxa de RVS de 86% (Tabela 4).

De acordo com os dados clínicos, o fator de risco, mais prevalente foi a transmissão do vírus através dos utensílios de Drogas Injetáveis ou Inaláveis, com 17% dos casos, seguida de meios Parenterais ou por Material Cortante, com 13,2%, depois por transmissão sexual e por transfusão de sangue, ambos com 9,4%, e os procedimentos cirúrgicos compreenderam 7,5% dos casos. Manicure e Pedicure e Seringa de vidro conferiram ambos 3,8%, e Hemodiálise, Agulhas de Acupuntura e Tatuagem, 1,9% dos casos cada. Referente ao grau de dano hepático, quatro pacientes apresentaram cirrose, e mais da metade do grupo apresentou algum grau de fibrose (Tabela 4).

Tabela 4 - Informações clínicas dos pacientes analisados. (A) Pacientes infectados com HCV genótipo 1a. (B) Pacientes infectados com HCV genótipo 1b. (C) Pacientes infectados com HCV genótipo 3a.

(A) Informações clínicas dos pacientes Genótipo 1a.

ID Paciente	LANL / Blast NCBI	Local/Cidade		Data de Nascimento	Gênero	Cor ou Raça	Data da Coleta	Data do Diagnóstico	Fator de risco de infecção	Início do Tratamento	Terapia	Retratamento	Terapia Secundária	Biópsia¹	RAS	Resposta Clínica
4	1a(98%)	CADIP	FERNANDOPOLIS	03/12/1979	F	Branco	15/02/2017	10/02/2017	Ignorado	NAIVE	-	Não	-	F2/F3	-	-
5	1a(97%)	SAE	JALES	10/08/1968	F	Branco	09/02/2017	14/12/2016	Sexual	NAIVE	-	Não	-	F2/F3	-	-
7	1a(97%)	HEC	CATANDUVA	22/03/1970	F	Amarelo	02/03/2017	02/03/2017	Ignorado					-	-	-
8	1a(97%)	HEC	CATANDUVA	07/03/1940	F	Branco	09/03/2017	19/09/2016	Transfusão de Sangue					-	-	-
9	1a(97%)	SAE	VOTUPORANGA	12/07/1931	F	Branco	07/03/2017	30/08/2011	Transfusão de Sangue	NAIVE	-	Não	-	-	-	-
10	1a(98%)	AMHV	SIRP	13/12/1963	F	Branco	08/03/2017	18/12/2003	Seringa de Vidro	NAIVE	-	Não	-	F2/F3	-	-
11	1a(98%)	CADIP	FERNANDOPOLIS	02/11/1961	F	Branco	08/03/2017	20/09/2016	Ignorado	NAIVE	-	Não	-	F3/F4	-	-
20	1a(96%)	AMHV	SIRP	20/03/1959	M	Branco	16/03/2017	01/08/2005	Drogas Inaláveis	NAIVE	-	Não	-	Cirroze	-	-
22	1a(97%)	AMHV	SIRP	17/09/1957	F	Branco	21/03/2017	15/02/2005	Procedimento Cirúrgico	12/06/2015	PEGINTERFERON + RIBAVIRINA	16/08/2017 (até 07/11/2017)	SOFOSBUVIR + SIMESPREVIR	F2/A1	-	Não Responderor
25	1a(99%)	HEC	CATANDUVA	01/10/1966	M	Pardo	30/03/2017	30/03/2017	Drogas Injetáveis					-	-	-
27	1a(98%)	HEC	CATANDUVA	30/03/1955	M	Amarelo	03/04/2017	03/04/2017	Ignorado					-	-	-
28	1a(98%)	CADIP	FERNANDOPOLIS	27/10/1964	M	Branco	05/04/2017	03/08/2011	Ignorado	NAIVE	-	Não	-	F2/F3	-	-
32	1a(97%)	CADIP	FERNANDOPOLIS	29/06/1971	F	Branco	21/03/2017	27/06/2017	Ignorado	NAIVE	-	Não	-	F2/F3	-	-
33	1a(98%)	CADIP	FERNANDOPOLIS	27/11/1974	F	Branco	11/04/2017	07/04/2017	Ignorado	18/08/2017	SOFOSBUVIR + DACLATASVIR	Não	-	F2/F3	-	-
34	1a(98%)	SAE	JALES	05/02/1969	M	Branco	06/04/2017	07/10/2011	Sexual	NAIVE	-	Não	-	F4	-	-
41	1a(97%)	HEC	CATANDUVA	24/01/1964	M	Branco	24/04/2017	24/04/2017	Ignorado			Não	-	-	-	-
44	1a(97%)	SAE	JALES	23/11/1962	M	Pardo	12/04/2017	01/09/2016	Drogas Injetáveis	NAIVE	-	Não	-	F2/F3	-	-
46	1a(98%)	AMHV	SIRP	27/09/1954	M	Branco	19/04/2017	23/11/2016	Manicure/Pedicure	29/07/2017 (até 20/10/2017)	SOFOSBUVIR + DACLATASVIR + RIBAVIRINA (60mg)	Não	-	F3/F4	-	-
48	1a(98%)	SAE	VOTUPORANGA	19/10/1961	M	Pardo	13/04/2017	09/09/2014	Tatuagem	NAIVE	-	Não	-	F1	-	-
49	1a (97%)	SAE	VOTUPORANGA	04/02/1970	M	Negro	14/02/2017	23/11/2015	Parenteral	NAIVE	-	Não	-	-	-	-
54	1a (97%)	SAE	VOTUPORANGA	12/02/1958	F	Branco	21/03/2017	10/02/2004	Ignorado	2005	PEGINTERFERON + RIBAVIRINA	Não	-	-	-	-
56	1a (97%)	AMHV	SIRP	11/05/1959	M	Pardo	23/03/2017	20/09/2006	Seringa de Vidro	30/08/2008	PEGINTERFERON + RIBAVIRINA	28/10/2017	SOFOSBUVIR + DACLASTAVIR + RIBAVIRINA (60mg)	F3/F4	-	Não Responderor
59	1a (96%)	AMHV	SIRP	03/11/1954	F	Pardo	28/03/2017	10/06/2016	Transfusão de Sangue	11/07/2017	SOFOSBUVIR + DACLATASVIR + RIBAVIRINA (60mg)	Não	-	F3/F4	-	-
60	1a (95%)	SAE	VOTUPORANGA	29/01/1975	F	Branco	28/03/2017	04/07/2008	Drogas Injetáveis	NAIVE	-	Não	-	-	C 316 Y	-
61	1a (97%)	SAE	SANTA FÉ DO SUL	26/05/1946	F	Branco	23/03/2017	05/10/2016	Transfusão de Sangue	01/10/2017	SOFOSBUVIR + DACLATASVIR	Não	-	-	-	-
63	1a (97%)	CADIP	FERNANDOPOLIS	26/01/1967	F	Branco	05/04/2017	24/03/2017	Ignorado					-	-	-
64	1a (96%)	HEC	CATANDUVA	09/05/1961	F	Branco	06/04/2017	18/06/2014	Medicação Injetável	20/05/2015	PEGINTERFERON + RIBAVIRINA	Não	-	F2A1	-	-
65	1a (98%)	HEC	CATANDUVA	14/05/1972	M	Branco	06/04/2017	23/05/2017	Drogas Injetáveis					-	-	-
67	1a (98%)	AMHV	SIRP	02/05/1952	M	Branco	18/04/2017	06/04/2004	Agulhas de Acupuntura	22/11/2004	PEGINTERFERON + RIBAVIRINA	25/10/2016	SOFOSBUVIR + DACLASTAVIR + RIBAVIRINA (60mg)	Cirroze	-	Não Responderor

(B) Informações clínicas dos pacientes Genótipo 1b.

ID Paciente	LANL / Blast NCBI	Local/Cidade		Data de Nascimento	Gênero	Cor ou Raça	Data da Coleta	Data do Diagnóstico	Fator de risco de infecção	Início do Tratamento	Terapia	Retratamento	Terapia Secundária	Biópsia ¹	RAS	Resposta Clínica
1	1b(96%)	SAE	JALES	15/08/1977	F	Pardo	01/03/2017	23/12/2015	Ignorado	NAIVE	-	Não	-	F2/F3	-	-
3	1b(96%)	CADIP	FERNANDOPOLIS	09/03/1973	M	Branco	15/02/2017	23/01/2015	Ignorado	09/09/2015	INTERFERON + RIBAVIRINA	24/05/2017	SOFOSBUVIR + DACLATASVIR	F2/F3	-	Não Responder
13	1b(97%)	AMHV	SJRP	02/01/1961	M	Branco	09/03/2017	28/02/2013	Transfusão de Sangue	10/10/2015 (até 12/09/2016)	INTERFERON + RIBAVIRINA	Não	-	F1/A1	-	-
14	1b(97%)	SAE	VOTUPORANGA	20/11/1970	F	Branco	14/03/2017	17/03/2016	Parenteral	22/06/2017	SOFOSBUVIR + DACLATASVIR	Não	-	F2/F3	-	-
21	1b(97%)	AMHV	SJRP	01/01/1949	M	Branco	21/03/2017	08/06/2016	Material Cortante	23/06/2017	SOFOSBUVIR + DACLATASVIR + RIBAVIRINA	Não	-	F3	-	-
23	1b(97%)	SAE	SANTA FÉ DO SUL	20/03/1954	M	Branco	23/03/2017	10/04/2017	Ignorado	NAIVE	-	Não	-	-	-	-
29	1b(97%)	HEC	CATANDUVA	19/06/1950	F	Branco	06/04/2017	06/04/2017	Ignorado					-	-	-
35	1b(95%)	SAE	JALES	06/03/1955	M	Pardo	05/04/2017	26/10/2011	Sexual	30/06/2014	INTERFERON + RIBAVIRINA	20/07/2017	SOFOSBUVIR + DACLASTAVIR	A2/F0	-	Não Responder
36	1b(98%)	SAE	JALES	30/11/1950	F	Branco	11/04/2017	15/06/2014	Ignorado	05/03/2015	INTERFERON + RIBAVIRINA	07/09/2017	SOFOSBUVIR + DACLASTAVIR	F2/F3	-	Recidivante
45	1b(95%)	CADIP	FERNANDOPOLIS	01/04/1947	F	Branco	18/04/2017	21/11/2016	Ignorado	NAIVE	-	Não	-	F3/F4	-	-
50	1b (97%)	AMHV	SJRP	10/07/1948	M	Branco	07/03/2017	21/06/2005	Sexual	15/06/2017	SOFOSBUVIR + DACLATASVIR + RIBAVIRINA (90mg)	Não	-	Cirrose	-	-
51	1b (97%)	AMHV	SJRP	07/09/1971	M	Branco	08/03/2017	24/06/2007	Drogas Injetáveis	15/07/2017	SOFOSBUVIR + DACLATASVIR + RIBAVIRINA (60mg)	Não	-	F2A1	C 316 N, Q 309 R	-
52	1b (96%)	SAE	VOTUPORANGA	23/07/1962	F	Branco	13/03/2017	02/02/2016	Parenteral	31/01/2017	SOFOSBUVIR + DACLATASVIR	Não	-	-	C 316 N, Q 309 R	-
53	1b (96%)	SAE	VOTUPORANGA	28/10/1980	F	Branco	14/03/2017	13/08/2014	Parenteral	14/08/2017	SOFOSBUVIR + DACLATASVIR	Não	-	-	C 316 N, Q 309 R	-
58	1b (96%)	AMHV	SJRP	22/05/1949	F	Branco	28/03/2017	04/10/2016	Procedimento Cirúrgico	24/06/2017	SOFOSBUVIR + DACLATASVIR (60mg)	Não	-	Cirrose	-	-
62	1b (97%)	AMHV	SJRP	21/07/1969	M	Branco	04/04/2017	23/07/2007	Drogas Injetáveis	15/07/2017	SOFOSBUVIR + DACLASTAVIR + RIBAVIRINA (60mg)	Não	-	F2/A1	-	-

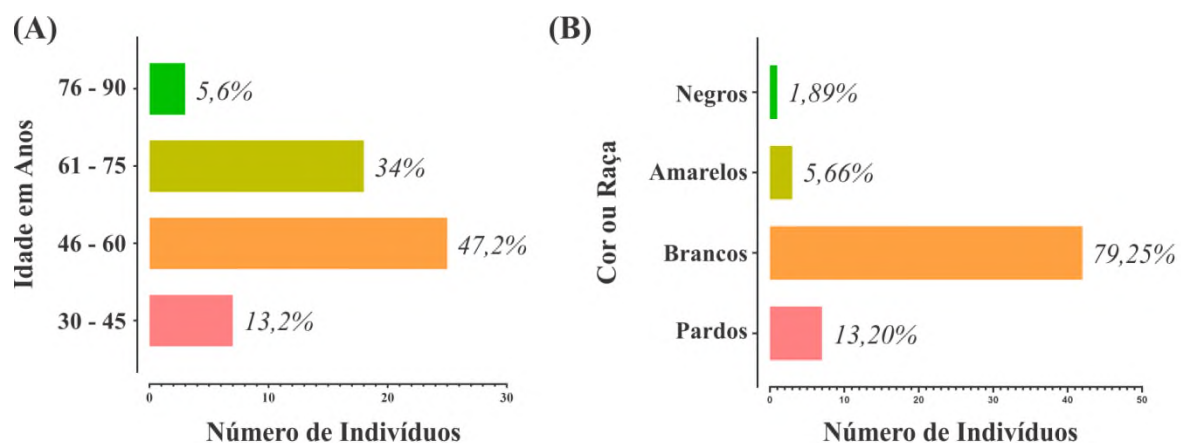
(C) Informações clínicas dos pacientes Genótipo 3a

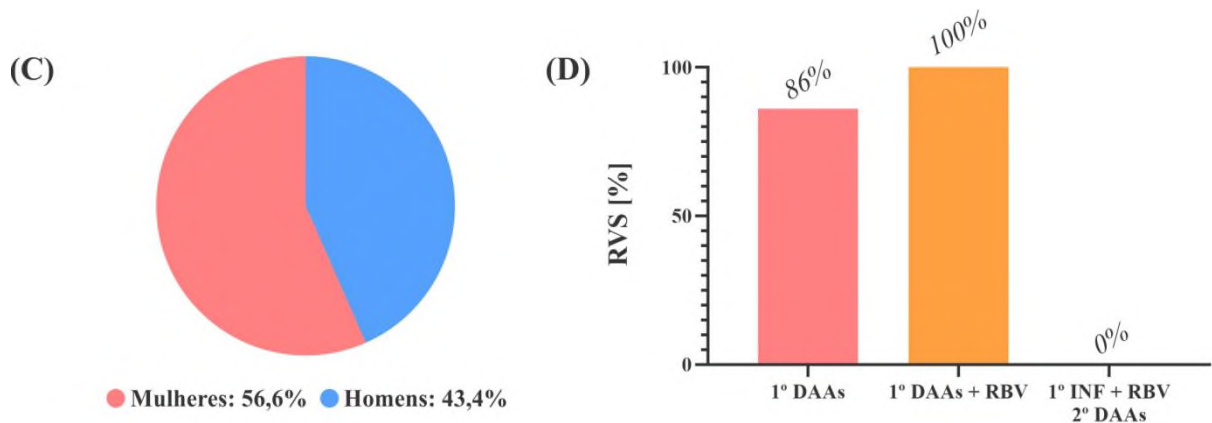
ID Paciente	LANL / Blast NCBI	Local/Cidade		Data de Nascimento	Gênero	Cor ou Raça	Data da Coleta	Data do Diagnóstico	Fator de risco de infecção	Início do Tratamento	Terapia	Retratamento	Terapia Secundária	Biópsia ¹	RAS	Resposta Clínica
6	3a(95%)	AMHV	SJRP	30/05/1961	F	Amarelo	07/03/2017	25/01/2017	Manicure/Pedicure	NAIVE	-	Não	-	F2/F3	-	-
16	3a(97%)	SAE	VOTUPORANGA	25/09/1956	F	Branco	14/03/2017	14/07/2014	Parenteral	04/08/2017	SOFOSBUVIR + DACLATASVIR + RIBAVIRINA	Não	-	F2/F3	-	-
17	3a(95%)	SAE	VOTUPORANGA	19/06/1941	F	Branco	14/03/2017	28/11/2015	Hemodiálise	22/06/2017	SOFOSBUVIR + DACLATASVIR	Não	-	F3/F4	-	-
30	3a(97%)	HEC	CATANDUVA	20/03/1974	F	Branco	06/04/2017	02/10/2006	Drogas Injetáveis					-	-	-
38	3a(97%)	HEC	CATANDUVA	12/03/1962	F	Branco	13/04/2017	24/07/2007	Procedimento Cirúrgico					-	-	-
39	3a(97%)	HEC	CATANDUVA	08/09/1951	F	Branco	17/04/2017	23/05/2017	Procedimento Cirúrgico					-	-	-
42	3a(95%)	HEC	CATANDUVA	23/08/1985	M	Branco	24/04/2017	21/02/2017	Sexual					-	-	-
47	3a(96%)	SAE	VOTUPORANGA	21/07/1949	M	Branco	13/04/2017	03/10/2014	Parenteral	30/03/2017	SOFOSBUVIR + DACLATASVIR	Não	-	F2/F3	-	Não Responder

Nota TABELA 4 - (1) Biópsia realizada para avaliar a função hepática. Usa-se a escala METAVIR, que é exclusiva para pacientes com hepatite C crônica. A letra “F” informa o grau de fibrose ou cirrose e a letra “A”, a atividade necroinflamatória. F0 – fígado em perfeito estado; F1 – com fibrose mínima; F2 – existência de fibrose moderada; fibrose avançada; F4 – cirrose ou uma fibrose muito avançada. A0 – atividade inflamatória mínima ou inexistente, progredindo até A3 – alta atividade inflamatória, progressão mais rápida para fibrose.

Sobre a idade dos indivíduos infectados, o grupo entre 46 e 60 anos é o mais prevalente, compreendendo 47,2 % dos infectados, seguido do grupo de 61 a 75 anos, com 34 %, 30 a 45 com 13,2 % e, por fim, o de 76 a 90 anos de idade com 5,6 % dos infectados (Tabela 4; Figura 8A). Na Figura 8B podemos observar o predomínio de indivíduos que se consideram brancos, sendo estes 79,25 % dos infectados, seguidos de 13,20 % de pardos, 5,66 % de amarelos, e o grupo com menos infectados foi dos que se consideram negros, 1,89%. Em (8C), a distribuição dos pacientes foi feita de acordo com o gênero, em que mais mulheres foram o grupo mais prevalente, compreendendo 56,6% das amostras. A Figura 8D compara a taxa RVS dos pacientes que fizeram tratamento com DAAs como primeira ou segunda abordagem. Podemos verificar que entre os pacientes que trataram primeiramente com DAA, a RVS foi de 86%, em que 6 dos 7 pacientes foram respondedores; dos pacientes que fizeram tratamento duplo com DAAs e ribavirina, a RVS foi de 100%, todos responderam ao tratamento; e entre aqueles que fizeram o primeiro tratamento com interferon e ribavirina, e um segundo tratamento com DAAs, a RVS foi de 0%, ou seja, nenhum deles responderam ao tratamento.

Figura 8 – Características da população de estudo. (A) Pacientes separados por idade, em intervalos de 15 anos, sendo a idade mais baixa 30 anos e a mais alta 90 anos. (B) Divisão étnica de acordo com a cor ou raça declarada durante a realização do tratamento. (C) Divisão por gênero, onde há o predomínio de mulheres. (D) Taxa de Resposta Virológica Sustentada (RVS) dos pacientes que fizeram tratamentos usando DAAs como primeira ou segunda abordagem.

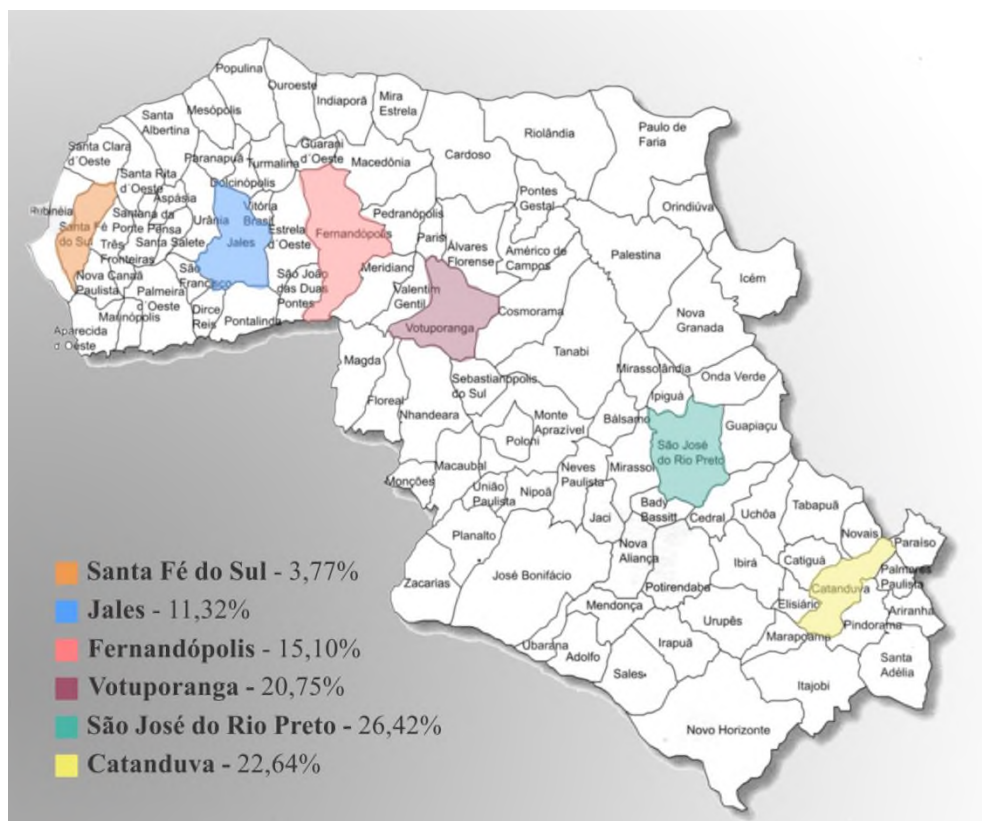




As amostras foram colhidas na região noroeste do estado de São Paulo, como demonstra a Figura 9. A cidade com maior número de indivíduos foi São José do Rio Preto, com 26,42% dos pacientes, seguida de Catanduva, com 22,64%, depois Votuporanga, com 20,75%, Fernandópolis, com 15,10%, Jales, 11,32% e, finalmente, Santa Fé do Sul, com 3,77%.

Figura 9 – Pacientes distribuídos por porcentagem de acordo com a cidade na região noroeste paulista. Fonte: Mapa adaptado de Assembleia Legislativa do Estado de São Paulo, “Região Administrativa de São José do Rio Preto”. Disponível em:

<<https://www.al.sp.gov.br/geral/noticia/detalhe.imagem.jsp?id=51396>>, acesso em 08 de julho de 2019.

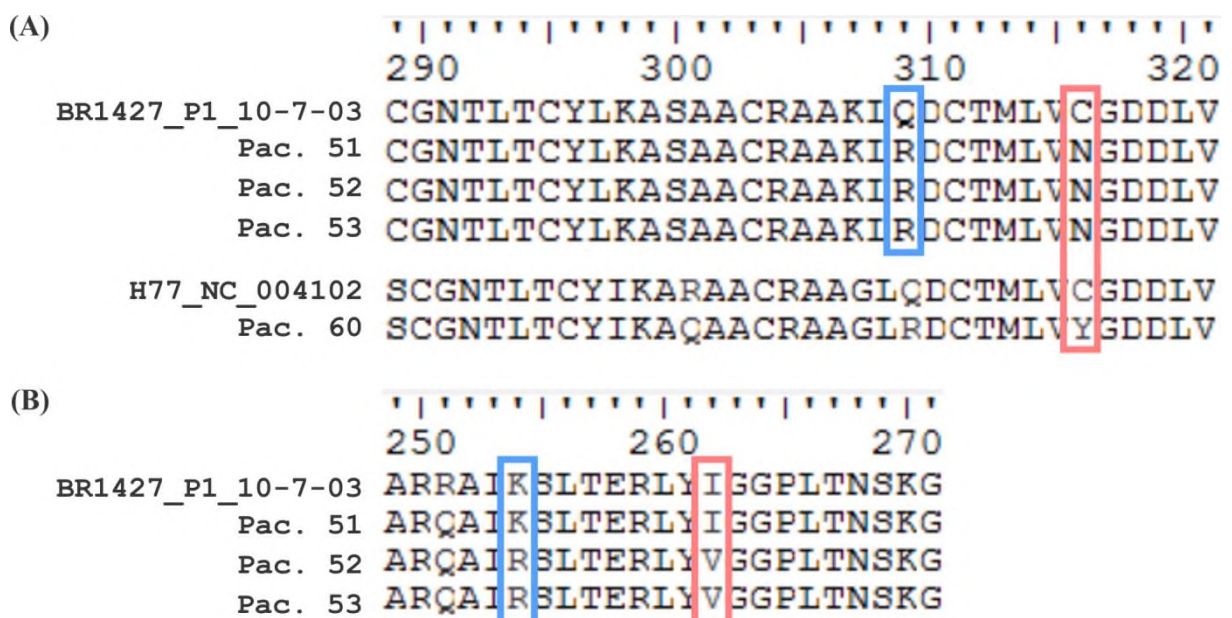


4.2. Análise da Variabilidade Genética das Sequências e Investigação das RAS

As amostras de HCV dos 53 pacientes infectados pelos genótipos 1a, 1b ou 3a foram amplificadas e sequenciadas, como descrito anteriormente na Metodologia. As sequências foram avaliadas quanto à qualidade e a similaridade por meio dos algoritmos BLAST e LANL (Tabela 4).

A cerca das sequências HCV 1b, ambas as RAS C316N e Q309R foram observadas nas sequências dos pacientes 51, 52 e 53 (Figura 10A). Das sequências do genótipo 1a, apenas a amostra 60 apresentou a RAS C316Y, previamente descritas na literatura para a região amplificada (Figura 10A). Nenhuma RAS foi identificada nas sequências de HCV 3a. Outras substituições não descritas na literatura como RAS foram observadas na sequência do indivíduo 51, nas posições R254K e V262D, quando comparado com os outros pacientes e às sequências referência do genótipo (Figura 10B).

Figura 10 – Alinhamento das sequências provenientes de amostras dos pacientes do estudo. (A) Pacientes 51, 52, 53 e da referência BR1427_P1_10-7-03, citada anteriormente, genótipo 1b. Em destaque, as RAS Q309R (azul) e C316N (vermelho). Abaixo, o paciente 60 com a RAS C316Y, também destacada em vermelho, alinhado com a referência H77_NC_004102. (B) Alinhamento das sequências do genótipo 1b com destaque para as diferenças do paciente 51 e os 52 e 53 pela presença das substituições dos aminoácidos não descritas na literatura nas posições R254K e V262D, em azul e vermelho, respectivamente.

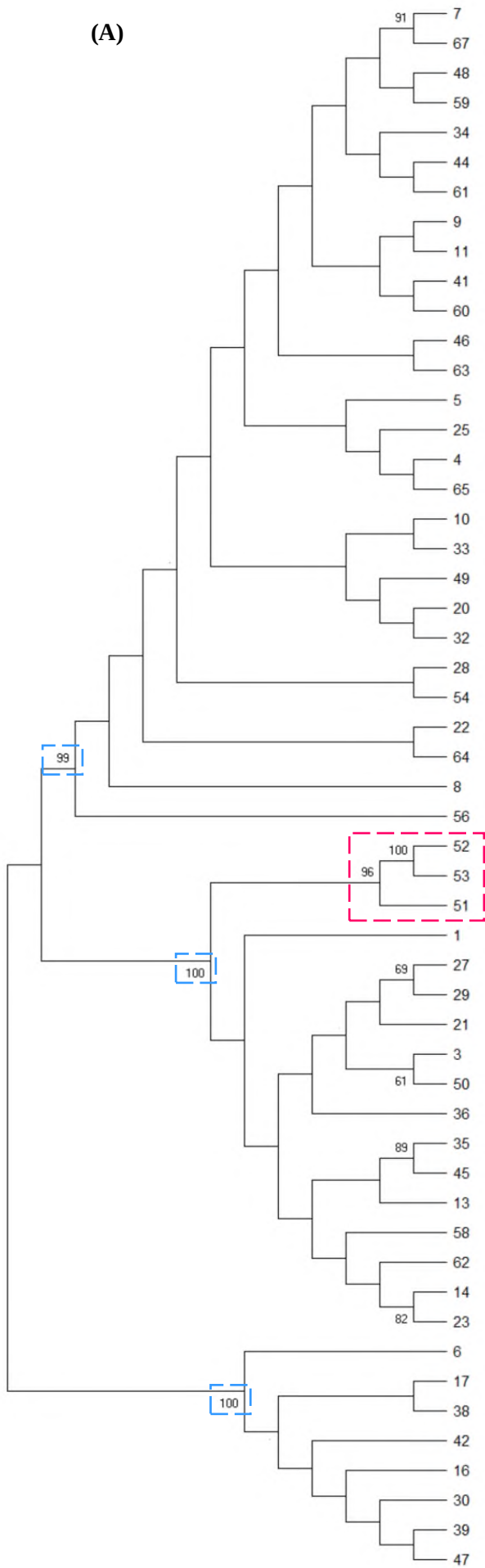
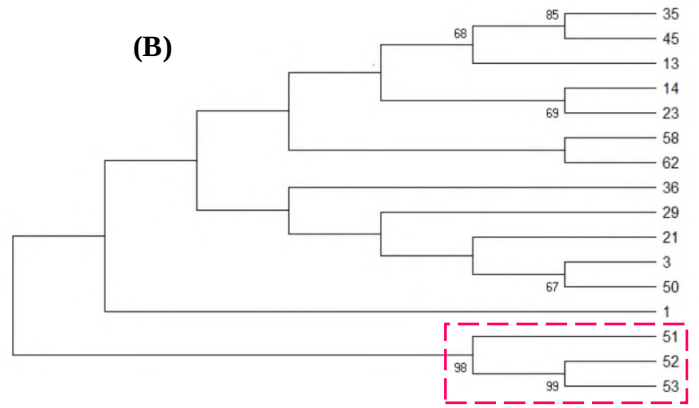


4.3. Análise Filogenética

A árvore oriunda da reconstrução filogenética com as 53 sequências analisadas pode ser observada na figura 9A. Os clados que separam os genótipos 1a, 1b e 3a apresentam valores de *bootstraps* de 99%, 100% e 100%, respectivamente, confirmando as análises anteriores de genotipagem, destacados em azul na Figura 11A.

Os resultados das análises demonstraram que as sequências 51, 52 e 53 do HCV 1b, que apresentaram as RAS C316N e Q309R (Figura 10A), se apresentaram em um mesmo ramo monofilético, com sustentação de *bootstraps* de 96 % (Figura 11). Adicionalmente, um segundo clado agrupa as sequencias 52 e 53, com *bootstrap* de 100 % (Figura 11). A variabilidade observada entre estas sequências pode ser devido a substituições não descritas na literatura como RAS, observadas na sequência do indivíduo 51, nas posições R254K e V262D, quando comparado com os outros pacientes e às sequências referência do genótipo (Figura 10B).

Figura 11 – Árvore filogenética não enraizada com 53 sequências de 308 nucleotídeos da região NS5B provenientes de amostras de pacientes infectados com HCV genótipos 1a, 1b e 3a. (A) Destaques em vermelho indicam o clado das sequências 51, 52 e 53, que contém os RAS C316N e Q309R. Valores de *bootstrap* obtidos com 1000 réplicas. Na figura estão representados os *bootstrap* com valores acima de 60. (B) Filogenia apenas das sequências do genótipo 1b, com ênfase no ramo monofilético que agrupa as sequencias 51, 52 e 53.

(A)**(B)**

5. Discussão

Por ter prevalência mundial e estar relacionada a doença hepática crônica, a hepatite C tem sido alvo constantes de pesquisas. A inexistência de uma vacina para a prevenção das infecções resultou em avanço significativo no tratamento antiviral contra o HCV nos últimos anos. A substituição da terapia com interferon e ribavirina pelos antivirais de ação direta melhorou sensivelmente a qualidade de vida dos pacientes, já que os DAAs interferem principalmente no ciclo de replicativo viral, e não apenas nas respostas imunológicas do organismo, gerando menos efeitos colaterais (PUCHADES RENAU; BERENGUER, 2018).

As novas descobertas sobre o uso da maquinaria celular para a replicação viral do HCV permitiram um melhor entendimento da atividade NS5B, e assim os medicamentos inibidores desta enzima começaram a ser implementados. Os antivirais de ação direta desta classe atuam principalmente na região da palma da NS5B, entre os aminoácidos nas posições 287 e 371, que é a região mais conservada e onde se localiza o sítio ativo da enzima. As substituições que conferem resistência a esta classe, ou a um antiviral específico, se concentram em grande parte nesta região genômica viral (DONALDSON *et al.*, 2014).

Dentre os resultados obtidos no presente estudo, destaca-se o fato de que 67% dos pacientes que foram submetidos previamente à terapia com interferon e ribavirina, necessitaram de uma segunda abordagem terapêutica, utilizando DAAs (sofosbuvir e daclastavir). Após serem submetidos aos dois protocolos terapêuticos, estes pacientes tiveram uma RVS de 0%, sendo 83,3% não-respondedores e 16,7% recidivantes. Estes dados sugerem que a terapia prévia com INF e RBV tende a interferir na eficácia da terapia posterior com antivirais de ação direta. Além disso, todos os pacientes que tiveram DAAs como primeira abordagem de tratamento foram respondedores, alcançando uma taxa de RVS de 86% e os que trataram primeiro com DAAs e RBV tiveram uma RVS de 100%.

Adicionalmente aos efeitos colaterais indesejáveis dos tratamentos com INF e RBV, um fator importante é a natureza incerta do mecanismo de ação da RBV. Sabe-se da sua atuação como análogo da purina, e, por conta disto, está envolvida em diversas vias celulares atuando sinergicamente com o INF (PUCHADES RENAU; BERENGUER, 2018). No entanto, dentro da ação antiviral da RBV nas vias celulares, um mecanismo importante é a inibição da replicação do HCV, o que interfere tanto na via da polimerase NS5B quanto nas vias da proteína multifuncional NS5A (TE; RANDALL; JENSEN, 2007). A ação da RBV como um análogo de purina, associada à falta de atividade corretiva da NS5B, resulta em altas taxas de mutações nas

variantes virais dos pacientes cronicamente infectados, submetidos a este protocolo terapêutico (ASAHINA *et al.*, 2005). Isto, além de potencialmente propiciar a falha do primeiro tratamento, poderia resultar na criação de um efeito de gargalo de garrafa (*bottleneck effect*) na população viral, ou seja, o tratamento prévio com INF e RBV poderia selecionar variantes resistentes, que seriam um fator para os pacientes retratados com DAAs não respondessem ao tratamento ou fossem recidivantes. Um estudo feito por JARDIM *et al.* para a avaliação de quasispécies em pacientes infectados cronicamente sugeriu que a composição de diversas quasispécies no início do tratamento dos pacientes estudados, seguida por um aumento de determinadas quasispécies predominantes após o tratamento de pacientes não-respondedores e recidivantes, demonstra uma vantagem para o vírus se manter no organismo (JARDIM *et al.*, 2009).

A resistência ao tratamento está associada a um conjunto de fatores. O mecanismo de resistência associado às RAS ainda não está muito bem descrito, assim, a presença de uma substituição isolada pode não conferir resistência ao tratamento. Sabe-se que a combinação das RAS L159F e L320F ou C316N, por exemplo, interferem diretamente na ação do sofosbuvir, tendo como alvo a região da palma da NS5B (DONALDSON *et al.*, 2014; HANG *et al.*, 2009). Além disso, um estudo UCHIDA, Y. *et al.* demonstrou que pacientes com tratamento prévio com RBV tiveram menos frequência da substituição C316N se comparados com os que não trataram com este medicamento (UCHIDA *et al.*, 2018). Assim como essas RAS, C316N/Y e Q309R já foram associadas com as variantes resistentes aos DAAs. A propagação dessas mutações dentro da região noroeste paulista é preocupante, pois pode aumentar o número de indivíduos resistentes ao tratamento. Portanto, a vigilância das variantes circulantes na população de infectados deve ser feita regularmente. Um estudo recente feito por Costa e colaboradores avaliou mais de 100 pacientes infectados por HCV no Rio de Janeiro comprovando a presença das substituições de aminoácidos nas posições 159 e 316 da NS5B do genótipo 1b. Apesar da maioria dos brasileiros ser suscetível aos regimes terapêuticos com DAAs, a presença dessas RAS nas variantes da região abre a possibilidade para a implementação de variantes virais resistentes (COSTA *et al.*, 2019).

No presente estudo, as RAS C316N e Q309R na palma da NS5B foram observadas nas sequências provenientes de amostras dos pacientes 51, 52 e 53. As sequências desses pacientes se agruparam em um mesmo ramo monofilético, com sustentação de *bootstrap* de 99%, demonstrando alta similaridade entre as variantes virais desses pacientes. Apesar desses pacientes terem apresentado RVS após terapia com DAAs, a identificação das RAS nas amostras desses pacientes é um importante indicativo de substituições que resistência que estão

circulando na região. As mutações no aminoácido C316 têm sido frequentes em variantes asiáticas, além disso, têm sido reportadas em muitas análises no Brasil (PERES-DA-SILVA; BRANDÃO-MELLO; LAMPE, 2017). Adicionalmente, um segundo ramo monofilético foi apresentado na reconstrução da topologia da árvore filogenética, agrupando as sequências 52 e 53, demonstrando que essas são mais próximas geneticamente quando comparadas a sequência 51. Curiosamente, os pacientes 52 e 53 foram atendidos e diagnosticados em Votuporanga, diferentemente do paciente 51 que foi atendido em São José do Rio Preto. Análises adicionais estão sendo realizadas para um melhor entendimento das relações genéticas e filogenéticas dessas sequências.

Todos os pacientes deste estudo que fizeram tratamento com DAAs, incluindo os não-respondedores, utilizaram tanto o antiviral sofosbuvir, cujo alvo é a NS5B, quando o daclatasvir, que tem alvo a NS5A, proteína multifuncional que também regula a replicação viral. Por causa da atuação diversa da NS5A no ciclo de vida do HCV, principalmente no complexo de replicação e na montagem dos vírus dentro da célula, a taxa de mutações na sequência por substituição é alta (BARTOLINI *et al.*, 2017; DIETZ *et al.*, 2018; MANNS, MICHAEL P. *et al.*, 2017). Assim, com relação aos pacientes não-respondedores, para melhor elucidação da não resposta ao tratamento, análises adicionais da região NS5A serão realizadas, já que, devido à natureza desta proteína, as RAS são frequentes.

Finalmente, os fatores de transmissão do vírus dentro da população estudada se assemelharam ao padrão nacional notificado pelo Ministério da Saúde, já que em seu último boletim epidemiológico sobre Hepatite C foi divulgado que o maior percentual de provável fonte de infecção foi referente ao uso de drogas, com 13,2% dos casos (BRASIL, 2018). No presente estudo, o montante relacionado ao uso de Drogas Injetáveis ou Inaláveis compreendeu 17% dos casos notificados, sendo esta a principal rota de transmissão do vírus. A transmissão do HCV através do compartilhamento de agulhas, seringas e outros materiais relacionados ao abuso de drogas lidera os fatores de risco no país, atingindo principalmente motoristas de caminhão, pessoas que estiveram na prisão e moradores de rua (TELES *et al.*, 2018). Isso demonstra a importância do acompanhamento das variantes virais dentro da população, principalmente dos que tiveram contato com o vírus através desta rota de transmissão. Os pacientes que não apresentaram a provável fonte ou mecanismo de infecção, ou a tiveram como “ignorada”, compreenderam 30,3% dos casos. Apesar de ainda ser um número alto, é bem menor do que a realidade do Brasil em que a falta de informação para caracterizar as rotas de transmissão somaram 53,7% dos casos notificados (BRASIL, 2018).

CONCLUSÃO

6. Conclusão

- O tratamento prévio com interferon e ribavirina pode ser um fator que colabora para a não resposta a um segundo protocolo terapêutico com DAAs;
- A presença das RAS C316N e Q309R não implica, necessariamente, em resistência ao tratamento com antivirais;
- O estudo das variantes virais circulantes em uma determinada região é importante para a determinação da rota de transmissão de mutações;
- A determinação da presença das RAS nas variantes em resposta aos tratamentos ainda precisa ser melhor elaborado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. Referências:

ABDEL-HAKEEM, M. S.; SHOUKRY, N. H. Protective immunity against hepatitis C: Many shades of gray. *Frontiers in Immunology*, v. 5, n. JUN, 2014.

ALFALEH, F. Z. *et al.* Strategies to manage hepatitis C virus infection disease burden - volume 3. *Journal of Viral Hepatitis*, v. 22, p. 42–65, dez. 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jvh.12474>>.

ASAHINA, Y. *et al.* Mutagenic effects of ribavirin and response to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*, v. 43, n. 4, p. 623–629, out. 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016882780500382X>>.

ASSELAH, T. *et al.* Direct-acting antivirals for the treatment of hepatitis C virus infection: optimizing current IFN-free treatment and future perspectives. *Liver International*, v. 36, p. 47–57, jan. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/liv.13027>>.

BALAGOPAL, A.; THIO, C. L. Editorial Commentary: Another Call to Cure Hepatitis B. *Clinical Infectious Diseases*, v. 61, n. 8, p. 1307–1309, 15 out. 2015. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/civ475>>.

BARTOLINI, B. *et al.* Characterization of naturally occurring NS5A and NS5B polymorphisms in patients infected with HCV genotype 3a treated with direct-acting antiviral agents. *Viruses*, v. 9, n. 8, p. 1–17, 2017.

BERKMAN, S. J.; ROSCOE, E. M.; BOURRET, J. C. Comparing self-directed methods for training staff to create graphs using Graphpad Prism. *Journal of Applied Behavior Analysis*, v. 52, n. 1, p. 188–204, fev. 2019. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jaba.522>>.

BRANDÃO, A. B.; COSTA FUCHS, S. Risk factors for hepatitis C virus infection among blood donors in southern Brazil: a case-control study. *BMC Gastroenterology*, v. 2, n. 1, p. 18, 8 dez. 2002. Disponível em: <<http://bmcgastroenterol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-230X-2-18>>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Hepatites virais - Boletim Epidemiológico. *Ministério da Saúde*, v. 49, n. 31, p. 1–69, 2018.

CACOUN, P. *et al.* Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C. *Arthritis & Rheumatism*,

v. 42, n. 10, p. 2204–2212, out. 1999. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/1529-0131%28199910%2942%3A10%3C2204%3A%3AAID-ANR24%3E3.0.CO%3B2-D>>.

CACOUB, P. *et al.* Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C virus infection. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, v. 3, n. 1, p. 3–14, 28 fev. 2016. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2049936115585942>>.

CAMPIOTTO, S. *et al.* Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, v. 38, n. 1, p. 41–9, jan. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15665987>>.

CASTILHO1, M. C. B. *et al.* Castilho et al 2011. v. 106, n. December, p. 968–975, 2011.

CHAN, D. P. C. *et al.* Sexually acquired hepatitis C virus infection: A review. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 49, n. January 1990, p. 47–58, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2016.05.030>>.

CHOI, K. H. Viral Polymerases. [S.l: s.n.], 2012. p. 267–304. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-0980-9_12>.

CHOO, Q. L. *et al.* Hepatitis C virus: the major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. *British medical bulletin*, v. 46, n. 2, p. 423–41, abr. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2116212>>.

CHOO, Q. L. *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science (New York, N.Y.)*, v. 244, n. 4902, p. 359–62, 21 abr. 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2523562>>.

COSTA, V. D. *et al.* Treatment of chronic HCV infection with DAAs in Rio de Janeiro/Brazil: SVR rates and baseline resistance analyses in NS5A and NS5B genes. *PloS one*, v. 14, n. 5, p. e0216327, 2019.

DAVIS, G. L. *et al.* Treatment of Chronic Hepatitis C with Recombinant Interferon Alfa. *New England Journal of Medicine*, v. 321, n. 22, p. 1501–1506, 30 nov. 1989. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM198911303212203>>.

DIAS, C.; PIPA, S.; MOTA, M. Acute hepatitis C from heterosexual transmission. *IDCases*, v.

14, p. e00448, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214250918301628>>.

DIETZ, J. *et al.* Patterns of Resistance-Associated Substitutions in Patients With Chronic HCV Infection Following Treatment With Direct-Acting Antivirals. *Gastroenterology*, v. 154, n. 4, p. 976- 988.e4, 2018.

DONALDSON, E. F. *et al.* Clinical Evidence and Bioinformatics Characterization of Potential Hepatitis C Virus Resistance Pathways for Sofosbuvir. p. 56–65, 2014.

ELTAHLA, A. *et al.* Inhibitors of the Hepatitis C Virus Polymerase; Mode of Action and Resistance. *Viruses*, v. 7, n. 10, p. 5206–5224, 29 set. 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1999-4915/7/10/2868>>.

EVANS, M. J. *et al.* Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*, v. 446, n. 7137, p. 801–805, 25 abr. 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature05654>>.

FEINSTONE, S. M. *et al.* Transfusion-Associated Hepatitis Not Due to Viral Hepatitis Type A or B. *New England Journal of Medicine*, v. 292, n. 15, p. 767–770, 10 abr. 1975. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM197504102921502>>.

FOURATI, S.; PAWLOTSKY, J. M. Virologic tools for HCV drug resistance testing. *Viruses*, v. 7, n. 12, p. 6346–6359, 2015.

GANE, E. *et al.* Strategies to manage hepatitis C virus (HCV) infection disease burden - volume 2. *Journal of Viral Hepatitis*, v. 22, p. 46–73, jan. 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jvh.12352>>.

GOWER, E. *et al.* Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology*, v. 61, n. 1, p. S45–S57, nov. 2014a. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827814005261>>.

GOWER, E. *et al.* Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology*, v. 61, n. 1, p. S45–S57, nov. 2014b. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827814005261>>.

HADZIYANNIS, S. J. Peginterferon- α 2a and Ribavirin Combination Therapy in Chronic

Hepatitis C. *Annals of Internal Medicine*, v. 140, n. 5, p. 346, 2 mar. 2004. Disponível em: <<http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/0003-4819-140-5-200403020-00010>>.

HAJARIZADEH, B.; GREBELY, J.; DORE, G. J. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 10, n. 9, p. 553–562, 2 set. 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrgastro.2013.107>>.

HAMANO, K. *et al.* Mutations in the NS5B region of the hepatitis C virus genome correlate with clinical outcomes of interferon-alpha plus ribavirin combination therapy. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v. 20, n. 9, p. 1401–1409, set. 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1440-1746.2005.04024.x>>.

HANG, J. Q. *et al.* Slow Binding Inhibition and Mechanism of Resistance of Non-nucleoside Polymerase Inhibitors of Hepatitis C Virus. *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 23, p. 15517–15529, 5 jun. 2009. Disponível em: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M808889200>>.

HEZODE, C. *et al.* Resistance analysis in patients with genotype 1–6 HCV infection treated with sofosbuvir/velpatasvir in the phase III studies. *Journal of Hepatology*, v. 68, n. 5, p. 895–903, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.11.032>>.

HONDA, M. *et al.* A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *Journal of virology*, v. 73, n. 2, p. 1165–74, fev. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9882318>>.

JARDIM, A. C. G. *et al.* Quasispecies of hepatitis C virus genotype 1 and treatment outcome with Peginterferon and Ribavirin☆. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 9, n. 4, p. 689–698, jul. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134808002244>>.

JOHNSON, M. *et al.* NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research*, v. 36, n. Web Server, p. W5–W9, 19 maio 2008. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkn201>>.

KAO, C. C.; YI, G.; HUANG, H.-C. The core of hepatitis C virus pathogenesis. *Current Opinion in Virology*, v. 17, p. 66–73, abr. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1879625716000122>>.

KUIKEN, C. *et al.* The LANL hemorrhagic fever virus database, a new platform for analyzing biothreat viruses. *Nucleic Acids Research*, v. 40, n. D1, p. D587–D592, 1 jan. 2012. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkr898>>.

KUMAR, S. *et al.* MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 1 jun. 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mbe/article/35/6/1547/4990887>>.

LAMPE, E. *et al.* Genetic diversity of HCV in Brazil. *Antiviral Therapy*, v. 18, n. 3 Pt B, p. 435–444, 2013. Disponível em: <<http://www.intmedpress.com/journals/avt/abstract.cfm?id=2606&pid=88>>.

LARKIN, M. A. *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics (Oxford, England)*, v. 23, n. 21, p. 2947–8, 1 nov. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17846036>>.

LEE, M.-H. *et al.* Chronic Hepatitis C Virus Infection Increases Mortality From Hepatic and Extrahepatic Diseases: A Community-Based Long-Term Prospective Study. *Journal of Infectious Diseases*, v. 206, n. 4, p. 469–477, 15 ago. 2012. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jis385>>.

LOHMANN, V. Hepatitis C virus cell culture models: an encomium on basic research paving the road to therapy development. *Medical Microbiology and Immunology*, v. 208, n. 1, p. 3–24, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00430-018-0566-x>>.

LONTOK, E. *et al.* Hepatitis C virus drug resistance-associated substitutions: State of the art summary. *Hepatology*, v. 62, n. 5, p. 1623–1632, 2015.

LONTOK, E. *et al.* Resistance analysis in patients with genotype 1–6 HCV infection treated with sofosbuvir/velpatasvir in the phase III studies. *Journal of Hepatology*, v. 89, n. 1, p. 6105–6116, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00705-018-3920-9>>.

LOPES, C. L. R. *et al.* Prevalence, risk factors and genotypes of hepatitis C virus infection among drug users, Central-Western Brazil. *Revista de saúde pública*, v. 43 Suppl 1, p. 43–50, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19669064>>.

LORTHOLARY, O. *et al.* Phylogenetic analyses confirm the high prevalence of hepatitis C

virus (HCV) type 4 in the Seine-Saint-Denis district (France) and indicate seven different HCV-4 subtypes linked to two different epidemiological patterns. *Journal of General Virology*, v. 82, n. 5, p. 1001–1012, 1 maio 2001. Disponível em: <<http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-82-5-1001>>.

MANNS, M. P. *et al.* Long-term clearance of hepatitis C virus following interferon α -2b or peginterferon α -2b, alone or in combination with ribavirin. *Journal of Viral Hepatitis*, v. 20, n. 8, p. 524–529, ago. 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jvh.12074>>.

MANNS, MICHAEL P. *et al.* Hepatitis C virus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 3, p. 17006, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrdp20176>>.

MANNS, MICHAEL P.; VON HAHN, T. Novel therapies for hepatitis C — one pill fits all? *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 12, n. 8, p. 595–610, 28 ago. 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrd4050>>.

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 of virology*, v. 66, n. 5, p. 3225–9, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1313927>><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC241092>>.

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, jan. 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0104423011703013>>.

MEMBRENO, F. E.; LAWITZ, E. J. The HCV NS5B Nucleoside and Non-Nucleoside Inhibitors. *Clinics in Liver Disease*, v. 15, n. 3, p. 611–626, ago. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1089326111000304>>.

MESSINA, J. P. *et al.* Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, v. 61, n. 1, p. 77–87, jan. 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/hep.27259>>.

MOHD HANAFIAH, K. *et al.* Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology*, v. 57, n. 4, p. 1333–

1342, abr. 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/hep.26141>>.

MOSLEY, R. T. *et al.* Structure of Hepatitis C Virus Polymerase in Complex with Primer-Template RNA. *Journal of Virology*, v. 86, n. 12, p. 6503–6511, 2012.

NIEPMANN, M. Hepatitis C Virus RNA Translation. [S.l: s.n.], 2013. p. 143–166. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-27340-7_6>.

NOBLE, C. F. *et al.* Natural occurrence of NS5B inhibitor resistance-associated variants in Brazilian patients infected with HCV or HCV and HIV. *Archives of Virology*, v. 162, n. 1, p. 165–169, 2017.

PAWLOTSKY, J.-M. Hepatitis C Treatment: The Data Flood Goes on—An Update From the Liver Meeting 2014. *Gastroenterology*, v. 148, n. 3, p. 468–479, mar. 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508515000141>>.

PAWLOTSKY, J. New Hepatitis C Therapies: The Toolbox, Strategies, and Challenges. *Gastroenterology*, v. 146, n. 5, p. 1176–1192, maio 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508514003047>>.

PAWLOTSKY, J. M. Hepatitis C virus population dynamics during infection. *Current topics in microbiology and immunology*, v. 299, p. 261–84, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16568902>>.

PENIN, F. *et al.* Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology*, v. 39, n. 1, p. 5–19, jan. 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/hep.20032>>.

PERALES, C. *et al.* Resistance of hepatitis C virus to inhibitors: Complexity and clinical implications. *Viruses*, v. 7, n. 11, p. 5746–5766, 2015.

PERES-DA-SILVA, A.; BRANDÃO-MELLO, C. E.; LAMPE, E. Prevalence of sofosbuvir resistance-associated variants in Brazilian and worldwide NS5B sequences of genotype-1 HCV. *Antiviral Therapy*, v. 22, n. 5, p. 447–451, 2017.

PHILLIPS, J. L.; GNANAKARAN, S. BioEdit: An important software for molecular biology. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 83, n. 1, p. 46–65, 2015. Disponível em: <http://www.academia.edu/2350041/BioEdit_An_important_software_for_molecular_biology>.

PILERI, P. Binding of Hepatitis C Virus to CD81. *Science*, v. 282, n. 5390, p. 938–941, 30 out. 1998. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.282.5390.938>>.

PLOSS, A. *et al.* Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature*, v. 457, n. 7231, p. 882–886, 28 fev. 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature07684>>.

POWDRILL, M. H. *et al.* Contribution of a mutational bias in hepatitis C virus replication to the genetic barrier in the development of drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 51, p. 20509–20513, 20 dez. 2011. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1105797108>>.

PUCHADES RENAULT, L.; BERENGUER, M. Introduction to hepatitis C virus infection: Overview and history of hepatitis C virus therapies. *Hemodialysis International*, v. 22, p. S8–S21, 2018.

RAO, V. B. *et al.* Hepatitis C seroprevalence and HIV co-infection in sub-Saharan Africa: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 15, n. 7, p. 819–824, 2015. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00006-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00006-7)>.

RAZAVI, H. *et al.* The present and future disease burden of hepatitis C virus (HCV) infection with today's treatment paradigm. *Journal of Viral Hepatitis*, v. 21, p. 34–59, maio 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jvh.12248>>.

RICE, S. NIH Public Access. *Nat.Med*, v. 19, n. 7, p. 837–849, 2014.

S., P. *et al.* Naturally occurring resistance mutations to inhibitors of HCV NS5A region and NS5B polymerase in DAA treatment-naïve patients. *Virology Journal*, v. 10, p. 1–7, 2013. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L52924005%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-10-355%5Cnhttp://ak7rt6cb3z.search.serialssolutions.com?sid=EMBASE&issn=1743422X&id=doi:10.1186%2F1743-422X-10-355&atitle=Naturally+o>>.

SARRAZIN, C. *et al.* Prevalence of Resistance-Associated Substitutions in HCV NS5A, NS5B, or NS3 and Outcomes of Treatment With Ledipasvir and Sofosbuvir. *Gastroenterology*, v. 151, n. 3, p. 501–512.e1, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2016.06.002>>.

SCARSELLI, E. *et al.* The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *The EMBO Journal*, v. 21, n. 19, p. 5017–5025, 1 out. 2002. Disponível em: <<http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/cdf529>>.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico - Hepatites virais. *Ministério da Saúde*, v. 48, n. 24, p. 1–65, 2017. Disponível em:

<http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2016/59121/boletim_hepatites_05_08_2016_pdf_96185.pdf>.

SIMMONDS, P. The Origin of Hepatitis C Virus. [S.l: s.n.], 2013. p. 1–15. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-27340-7_1>.

STANAWAY, J. D. *et al.* The global burden of viral hepatitis from 1990 to 2013: findings from the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*, v. 388, n. 10049, p. 1081–1088, set. 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673616305797>>.

STASI, C. *et al.* The epidemiological changes of HCV and HBV infections in the era of new antiviral therapies and the anti-HBV vaccine. *Journal of Infection and Public Health*, v. 9, n. 4, p. 389–395, jul. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S187603411500101X>>.

STROSBERG, A. D. *et al.* Core as a novel viral target for hepatitis C drugs. *Viruses*, v. 2, n. 8, p. 1734–1751, 2010.

SVAROVSKAIA, E. S. *et al.* Infrequent Development of Resistance in Genotype 1–6 Hepatitis C Virus–Infected Subjects Treated With Sofosbuvir in Phase 2 and 3 Clinical Trials. *Clinical Infectious Diseases*, v. 59, n. 12, p. 1666–1674, 15 dez. 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article/59/12/1666/2895511>>.

SVAROVSKAIA, E. S. *et al.* L159F and V321A Sofosbuvir-Associated Hepatitis C Virus NS5B Substitutions. *Journal of Infectious Diseases*, v. 213, n. 8, p. 1240–1247, 15 abr. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jiv564>>.

SWAIN, M. G. *et al.* A Sustained Virologic Response Is Durable in Patients With Chronic Hepatitis C Treated With Peginterferon Alfa-2a and Ribavirin. *Gastroenterology*, v. 139, n. 5, p. 1593–1601, nov. 2010. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508510010516>>.

TANG, H.; GRISÉ, H. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. *Clinical Science*, v. 117, n. 2, p. 49–65, 1 jul. 2009. Disponível em: <<http://www.clinsci.org/cgi/doi/10.1042/CS20080631>>.

TE, H. S.; RANDALL, G.; JENSEN, D. M. Mechanism of action of ribavirin in the treatment of chronic hepatitis C. *Gastroenterology and Hepatology*, v. 3, n. 3, p. 218–225, 2007.

TELES, S. A. *et al.* Emergent predictors of hepatitis C infection among non-injection drug users. *Journal of Infection and Public Health*, v. 11, n. 4, p. 526–529, jul. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1876034117302836>>.

TONG, X. *et al.* In Vivo Emergence of a Novel Mutant L159F/L320F in the NS5B Polymerase Confers Low-Level Resistance to the HCV Polymerase Inhibitors Mericitabine and Sofosbuvir. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 209, n. 5, p. 668–675, 1 mar. 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jit562>>.

TSUKIYAMA-KOHARA, K.; KOHARA, M. Hepatitis C virus: Viral quasispecies and genotypes. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 1, p. 1–8, 2018.

UCHIDA, Y. *et al.* Significance of NS5B Substitutions in Genotype 1b Hepatitis C Virus Evaluated by Bioinformatics Analysis. *Scientific Reports*, n. May, p. 1–12, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-27291-7>>.

VERCAUTEREN, K. *et al.* Targeting a host-cell entry factor barricades antiviral-resistant HCV variants from on-therapy breakthrough in human-liver mice. *Gut*, v. 65, n. 12, p. 2029–2034, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Hepatitis C*. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>>. Acesso em: 1 maio 2019.

ZHOU, D. *et al.* Separation of near full-length hepatitis C virus quasispecies variants from a complex population. *Journal of Virological Methods*, v. 141, n. 2, p. 220–224, maio 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166093406004460>>.