

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO
MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA A PESQUISA
BIOMÉDICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FORMAÇÃO TÉCNICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOFÍSICA E FISILOGIA

Aluna: Elizabeth Valentin de Souza
Orientadores: Rosane Silva e Edson Rondinelli
Co-orientadora: Luísa Hoffmann

Protocolo para o uso de ferramenta molecular empregada na produção da NS3 protease variante do vírus da hepatite C de pacientes crônicos.

Volume único
Rio de Janeiro – RJ
2014

ELIZABETH VALENTIN DE SOUZA

TÍTULO: Protocolo para o uso de ferramenta molecular empregada na produção da NS3 protease variante do vírus da hepatite C de pacientes crônicos.

Volume único

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Formação Técnica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção de título de Mestre em Formação para a Pesquisa Biomédica. Área de concentração: Biofísica e Fisiologia.

Orientadores: Rosane Silva e Edson Rondinelli

Co-orientadora: Luísa Hoffmann

Rio de Janeiro, RJ.

2014

Valentin, Elizabeth de Souza.

Protocolo para o uso de ferramenta molecular empregada na produção da NS3 protease variante do vírus da hepatite C de pacientes crônicos. Elizabeth Valentin de Souza. - Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2014.

xvii, 103f.

Orientadores: Rosane Silva/Edson Rondinelli/Luísa Hoffmann

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho / Programa de Pós-graduação do Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica, 2014.

Referências Bibliográficas: 73-90

1. HCV. 2. Protocolo. 3. Ferramenta Molecular. 4. NS3 protease. I. Silva, Rosane; Rondinelli, Edson; Hoffmann, Luísa. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-graduação em Formação Técnica para a Pesquisa Biomédica. III. Protocolo para o uso de ferramenta molecular empregada na produção da NS3 protease variante do vírus da hepatite C de pacientes crônicos.

Elizabeth Valentin de Souza

Protocolo para o uso de ferramenta molecular empregada na produção da NS3 protease variante do vírus da hepatite C de pacientes crônicos.

Rio de Janeiro, 26 de maio de 2014.

Dra. Rosane Silva, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Orientadora).

Dr. Edson Rondinelli, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Orientador).

Dra. Luísa Hoffmann, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Co-orientadora).

Dr. Álvaro da Costa Leitão, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Banca).

Dra. Luciana Jesus da Costa, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Banca).

Dr. Renato Sampaio Carvalho, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Banca).

Dra. Christianne Bandeira de Melo, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Suplente interna e Revisora).

Dra. Ana Beatriz Furlanetto Pacheco, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Suplente externa).

Agradecimentos

Nenhum trabalho é obra de uma pessoa só. Este agradecimento se estende a todos que de maneira direta ou indireta me ajudaram na conclusão deste trabalho. Se há mérito neste trabalho, deve pertencer a todos que contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

Agradeço primeiramente a Deus, pela minha existência.

Agradeço ao meu marido Wilmar por ser um ótimo companheiro, que está sempre disposto a me ajudar em diferentes situações da minha vida. Obrigada por tudo! Sem você não teria conseguido.

Agradeço aos meus pais: Isaias e Marly, por tudo o que fizeram e continuam fazendo por mim. Sou o que sou, graças a eles.

Agradeço ao meu querido irmão Cleverson por todo amor e carinho. Por estar sempre presente em todos os momentos da minha vida.

Aos meus queridos cunhados Aline e Leandro, meus mais novos irmãos. Obrigada pelo amor e carinho de vocês.

Aos meus queridos sogros João e Gonçala por todo amor e carinho.

Agradeço a todos os meus colegas de turma do mestrado profissional pelo companheirismo e dedicação de cada um. Em especial às amigas Jorgete e Joana, obrigada meninas por todo carinho e amizade de vocês.

Aos alunos do laboratório LMMFTC: Silvana, Beatriz, Caleb, Fabiane, Fábio Leão, Pâmela, Catarina, Jennifer, Luciana, Ernesto, obrigada pelo apoio e carinho de vocês.

À Bianca e Thayane que fizeram os dias no laboratório ficarem mais alegres. Obrigada por toda a ajuda, apoio e carinho que vocês me deram.

À Tatiana Nogueira, Sylvia Massilac e a Vanessa Montinelli agradeço por todo apoio e carinho, obrigada pela amizade de vocês.

Aos membros do LMMFTC: Ao Bill por toda a sua dedicação ao laboratório, por estar sempre pronto para ajudar. Ao César por todo carinho, dedicação e conselhos. Obrigada por estar sempre disposto em ajudar a qualquer hora, não só na bancada, mas também na vida pessoal. Ao Jorge Luiz por toda paciência e dedicação nos ensinamentos técnicos no início da minha vida profissional. Obrigada pelo carinho e amizade. A Juliene por estar sempre disposta a incentivar e a ajudar, obrigada pelo carinho e amizade.

A todos do Labfor: Alessandra, Isadora e Victor e em especial a minha amiga Priscila, obrigada pelo carinho e amizade.

Ao professor Alvaro pela dedicação com o curso e com os alunos do MP.

À Luísa, minha co-orientadora, obrigada pela paciência, compreensão, incentivo, apoio, ajuda nos experimentos e nas escritas. Obrigada pelo carinho e amizade.

Aos professores Túran, Débora e Rodrigo Moura pelos ensinamentos e apoio.

Aos professores e orientadores, Edson e Rosane. Obrigada por todo ensinamento, orientação e dedicação, sempre dispostos a ajudar.

Aos membros da banca pela dedicação.

**“Ninguém comete erro maior do que não fazer nada porque só pode
fazer um pouco.”**

(Edmund Burk)

Resumo

Valentin, Elizabeth de Souza. **Protocolo para o uso de ferramenta molecular empregada na produção da NS3 protease variante do vírus da hepatite C de pacientes crônicos.** Rio de Janeiro, 2014. Dissertação (Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

A hepatite C é uma doença causada pela infecção com o vírus da hepatite C (HCV). É considerada um problema de saúde pública no Brasil, com 3 milhões de pessoas infectadas. Apenas 50% dos pacientes tratados com a terapia convencional (interferon peguilado e ribavirina, PEG-IFN/RBV), alcançam sucesso. Por conta dos pacientes que não conseguem obter uma boa resposta ao tratamento com a terapia convencional, outros alvos terapêuticos estão sendo estudados, especialmente os inibidores da NS3 protease viral (IPs). Em trabalho prévio do nosso grupo, em colaboração com o Serviço de Hepatologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da UFRJ, foram coletadas amostras de 68 pacientes com hepatite crônica C de genótipo 1, em momentos diferentes durante o tratamento com PEG-IFN/RBV. Em três destes pacientes foram identificadas mutações de resistência descritas aos inibidores de protease na região da NS3 protease do HCV. É interessante ter o conhecimento prévio de mutações na região da protease NS3 para a escolha adequada do tratamento eficaz com estes novos inibidores. Visando a confeccionar um protocolo para o uso de uma ferramenta molecular empregada na produção *in vitro* da NS3 protease do HCV foi construído um vetor denominado **pET17b NS3/4A Δ domínio protease** que possui um tamanho de 4,7 kb e contém: o domínio NS3 helicase e a NS4A de HCV genótipo 1b, uma região promotora, um sítio de entrada do ribossomo (IRES) e uma região terminadora. Com o objetivo de empregar um protocolo para ensaio fenotípico da NS3 protease destes pacientes, foi realizada a extração do RNA viral destas amostras seguida de transcrição reversa e amplificação da região da NS3 protease através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Cada produto de PCR foi clonado no vetor descrito acima, os clones foram confirmados por sequenciamento e submetidos à transcrição e tradução *in vitro* para produção destas proteases variantes. A caracterização da proteína foi realizada com ensaio de *Western Blot* utilizando os anticorpos contra a NS3 de HCV. Foi concluído

que de fato se tratava da NS3 protease variante. De posse deste protocolo poderemos testar fenotipicamente a NS3 protease variante do vírus da hepatite C de pacientes. Concluimos que a técnica descrita neste estudo possui vantagens em relação a outros ensaios com drogas, pois é uma técnica isenta de sistema de células, o que a torna menos dispendiosa e complexa e sujeita a eventual utilização em rotina em laboratórios clínicos, sendo possível testar se o paciente irá se beneficiar da terapia com IP. Portanto, o protocolo desenvolvido pode contribuir para a escolha do melhor tratamento de IP a ser aplicado nestes pacientes.

Abstract

Hepatitis C is a disease caused by infection with the hepatitis C virus (HCV). It is considered a public health problem in Brazil with 3 million people infected. Only 50% of patients treated with conventional therapy (pegylated interferon and ribavirin, PEG-IFN/RBV) achieve success. On behalf of patients that cannot get a good response to treatment with conventional therapy, other therapeutic targets are being studied, especially the viral NS3 protease inhibitors (PIs). In a previous study from our group, in collaboration with the Serviço de Hepatologia of the University Hospital Clementino Fraga Filho, UFRJ, samples from 68 patients with chronic hepatitis C genotype 1 were collected at different times during treatment with PEG-IFN/RBV. In three of these patients have been identified mutations of resistance to protease inhibitors described in the NS3 protease region of HCV. A suitable choice for the effective treatment with these new inhibitors is interesting to have prior knowledge of mutations in the NS3 protease region. Aiming to develop a protocol to in vitro producing of the HCV NS3 protease, it was constructed the vector called pET17b NS3/4A Δ protease domain which has a size of 4.7 kb and contains: NS3 helicase domain and HCV NS4A genotype 1b, a promoter, a site of ribosome entry and a terminator region. In order to generate a phenotypic assay protocol for the viral NS3 protease region of these patients, RNA extraction was carried out, followed by reverse transcription and the amplification of the NS3 protease region by polymerase chain reaction (PCR). Each PCR product was cloned into the vector described above, the clones were confirmed by sequencing and subjected to in vitro transcription and translation for production of such protease variants. Protein characterization was performed by Western blot assay using antibodies against HCV NS3. It was concluded that in fact it was the NS3 protease variant. Using this protocol we can phenotypically test NS3 protease variant from patient's hepatitis C virus. We conclude that the technique described in this study has advantages, compared to other drug assays, since it is a free cell system technique, which is less costly, complex and can be used in routine clinical laboratories, which can be tested to predict if patients will benefit from PI therapy. Therefore, the protocol developed can contribute to the choice of best PI treatment to be applied to these patients.

Lista de Figuras

Figura 1: Mapa geográfico mostrando a prevalência da infecção pelo vírus da hepatite C	20
Figura 2: Organização do genoma do vírus da hepatite C	22
Figura 3: Ciclo de replicação do vírus da hepatite C	25
Figura 4: Esquema da tradução e processamento das proteínas do HCV	27
Figura 5: Racional experimental do desenvolvimento de protocolo para ensaio fenotípico de proteases NS3 de HCV variantes.....	43
Figura 6: Inserção de terminais homólogos às regiões do vetor pET17b NS3/4A Δ domínio protease por PCR <i>nested</i>	54
Figura 7: Análise do pET17b NS3/4A Δ domínio protease linearizado com NotI.....	55
Figura 8: Análise do plasmídeo linearizado purificado por eletroforese em gel de agarose.....	56
Figura 9: Análise das minipreparações de plasmídeos dos transformantes provenientes da clonagem do fragmento da região gênica da NS3 protease variante no vetor pET17b NS3/4A Δ domínio protease	57
Figura 10: Eletroferograma resultante do sequenciamento do clone p_NS3_1.....	59
Figura 11: Eletroferograma resultante do sequenciamento do clone p_NS3_2.....	59
Figura 12: Eletroferograma resultante do sequenciamento do clone p_NS3_3.....	60
Figura 13: Análise das maxi-preparações de DNA dos transformantes da clonagem dos fragmentos de NS3 protease variantes no pET17b NS3/4A Δ domínio protease.....	61
Figura 14: Perfil do extrato proteico do ensaio da síntese <i>in vitro</i> por SDS-PAGE corado com azul de Comassie.....	62
Figura 15: Detecção por western blotting da protease NS3 sintetizada <i>in vitro</i>	63

Lista de Quadros

Quadro 1: Estimativas das prevalências de anti-HCV e seus respectivos intervalos de confiança (IC95%) e endemicidade de hepatite C para o conjunto das capitais de cada região e Distrito Federal	21
Quadro 2: Efeitos Adversos do Tratamento com IFN e RBV	31
Quadro 3: Mutações de resistência já descritas aos diferentes inibidores de protease ..	33
Quadro 4: Características dos grupos de pacientes estudados.....	45
Quadro 5: Via mutacional para formação das mutações de resistência aos inibidores de protease V36L, T54S e V55A	45
Quadro 6: Iniciadores utilizados para amplificação do HCV dos soros dos pacientes..	47
Quadro 7: Iniciadores utilizados na reação de sequenciamento para confirmação dos clones.....	50

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos.

aa – aminoácido

ALT – alanina aminotransferase

Anti-HCV – marcador sorológico que detecta a presença do anticorpo contra o vírus da hepatite C.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Asp-81 - asparagina-81

b-DNA – *branched* DNA

Cardif - *caspase and recruitment domain – card – adaptor inducing IFN- β - if*

cDNA – DNA complementar

CDC – *Center for Diseases Control*

CHC – carcinoma hepatocelular

CD81 – *Cluster of differentiation 81*

CLDN1 – Claudin-1

CYPA – ciclofilina A

DAAAs - *direct acting antivirals*

DNA – ácido desoxirribonucleico

d-NTP – desoxirribonucleotídeo

DST – doença sexualmente transmissível

ELISA – ensaio imunoenzimático

E1 – proteína do envelope 1

E2 – proteína do envelope 2

ER – retículo endoplasmático

FDA – *Food and Drug Administration*

GFP - *green fluorescent protein*

HBV – vírus da hepatite B

HCV – vírus da hepatite C

HCVcc – culturas de células de HCV

HCVpp – pseudopartículas de HCV

HDV – vírus da hepatite Delta

His-57 - histidina-57

HIV – vírus da imunodeficiência humana

IC - intervalos de confiança
IFN – interferon
IRES – sítio de entrada de ribossomo
ISDR – região determinante da sensibilidade ao interferon
kb – kilobases
kg - kilogramas
kDa – kilodalton
LDL – lipoproteína de baixa densidade
LDs – *lipid droplets*
LMMFTC – Laboratório Macromolecular Firmino Torres de Castro
mg - miligrama
mL - mililitro
MS – Ministério da Saúde
MUI – milhões de unidades internacionais
MW – *membranous web*
nm – nanômetro
NR - não respondedor
NS – não estrutural
N-terminal – NH₂-terminal
OCLN – occudine
OMS – Organização Mundial de Saúde
OR – *odds ratio*
ORF – fase de leitura aberta
pb – pares de bases
PCR – reação em cadeia da polimerase
PEG-IFN – interferon peguilado
RBS - *ribosome entry site*
RBV – ribavirina
REC - recidivante
RIG-I – *retinoc acid inducible gene I*
RNA – ácido ribonucleico
rpm – rotação por minuto
RT – transcrição reversa
RT-PCR – transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

RVS – resposta viral sustentada

SDS – dodecil sulfato de sódio

Ser-139 - serina- na posição 139

SRBI – *scavenger receptor class B type I*

SUS – Sistema Único de Saúde

TBE – tris-borato-EDTA

TLR3 - *toll-like receptor 3*

TRIF - *toll/interleukin-1 receptor-containing adaptor inducing IFN*

UI – Unidade internacional

UTR – região não traduzida

UV – ultra-violeta

µg - micrograma

Sumário

1. Introdução.....	18
1.1 Patologia e transmissão da hepatite C.....	18
1.2 Profilaxia da hepatite C.....	19
1.3 Prevalência da hepatite C.....	19
1.4 O vírus da hepatite C e seu genoma.....	21
1.4.1 O ciclo infeccioso do HCV e função das proteínas virais.....	23
1.4.2 A protease NS3/4A do HCV.....	26
1.5 Aspectos clínicos da hepatite C.....	28
1.6 Diagnóstico da hepatite C.....	29
1.7 Tratamento da hepatite C e seus efeitos colaterais.....	30
1.8 Novos agentes terapêuticos na hepatite C crônica.....	31
1.8.1 Inibidores de Protease (IPs).....	32
1.9 Replicação <i>in vitro</i> do vírus da hepatite C derivados de soros de pacientes....	34
1.9.1 Modelos experimentais para o estudo do vírus da hepatite C <i>in vitro</i>	35
1.9.1.1 Pseudopartículas virais (HCVpp).....	35
1.9.1.2. Replicon subgenômico.....	36
1.9.1.3. Modelo de cultura de células com o vírus da hepatite C.....	37
Justificativa.....	39
Objetivos.....	41
Objetivo Geral.....	41
Objetivos Específicos.....	41
Racional.....	42
Estratégia de desenvolvimento de protocolo para uso de ferramenta molecular empregada na produção da NS3 proteases variantes de HCV, em sistema livre de células.....	42
2. Materiais e Métodos.....	44
2.1 Seleção dos pacientes.....	44
2.2 Preparação das amostras.....	46
2.2.1 Extração do RNA de HCV dos soros.....	46
2.2.2 Reação de transcrição reversa (RT).....	46
2.2.3 Amplificação da região NS3 protease variante do HCV a partir do cDNA... 46	
2.3 Linearização e quantificação do pET17b NS3/4A Δ domínio protease e do fragmento da NS3 protease.....	47

2.4 Inserção da NS3 protease variante no vetor pET 17b NS3/4A Δ domínio protease pela recombinação homóloga.	48
2.5 Transformação Bacteriana e Extração do DNA Plasmidial (Minipreparação).....	48
2.6 Sequenciamento automatizado dos clones.....	49
2.7 Transformação Bacteriana e Extração do DNA Plasmidial (Maxipreparação). ...	50
2.8 Produção das proteases variantes.....	51
2.9 Análise das proteínas sintetizadas <i>in vitro</i>	51
2.9.1 Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).	52
2.9.2 Análise do produto de transcrição e tradução <i>in vitro</i> por <i>Western Blotting</i> . 52	
3 Resultados.....	54
3.1 Obtenção do fragmento correspondendo à região NS3 protease do HCV a partir do soro dos pacientes.	54
3.2 Preparo do vetor pET 17b NS3/4A Δ domínio protease.....	55
3.3 Clonagem através de recombinação homóloga da região gênica da NS3 protease variante amplificada no vetor pET17b NS3/4A Δ domínio protease.	56
3.4 Transformação Bacteriana e Extração do DNA plasmidial (Minipreparações). ..	56
3.5 Sequenciamento automático dos clones.....	58
3.6 Maxi-preparações dos plasmídeos p_NS3_1, p_NS3_2 e p_NS3_3 para ensaios de transcrição e tradução <i>in vitro</i>	60
3.7 Perfil proteico do extrato de ensaio de síntese <i>in vitro</i>	61
3.8 Detecção por Western Blotting com anticorpo específico.....	62
4. Discussão	64
Perspectivas	68
5. Conclusões.....	69
Referências Bibliograficas.....	73
Anexos	91

1. Introdução

1.1 Patologia e transmissão da hepatite C.

A hepatite C é uma doença infectocontagiosa que atua silenciosamente sobre o ser humano. Não apresenta sintomas específicos, podendo ser confundida com várias outras enfermidades. Deste modo silencioso, o vírus da hepatite C (HCV), descoberto em 1989 (Choo *et al.*, 1989) e pertencente ao grupo das viroses sistêmicas hepatotrópicas, se instala nos hepatócitos e atua no fígado do portador. Esta infecção pelo HCV produz um quadro de hepatite aguda podendo ser assintomática ou sintomática. Dependendo do genótipo viral, dos níveis virais circulantes e das condições do hospedeiro, pode evoluir para hepatite crônica, cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) mostra dados nos quais dos 180 milhões de infectados, 150 milhões possuem a forma crônica da doença podendo desenvolver cirrose hepática e/ou CHC. Desde a sua descoberta, o HCV é reconhecido como a maior causa de hepatites crônicas liderando os casos de cirrose e CHC e é a causa mais comum de transplante de fígado em todo o mundo (OMS, 2012; Rubin *et al.*, 2011; Ministério da Saúde (MS), 2005; Kim, 2002; EASL, 1999). Os aspectos clínicos da infecção crônica são heterogêneos e o curso natural da doença é variável e não totalmente compreendido (Lauer and Walker, 2001).

A transmissão do HCV ocorre pelo contato com sangue infectado em virtude de exposição percutânea, transfusão de sangue e/ou hemoderivados e transplantes de doadores infectados. Atualmente, destacam-se como importantes formas de transmissão do HCV: o compartilhamento de objetos para uso de drogas, confecção de tatuagens e colocação de *piercings*, além de objetos de uso pessoal, tais como lâminas de barbear ou depilar, escovas de dente e instrumentos para pedicure/manicure. O HCV é transmitido de forma menos eficiente por exposição de mucosas ou contato com fluidos corporais. A transmissão sexual é pouco frequente, menos de 1%, e ocorre principalmente em pessoas com múltiplas parcerias e com práticas sexuais desprotegidas. A coexistência de alguma doença sexualmente transmissível (DST), incluindo o vírus da imunodeficiência humana (HIV), constitui relevante facilitador para a transmissão. A transmissão vertical do HCV é menos frequente quando comparada à da hepatite B e ocorre em cerca de 5%

dos bebês nascidos de mães portadoras do HCV com níveis virais elevados. O risco de transmissão é aproximadamente quatro vezes maior em crianças nascidas de mulheres coinfectadas com HCV e HIV. Constituem populações de risco acrescido para infecção pelo HCV: pessoas que receberam transfusão de sangue e/ou hemoderivados antes de 1993; usuários de drogas injetáveis, inaladas ou pipadas, que compartilham equipamentos contaminados como agulhas, seringas, canudos e cachimbos; pessoas que compartilham equipamentos não esterilizados ao frequentar pedicures, manicures e podólogos; pessoas submetidas a procedimentos para colocação de *piercing* e confecção de tatuagens; pacientes que realizam procedimentos cirúrgicos, odontológicos, de hemodiálise e de acupuntura sem as adequadas normas de biossegurança (MS, 2011).

1.2 Profilaxia da hepatite C.

Atualmente não há uma vacina contra o HCV. O que pode ser feito para evitar a contaminação com o HCV é o uso de profilaxias como: monitorar, controlar os centros de doação de sangue e derivados e manter todo cuidado necessário no ambiente de saúde visando a reduzir ao máximo a exposição percutânea. Como prevenção deve-se incluir: o aconselhamento de pessoas que usam drogas compartilhando objetos, que praticam atos sexuais sem proteção e que compartilham objetos percutâneos sem a devida esterilização. Diante das evidências de que o tratamento da forma aguda da hepatite C poderia prevenir a cronificação, sugere-se, principalmente nas exposições de alto risco com fonte positiva, a realização da pesquisa do RNA viral no 90° dia após a exposição, para diagnóstico e tratamento precoce da possível infecção. Imunoglobulinas e agentes antivirais não são recomendadas após o contato com HCV (Strauss, 2001).

1.3 Prevalência da hepatite C.

A infecção pelo HCV representa um problema de saúde pública no Brasil e no Mundo e sua prevalência varia entre os países (Figura 1). Desde a descoberta do HCV, em 1989, a hepatite C passou a ganhar especial relevância entre as causas de doença hepática crônica no mundo. Os diferentes cenários epidemiológicos e os fatores associados à infecção advêm, em grande parte, de estudos de soroprevalência realizados com doadores de sangue, populações específicas, estudos-sentinela e, menos frequentemente, de pesquisas de base populacional. Na ausência destes, médias

ponderadas têm sido empregadas para estimar a prevalência da hepatite C e subsidiar ações de prevenção e controle. Estima-se que aproximadamente 3% da população mundial estejam infectados pelo HCV, o que representa cerca de 180 milhões de indivíduos com infecção crônica e sob risco de desenvolver as complicações da doença. De acordo com a OMS, o Brasil é considerado um país de endemicidade intermediária para hepatite C, com prevalência da infecção situada entre 2,5% e 10% (OMS, 2002). Entretanto, estudos de base populacional e com doadores de sangue revelam prevalências inferiores às estimadas, colocando o Brasil como de baixa endemicidade (MS-B, 2010).



Figura 1: Mapa geográfico mostrando a prevalência da infecção pelo vírus da hepatite C. Fonte: *Centers for Disease Control (CDC), World Map of Hepatitis C*, Março, 2013.

Tendo como base os dados do ano de 2002, provenientes da rede de hemocentros de pré-doadores de sangue, a distribuição de soroprevalência da hepatite C variou entre as regiões brasileiras: 0,62% no Norte, 0,55% no Nordeste, 0,28% no Centro-Oeste, 0,43% no Sudeste e 0,46% no Sul (Paltanin and Reiche, 2002). Realizado nas capitais brasileiras, o estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C encontrou as seguintes prevalências de anti-HCV: na Região Norte, 2,1% (intervalos de confiança de 95% (IC95%) 1,4-2,8); no Nordeste, 0,7% (IC95% 0,4-1,0); no Centro-Oeste, 1,3% (IC95% 0,9-1,7); no Sudeste, 1,3% (IC95% 0,9-1,6); no Sul, 1,2% (IC95% 0,8-1,6); e no Distrito Federal, 0,9% (IC95%

0,4-1,2) (Quadro 1). Os fatores de risco mais relevantes encontrados na população de 10 a 69 anos foram o uso de drogas injetáveis *odds ratio* (OR=6,7; IC95% 2,5-17,9) e o uso de droga inalada (OR=2,6; IC95% 1,3-5,0) (MS-A, 2010).

Quadro 1: Estimativas das prevalências de anti-HCV e seus respectivos intervalos de confiança (IC95%) e endemicidade de hepatite C para o conjunto das capitais de cada região e Distrito Federal.

Características/variáveis	Norte	Nordeste	Centro-Oeste	Sudeste	Sul	DF
Prevalência (%) 10 a 69 anos	2,1 (1,4-2,8)	0,7 (0,4-0,9)	1,3 (1,0-1,7)	1,3 (1,0-1,6)	1,2 (0,8-1,6)	0,9 (0,5-1,3)
Prevalência (%) 10 a 19 anos	1,0 (0,4-1,6)	0,4 (0,1-0,7)	1,0 (0,5-1,5)	1,0 (0,5-1,3)	0,5 (0,1-0,9)	0,6 (0,1-1,1)
Prevalência (%) 20 a 69 anos	3,2 (2,0-4,4)	1,0 (0,5-1,4)	1,6 (1,1-2,1)	1,6 (1,1-2,2)	1,7 (1,1-2,3)	1,1 (0,5-1,7)
Endemicidade	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa

Fonte: UNIVERSIDADE de Pernambuco. Núcleo de Pós-Graduação. Estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil. Relatório de Pesquisa. Brasil, 2010.

1.4 O vírus da hepatite C e seu genoma.

O HCV pertence ao gênero Hepacivirus da família *Flaviviridae*. É um vírus de genoma RNA fita simples de polaridade positiva com aproximadamente 9.600 bases. A partícula viral varia entre 50 e 60 nm de diâmetro, é composta por um envelope de bicamada lipídica tendo o complexo glicoproteína E1 e E2, que facilita a interação celular entre partícula e hospedeiro.

O RNA viral contém uma região 5' não codificante, que possui o sítio de entrada de ribossomo (IRES) e uma região 3' não codificante. O genoma possui uma única fase de leitura aberta (*open Reading frame* – ORF), que codifica polipeptídeo precursor de 3.000 aminoácidos. Este é clivado para produzir 4 proteínas estruturais: Proteína do Core, Proteína do Envelope E1, Proteína do Envelope E2 e o Canal Iônico p7 e 6 proteínas não estruturais (NS): Protease NS2-3, a Serino Protease e RNA Helicase NS3, o Polipeptídeo NS4A e as NS4B, NS5A e a RNA Polimerase dependente de RNA, NS5B (Figura 2).

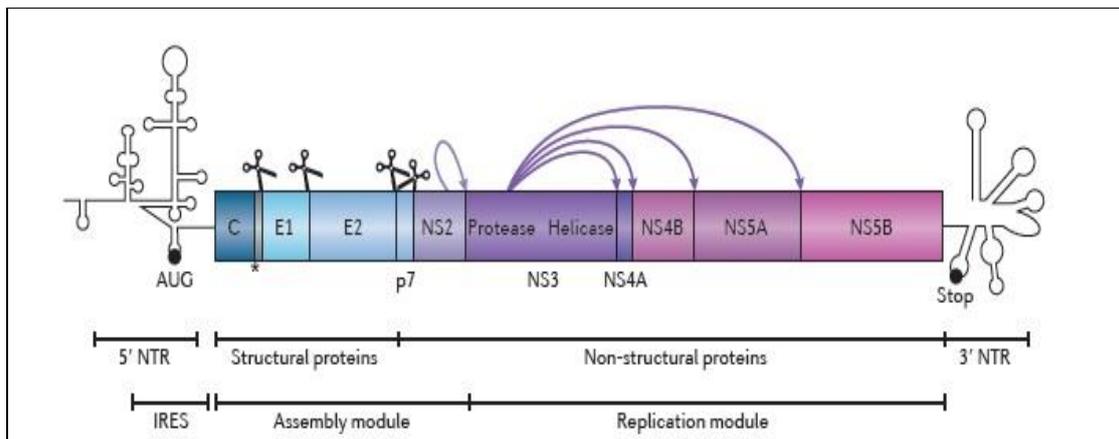


Figura 2: Organização do genoma do vírus da hepatite C. Fonte: Bartenschlager *et al.*, 2013.

Sendo assim, as proteínas estruturais constituem os blocos de construções para os vírus e as proteínas não estruturais replicam o RNA viral (Timpe and McKeating, 2008). Essa formação viral é associada com uma série de fatores de ligações que incluem as lectinas do tipo C, receptores de lipoproteínas e sulfato de heparano (Zeisel *et al.*, 2011). O HCV infecta os hepatócitos através de quatro moléculas de receptores celulares: a tetraspanina CD81, *Scavenger receptors* membro da classe B1 também conhecido como SR-BI, e as proteínas de junções Claudin-1 (CLDN1) e Occludine (OCLN) (Ploss *et al.*, 2009; Evans *et al.*, 2007; Scarselli *et al.*, 2002; Pileri *et al.*, 1998).

O genoma do HCV por ser RNA possui uma heterogeneidade significativa como resultado de acúmulo de mutações durante sua replicação. Esta característica pode ser atribuída à incapacidade de correção de erros da RNA polimerase dependente de RNA, resultando nas quasiespecies (Gao *et al.*, 2005; Martell *et al.*, 1992). As quasiespecies consistem um ou mais genomas majoritários, predominantes quantitativamente, e vários genomas minoritários, representando proporções variáveis do total da população viral (Farci, 2011), ou seja, é a presença de diferentes espécies virais de mesma origem dentro de um único indivíduo hospedeiro a qualquer momento. Esta heterogeneidade genética tem sido correlacionada com prognóstico e patogenicidade da doença assim como com resposta a terapia antiviral, podendo auxiliar o clínico quanto ao tratamento.

O HCV é classificado em seis diferentes genótipos, numerados de 1 a 6, que contém subtipos que são descritos em letras minúsculas após o número referente ao genótipo. Esses genótipos diferem entre si por pelo menos 30% de suas sequências genômicas (Simmonds *et al.*, 1994). Novas variantes foram descritas na Indonésia,

Vietnã e Tailândia, sendo originalmente classificadas como genótipos 7, 8, 9, 10 e 11 (Tokita *et al.*, 1994, 1995, 1996). Porém, com análises feitas posteriormente, concluíram que os grupos 7, 8, 9 e 11 deveriam ser classificados no genótipo 6a e o tipo 10 agrupado dentro do genótipo 3a (Mcgarvey *et al.*, 1998; Mizokami *et al.*, 1996). A distribuição dos genótipos de HCV é variável no mundo e entre as diferentes regiões do Brasil onde se verifica prevalência do HCV genótipo 1b, seguido do genótipo 3 (Altuglu *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2006; Codes *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2002).

Entre os genótipos pode haver diferentes prognósticos da doença. O genótipo 1 prevalece em 40% a 80% da população mundial de infectados pelo HCV. Este parece representar o tipo viral mais agressivo, de prognóstico menos favorável e pior respondedor à terapia com interferon (IFN), quando comparado com os tipos 2 e 3 (Sherlock and Dooley, 2001). Sendo assim, os genótipos possuem grande importância clínica, pois pacientes infectados com HCV genótipo 1 respondem pior ao tratamento baseado em IFN e tem menos chances de apresentar resposta viral sustentada (RVS). De acordo com o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções (MS, 2011), a RVS ocorre pela não detecção do RNA de HCV no soro, através de teste de detecção qualitativa após 24 semanas do término da terapia antiviral.

1.4.1 O ciclo infeccioso do HCV e função das proteínas virais.

Após a penetração do vírus no hepatócito, que pode ser mediada por diferentes receptores, o genoma do vírus é desencapado e a sua tradução ocorre pelos ribossomos da célula hospedeira produzindo a poliproteína viral. A replicação do RNA genômico se dá pela cópia direta na forma intermediária replicativa do RNA, de polaridade negativa, e novamente em RNA genômico de polaridade positiva, pela enzima RNA polimerase dependente de RNA viral codificada pelo gene NS5B. As proteínas estruturais são subsequentemente montadas com os novos RNAs genômicos, gerando partículas virais maduras (Figura 3).

A proteína do core é responsável pela formação do nucleocapsídeo (McLauchlan *et al.*, 2002). As proteínas E1 e E2 são glicosiladas e formam um complexo não covalente que se acredita ser a unidade que compõem o envelope viral (Dubuisson *et al.*, 2002). O canal iônico p7 é essencial para a infecção *in vivo* e especula-se que possua importante papel na maturação e liberação da partícula viral (Sakai *et al.*, 2003). A protease NS2-3, conhecida como auto-protease, é essencial para que o ciclo de

replicação se complete, seja *in vitro* ou *in vivo* (Pietschmann *et al.*, 2006; Kolykhalov *et al.*, 2000). No complexo NS3-4A, a NS3 é uma proteína multifuncional contendo duas atividades: uma serino protease na região N-terminal e uma RNA helicase/NTPase (nucleosídeo trifosfatase) na região C-terminal e a NS4A é uma proteína acessória para a serino protease NS3 (Wölk *et al.*, 2000). A NS4B induz alterações na membrana do retículo endoplasmático do hospedeiro que serve como arcabouço para o complexo de replicação do HCV (Egger *et al.*, 2002). Acredita-se que a NS5A esteja envolvida nas interações específicas proteína-proteína, essenciais para a formação de um complexo de replicação de HCV funcional (Penin *et al.*, 2004). Além do seu papel essencial na replicação, a NS5A foi inicialmente estudada pelo seu potencial de modular a resposta ao interferon, foi descrita como sendo a região determinante da sensibilidade ao interferon (ISRD) (Enomoto *et al.*, 1995). A NS5B foi extensivamente caracterizada como a enzima-chave responsável pela replicação do HCV.

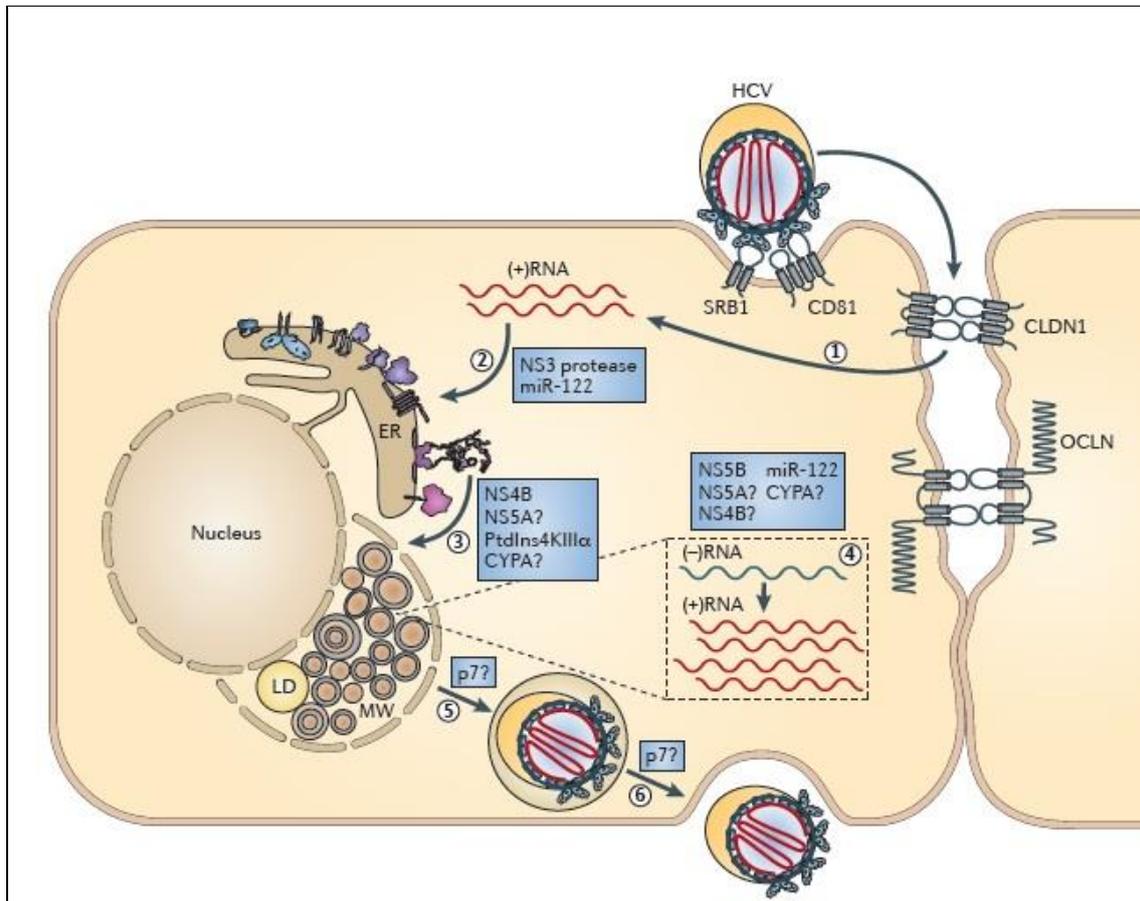


Figura 3: Ciclo de replicação do vírus da hepatite C. 1- O ciclo se inicia com a ligação da partícula viral do HCV aos receptores SRB1 e CD81, a partícula se envolve em novas interações com as proteínas de junções CLDN1 e OCLN e finalmente entra na célula mediada por receptores da endocitose. 2- O genoma de RNA viral é liberado para o citoplasma e traduzido no retículo endoplasmático (ER), dando origem a uma poliproteína que é clivada em proteínas maduras. 3- As proteínas virais, em conjunto com os fatores das células hospedeiras, induzem a formação de compartimentos membranosos (*membranous web*, MW), compostos por vesículas membranosas: únicas, duplas e múltiplas; assim como por gotículas lipídicas (LDS). 4- A replicação do RNA ocorre em um local não específico dentro da MW e processada uma cópia via sentido negativo RNA (-) que serve como um molde para a produção de quantidades excessivas de RNAs descendentes de sentido positivo (RNA +). A montagem da partícula do HCV provavelmente se inicia em estreita proximidade com o ER e as gotículas lipídicas, onde acumulam se proteínas do núcleo e o RNA viral. O envelope viral é adquirido por brotamento através da membrana do ER num processo que está ligado à síntese de lipoproteína. As partículas do HCV são programadas para serem lançadas através da via de secreção constitutiva. Os fatores celulares do hospedeiro e do vírus que são direcionados por inibidores (que estão indicados na figura acima em caixas de cor azul) e as etapas do ciclo de replicação que são promovidas por esses fatores são: CYPA, ciclofilina A; PtdIns4KIII α , phosphatidylinositol 4-kinase III α . Fonte: Bartenschlager *et al.*, 2013.

1.4.2 A protease NS3/4A do HCV.

A NS3 protease possui um peso molecular de 20 kDa e aproximadamente 180aa. É uma serino protease estruturalmente homóloga às outras serino proteases extracelulares, tais como tripsina e quimiotripsina, localizada no domínio N-terminal da proteína NS3. As proteases extracelulares homólogas apresentam pontes de dissulfeto para a estabilização da estrutura molecular. Porém, a NS3 não contém pontes de dissulfeto, e sim íons de Zn^{+2} que lhe confere estabilidade molecular através da sua atividade hidrolítica (Stempniak *et al.*, 1997; De Francesco *et al.*, 1996).

É uma proteína multifuncional com domínio carboxi-terminal que compreende uma ATPase/helicase, capaz de desenovelar ácidos nucleicos de fita dupla (Kim *et al.*, 1995) e está envolvida na montagem da partícula viral (Ma *et al.*, 2008).

A serino protease tem como função clivar a poliproteína separando NS3 de 4A, NS4A de 4B, NS4B de 5A e NS5A de 5B (Lin *et al.*, 1994; Failla *et al.*, 1994; Bartenschlager *et al.*, 1994) (Figura 4).

Ao entrar na célula, o vírus ativa duas vias de sinalização celulares: RIG-I (*retinoic-acid-inducible gene 1*) que é a via da RNA helicase citosólica acoplada ao adaptador mitocondrial chamado Cardif (*caspase and recruitment domain – CARD – adaptor inducing IFN- β*) e a TLR3 (*toll-like receptor 3*) que é a segunda via, do receptor endossomal acoplado ao seu adaptador citosólico TRIF (*toll/interleukin-1 receptor-containing adaptor inducing IFN*). Ambas levam a indução de IFN e da resposta imune inata. Entretanto, a protease NS3/4A do HCV tem capacidade de clivar TRIF e Cardif impedindo a indução de interferon, desta forma, permitindo o escape do vírus (Breiman *et al.*, 2005; Foy *et al.*, 2003). Sendo assim, a NS3/4A exerce papel na resposta de defesa celular inata do hospedeiro através da inibição da indução de interferon, permitindo ao vírus escapar do sistema imune do hospedeiro.

Sequências da NS3 protease comparadas entre os flavivirus demonstraram a presença de três resíduos conservados: a histidina-57 (His-57), a asparagina-81 (Asp-81) e a serina-139 (Ser-139), que compõem o centro catalítico da enzima (GraKoui *et al.*, 1993). Através de estudos realizados com a NS3 sem a proteína acessória NS4A, a conformação da tríade catalítica de NS3 fica significativamente distorcida e a protease não apresenta atividade apropriada. Desta forma, o papel proteína NS3/4A no ciclo viral, na infecção celular e na resposta imune do hospedeiro a torna alvo atrativo para fins terapêuticos.

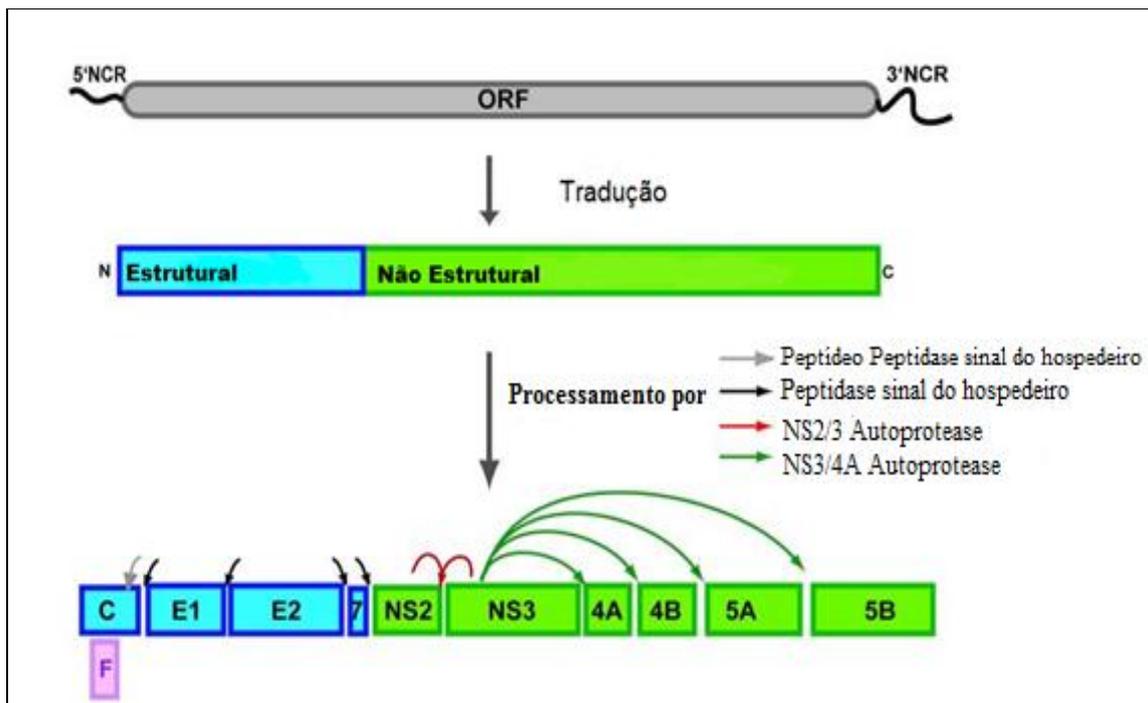


Figura 4: Esquema da tradução e processamento das proteínas do HCV. A tradução da ORF gera uma poliproteína de aproximadamente 3.000 aminoácidos organizada em proteínas estruturais e não estruturais. A poliproteína é processada por um complexo de eventos co- e pós-traducionais, catalisadas por proteases do hospedeiro e viral, gerando 4 proteínas estruturais (C-Core, E1-Envelope1, E2-Envelope2, P7-Canal iônico) (em azul) e 6 proteínas não estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) (em verde). Adaptado de: Tellinghuisen *et al.*, 2007.

1.5 Aspectos clínicos da hepatite C.

O período de incubação varia entre 4 e 24 semanas, com média entre 7 e 8 semanas, com a grande maioria dos casos assintomáticos ou oligossintomáticos na fase aguda. Em cerca de 15% dos infectados ocorre cura espontânea; cerca de 25% apresentam infecção assintomática, com alanina aminotransferase (ALT) persistentemente normal e ausência de alterações significativas à histologia hepática; os demais apresentam níveis elevados de ALT, porém variáveis ao longo do tempo, geralmente com histologia hepática alterada. A incidência anual de CHC nos pacientes com cirrose é estimada entre 1% e 4% (Sherlock and Dooley, 2004). A prevalência de cirrose após 20 anos de infecção pelo HCV foi estimada em 14,8% (Puoti *et al.*, 2010).

A maioria dos portadores de hepatite aguda pelo vírus C apresenta a forma anictérica, com ausência de queixas ou com manifestações inespecíficas, ligadas à fase prodômica da doença. É comum que a elevação da ALT seja a única manifestação da doença. Nos casos sintomáticos, predominam sintomas gerais como falta de apetite, fadiga, cefaléia, artralgias, mialgias, náuseas e vômitos, febre baixa e astenia. A icterícia é, quando existe, pouco intensa. A hepatite fulminante pelo vírus C é um evento muito raro, embora haja algumas descrições na literatura científica (Farci *et al.*, 1996).

Após a fase aguda, a evolução para a cronicidade, definida como a persistência da infecção pelo tempo mínimo de seis meses, é a regra, com somente 10% a 15% alcançando a cura espontânea (Lauer and Walker, 2001; Conte, 2000). A evolução da hepatite C crônica é insidiosa e progressiva, frequentemente com manifestações clínicas discretas ou ausentes nas primeiras décadas da doença (Araújo, 2004). A cirrose hepática representa, usualmente, o estágio final da hepatite crônica pelo vírus C, alcançado geralmente após décadas de doença. Habitualmente, os pacientes que apresentam outras condições capazes de induzir hepatopatia crônica como: etilismo, coinfeção pelos vírus da hepatite B (HBV) ou Delta (HDV) e algumas doenças metabólicas (as quais são capazes de desencadear cirrose – tais como doença de Wilson, hemocromatose hereditária e deficiência de alfa-1 antitripsina) evoluem para cirrose em menor tempo. Os indivíduos na terceira idade que adquiriram a infecção e indivíduos do sexo feminino também apresentam desenvolvimento mais precoce de doença hepática avançada (Modi and Liang, 2008).

O tempo entre a aquisição da infecção pelo HCV e o surgimento de doença hepática avançada é variável, com surgimento de cirrose que se manifesta clinicamente em um quinto dos indivíduos dentro de 20 anos ou menos; nos demais pacientes, as primeiras complicações podem ser vistas após 30 anos de infecção (Dienstag, 2008). Além do acometimento hepático, são importantes as manifestações extra-hepáticas da infecção pelo HCV associados a processos imunes, provavelmente devido à possibilidade do vírus se replicar nas células linfóides e à deposição de imunocomplexos nos diversos tecidos. Uma diversidade de síndromes autoimunes pode fazer parte do quadro clínico do portador de hepatite C crônica.

As mortes relacionadas à hepatite C estão ligadas às complicações da cirrose – hemorragias digestivas, síndromes hepatorenal e hepatopulmonar, infecções, encefalopatia hepática – e à ocorrência do CHC. A sobrevida em cinco anos é observada em cerca de 80% dos pacientes com cirrose Child-Pugh A. Por outro lado, a sobrevida média não ultrapassa dois anos a partir do momento em que já exista ascite.

1.6 Diagnóstico da hepatite C.

O diagnóstico sorológico de pacientes infectados pelo HCV é realizado utilizando-se duas categorias de testes. Testes indiretos, que detectam anticorpos contra o HCV (anti-HCV) e diretos, que detectam, quantificam e genotipam a partícula viral. A quantificação do RNA do HCV pode ser feita pela amplificação do alvo (RT-PCR). Os ensaios de RT-PCR em tempo real são uma ferramenta promissora por causa da sensibilidade e larga faixa de linearidade. O Cobas Taqman 48 HCV (Roche) tem um limite de detecção da partícula viral entre 10 a 100 UI/mL, o que o torna um ensaio quantitativo recomendado para uso no acompanhamento do tratamento. A genotipagem analisa a sequência de região do genoma e permite a identificação dos tipos e subtipos do HCV. Pode ser realizada através de sequenciamento ou hibridação com sondas tipo-específicas e RT-PCR em tempo real. O sequenciamento direto de determinadas regiões do genoma do HCV é considerado o “padrão ouro” (I Consenso da Sociedade Brasileira de Infectologia para o Manuseio e Terapia da Hepatite C, 2008).

1.7 Tratamento da hepatite C e seus efeitos colaterais.

O objetivo do tratamento da hepatite C é a eliminação (de forma sustentada) da replicação do vírus, para que não haja a progressão da doença (Ruiz and Zylbergeld Neto, 2004).

O uso da terapia combinada, interferon (IFN) e ribavirina (RBV), trouxeram melhores taxas de RVS em comparação com a monoterapia de IFN, introduzida nos anos 90 (Hayashi and Takehara, 2006). O mecanismo de ação do IFN- α e RBV ainda não é bem compreendido (Clark and Nelson, 2012; Manns *et al.*, 2007). O IFN é uma glicoproteína que possui atividades de inibição da replicação viral e da proliferação celular além de atividades imunomoduladoras (Balfour, 1999; Tilg, 1997). A RBV é um análogo sintético da guanosina, que possui amplo espectro de atividade antiviral e tem sido usada para várias doenças virais. Essa atividade antiviral da RBV é exercida através da mutagênese, incapacitando a infectividade do RNA genômico (Crotty *et al.*, 2001).

Segundo o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para hepatite C, para os pacientes portadores de HCV com genótipo 1, o tratamento deve ser realizado com 180 μg /semana de IFN peguilado (PEG-IFN) α -2a ou 1,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ /semana de PEG-IFN α -2b associado a 15 $\text{mg}/\text{kg}/\text{dia}$ de RBV por 48 a 72 semanas (Farnick *et al.*, 2010). Em pacientes com HCV genótipos 2 e 3, o tratamento pode ser realizado com 3 MUI (milhões de unidades internacionais) de IFN convencional 3 vezes por semana associado a 15 $\text{mg}/\text{kg}/\text{dia}$ de RBV por um período de 24 semanas ou ainda, para pacientes portadores destes vírus, porém com fatores preditivos de má resposta ao IFN convencional, o tratamento deve ser realizado com PEG-IFN α -2a ou α -2b mais RBV. Com este tratamento, são obtidas taxas de RVS de aproximadamente 42% para pacientes com HCV genótipo 1 e em torno de 80% para aqueles com HCV genótipos 2 e 3 (CDC, 2012).

O tratamento com IFN e RBV para a hepatite C ocasiona diversas alterações laboratoriais e possíveis efeitos colaterais que necessitam de monitoramento clínico e laboratorial mais rigoroso, com objetivo de melhorar a adesão ao tratamento e a adequação de doses (Ghany *et al.*, 2009). No Quadro 2 estão os principais efeitos adversos comuns e raros devido ao tratamento com IFN e RBV.

A piora na qualidade de vida durante o tratamento pode influenciar negativamente a confiança e contribuir para um desfecho clínico desfavorável. O

suporte multiprofissional na abordagem dos efeitos colaterais, com estratégias de apoio e motivação, auxilia a reduzir o risco de abandono precoce do tratamento (MS, 2011).

Quadro 2: Efeitos Adversos do Tratamento com IFN e RBV.

	Efeito Adversos Comuns	Efeito Adversos Raros
IFN	Distúrbios Autoimunes, Diarréia, Anemia, Alopecia, Fadiga, Mal Estar, Artralgias, Febre, Diminuição de Peso, Dificuldade de Concentração, Distúrbios do Sono, Transtornos de Humor, Retinopatia, Disfunção da Tireóide, Dor ou Eritema no local da injeção, Irritabilidade, Ansiedade, Depressão, Diminuição de Plaquetas e Leucócitos, Susceptibilidade a Infecção: Bronquite, Sinusite e Infecções Urinárias.	Ideação Suicida ou Paranóide, Retoma de Consumo de Álcool ou Drogas, Púrpura Trombocitopênica, Nefrite, Insuficiência Renal Aguda, Proteinúria, Agravamento de Insuficiência Hepática, Sepses, Diabetes.
RBV	Naúseas, Anemia hemolítica, Tosse, Dispnéia, Gota, Insônia, Prurido, Rash Cutâneo, Intolerância Gastrointestinal, Anorexia.	Teratogenicidade.

Fonte: Garcia *et al.*, 2012.

1.8 Novos agentes terapêuticos na hepatite C crônica.

Novos agentes terapêuticos estão sendo estudados devido às baixas taxas de RVS com o tratamento atual, principalmente nos pacientes portadores do HCV genótipo 1. Alguns tratamentos foram aprovados por órgãos competentes regulamentadores no Brasil, Estados Unidos e Europa, e outros estão em fase avançada de estudo (Gane, 2011; Asselah and Marcellin, 2011; Liu-Young and Kozal, 2008).

Os dois alvos terapêuticos mais promissores no tratamento da hepatite C são os inibidores da RNA polimerase dependente de RNA (NS5B) e a serino protease (NS3).

As polimerases da célula hospedeira não possuem atividade RNA polimerase dependentes de RNA, conferindo a NS5B um alvo específico para a terapia anti-HCV. Da mesma forma, a serino protease NS3 tem uma estrutura molecular muito diferente daquelas das células humanas, possibilitando desenvolver inibidor específico da protease viral.

A dificuldade de se obter um sistema de cultura de células capaz de sustentar a replicação do HCV, assim como, a ausência de um modelo animal de pequeno porte, dificulta a avaliação da eficácia de compostos antivirais tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Njoroge *et al.*, 2008). Inicialmente, para estudo do genoma viral, foi desenvolvido o sistema de replicon subgenômico em cultura de células (Lohmann *et al.*, 1999) e esse é ainda utilizado em teste de eficácia antiviral de diferentes compostos (Binder *et al.*, 2011). Porém, esse sistema tinha uma grande desvantagem que era a limitação da observação das etapas intracelulares do ciclo infeccioso do HCV por não haver a produção de partículas virais completas. Recentemente, foi descrito um sistema de replicons com o genoma completo do HCV, produzindo vírions infecciosos (Arai *et al.*, 2011) e também foi desenvolvido um sistema de cultivo de HCV em células Huh-7 para genótipo 3a (Asad *et al.*, 2012).

1.8.1 Inibidores de Protease (IPs).

O telaprevir (nome comercial “Incitec”) (Vertex Pharmaceuticals, Inc./Jansen Pahrma./Tibotec Pharmaceuticals) foi aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pela *Food and Drug Administration* (FDA) em maio de 2011 para ser administrado por via oral na dose de 750 mg, 3 vezes ao dia, aos pacientes com HCV genótipo 1 nunca tratadas ou que não responderam de forma sustentada ao tratamento atual com IFN peguilado (PEG-IFN) e RBV. O boceprevir (“Victrelis”) (Schering Plough) foi aprovado pela ANVISA em julho de 2011 (Kwo *et al.*, 2010).

O uso combinado de boceprevir ou telaprevir com PEG-IFN e RBV em pacientes que nunca foram tratados trouxe taxas de RVS para 70%, reduzindo, portanto, o percentual de pacientes não respondedores (NR). Em pacientes que não responderam ao tratamento prévio com PEG-IFN e RBV, as taxas de RVS com uso de um inibidor de protease + PEG-IFN e RBV chegaram a 60% comparado com 21% de RVS quando retratados com PEG-IFN e RBV por 48 semanas (Berengue and López-Labrador, 2011; Asselah and Marcellin, 2011). Os inibidores de protease são indicados somente para

pacientes infectados com HCV genótipo 1 pois mostraram atividade limitada para pacientes com HCV genótipo 3.

Com o surgimento frequente de resistência viral aos inibidores da protease (Forestier *et al.*, 2007) há uma limitação do uso clínico desses inibidores (Quadro 3). Em 2008 um importante estudo foi publicado por Bartels e cols., no qual foi relatada pela primeira vez a prevalência natural de variantes relacionados com redução da sensibilidade aos inibidores de protease viral e seus efeitos na resposta à terapia antiviral. Afinal, o sucesso da terapia também depende de variantes virais existentes antes do início da terapia (Bartels *et al.*, 2008). Vários trabalhos mostraram a presença de variantes com mutações de resistência antes mesmo do uso desses inibidores (Vicenti *et al.*, 2012; Franco *et al.*, 2011) ou que foram selecionadas com o uso dos inibidores (Vermehren *et al.*, 2012).

Quadro 3: Mutações de resistência já descritas aos diferentes inibidores de protease.

Inibidores de Protease	Mutações de resistência										
	V36A/L M/G	Q41R	F43C/S	T54S/A	V55A	Q80R/K	S138T	R155K/T G/L/Q/M S/L	A156S/T I	D168A/V H/E/G	V170A/T/I
Asunaprevir (BMS-650032)											
Boceprevir (SCH503034)											
Ciluprevir (BILN-2061)											
Danoprevir (TMN-191)											
Faldaprevir (BI 201335)											
Narlaprevir (SCH900518)											
Simeprevir (TMC435350)											
Telaprevir (VX-950)											
Vaniprevir (MK-7009)											

Fonte: Lagacé *et al.*, 2012; Berengue and López-Labrador, 2011; Sarrazin and Zeuzem, 2010; Gaudieri *et al.*, 2009; Liu-Young and Kozal, 2008; Kuntzen, *et al.*, 2008; Tong *et al.*, 2008 e McPhee *et al.*; 2012.

Um dos principais desafios do futuro para o regime do tratamento contra o HCV será o campo emergente da combinação dos diferentes fármacos antivirais de ação direta (DAAs). Barreiras genéticas com baixa resistência têm sido relatadas para os IPs do HCV e os inibidores da polimerase nucleosídeos comparados aos inibidores da polimerase não nucleosídeos do HCV que parecem ter uma alta barreira genética para a resistência. No entanto, a erradicação do HCV não pode ser adquirida apenas com monoterapia de qualquer um dos grupos de drogas. Desta forma, combinações de drogas de não resistência cruzada deverão ser avaliadas posteriormente. Além disso, as variantes de resistência pré-existentes e o seu potencial de persistência em longo prazo têm de ser levados em conta para a seleção de melhor tratamento e estratégias de re-tratamento. Os riscos de potenciais interações medicamentosas estão sendo levados em consideração e os números dos doentes tratados com DAAs provavelmente tenderão a aumentar (Vermehren and Sarrazin, 2011). A monitorização terapêutica pode, eventualmente, ter um papel importante na gestão destas interações (Seden *et al.*, 2010).

1.9 Replicação *in vitro* do vírus da hepatite C derivados de soros de pacientes.

Desde a descoberta do HCV, muitos investimentos têm sido feitos para infectar células em cultivo com o vírus isolado do soro de pacientes infectados pelo vírus, utilizando tanto linhagens celulares humanas de origem hepática como de outras origens e/ou outras espécies. Em um primeiro estudo sobre a replicação do HCV *in vitro* inocularam-se células MOLT-4 (linhagem celular humana derivada de células T) com soro contendo o HCV (Shimizu *et al.*, 1992). Sete dias depois da inoculação, não só foi detectada a presença de RNA de cadeia negativa nas células, mas também a expressão de antígenos virais do capsídeo e a NS4 por imunofluorescência, demonstrando que estas células eram susceptíveis à replicação do HCV. No entanto, o nível de replicação de HCV nestas células era muito baixo e o sistema foi improdutivo para aplicação *in vitro*. A análise de outras linhagens de origem linfóide levou à identificação de um clone da linhagem celular HPB-Ma (derivada da célula T), capaz de suportar consistentemente a replicação do HCV (Shimizu *et al.* 1993). Além disso, os autores demonstraram que havia uma correlação entre a infectividade de diferentes inóculos de HCV *in vivo* (chimpanzé) e infecciosidade *in vitro*. Apesar de vários estudos terem descrito a susceptibilidade das linhagens celulares derivadas de células T, B e hepatócitos de fetos humanos a infecção pelo HCV após a inoculação com o soro do

paciente (Bertolin *et al.*, 1993; Carloni *et al.*, 1993; Iacovacci *et al.*, 1993; Kato *et al.*, 1995; Cribier *et al.*, 1995; Nakajima *et al.*, 1996), a manutenção e a propagação do vírus nestes sistemas de cultura é bastante complexa, provavelmente devido aos baixos níveis de replicação do HCV *in vitro*.

O tropismo de HCV pelo fígado foi demonstrado pela primeira vez por estudos *in vitro*, quando um número de 6 de 7 soros de pacientes positivos para o HCV preferiram infectar as células PH5CH (linhagem de células derivadas hepatócitos humanos) do que as células MT-2 (linhagem de células humanas derivada da célula T) (Ikeda *et al.*, 1997). Depois disso, os investigadores se dedicaram às inoculações celulares em linhagens originadas do sistema hepático. Foi então estabelecida a cultura em longo prazo usando linhagens celulares derivadas do hepatoma humano (Huh7, Hep G2) (Seipp *et al.*, 1997), no qual se conseguiu infectar culturas primárias de hepatócitos humanos com soros de pacientes positivos para HCV (Fournier *et al.*, 1998). No entanto, os modelos baseados na inoculação de cultivos primários ou diferentes linhagens celulares com soro de pacientes apresentaram baixa reprodutibilidade e sua aplicabilidade é limitada a algumas amostras de soro muito selecionadas. Portanto, estes sistemas foram praticamente abandonados, com a descoberta de replicons subgenômicos de genótipos 1a (Blight *et al.*, 2003) e 1b (Blight *et al.*, 2000; Lohmann *et al.*, 1999), que se replicam de forma autônoma e, de preferência, em subclones selecionados de linhagens celulares de hepatoma humano Huh7, como Huh7.5 (Blight *et al.*, 2002) ou Huh7-Lunet (Friebe *et al.*, 2005).

1.9.1 Modelos experimentais para o estudo do vírus da hepatite C *in vitro*.

1.9.1.1 Pseudopartículas virais (HCVpp).

Durante os anos 1990, devido à falta de um sistema de cultura de células para a propagação do HCV, foram utilizados sistemas celulares clássicos de expressão transitória ou estável para estudar a função das proteínas do HCV. Para estudar a entrada do HCV em suas células-alvo, no ano de 2003, Bartosch *et al.* e Hsu *et al.*, desenvolveram o sistema da infecção pelas pseudopartículas do HCV (HCVpp). Ambos os grupos utilizaram as propriedades dos retrovírus que pode incorporar glicoproteínas

heterólogas em sua volta, neste caso, as glicoproteínas envoltas do envelope E1 e E2 do HCV.

As HCVpp são produzidas por co-transfecção de células 293T (células de rim embrionário humano) com vetores de expressão que codificam para: **a)** as glicoproteínas do HCV, **b)** as proteínas retrovirais (capsídeo e polimerase) e o sinal de empacotamento, e **c)** um gene repórter (luciferase ou a proteína verde fluorescente, GFP (*green fluorescent protein*)). Os vetores retrovirais utilizados para a produção das HCVpp estão baseados em vírus da leucemia murina (MVL) ou o vírus da imunodeficiência humana (HIV). As HCVpp são secretadas para o meio de cultura e a partir de 48 horas após a transfecção, os sobrenadantes são recolhidos e utilizados para infectar células alvos, tais como Huh7, e seus derivados. A infecciosidade das HCVpp foi analisada em diversas linhagens celulares e culturas primárias de hepatócitos humanos. Curiosamente, as HCVpp apresentam um tropismo claro para as linhagens de origem hepática celular e hepatócitos humanos, ao passo que, em geral, as linhagens celulares que não são de origem hepática, não estão infectadas ou estão com uma mínima infecção.

Notavelmente, o sistema das HCVpp serve apenas para o estudo da entrada de HCV em células alvo. Mesmo assim, tem sido usado com êxito para estudar os processos imediatos de ligação do vírus à célula e a identificação dos receptores na chave de entrada viral, revelando que a entrada do HCV em hepatócitos é muito complexa e é um processo muito regulado (Hahn and Rice, 2008).

1.9.1.2. Replicon subgenômico.

No ano de 1999 houve um grande avanço no campo da biologia molecular do HCV quando Lohmann *et al.* desenvolveu o primeiro HCV replicon subgenômico funcional. Por definição, os replicons são moléculas de ácidos nucleicos capazes de se autoduplicarem. No caso do HCV, a primeira geração foram replicons derivados de um genoma de HCV genótipo 1b, em que os genes estruturais foram substituídos por um gene de resistência à neomicina (neomicina-fosfotransferase). Também está incluído um segundo elemento, o IRES, que serve para aumentar a tradução das proteínas não estruturais do HCV, que formam o mecanismo de replicação do vírus. Assim, essas construções subgenômicas e bicistrônicas podem autoduplicar-se, através da síntese de

uma cadeia negativa, e propagar-se em cultura de células durante muitos anos (Pietschmann *et al.*, 2001). As linhagens celulares mais permissivas para isso são: Huh7.5 e Huh7-Lunet.

Dado que o sistema de replicon subgenômico do HCV não contém genes estruturais não é capaz de produzir partículas virais. Portanto, replicons que continham o genoma completo de HCV e um marcador de seleção também foram desenvolvidos (Pietschmann *et al.*, 2002). Estes replicons genômicos necessitam de mutações adaptativas ao cultivo celular para replicar de forma eficiente e em níveis suficientemente altos para a seleção por genes marcadores. Embora replicons genômicos de HCV fossem muito promissores, o aparecimento de mutações adaptativas parece interferir com a produção das partículas (Pietschmann *et al.*, 2009).

Replicons subgenômico têm sido ferramentas valiosas em estudos de mecanismos de replicação do HCV e a caracterização estrutural e bioquímica de complexos de replicação viral (Aizaki *et al.*, 2004; Gosert *et al.*, 2003) e em testes de novas drogas contra a hepatite C (inibidores da protease e polimerase de HCV), incluindo a identificação da resistência aos antivirais (Flint *et al.*, 2009; He *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2006).

1.9.1.3. Modelo de cultura de células com o vírus da hepatite C.

Em 2003, Kato *et al.* descobriram um replicon subgenômico com base numa sequência de genótipo 2a, por razões desconhecidas, replicadas em níveis entre 50 a 500 vezes maior em comparação com os replicons de uma base, sem a necessidade de mutações adaptativas (Kato *et al.*, 2003). Este replicon foi construído a partir de um genoma de HCV de genótipo 2a denominado JFH-1, obtido a partir de um paciente japonês que sofreu hepatite fulminante (Kato *et al.*, 2001). Dois anos mais tarde, três grupos independentes desenvolveram um modelo de cultura de células com o HCV (HCVcc) baseado no genoma completo do JFH-1, que era capaz replicar e produzir partículas infecciosas *in vitro* (Zhong *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005; Lindenbach *et al.*, 2005). Especificamente, a transfecção de células Huh7 (ou seus derivados) com o RNA do JFH implica na produção e liberação de partículas virais no meio de cultura, que são infecciosas somente em cultura de células de chimpanzés e ratos.

Uma melhoria significativa do sistema tem sido a geração de vírus quimérico baseado no JFH-1 com grande capacidade de replicação. Basicamente, estes genomas

quiméricos contém as extremidades 3' e 5' e a região NS3-NS5B do JFH-1 (essencial para que se produza a replicação e produção de partículas virais) e da região do núcleo, NS2 a partir de outra estirpe de genótipo 2a chamada J6 (Pietschmann *et al.*, 2006). A quimera J6/JFH-1 replica em cultura celular e os títulos virais produzidos são de 100 vezes mais do que a seu genoma parental JFH-1. Além dessa quimera intragenotípica, também foram gerados vírus quiméricos com todos os genótipos do HCV. Ao contrário da J6/JFH-1 quimera, estas quimeras intergenotípicas precisam das mutações adaptativas para cultura celular (Gottwein *et al.*, 2007; Yi *et al.*, 2007; Koutsoudakis *et al.*, 2011). Dado que não existe nenhum outro genoma do HCV capaz de reproduzir o ciclo de vida completo do vírus com a mesma eficiência do JFH-1 e que o genótipo do HCV influencia na resposta ao tratamento antiviral, o fato de dispor de diferentes genomas quiméricos de genótipos do HCV é especialmente relevante para o desenvolvimento de novas estratégias antivirais, a avaliação de vacinas e caracterização da resposta imune humoral numa vasta gama de genótipos.

Outras estratégias para otimizar a seleção de modelos das HCVcc são clones de células especialmente permissivos para a replicação do vírus, do estudo sistemático das mutações adaptativas da cultura de células, especialmente a identificação daqueles que aumentam os valores virais sem afetar a replicação (Li *et al.*, 2011), e a geração das HCVcc que contenham genes repórteres (tais como luciferase ou GFP), para facilitar a detecção da infecção (Schaller *et al.*, 2007; Koutsoudakis *et al.*, 2006).

Justificativa

Sabendo-se da importância do desenvolvimento de ferramentas para realização de testes que auxiliem na predição de resposta à terapia anti-HCV, desenvolvemos um protocolo para a utilização de ferramentas laboratoriais para a produção da NS3 protease variante do vírus da hepatite C de pacientes crônicos em um sistema livre de célula. Este protocolo não requer o uso de animais e de cultura de células, onde é possível a realização dos ensaios em um menor tempo com um menor custo, é possível a realização de todas as etapas do protocolo em uma semana.

Uma vez que o tratamento para hepatite C crônica apresenta alto custo para o Sistema Único de Saúde (SUS) tanto pelo custo dos fármacos quanto pelo acompanhamento dos pacientes, e pelos severos efeitos adversos consequentes, a conduta clínica na decisão de tratar ou ainda de quais fármacos deverão ser escolhidos, torna-se necessário o uso de ferramentas para a otimização da terapia anti-HCV. Isto evita o tratamento de pacientes com pouca ou nenhuma chance de apresentar resposta viral sustentada (RVS), ou seja, que se mantenha após a retirada dos fármacos.

Atualmente, o tratamento da hepatite C para pacientes infectados com vírus da hepatite C genótipo 1 é baseado na tripla terapia com interferon peguilado e ribavirina associados a um inibidor de protease (IP). Porém, mutações de resistência a estes inibidores têm sido descritas tanto como primárias, ou seja, que aparecem antes mesmo dos pacientes serem submetidos ao tratamento, quanto selecionadas durante o tratamento. Desta forma, a identificação precoce destas mutações auxilia na conduta clínica dos pacientes. Além disso, outras mutações não-sinônimas na região gênica da NS3 protease de HCV têm sido verificadas e também devem ser identificadas e ensaiadas pois podem influenciar na atividade da NS3 protease ou ainda na ligação do fármaco no sítio catalítico desta proteína.

Sendo assim, este trabalho faz parte de um projeto mais amplo que objetiva a identificação de fatores tanto virais quanto do hospedeiro associados com resposta à terapia anti-HCV. Após a identificação das mutações descritas como de resistência aos inibidores de protease, torna-se importante a produção da NS3 protease variante de forma mais rápida, eficaz e de baixo custo para futura realização de ensaio fenotípico e avaliação de sua atividade na ausência e presença de diferentes combinações de drogas

antivirais. Portanto, para a futura realização de ensaio fenotípico, várias etapas devem ser cumpridas, desde a coleta de soro dos pacientes até a produção da proteína NS3 protease. Para isto, desenvolvemos um protocolo para o uso da ferramenta molecular empregada na produção da NS3 variante. Assim, teremos uma otimização de um protocolo de *screening* que possibilite sua implementação tanto em laboratórios de pesquisa quanto em laboratórios de rotina, que preconizam procedimentos menos trabalhosos, mais rápidos, mais facilmente padronizáveis e que mantenham a reprodutibilidade. A implementação pode ser feita tanto em laboratórios da rede privada quanto da pública. Desta forma, propomos a redução de etapas assim como do tempo utilizado na execução dos procedimentos, até a geração da proteína recombinante.

Objetivos

Objetivo Geral

Desenvolver um protocolo para uso de uma ferramenta de clonagem molecular para produção, em sistema livre de células, da NS3 protease de HCV isolado de soro de pacientes, para futuro ensaio fenotípico.

Objetivos Específicos

- Inserção no plasmídeo denominado pET17b NS3/4A Δ domínio protease da região NS3 protease variante obtida de HCV do soro de pacientes com hepatite C crônica.
- Produzir a NS3 protease variante de HCV de pacientes em sistema livres de células.
- Caracterizar a NS3 protease variante produzida *in vitro* quanto à sua afinidade por anticorpo específico.

Racional

Estratégia de desenvolvimento de protocolo para uso de ferramenta molecular empregada na produção da NS3 proteases variantes de HCV, em sistema livre de células.

O desenvolvimento deste trabalho se dará a partir do racional experimental citado abaixo onde, a partir da obtenção de soros de pacientes com hepatite C crônica e de vetor de expressão para produção de NS3 protease de HCV, desenvolvemos um protocolo para o uso desta ferramenta molecular capaz de sintetizar a NS3 protease variante com intuito de posterior ensaio fenotípico.

Com o protocolo proposto (Figura 5) pretendemos aperfeiçoar a produção e caracterização da NS3 protease variante possibilitando a implementação em laboratórios de rotina. Para isso, inicia-se com a extração de RNA do HCV a partir de soro coletado dos pacientes com hepatite C. Posteriormente, o RNA viral é submetido à transcrição reversa para produção de cDNA que será utilizado na amplificação da região gênica da NS3 protease por reação em cadeia da polimerase (PCR). Para viabilizar a próxima etapa, de clonagem do produto de PCR no vetor de expressão pela recombinação homóloga, é necessária a inserção de regiões homólogas ao vetor nas extremidades do fragmento amplificado. A utilização de recombinação homóloga torna possível uma clonagem rápida e eficiente na obtenção de insertos na orientação correta sem o uso de enzimas de restrição e DNA ligase. Os transformantes gerados são sequenciados para confirmação dos clones que são então submetidos a transcrição e tradução *in vitro* simultâneas, em sistema livre de células, no qual a proteína é gerada em apenas uma hora de reação. A caracterização da proteína é realizada através de afinidade com anticorpo específico.

O vetor de expressão utilizado, denominado pET 17b NS3/4A Δ domínio protease (Hoffmann, 2012), possui o domínio da NS3 helicase e NS4A de HCV genótipo 1b, uma região promotora, um sítio de entrada do ribossomo (RBS- *ribosome entry site*) e uma região terminadora, e contém 4,7 kb. Códon de terminação foram introduzidos entre os domínios protease e helicase, portanto o peptídeo NS3 protease possuirá 25 kDa.

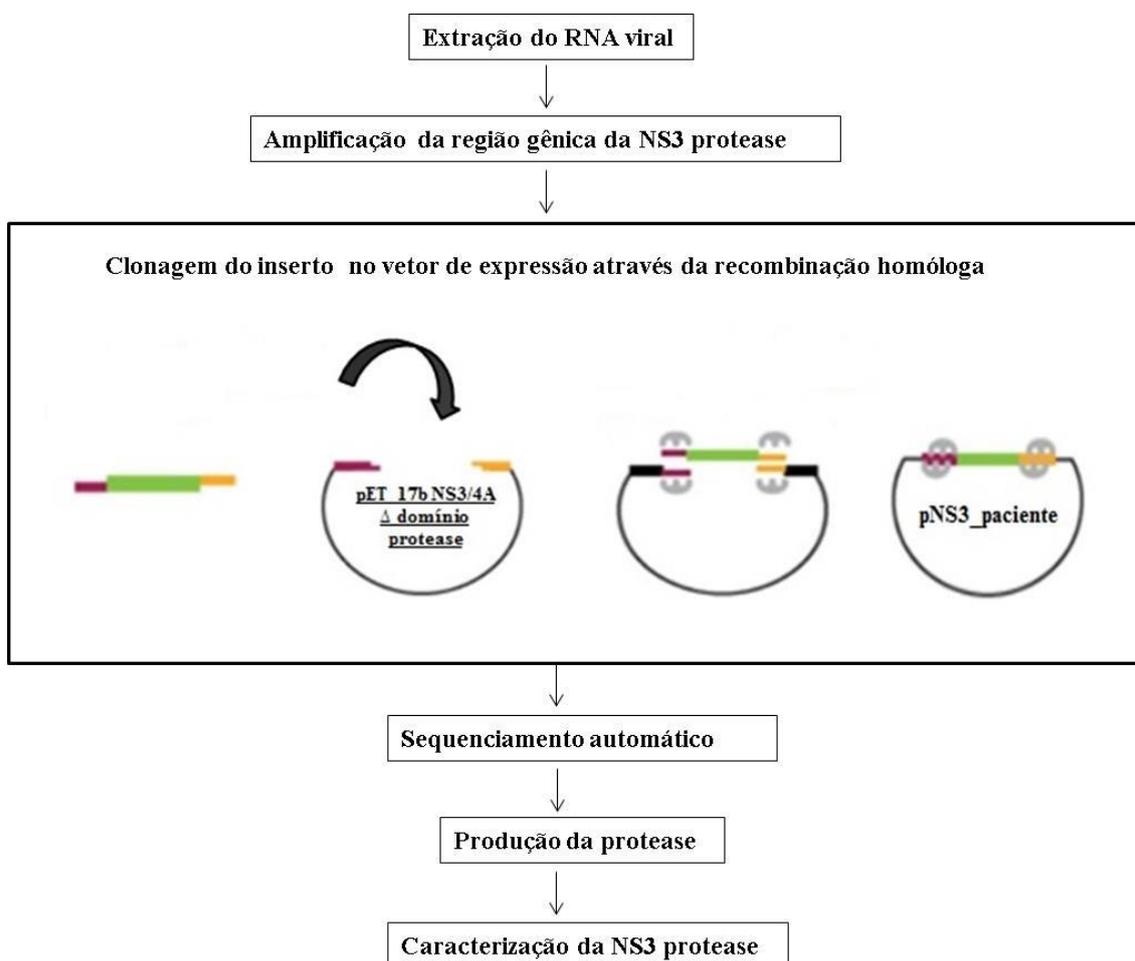


Figura 5: Racional experimental do desenvolvimento de protocolo para ensaio fenotípico de proteases NS3 de HCV variantes. Após seleção do paciente e extração do RNA viral, será feita a transcrição reversa seguida de amplificação da região NS3 variante. O fragmento amplificado será inserido, pela recombinação homóloga, no vetor pET17b NS3/4A Δ domínio protease, gerando os vetores contendo o fragmento amplificado de HCV dos pacientes 1, 2 e 3 (denominados pNS3_1, pNS3_2 e pNS3_3). A produção da NS3 protease recombinante se dará então por transcrição e tradução *in vitro*. O produto sintetizado será analisado por SDS-PAGE e a proteína caracterizada por afinidade com anticorpo específico, pela técnica de *Western Blotting*.

2. Materiais e Métodos.

2.1 Seleção dos pacientes.

O Laboratório de Metabolismo Macromolecular Firmino Torres de Castro (LMMFTC), do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), vem trabalhando com população de pacientes com hepatite C crônica juntamente com o Serviço de Hepatologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF). Neste trabalho, em andamento, temos acesso ao material biológico e aos dados clínicos dos pacientes, possibilitando a investigação tanto de fatores virais quanto do hospedeiro associados com resposta ao tratamento antiviral.

Os pacientes foram selecionados obedecendo aos seguintes critérios de inclusão: idade maior ou igual a 18 anos; diagnóstico de hepatite C crônica; confirmação histopatológica de hepatopatia crônica; RNA de HCV detectado no soro por PCR qualitativo; sem contra-indicação ao uso de IFN e RBV; concordaram em usar método contraceptivo iniciado 1 mês antes do tratamento e mantido até 6 meses após o término do tratamento com RBV. Além disso, os pacientes assinaram o consentimento livre e esclarecido (Anexo 2). Os critérios de exclusão eram: mulheres grávidas ou amamentando; pacientes em uso de imunossupressores ou em terapia antineoplásica; co-infecção com HIV ou com o vírus da Hepatite B (HBV); história ou evidências clínico-laboratoriais de outras hepatopatias crônicas; sinais ou sintomas de carcinoma hepatocelular (CHC); ou contra-indicação ao tratamento com as drogas propostas.

Utilizando esta coorte de pacientes com hepatite C crônica (características mostradas no quadro 4), nosso laboratório trabalhou na investigação de mutações de resistência aos inibidores de protease através do estudo da variabilidade genética da NS3 protease do HCV. Dos 68 pacientes portadores de HCV genótipo 1 tratados com PEG-IFN/RBV estudados, em três foram encontradas as seguintes mutações de resistência: V36L, T54S e V55A (Hoffmann *et al.*, 2013; Hoffmann, 2012). Tais pacientes foram denominados: paciente 1 (p1), não respondedor (NR), com a mutação T54S; paciente 2 (p2), recidivante (REC), com a dupla mutação V36L e V55A; e paciente 3 (p3), respondedor viral sustentado (RVS), com a mutação T54S.

Quadro 4: Características dos grupos de pacientes estudados.

Característica dos pacientes	RVS (n=26)	REC (n=10)	NR (N=32)	TOTAL (n=68)
Mediana da Idade	54.00	56.00	56.00	55.00
Mediana do IMC	25.96	27.15	24.58	25.49
Sexo Masculino (%)	62	40	56	56

Fonte: Hoffmann, 2012.

O Quadro 5 ilustra as trocas de nucleotídeos nos códons que originaram as mutações tendo como base a sequência referência de HCV de genótipo 1a AF009606.

Quadro 5: Via mutacional para formação das mutações de resistência aos inibidores de protease V36L, T54S e V55A. Na primeira coluna, a posição do aminoácido na proteína NS3 protease e a respectiva troca de aminoácidos.

Aminoácido e posição na proteína	Códon na proteína referência	Códon de resistência e aminoácido	Via mutacional
V36L	GTG	CTG	1 transversão
T54S	ACT	TCT	1 transversão
V55A	GTC	GCC	1 transição

Fonte: Hoffmann, 2012.

2.2 Preparação das amostras.

As amostras de sangue foram coletadas em tubo sem anticoagulante e centrifugados à 2500 rpm por 10 minutos na centrífuga LS-3 Plus CELM. Os soros foram identificados, aliquotados em criotubos e armazenados a -70°C para posterior extração do RNA viral.

2.2.1 Extração do RNA de HCV dos soros.

Os soros dos três pacientes descritos acima foram descongelados e foi utilizado um volume de 100 μL de cada um para a extração do RNA viral. Foi utilizado o *kit* QIAmp® MiniElute® Virus Spin (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante.

2.2.2 Reação de transcrição reversa (RT).

Após a extração, o RNA foi submetido à reação de transcrição reversa utilizando-se o High Capacity cDNA Archive *kit* (Applied Biosystems, Inc., Foster City, California, USA), conforme orientações do fabricante. A reação consiste na mistura do tampão 10X, iniciadores randômicos 10X, dNTPs 25X e a Multiscribe Reverse Transcriptase (5U/ μL). A esta mistura (25 μL) foi adicionado o RNA de volume aproximado de 25 μL , ou seja, todo RNA obtido na extração com o kit QIAmp® MiniElute® Virus Spin. A incubação da reação de transcrição reversa foi realizada por 10 minutos a 25°C , seguido de 120 minutos a 37°C e 5 segundos a 85°C , em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, California, USA).

2.2.3 Amplificação da região NS3 protease variante do HCV a partir do cDNA.

A PCR foi realizada em duas etapas (*nested*), utilizando um par de iniciadores externos na primeira etapa e um par de iniciadores internos na segunda etapa (Quadro 6). O par de iniciadores internos contém 37 bases (senso) e 35 bases (anti-senso) de homologia com sequências que flanqueiam o local desejado para a inserção por

recombinação no vetor de clonagem (pET 17b NS3/4A Δ domínio protease). Foram utilizados 0,15 mM de dNTPs, 2 mM de MgCl₂, 20 pmoles de cada par de iniciadores e 1 unidade (U) da enzima Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e tampão 1X (10X buffer: 200mM Tris-HCl pH 8,4 e 500mM KCl), em volume de 50 μL.

Na 1ª etapa da RT-PCR foram utilizados 5 μL de cDNA e 45 μL da mistura de reação de PCR. Na 2ª etapa da RT-PCR utilizamos 5 μL do produto da 1ª etapa da PCR e 45 μL da mistura da reação. A ciclagem consistiu de 5 minutos a 94°C; 30 ciclos de: 30 segundos a 94°C, anelamento; 30 segundos a 55°C, extensão e 60 segundos a 72°C por 10 minutos, extensão final. O PCR *nested* foi realizado em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, California, USA). Após a síntese, uma alíquota de 10 μL foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1,5% em TBE 1X, e foi visualizada por coloração de brometo de etídio a 1 μg/mL.

Os produtos de PCR foram purificados com o Amicon® Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices (Millipore, Billerica, MA, USA), seguindo as orientações do fabricante.

Quadro 6: Iniciadores utilizados para amplificação do HCV dos soros dos pacientes.

Iniciador	Sequência (5' para 3')
NS3 externo_Senso	gCDCCYATYACRGCBTAYKCYCARCAgAC
NS3 externo_Anti-Senso	ACYTTTRgTgCTYTTRCCgCTRCCRgTggg
NS3 interno_Senso	AAggAgATATACATATggCgggCgCDCCYATYACDgC
NS3 interno_Anti-Senso	ACgAgTTgTCCgTgAAgACCgggCggCCgCAATgT

Em verde, as regiões de homologia com pET17b NS3/4A Δ domínio protease. Em azul, sítios de restrição para a enzima *NotI*.

2.3 Linearização e quantificação do pET17b NS3/4A Δ domínio protease e do fragmento da NS3 protease.

Foi feita a digestão do vetor pET 17b NS3/4A Δ domínio protease utilizando-se a enzima de restrição *NotI* Fast Digest (Fermentas), obtendo-se o vetor linearizado. Posteriormente foi realizada a inserção da região gênica da NS3 protease variante, pela recombinação homóloga, no vetor pET 17b NS3/4A Δ domínio protease para subsequente produção da proteína variante. A reação de digestão foi realizada conforme

as instruções do fabricante, e consiste na mistura de 2 unidades de NotI, seu tampão na concentração final de 1X, H₂O Milli Q e 1,8 µg de vetor. A reação foi incubada por 3 horas a 37°C e 5 minutos a 80°C para a inativação da enzima. Após a reação de digestão foi tomada uma alíquota de 10 µL para a realização de eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 1X e visualização por coloração de brometo de etídio a 1 µg/mL. Este gel serviu como preparativo para extração dos fragmentos obtidos. Com o uso de aparelho portátil de emissão de UV longo, o gel foi rapidamente irradiado para que se pudesse localizar o fragmento de interesse (de 4,7 kb). Este, foi extraído com o QIAquick® Spin para QIAquick gel extraction Kit (Qiagen), conforme instruções do fabricante. Os fragmentos extraídos foram então analisados em eletroforese em gel de agarose a 1% em TBE 1X, corado em brometo de etídeo a 1 µg/mL.

Tanto o fragmento amplificado da NS3 protease variante quanto o vetor pET 17b NS3/4A Δ domínio protease linearizado foram quantificados em Nanodrop (*Thermo Scientific*), para que pudéssemos calcular a relação molar de 3:1 do inserto em relação ao vetor.

2.4 Inserção da NS3 protease variante no vetor pET 17b NS3/4A Δ domínio protease pela recombinação homóloga.

A clonagem do fragmento de NS3 protease variante amplificado no vetor pET17b NS3/4 Δ domínio protease foi feita utilizando-se o In-Fusion® Dry-Down PCR Cloning Kit (Clontech), conforme instruções do fabricante. Este é altamente eficiente na obtenção de insertos na orientação correta. A reação de ligação dos produtos amplificados de NS3 protease e pET17b NS3/4 Δ domínio protease foi realizada por incubação por 15 minutos a 37°C, 15 minutos a 50°C e posteriormente transferida para gelo.

2.5 Transformação Bacteriana e Extração do DNA Plasmidial (Minipreparação).

Para a transformação de bactérias competentes usamos a *Escherichia coli* DH5α-F'IQ com eficiência de transformação de 10⁷ transformantes/µg de DNA, com 20 µL de cada reação de ligação e 200 µL de bactérias, conforme protocolo descrito por Sambrook and Russel (2001). A indução de competência foi do tipo química baseada no

método de cloreto de cálcio (CaCl_2), com protocolo adaptado de Sambrook and Russel (2001).

A mistura foi distribuída uniformemente sobre o meio LB-ágar contendo ampicilina a 100 $\mu\text{g/mL}$ em placas de Petri. Após 16 horas a 37° C, as colônias obtidas foram removidas para 3 mL de meio LB e ampicilina, para crescimento das bactérias, sob agitação.

Após 16 horas a 37° C, as bactérias foram centrifugadas por 1 minuto a 13000 rpm na microcentrífuga (MiniSpin Eppendorf) e o sedimento celular foi ressuspenso em solução de glicose 50mM, Tris-HCL 25mM pH 8.0 e EDTA 10mM gelada.

As bactérias foram lisadas em solução de NaOH 0,2 e SDS1% e incubadas no gelo por 10 minutos. O pH da solução foi neutralizado com solução de acetato de potássio 3M pH 4,8 seguido de incubação no gelo por 5 minutos e centrifugação por 5 minutos a 13000 rpm na microcentrífuga (MiniSpin Eppendorf). O sobrenadante foi transferido para outro tubo e tratado com 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de RNase A por 1 hora a 37°C e posteriormente foi extraído com fenol clorofórmio saturado em 0,1 M Tris-HCl pH 8,0. Após homogeneização em vortex e a incubação a temperatura ambiente por 2 minutos, foi centrifugado por 2 minutos a 13.200 rpm na microcentrífuga (MiniSpin Eppendorf). A fase aquosa foi transferida para outro tubo e o DNA plasmidial foi precipitado com dois volumes de etanol absoluto gelado. Após precipitação, foi homogeneizado em vortex e incubado a temperatura ambiente por 2 minutos e a -70°C por 15 minutos. Após centrifugação por 5 minutos a 13.200 rpm na microcentrífuga (MiniSpin Eppendorf), o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado em 1 mL de etanol a 70% gelado e centrifugado por 2 minutos a 13.200 rpm na microcentrífuga (MiniSpin Eppendorf). O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado foi deixado por alguns minutos à temperatura ambiente para que pudesse secar. O sedimento do DNA plasmidial foi ressuspenso em 30 μL de TE (10 mM Tris-HCL pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) e armazenado a -20°C.

Após a obtenção do DNA plasmidial, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1% e corado com brometo de etídio a 1 $\mu\text{g/mL}$ para visualização em transiluminador com luz UV.

2.6 Sequenciamento automatizado dos clones.

Os clones obtidos foram confirmados por sequenciamento automático pelo método de Sanger utilizando-se os iniciadores: NS3 interno_Senso, pET17b Senso e NS3helicaseAnti-Senso (Quadro 7). Estes plasmídeos contendo a região NS3 amplificada, passarão a ser chamados pNS3_1, pNS3_2 e pNS3_3, respectivamente para os pacientes 1, 2 e 3.

Quadro 7: Iniciadores utilizados na reação de sequenciamento para confirmação dos clones.

Iniciador	Sequência (5' para 3')
NS3 interno_Senso	AAggAgATATACATATggCggCCgCgCDCCYATYACDgC
pET17b Senso	AgATCTCgATCCCgCgAAA
NS3 helicase Anti-Senso	TgCTCTTgCCgCTACCAgtAggg

A reação de sequenciamento foi realizada em sequenciador ABI PRISM® 3500 Genetic Analyzer utilizando o Big Dye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Inc., Foster City, Califórnia, USA). A reação de sequenciamento conteve iniciadores a 3,2 µM, 1 µL de Ready Reaction Premix, 1 µL de BigDye Sequencing Buffer, 1 µL de H₂O MilliQ e 500 ng de DNA. A reação foi realizada em placa de 96 poços e em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, INc., Foster City, California, USA). A ciclagem foi realizada por 11 minutos a 96°C; e 25 ciclos de 20 segundos a 96 °C, 15 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C. Após a reação de sequenciamento, as amostras foram precipitadas com 10% do volume inicial de EDTA 125 mM e Acetato de Sódio 3M e 25 µL de etanol absoluto.

As sequências geradas foram então analisadas no *software* Geneious v. 4.7.6. As sequências obtidas com iniciadores senso e anti-senso foram conferidas manualmente onde alguns artefatos de sequenciamento foram corrigidos. Foi realizado um alinhamento de nucleotídeos entre as sequências obtidas, as sequências do plasmídeo usado na geração do vetor de expressão pET17b NS3/4 Δ domínio protease, o pET17b (Novagen) e a sequência referência da região NS3 do HCV (H77, genótipo 1) (Wenjuan *et al.*, 2006).

2.7 Transformação Bacteriana e Extração do DNA Plasmidial (Maxipreparação).

Os clones confirmados, um para cada um dos três pacientes, foram submetidos à maxi-preparação, utilizando-se o Plasmid DNA Purification NucleoBond® Xtra Maxi Plus (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Germany), seguindo instruções do fabricante e posteriormente dosados no Nanodrop (*Thermo Scientific*). A maxipreparação feita com o Kit citado acima é realizada para que possamos obter uma quantidade maior de plasmídeos clonados purificados, com isso seguimos para a etapa de produção das proteases variantes.

2.8 Produção das proteases variantes.

A produção das proteases variantes, a partir dos clones pNS3_1, pNS3_2 e pNS3_3, foi realizada em sistema de transcrição e tradução *in vitro* utilizando-se o sistema S30 T7 High-Yield Protein Expression Systems. Este sistema é baseado em um extrato de *E. coli*, livre de células e que simplifica a transcrição e tradução de sequências clonadas em plasmídeo contendo o promotor T7 já que fornece um extrato que contém T7 RNA polimerase para transcrição e todos os componentes necessários para tradução. O S30 T7 High-Yield Protein Expression Systems pode produzir elevados níveis de proteínas recombinantes (até centenas de microgramas de proteína por mililitro de reação dentro de uma hora) a partir de 1µg de DNA plasmidial. Este método foi desenvolvido pelo método de Zubay (1962) a partir de uma cepa B de *E.coli* deficiente de Ompt endoproteinase e de atividade da Ion protease, resultando em maior estabilidade das proteínas traduzidas.

Para o S30 T7 High Yield Protein Expression System, as quantidades de DNA utilizadas foram 1089 ng da maxipreparação do clone p_NS3_1, 1065 ng da maxipreparação do clone p_NS3_2, 1292 ng da maxipreparação do clone p_NS3_3, 1089 ng da maxipreparação do clone p_NS3_Selvagem e 1µg de DNA controle, segundo instruções do fabricante (controle positivo do Kit, pFN6 (HQ) Flexi®Vector que codifica luciferase de *Renilla reniformis*). A produção foi feita a 37°C por 1 hora e sob agitação de 1200 rpm utilizando o Thermomixer Comfort (Eppendorf). Após a incubação, os tubos contendo o produto da transcrição e tradução *in vitro* foram incubados no gelo por 5 minutos e depois armazenados a -20°C.

2.9 Análise das proteínas sintetizadas *in vitro*.

2.9.1 Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Os produtos produzidos *in vitro* pelo sistema livre de células foram preparados para a análise eletroforética acrescentando-se TBS 1X e RNase A a 1 mg/mL e incubando-os a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foi acrescentado o tampão de amostra contendo β -mercaptoetanol 1X (1,25 mL Tris-HCL 0,5M pH 6,8, 2,5 mL glicerol, 2 ml SDS 10, 0,2 mL 0,5% (w/v) azul de bromofenol, 3,55 mL de H₂O Milli Q) e incubadas por 5 minutos a 96°C-98°C. Após a incubação, as amostras foram homogeneizadas em vortex e incubadas no gelo até a aplicação no gel de poliacrilamida.

As amostras foram aplicadas no gel com auxílio de seringa Hamilton de 50 μ L. A corrida eletroforética foi realizada em duplicata em gel SDS-PAGE a 10%, utilizando o aparato de eletroforese vertical Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Durante a corrida eletroforética, Electrophoresis Power Supply EPS 3.500 (Pharmacia Biotech), a corrente elétrica foi mantida constante, a 25 mA. Foi utilizado como padrão de peso molecular o Precision Plus Protein™ Standards Kaleidoscope™ (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

Em seguida, foi feita a coloração com solução de Azul de Coomassie [Solução A: Coomassie Brilliant 0,5g Blue R-250 (Bio-Rad), 225 mL de metanol (Merck) a 90%, H₂O Milli Q q.s.p. 250 mL e Solução B: 50 mL de ácido acético, 200 mL H₂O Milli Q. Soluções A e B misturadas na proporção 1:1], a descoloração [metanol a 40%, ácido acético glacial a 7% e H₂O Milli Q] e a secagem utilizando uma solução encolhedora [325 mL de metanol, 2,5 mL de glicerol e H₂O Milli Q q.s.p. 500 mL] e posteriormente seco entre papel celofane por aproximadamente 16 horas a temperatura ambiente. O segundo gel foi transferido para membrana para posterior *western blotting*.

2.9.2 Análise do produto de transcrição e tradução *in vitro* por Western Blotting.

O material separado em SDS-PAGE descrito acima, foi transferido para membrana de nitrocelulose de 0.45 μ m e 30 cm X 3 m (Hybond ECL, Code: RPN 303D, GE Healthcare). A transferência foi do tipo úmida utilizando-se tampão de transferência [NaHCO₃ 13mM, metanol a 20% e H₂O Milli Q] em Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA), seguindo instruções do fabricante.

A transferência foi feita por 16 horas a 4°C utilizando a fonte de eletroforese EPS 3.500 (Pharmacia Biotech) com corrente elétrica de 17 V e 150 mA. Após a transferência, para visualização das bandas e confirmação da completa transferência do gel para membrana, a membrana de nitrocelulose foi imersa em solução de vermelho de Ponceau (50 mg Ponceau S, 2,5 mL ácido acético glacial e H₂O Milli Q q.s.p. 50 mL). Em seguida, a membrana foi lavada com H₂O Milli Q e bloqueada por 1 hora com 1X PBS/blot (10X: 100g NaCl, 2,5 g KCl, 14,37 g Na₂HPO₄, 2,5 g KH₂PO₄, H₂O Milli Q q.s.p. 1 litro) e 5% de leite em pó desnatado da marca Molico com agitação leve a temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada por 3 vezes, 5 minutos cada, com 1X PBS/blot e 0,05% de detergente NP-40 (Sigma). A incubação com anticorpo primário (Hep C NS3 1828 sc69938, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) foi feita por 1 hora em 5% de leite molico e PBS/blot 1X e 0,05% de NP-40. O anticorpo primário possui como sítio combinatório os domínios da protease e helicase de NS3 do HCV. A incubação com anticorpo secundário anti-mouse Ig horseradish peroxidase (Amersham) diluído 1:4.000 foi feita por 1 hora com 5% leite Molico, PBS/blot 1x e 0,05% de NP-40 e a membrana lavada por 7 minutos 2 vezes e 1 vez por 10 minutos com PBS/blot 1X e 0,05% de NP-40, e 1 vez por 2 minutos com PBS/blot 1X.

A revelação foi feita com o ECL™ Western Blotting Detection Reagents (Amersham/GE Healthcare). Foram misturados os dois reagentes do ECL, 1 e 2, na mesma proporção e aplicados sobre a membrana de nitrocelulose. O excesso foi removido com o auxílio de papel filtro e a membrana foi coberta com filme PVC para exposição ao filme de raios-X (Kodak), à temperatura ambiente. Foi feita a exposição aos filmes em diferentes tempos: 15 segundos, 1 minuto, 5 minutos e 30 minutos.

3 Resultados

3.1 Obtenção do fragmento correspondendo à região NS3 protease do HCV a partir do soro dos pacientes.

Para o estudo foram utilizados o soro coletado dos 3 pacientes referente ao último ponto em que o RNA de HCV foi detectado por PCR qualitativo, ou seja, após 3 meses de tratamento para o paciente 1, e 7 dias de tratamento com interferon e ribavirina para os pacientes 2 e 3. Após a extração do RNA viral a partir do soro foi realizada a reação de transcrição reversa conforme citado na Metodologia. O cDNA produzido foi submetido a PCR *nested* utilizando para este fim um par de iniciadores para a amplificação da região gênica da protease NS3 e de sítios de homologia com o vetor de expressão pET17b NS3/4A Δ domínio protease (Figura 6) que permite a inserção do fragmento na direção correta. O tamanho esperado do fragmento é de 600 pares de bases.

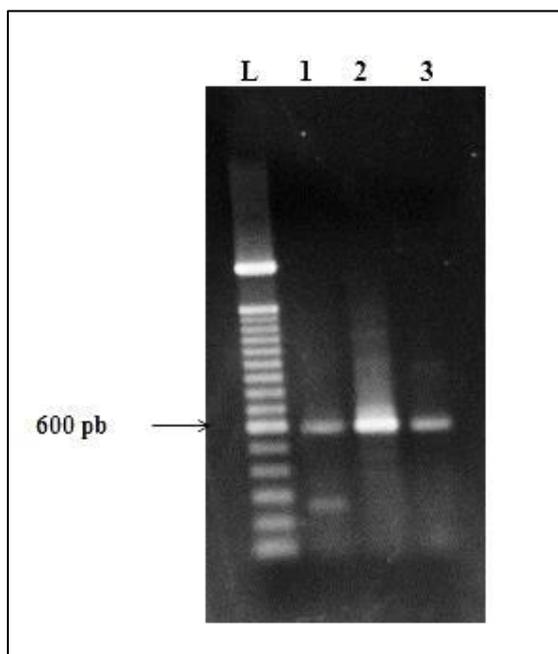


Figura 6: Inserção de terminais homólogos às regiões do vetor pET17b NS3/4A Δ domínio protease por PCR *nested*. Análise eletroforética de fragmentos da região gênica da NS3 protease contendo as regiões de homologia nas extremidades. Seta indicando os produtos do RT-PCR *nested*, de tamanho esperado de 600 pb, correspondendo a região gênica de NS3 protease variante após purificação em coluna. **Raia L:** Marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen); **Raias 1, 2 e 3:** Produto de RT-PCR dos soros dos pacientes 1, 2 e 3. Análise por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em TBE 1X, corado com brometo de etídio a 1 µg/mL.

3.2 Preparo do vetor pET 17b NS3/4A Δ domínio protease.

Para inserção do fragmento amplificado de NS3 protease de HCV no vetor pET17b NS3/4A Δ domínio protease, fez-se primeiramente a linearização do vetor por digestão no sítio de clonagem com a enzima de restrição NotI (Figura 7) .

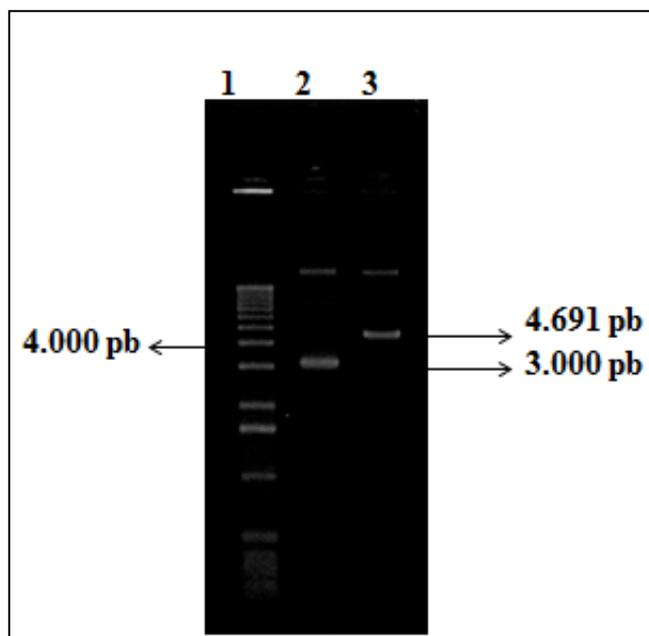


Figura 7: Análise do pET17b NS3/4A Δ domínio protease linearizado com NotI. Análise eletroforética da reação de digestão do vetor pET 17b NS3/4A Δ domínio protease com a enzima Not I Fast Digest (Fermentas). **Raia 1:** Marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen); **Raia 2:** vetor pET 17b NS3/4A Δ domínio Protease não digerido e **Raia 3:** vetor pET 17b NS3/4A Δ domínio Protease linearizado por digestão com Not I, resultando em um fragmento esperado de 4.691 pb.

O fragmento do vetor de 4.691 pb foi purificado através de separação em gel de agarose utilizando o QIAquick gel extraction Kit (Qiagen), conforme as instruções do fabricante. Tomou-se então alíquota do produto de extração e analisou-se por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio (Figura 8).

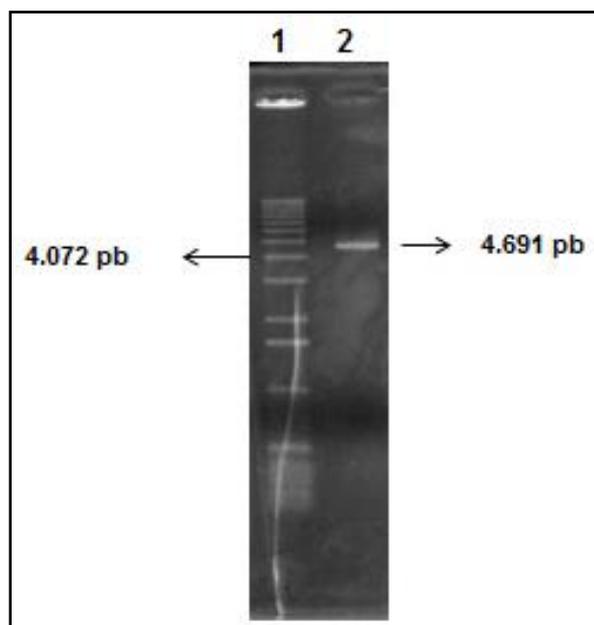


Figura 8: Análise do plasmídeo linearizado purificado por eletroforese em gel de agarose. Gel de agarose a 1% em TBE 1X, corado em brometo de etídeo a 1 µg/mL. **Raia 1:** Marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen); **Raia 2:** Fragmento de interesse de 4.691 pb para realização da clonagem da NS3 protease variante.

3.3 Clonagem através de recombinação homóloga da região gênica da NS3 protease variante amplificada no vetor pET17b NS3/4A Δ domínio protease.

Após amplificação da NS3 variante e linearização do vetor foi feita a clonagem. As clonagens dos produtos de PCR referentes à região gênica da NS3/4A protease variante de cada paciente (p1, p2, e p3), denominadas pNS3_1, pNS3_2 e pNS3_3, em plasmídeos pET17b NS3/4A Δ domínio protease foram realizadas pela recombinação homóloga utilizando-se o In-Fusion® Dry-Down PCR Cloning Kit (Clontech).

3.4 Transformação Bacteriana e Extração do DNA plasmidial (Minipreparações).

Com os plasmídeos contendo a região NS3 variante dos pacientes foi realizada a transformação bacteriana, utilizando alíquotas de *Escherichia coli* DH5α eletrocompetentes. O plaqueamento destes materiais em meio de cultura contendo antibiótico resultou, ao todo, em 29 colônias diferentes, correspondendo 12 colônias do paciente 1 identificado como pNS3_1, 12 colônias do paciente 2 identificado como pNS3_2 e 5 colônias do paciente 3 identificado como pNS3_3.

Os DNAs plasmidiais dessas 29 colônias diferentes foram extraídos e analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% para verificação do tamanho dos fragmentos dos transformantes. Nesta análise, como esperado, verificaram-se dois padrões de tamanho do plasmídeo determinado pela inserção ou não do fragmento de NS3 (Figura 9).

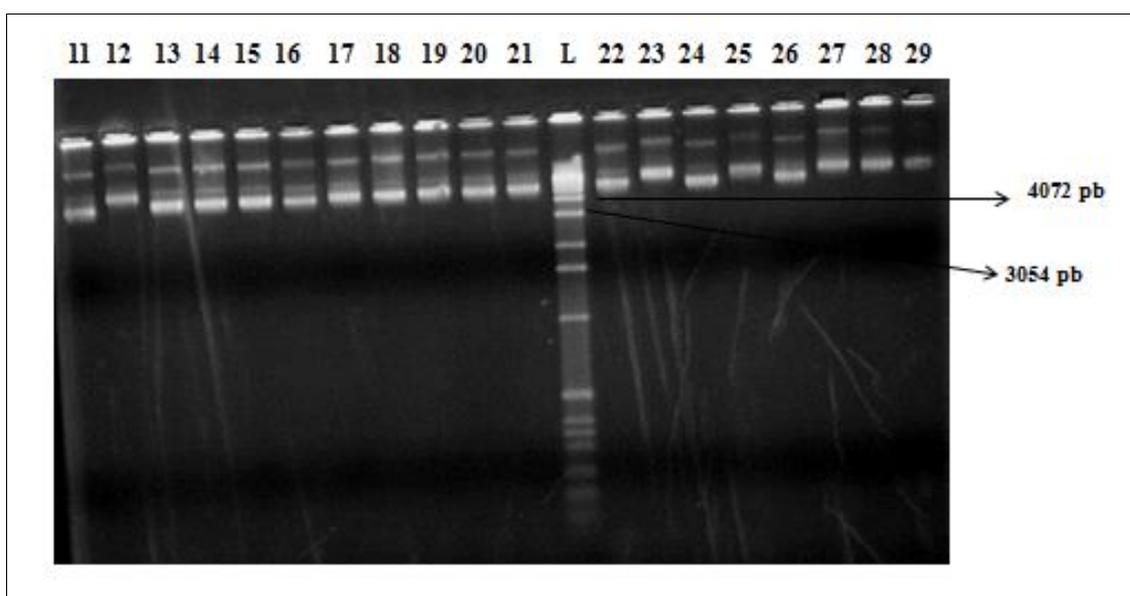
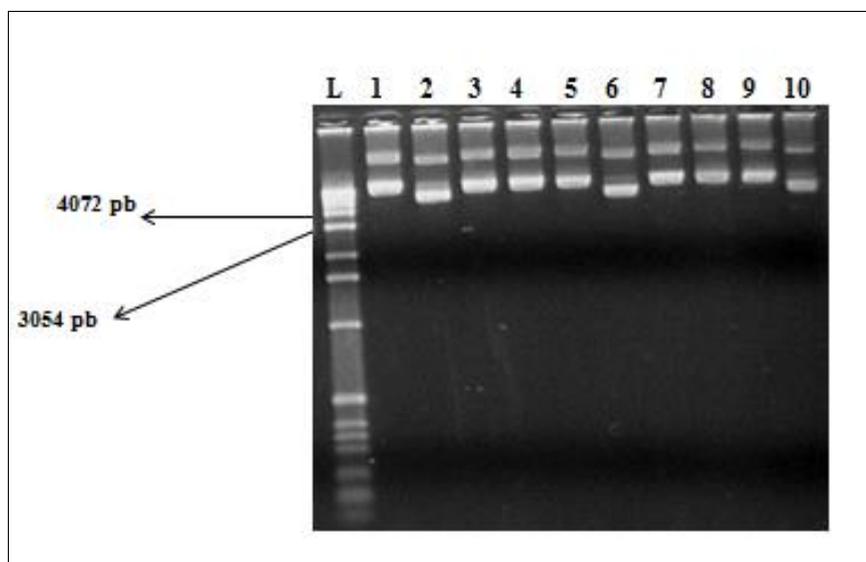


Figura 9: Análise das minipreparações de plasmídeos dos transformantes provenientes da clonagem do fragmento da região gênica da NS3 protease variante no vetor pET17b NS3/4A Δ domínio protease. Análise por eletroforese em gel de agarose a 1% em TBE 1X, corado com brometo de etídeo a 1 µg/mL dos 29 transformantes. **Raia L:** Marcador de peso molecular de 1kb (Invitrogen). Os clones do paciente 1, representados por p_NS3_1, nas **Raias: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 e 13;** do paciente 2, representados por p_NS3_2, nas **Raias: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 e 25;** e do paciente 3, representados por p_NS3_3, nas **Raias: 11, 26, 27, 28 e 29.**

Após análise por tamanho, selecionamos as minipreparações para o sequenciamento. As minipreparações que apresentava menor peso molecular observado pelo gel de agarose, não possuíam a região NS3, ou seja, não apresentavam inserto. Todas as minipreparações que apresentavam peso molecular maior foram sequenciadas em ambas as fitas do DNA, confirmando a região da NS3 de cada paciente.

3.5 Sequenciamento automático dos clones

As minipreparações que apresentavam peso molecular maior foram sequenciadas em ambas as fitas do DNA, confirmando a região da NS3 de cada paciente.

Nas Figuras 10, 11 e 12 pode-se visualizar os eletroferogramas correspondentes a uma das fitas do DNA da NS3 dos pacientes (p1, p2 e p3). Podemos observar nos eletroferogramas a indicação de sequências no vetor, como o promotor do bacteriófago T7, que é importante para a produção dos transcritos e a região RBS (*ribosome entry site*) que é a sequência de reconhecimento no RNA para a maquinaria de tradução de proteínas.

Observamos, pela indicação de setas, as mutações não sinônimas em relação à sequência referência do HCV (AF009606). As setas em vermelho indicam aquelas mutações que conferem resistência aos novos inibidores de NS3 protease já relatadas. A existência de sequências com códon de parada no desenho da sequência indicam que o peptídeo predito deverá ter em torno de 25 kDa (Figura 12).

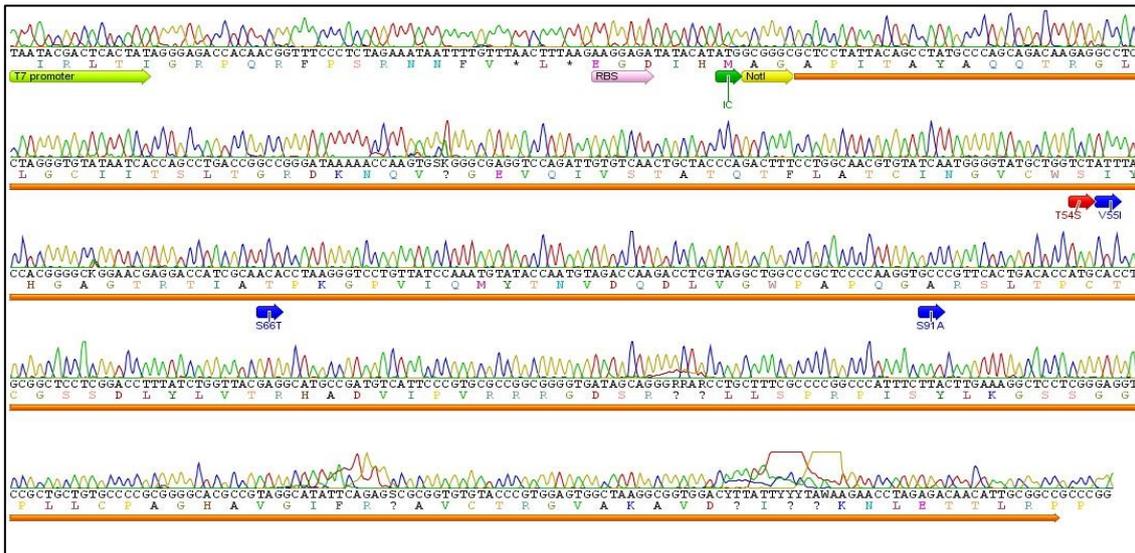


Figura 10: Eletroferograma resultante do sequenciamento do clone p_NS3_1. Na sequência: em verde, o promotor T7; em rosa, o sítio de entrada do ribossomo (RBS); em verde, o códon de iniciação ATG; em amarelo, o sítio de restrição para a enzima NotI; e em laranja, a região gênica da NS3 protease de HCV. Em vermelho, a mutação de resistência aos inibidores de protease e em azul, alterações não-sinônimas na sequência da NS3 protease. Figura extraída do *software* Geneious v. 4.7.6.

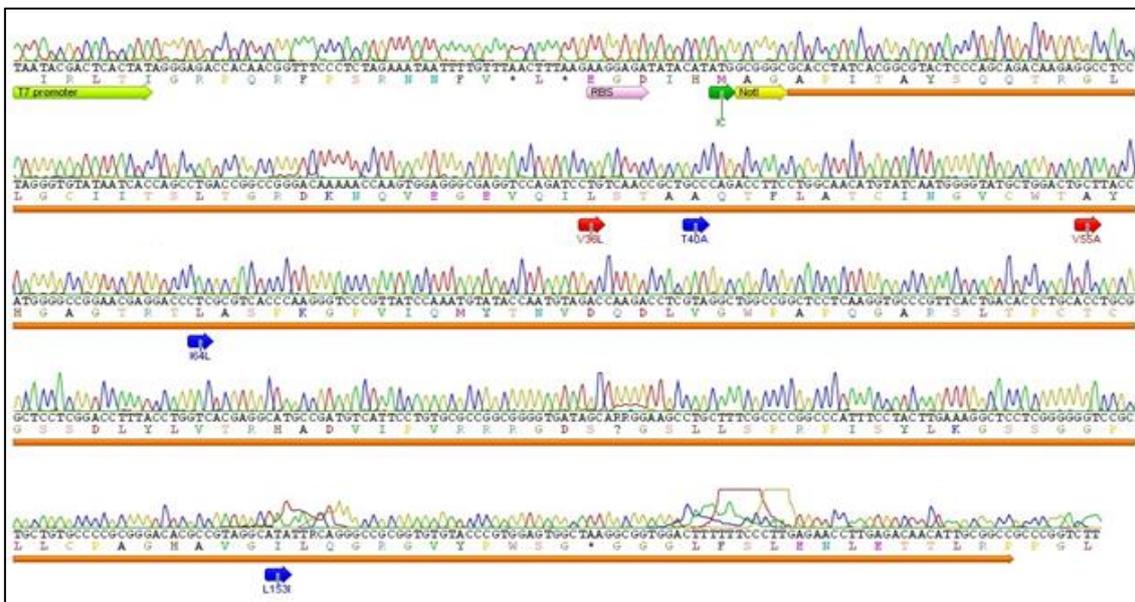


Figura 11: Eletroferograma resultante do sequenciamento do clone p_NS3_2. Na sequência: em verde, o promotor T7; em rosa, o sítio de entrada do ribossomo (RBS); em verde, o códon de iniciação ATG; em amarelo, o sítio de restrição para a enzima NotI; e em laranja, a região gênica da NS3 protease de HCV. Em vermelho, as mutações e resistência aos inibidores de protease e em azul, alterações não-sinônimas na sequência da NS3 protease. Figura extraída do *software* Geneious v. 4.7.6.

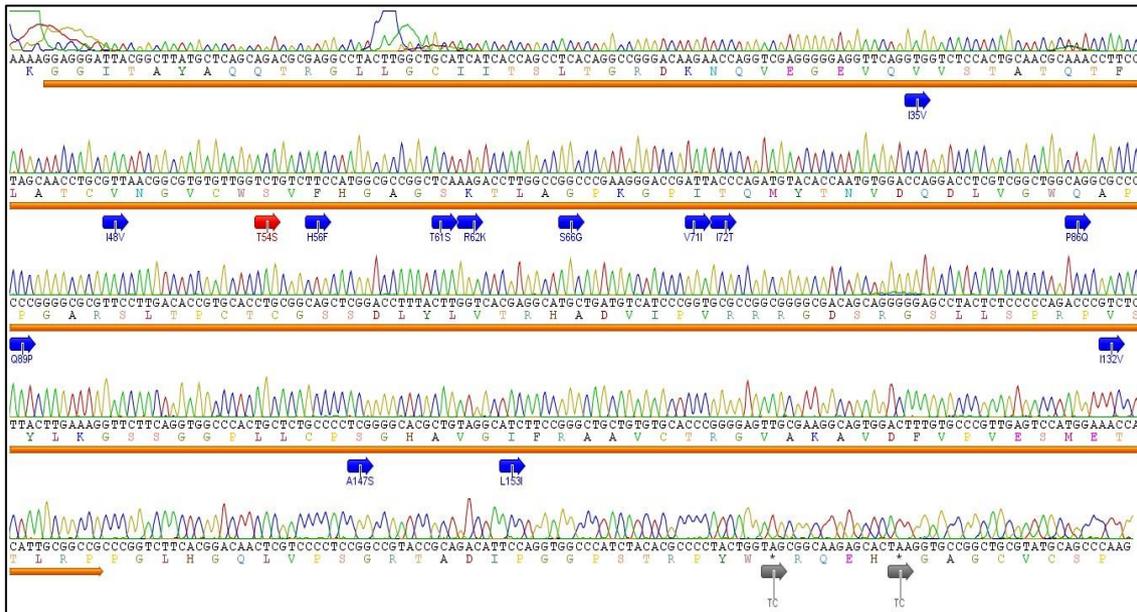


Figura 12: Eletroferograma resultante do sequenciamento do clone p_NS3_3. Em laranja, a região gênica da NS3 protease de HCV. Em vermelho, a mutação de resistência aos inibidores de protease e em azul, alterações não-sinônimas na sequência da NS3 protease. Em cinza, códons de terminação. Figura extraída do *software* Geneious v. 4.7.6.

3.6 Maxi-preparações dos plasmídeos p_NS3_1, p_NS3_2 e p_NS3_3 para ensaios de transcrição e tradução *in vitro*.

Os clones p_NS3_1, p_NS3_2 e p_NS3_3, selecionados por sequenciamento automático, foram produzidos em grande quantidade (maxipreparação) para os ensaios de transcrição e tradução *in vitro*. A análise das maxipreparações foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio (Figura 13).

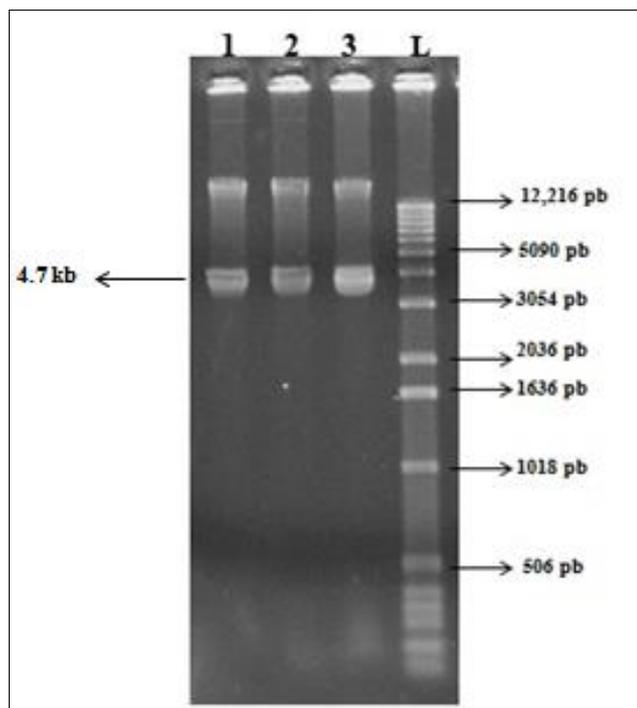


Figura 13: Análise das maxi-preparações de DNA dos transformantes da clonagem dos fragmentos de NS3 protease variantes no pET17b NS3/4A Δ domínio protease. Na Raia 1: p_NS3_1, Raia 2: p_NS3_2 e Raia 3: p_NS3_3, o DNA plasmidial dos três pacientes possuindo um tamanho aproximado de 4,7kb, correspondendo ao vetor mais a região gênica da NS3 protease variante. Raia L: Marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen). Análise em eletroforese em gel de agarose a 1% em TBE 1X, corado com brometo de etídeo a 1 µg/mL.

3.7 Perfil proteico do extrato de ensaio de síntese *in vitro*.

Os ensaios de transcrição e tradução *in vitro*, em sistema livre de células utilizando o kit S30 T7 High-Yield Protein Expression System, foram realizados como descrito em métodos.

Após o ensaio, os extratos proteicos da síntese *in vitro* foram analisados por SDS-PAGE corado com azul de Coomassie (Figura 15). Como controle negativo de síntese *in vitro* foi utilizado o plasmídeo pET17b NS3/4A Δ domínio protease sem inserto e, como controle positivo do ensaio, foi utilizado o plasmídeo pFN6 (HQ), fornecido pelo *kit*, que codifica a luciferase de *Renilla reniformis*. Nestes ensaios foram utilizadas as amostras provenientes dos três pacientes (p_NS3_1, p_NS3_2 e p_NS3_3) em duplicatas além de uma correspondendo a um clone contendo a região da NS3 selvagem. Observamos na Figura 14 o perfil proteico das proteínas contidas no ensaio *in vitro* utilizando os plasmídeos citados acima. Na raia 2 (controle positivo), é possível

observar um peptídeo de tamanho aproximado de 35 kDa correspondendo a luciferase de *Renilla reniformis*. Porém, nas demais raias não se observa o peptídeo correspondente a NS3 protease (25 kDa). Para determinar se a proteína havia sido produzida utilizamos o anticorpo específico para NS3.

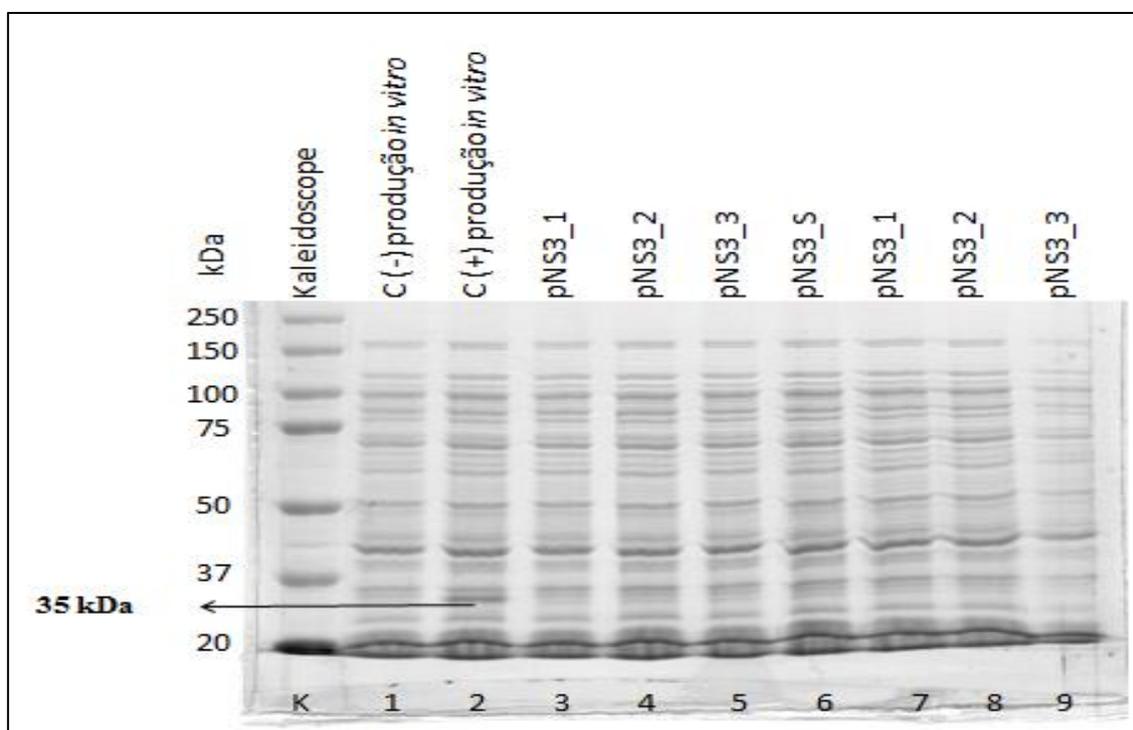


Figura 14: Perfil do extrato proteico do ensaio da síntese *in vitro* por SDS-PAGE corado com azul de Comassie. Gel de poliacrilamida a 10%. **Raia K:** Marcador de peso molecular Kaleidoscope (BioRad). **Raia 1:** Controle negativo da síntese *in vitro*. **Raia 2:** Controle positivo da síntese *in vitro*. **Raias 3 e 7 (duplicatas):** Protease NS3 oriunda do HCV do paciente 1 sintetizada *in vitro*. **Raias 4 e 8:** Protease NS3 oriunda do HCV do paciente 2 sintetizada *in vitro*. **Raias 5 e 9:** Protease NS3 oriunda do HCV do paciente 3 sintetizada *in vitro*. **Raia 6:** Protease NS3 selvagem sintetizada *in vitro*. Foram adicionados 10 µL de extrato proteico por raia.

3.8 Detecção por Western Blotting com anticorpo específico.

A identificação da NS3 protease nos ensaios de transcrição e tradução foi realizada por *western blotting* utilizando o anticorpo específico, que possui como epítopo os domínios da protease e helicase de NS3 do HCV. Como controles negativos de síntese *in vitro* de NS3 foi utilizado uma reação de síntese com os plasmídeos **pET17b NS3/4A Δ domínio protease** (ausência da região NS3) e pFN6 (HQ) que

codifica a luciferase de *Renilla reniformis*. Como controle positivo, utilizamos o peptídeo correspondendo a NS3 protease selvagem. Os peptídeos correspondentes às NS3 proteases variantes do HCV dos pacientes foram aplicados ao gel em duplicata. Ao revelarmos a membrana (Figura 15) observamos peptídeos de tamanho esperado de 25 kDa correspondendo ao domínio da NS3 protease.

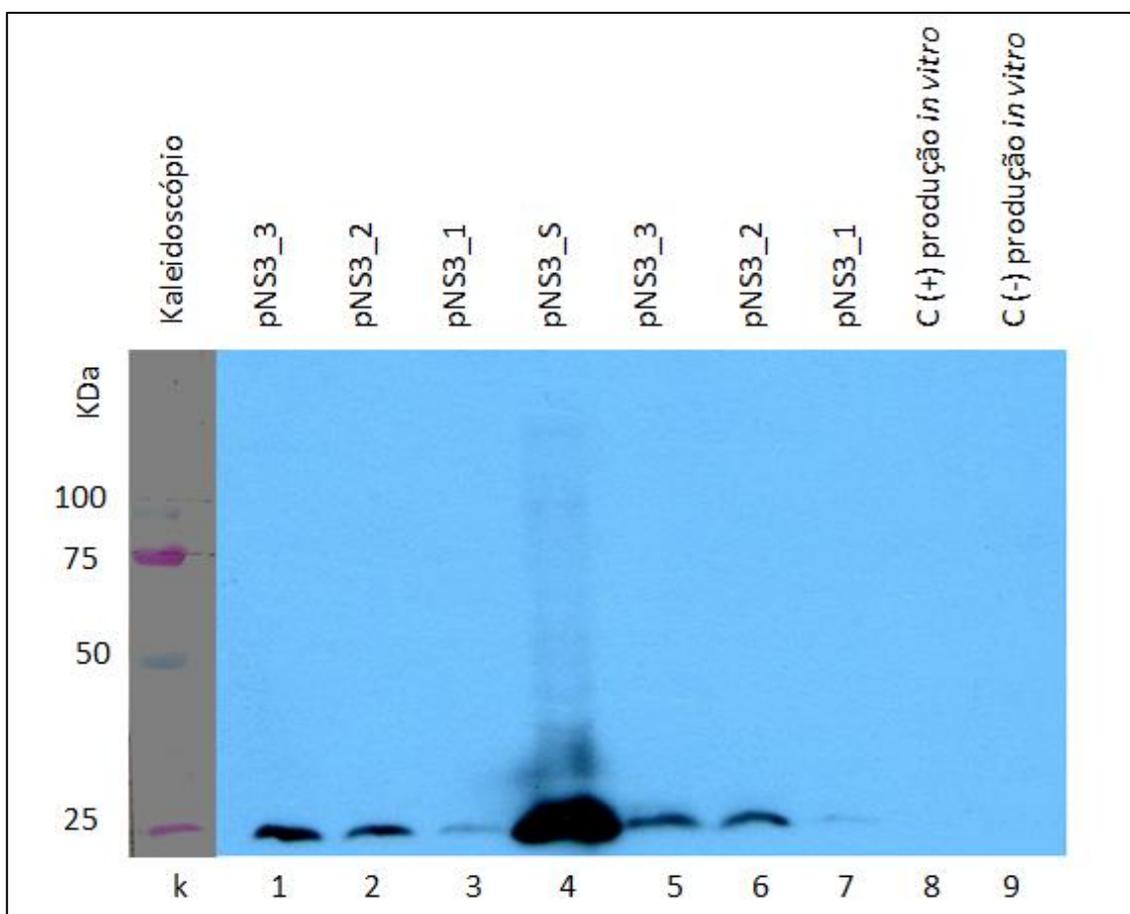


Figura 15: Detecção por *western blotting* da protease NS3 sintetizada *in vitro*. Membrana de nitrocelulose com 15 segundos de exposição ao filme de raio X à temperatura ambiente. Raia K: Kaleidoscópico (BioRad), marcador de kDa. **Raias 1 e 5:** Protease NS3 oriunda do HCV do paciente 3 sintetizada *in vitro*. **Raias 2 e 6:** Protease NS3 oriunda do HCV do paciente 2 sintetizada *in vitro*. **Raias 3 e 7:** Protease NS3 oriunda do HCV do paciente 1 sintetizada *in vitro*. **Raia 4:** Protease NS3 selvagem sintetizada *in vitro*. **Raia 8:** Controle positivo da síntese *in vitro*. **Raia 9:** Controle negativo da síntese *in vitro*.

4. Discussão

A hepatite C é um problema de saúde pública no Brasil e no mundo. A infecção pelo HCV é a principal causa de hepatite crônica, cirrose e CHC, assim como é a indicação mais frequente de transplante hepático no mundo. Estima-se que haja de 170 a 200 milhões de pessoas infectadas com o HCV.

Até poucos meses, a terapia padrão para a hepatite C era baseada na combinação de PEG-IFN/RBV. Uma vez que este tratamento não tem eficácia satisfatória, particularmente em doentes infectados com HCV genótipos 1 e 4, a recente inclusão de inibidores da protease viral (IPs) (Telaprevir e Boceprevir) para a terapia anti-HCV, tem alcançado uma taxa de resposta de até 80% em pacientes infectados com o genótipo 1 (Bacon *et al.*, 2011, Jacobson *et al.*, 2011 e Zeuzem *et al.*, 2011).

A aprovação desses novos agentes terapêuticos representa um importante avanço no tratamento da hepatite C já que pela primeira vez será feito com antivirais de ação direta (DAAs) no ciclo infeccioso do vírus. Porém, resistência a esses inibidores frequentemente ocorre e é motivo de preocupação para pesquisadores e clínicos já que pode interferir na eficácia terapêutica.

As mutações de resistência aos inibidores de protease NS3/4A do HCV são frequentemente mapeadas através de ensaios fenotípicos que indicam se essa variabilidade genética interfere na atividade de processamento da proteína.

No entanto, este tratamento não é igualmente eficaz contra todos os genótipos de HCV e em todos os grupos de pacientes, e incita o desenvolvimento de uma nova geração de fármacos, sozinhos ou em combinação, que poderão eliminar o vírus, driblando a variabilidade genética, o aparecimento de mutações de resistências e os mecanismos de defesa do vírus.

A pesquisa sobre a biologia molecular do HCV e a sua interação com o hospedeiro tem sido limitada por anos devido à falta de um modelo animal adequado (de pequeno porte), e um sistema de cultura celular *in vitro* capaz de reproduzir um ciclo replicativo completo do HCV, incluindo a produção de partículas virais infecciosas. Além disso, por razões desconhecidas, o HCV derivado de soros de pacientes replicam em um nível muito baixo e muito pouco reprodutível em culturas primárias de hepatócitos humanos e em linhagens celulares derivadas de hepatoma (Ito *et al.*, 1996; Seipp *et al.*, 1997; Fournier *et al.*, 1998).

Na sequência viral de genótipo 1, dos pacientes com hepatite C deste trabalho, foram encontradas as mutações de resistência: V36L, T54S e V55A. Essas são mutações primárias de resistência uma vez que foram encontradas antes mesmo dos pacientes serem submetidos ao tratamento antiviral com inibidores de protease. As mutações V36L e T54S já haviam sido previamente descritas na população naïve brasileira (Peres-da-Silva *et al.*, 2010). Da mesma forma, essas mutações já foram descritas na população naïve em vários países. Vicenti e cols., no ano de 2012, relataram um estudo no qual 9,2% dos isolados virais provenientes de pacientes italianos apresentavam as mesmas mutações de resistência encontradas em nosso trabalho, V36L, T54S e V55A.

A relação genótipo *versus* fenótipo é essencial para verificar se as mutações encontradas nas sequências de nucleotídeos e aminoácidos na região NS3 do HCV irão influenciar na atividade de processamento da proteína. Além disso, os pacientes não deveriam ser tratados com inibidores de protease sem antes serem submetidos a teste fenotípico. A terapia tripla de IP/PEG-IFN/RBV possui um alto custo e causa diversos efeitos adversos (rash cutâneo; anemia, sendo necessário, em alguns casos, fazer transfusões sanguíneas; distúrbios psicológicos/psiquiátricos, como depressão ou transtornos do humor; distúrbios autoimunes; etc.), influenciando na qualidade de vida dos pacientes. Sendo assim, é de grande relevância a implementação de protocolo para o uso de ferramenta molecular para a produção da NS3 protease variantes do vírus da hepatite C de pacientes crônicos, protocolo este que é realizado de forma mais rápida, eficaz e de menor custo. Desta forma, não é necessário o uso de equipamentos de alto nível de biossegurança, podendo ser implementado tanto em laboratório de pesquisa quanto laboratório de rotina. Poderá ser utilizado como um *screening* em laboratório de rotina, facilitando os pacientes portadores de hepatite C crônica. Os pacientes poderão ter o RNA viral extraído e analisado, em seguida a NS3 protease variante poderá ser produzida para posterior realização de ensaio fenotípico com as drogas disponíveis no mercado. Desta forma, será acertada a escolha da melhor droga a ser utilizada de forma individual. Evitam-se gastos maiores com medicamentos ineficazes para cada paciente, melhorando a sua qualidade de vida e aumentando as chances de cura. Os ensaios fenotípicos já descritos para testes de determinação da atividade da protease do HCV utilizam sistemas de culturas de células, sistemas quiméricos de replicons para monitoramento fenotípico de isolados clínicos e sistema de infecção do HCV genótipo 2a utilizando replicons que selecionam vírus resistentes aos inibidores de protease. Tais

sistemas envolvem uma metodologia onerosa, trabalhosa e requer um laboratório com uma infraestrutura adequada, ou seja, um laboratório com todos os requisitos relacionados à biossegurança atendidos.

Para a produção de proteínas *in vitro* é necessário o uso de plasmídeos construídos para serem utilizados em um sistema livre de células. Os plasmídeos devem possuir uma região promotora, uma sequência Shine-Delgarno procariótica eficiente (RBS – *ribosome entry site*) com uma distância ótima do códon de iniciação da tradução, um sítio múltiplo de clonagem, e uma região terminadora. E para um sistema livre de células, ou seja, em um sistema no qual não necessitaremos de condições laboratoriais para cultura de células, é utilizado um lisado de *Escherichia coli* para que seja possível ocorrer as reações de transcrição e tradução, juntamente com o auxílio dos vetores otimizados, mencionados acima. Com este sistema, não é necessária a etapa de purificação da proteína.

Em nosso trabalho, utilizamos o sistema comercial de transcrição e tradução *in vitro*, o S30 T7 High- Yield Protein Expression System (Promega). Ele apresenta um bom rendimento, boa reprodutibilidade, estabilidade da proteína e a reação de síntese ocorrem em apenas uma hora. Foi sintetizado apenas o domínio da protease embora o clone possua o domínio da helicase em sua sequência. O domínio da helicase não foi sintetizado em função da presença de códons de terminação no final do domínio da protease presente nos clones, conforme mostrado nas figuras dos eletroferogramas do sequenciamento automático. Desta forma, é interessante a análise específica da protease NS3 variante dos pacientes por tratar-se de amplificação de produto menor e posterior clonagem direcional. Os níveis virais (carga viral) do paciente para tal pode ser feita com um título baixo, de aproximadamente 25 UI/ml.

A confirmação dos processos de amplificação, clonagem e produção do peptídeo correspondente ao segmento da NS3 protease de pacientes foi alcançada. A eficiência na produção da NS3 protease pode variar, porém, esta poderá ser executada em 5 dias a contar da coleta do soro do paciente. Análises preliminares de atividade NS3 protease sugeriram que é possível otimizar os ensaios fenotípicos para os testes de resistência a drogas.

A utilização de *kits* de transcrição e tradução *in vitro* já foi relatada em estudos de localização e funções de proteínas, inclusive relacionados ao HCV. O *kit* de ensaio para transcrição e tradução, acoplados no estudo do processamento da poliproteína, mediado por NS3 já foram utilizados por D'Sousa e cols. no ano de 1994. Da mesma forma,

Chard e cols. já no ano de 2006 utilizaram um *kit* similar para avaliar a existência de IRES para a tradução independente de CAP semelhante ao HCV em múltiplos gêneros da família *Picornaviridae*.

Então, neste trabalho, propomos um protocolo para uso de ferramenta molecular empregada na produção de NS3 protease *in vitro* para posterior ensaio fenotípico de mutações de resistência utilizando técnica *in vitro*, em meio livre de células, menos complexa e passível de uso eventual em laboratórios de rotina.

Desta forma, neste trabalho desenvolvemos um protocolo para o uso de ferramenta molecular empregada na produção *in vitro* da NS3 protease variante do vírus da hepatite C em um sistema livre de células, para posterior utilização em ensaios fenotípicos. Este protocolo poderá ser implementado tanto em laboratórios de pesquisa quanto em laboratórios de rotina já que para a sua realização não é requerido uma infraestrutura laboratorial contendo alto nível de biossegurança, além de permitir a produção da proteína NS3 do vírus da hepatite C num tempo mais rápido e com menos custo. O estudo das variações na região gênica da NS3 do vírus da hepatite C é de suma importância para a escolha do melhor tratamento com inibidores de protease, pois já é descrito na literatura que determinadas mutações na sequência viral podem levar resistências aos inibidores de protease. Cabe ressaltar que estudos mais aprofundados na sequência para a verificação de outras mutações não sinônimas também é necessário já que tais mutações podem alterar os aminoácidos, alterando também a conformação da proteína, dificultando a ligação da proteína com o fármaco.

Perspectivas

A produção da NS3 protease variante do vírus da hepatite C de pacientes crônicos poderá ser utilizada para a realização de ensaios fenotípicos frente a substrato específico na presença e ausência dos inibidores de protease disponíveis no mercado. O estudo fenotípico é importante, pois verifica se alterações nucleotídicas e de aminoácidos no gene que codifica a protease NS3 ou na sua própria proteína levam a alterações na sua atividade, contribuindo para a melhor escolha do tratamento a ser feito individualmente, aumentando as chances de resposta e até mesmo obtendo-se a cura da hepatite C.

5. Conclusões

Resumidamente, as etapas do protocolo desenvolvido para o uso de ferramenta molecular empregada na produção da NS3 proteases variantes de vírus da hepatite C de pacientes crônicos, estão descritas abaixo:

1) Coleta do soro dos pacientes com hepatite C crônica.

Foi realizada a coleta do soro dos três pacientes selecionados, que possuem mutações descritas como mutações de resistência e outras mutações também não sinônimas que devem ser estudadas de forma mais aprofundada.

2) Extração RNA do HCV dos soros.

A partir dos soros contendo o vírus da hepatite C foi realizada a extração do RNA viral.

3) Amplificação da região gênica da NS3 protease variante.

Em posse do RNA viral foi possível realizar a transcrição reversa seguida da amplificação da região gênica da NS3 protease variante utilizando a reação em cadeia da polimerase *nested* com primers específicos.

4) Clonagem do produto de PCR da região gênica da NS3 protease variante no vetor de expressão pET 17b NS3/4A Δ domínio protease através de recombinação homóloga.

Após a PCR foi possível clonar a região gênica da NS3 protease variante no vetor de expressão específico. Essa recombinação homóloga é mais rápida, pois não requer o uso de várias enzimas de restrições e maior tempo para que ocorra a reação de clonagem. Baseia-se no método de clonagem de infusão onde na presença da enzima de infusão são criadas regiões de cadeia simples, nas extremidades do produto de PCR e do vetor, os quais são então fundidas, devido à homologia de 15 pares de bases e o clone resultante pode ser usado para transformar *E. coli*. Esta reação requer apenas 30 minutos.

5) Transformação bacteriana e extração do DNA plasmidial (Minipreparações).

Os plasmídeos contendo a região NS3 dos pacientes, foram submetidos a transformação bacteriana, utilizando alíquotas de *Escherichia coli* DH5 α eletrocompetentes.

6) Sequenciamento dos clones

Foi realizado o sequenciamento dos clones para a confirmação da região gênica da NS3 protease variante do HCV.

7) Transformação bacteriana e extração do DNA plasmidial (Maxipreparação).

Para realizar a Transcrição e Tradução *in vitro* foi necessário a realização de uma maxipreparação dos clones, pois desta forma conseguimos uma quantidade maior de clones purificados.

8) Transcrição e Tradução *in vitro* simultaneamente em sistema livre de células.

Foram produzidas as NS3 proteases variantes do vírus da hepatite C de pacientes crônicos em sistema baseado em um extrato de *E.coli*. Este é um sistema de síntese de proteínas livre de células que simplifica a transcrição e tradução de sequências clonadas em plasmídeo contendo o promotor T7 já que fornece um extrato que contém T7 RNA polimerase para transcrição e todos os componentes necessários para tradução. A produção é realizada em apenas uma hora de reação e produz elevados níveis de proteínas recombinantes.

9) SDS-PAGE.

Os produtos produzidos *in vitro* pelo sistema livre de células foram submetidos a análise eletroforética e transferido para uma membrana de nitrocelulose para posterior *western blotting*.

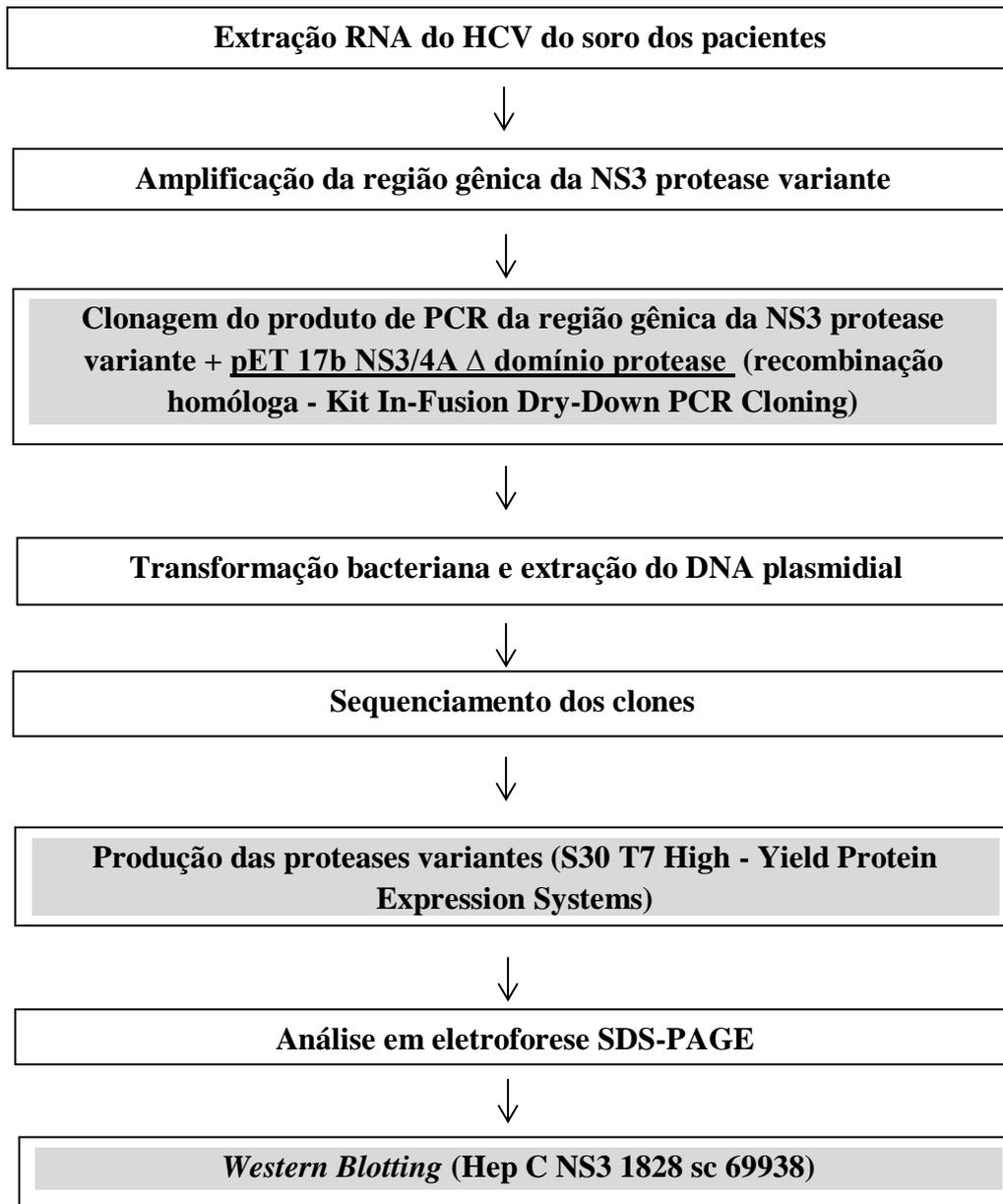
10) Caracterização da NS3 protease variante através de *Western Blotting* com anticorpo específico.

Para caracterizar a NS3 protease variante foi realizado um *western blotting* onde o gel SDS-PAGE foi transferido para uma membrana de nitrocelulose e esta membrana foi

tratada com anticorpo específico, que possui como epítipo os domínios da protease e helicase de NS3 do HCV. E, posteriormente, foi realizada a revelação mostrando através do tamanho molecular que as proteínas reveladas no filme de raio X se tratavam da NS3 protease.

Portanto, através do desenvolvimento e realização de todas as etapas descritas neste trabalho foi confeccionado um protocolo para o uso de ferramenta molecular empregada na produção da NS3 protease do HCV isolado de soro de pacientes em sistema livre de células para posteriores testes de atividade enzimática. Abaixo o protocolo final, onde foram destacadas as principais etapas que oferecem vantagens comparadas aos métodos experimentais existentes.

Protocolo



Referências Bibliográficas

Aizaki, H.; Lee, K.J.; Sung, V.M.; Ishiko, H.; Lai, M.M. *Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts. Virology.* 2004; 324:450-61.

Altuglu, I.; Soyler, I.; Ozacar, T.; Erensoy, S. *Distribution of hepatitis C virus genotypes in patients with chronic hepatitis C infection in Western Turkey. Int. J. Infect. Dis.* 2008, 12: 239-44.

Arai, M.; Suzuki, H.; Tobita, Y.; Takagi, A.; Okamoto, K.; Ohta, A.; Sudoh, M.; Kohara, M. *Establishment of infectious HCV virion-producing cells with newly designed full-genome replicon RNA. Arch. Virol.* 2011, 156; 295-304.

Araújo, E.S.A. Hepatite C. In: Cinerman S, Cinerman B, (editores). *Condutas de infectologia. São Paulo: Atheneu; 2004. P.346-95.*

Asad, S.; Ijaz, B.; Ahmad, W.; Kausar, H.; Sarwar, M.T.; Gull, S.; Shahid, I.; Khan, M.K.; Hassan, S. *Development of a persistent HCV genotype 3a infection cell culture model in huh-7cell. Virol. J.* 2012, 9(1):11.

Asselah, T. and Marcellin, P. *New direct-acting antivirals' combination for the treatment of chronic hepatitis C. Liver Int.* 2011, S1: 68-77.

Bacon, B.R.; Gordon, S.C.; Lawitz, E.; Marcelli, P.; Vierling, J.M.; Zeuzem, S.; Fred, P.; Goodman, Z.D.; Sings, H.L.; Boparai, N.; Burroughs, M.; Brass, C.A.; Albrecht, J.K.; Esteban, R. *Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. N. Engl. J. Med.* 2011; 364:1207-17.

Balfour, H. H. Jr. *Antiviral drugs. N. Engl. J. Med.* 1999, 340: 1255-68.

Bartels, D.J.; Zhou, Y.; Zhang, E.Z.; Marcial, M.; Byrn, R.A.; Pfeiffer, T.; Tigges, A.M.; Adiwijaya, B.S.; Lin, C.; Kwong, A.D.; Kieffer, T.L. *Natural prevalence of*

hepatitis C virus variants with decreased sensitivity to NS3.4A protease inhibitors in treatment-naïve subjects. J. Infect. Dis. 2008, 198: 800-7.

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

Bartenschlager, R; Lohmann, V. and Penin, F. *The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. Nature.* 2013. Volume 11; 482-496.

Bartosch, B.; Dubuisson, J.; Cosset, F.L. *Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. J. Exp. Med.* 2003; 197: 633-42.

Berenguer, M. and López- Labrador. *Boceprevir in the Treatment of Chronic Hepatitis C Virus Infection. Virus Adaptation and Treatment.* 2011, 3: 7-17.

Bertolini, L.; Iacovacci, S.; Ponzetto, A.; Gorini, G.; Battaglia, M.; Carloni, G. *The human bone-marrow-derived B-cell line CE, susceptible to hepatitis C virus infection. Res. Virol.* 1993;144:281-5.

Binder, J.; Tetangco, S.; Weinshank, M.; Maegley, K.; Lingardo, L.; Diehl, W.; Love, R.; Patick, A.K.; Smith III, G.J. *Development of hepatitis C virus chimeric replicons for identifying broad spectrum NS3 protease inhibitors. Antiviral Res.* 2011, 91 (2): 102-11.

Blight, K.J.; Kolykhalov, A.A.; Rice, C.M. *Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. Science.* 2000; 290: 1972-4.

Blight, K.J.; McKeating, J.A.; Rice, C.M. *Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. J. Virol.* 2002; 76:13001-14.

Blight, K.J.; McKeating, J.A.; Marcotrigiano, J.; Rice, C.M. *Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. J. Virol.* 2003; 77:3181-90.

Breiman, A.; Grandvaux, N.; Lin, R.; Akira, S.; Yoneyama, M.; Fujita, T.; Hiscott, J.; Meurs, E.F. *Inhibition of RIG-I Dependent Signaling to the Interferon Pathway during Hepatitis C Virus Expression and Restoration of Signaling by IKKε*. **J. Virol.** 2005, 79 (7): 3969-78.

Carloni, G.; Iacovacci, S.; Sargiacomo, M.; Ravagnan, G.; Ponzetto, A.; Peschle, C.; Battaglia, M. *Susceptibility of human liver cell cultures to hepatitis C virus infection*. **Arch. Virol. Suppl.** 1993. 8: 31-9, 31-9.

Centers for Disease Control and Prevention. *Viral Hepatitis C: Frequently Asked Questions about Hepatitis C*. 2012. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/c/faq.htm>. Acesso em: 30 out. 2012.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Map 3-05. *Prevalence of chronic hepatitis C virus infection*. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2014/chapter-3-infectious-diseases-related-to-travel/hepatitis-c>. Acesso em 30 de outubro de 2013.

Chard, L. S.; Bordeleau, M.E.; Pelletier, J.; Tanaka, J.; Belsham, G.J. *Hepatitis C virus related internal ribosome entry sites are found in multiple genera of the family Picornaviridae*. **J. Gen. Virol.** 2006, 87; 927-36.

Choo, Q.L.; Kuo, G.; Weiner, A.J.; Overby, L.R.; Bradley, D.W.; Houghton, M. *Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome*. **Science**. 1989, 244 (4902): 359-62.

Clark, V. and Nelson, D.R. *Review Article: The role of ribavirin in direct acting antiviral drug regimens for chronic hepatitis C*. **Liver Int.** 2012, 32 (S1): 103-7.

Codes, L.; de Freitas, L.A.R.; Santos-Jesus, R.; Vitvitski, L.; Silva, L.K.; Trepo, C.; Reis, M.G.; Paraná, R. *Comparative study of hepatitis C virus genotypes 1 and 3 in Salvador, Bahia*. **Braz. J. Infect. Dis.** 2003, 7 (6): 409-17.

Conte VP. *Hepatite crônica por vírus C – parte 1. Considerações gerais. Arq. Gastroenterol.* 2000; 37 (3): 187-94.

Cribier, B.; Schmitt, C.; Bingen, A.; Kirn, A.; Keller, F. *In vitro infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus. J. Gen. Virol.* 1995; 76:2485-91.

Crotty, S.; Cameron, C.E.; Andino, R. *RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001, 98 (12): 6895-900.

De Francesco, R.; Urbani, A.; Nardi, M.C.; Tomei, L.; Steinkühler, C.; Tramontano, A. *A zinc binding site in viral serine proteinases. Biochemistry* 35, 13282–13287. 1996.

Dienstag, J.L. **Hepatite viral aguda.** In: Braunwald, E.; Kasper, D.L.; Fauci, A.S.; Hanser, S. L.; Longo, D.L.; Jameson, J.L. (editores). *Harrison Medicina Interna*. 17^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, Interamericana do Brasil, 2008. P.1932-48.

D'Souza, E.D.A.; O'Sullivan, E.; Amphlett, E. M.; Rowlands. D. J.; Sanger, D.U.; Clarke, B.E. *Analysis of NS3 mediated processing of the hepatitis C virus non structural region in vitro. J. Gen.Virol.* 1994, 75: 3469-76.

Dubuisson, J., Penin, F., Moradpour, D. *Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. Trends Cell Biol.* 2002, 12: 517-23.

EASL. *International Consensus Conference on Hepatitis C. Consensus Statement. Journal of Hepatology.* 1999, 31: (Suppl. 1): 3-8.

Egger, D.; Wölk, B.; Gosert, R.; Bianchi, L.; Blum, H.E.; Moradpour, D.; Bienz, K. *Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. J. Virol.* 2002, 76 (12): 5974-84.

Enomoto, N.; Sakuma, I.; Asahina, Y.; Kurosaki, M.; Murakami, T.; Yamamoto, C.; Izumi, N.; Marumo, F.; Sato, C. *Comparasion of full- length sequences of interferon*

sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. J Clin Invest. 1995, 96 (1): 224-230.

Evans, M.J.; Von Hahn, T; Tscherne, D.M.; Syder, A. J.; Panis, M.; Wölk, B.; Hatzuonnou, T.; Mckeating, J. A.; Bieniasz, P.D.; Rice, C. M. *Claudin-1 is a hepatitis C virus co- receptor required for a late step in entry. Nature*, vol. 446, no.7137, pp.801-805, 2007.

Failla, C.; Tomei, L.; de Francesco, R. *Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. J. Virol.* 1994, 68 (6): 3753-60.

Farci, P.; Alter, H.J.; Shimoda, A.; Govindarajan, S.; Cheung, L. C.; Melpolder, J. C.; Sacher, R. A.; Shih, J.W.; Purcell, R. H. *Hepatitis C virus-associated fulminant hepatic failure. N Eng J Med.* 1996; 335(9):631-4.

Farci, P. *New insights into the HCV quasispecies and compartmentalization. Semin. Liver Dis.* 2011, 31: 356-74.

Farnik, H.; Lange, C.M.; Sarrazin, C.; Kronenberger, B.; Zeuzem, S.; Herrmann, E. *Meta-analysis shows extended therapy improves response of patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection. Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2010, 8: 884-90.

Flint, M.; Mullen, S.; Deatly, A.M.; Chen, W.; Miller, L.Z.; Ralston, R.; Broom, C.; Emini, E.A.; Howe, A.Y. *Selection and characterization of hepatitis C virus replicons dually resistant to the polymerase and protease inhibitors HCV-796 and boceprevir (SCH 503034). Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53:401-11.

Forestier, N.; Reesink, H.W.; Weegink, C.J.; McNair, L.; Kieffer, T.L.; Chu, H.M.; Purdy, S.; Jansen, P.L.M.; Zeuzem, S. *Antiviral activity of telaprevir (VX-950) and peginterferon Alfa-2a in patients with hepatitis C. Hepatology.* 2007, 46 (3): 640-8.

Fournier, C., Sureau, C., Coste, J.; Ducos, J.; Pageaux, G.; Larrey, D.; Domirque, J.; Maurel, P. *In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus*. **J. Gen. Virol.** 1998; 79: 2367-74.

Foy, E.; Li, K.; Wang, C.; Sumpter Jr., R.; Ikeda, M.; Lemon, S.M.; Gale Jr.; M. *Regulation of Interferon Regulatory Factor-3 by the Hepatitis C Virus Serine Protease*. **Science**. 2003, 5622: 1145-8.

Franco, S.; Bellido, R.; Aparicio, E.; Canete, N.; Garcia-Retortillo, M.; Sola, R.; Tural, C.; Clotet, B.; Paredes, R.; Martinez, M.A. *Natural prevalence of HCV minority variants that are highly resistant to NS3/4A protease inhibitors*. **J. Viral Hepat.** 2011, 18 (10): e578-82.

Friebe, P.; Boudet, J.; Simorre, J.P.; Bartenschlager, R. *Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication*. **J. Virol.** 2005; 79:380-92.

Gane, E. *Future hepatitis C virus treatment: interferon-sparing combinations*. **Liver Int.** 2011, S1: 62-7.

Gao, G.; Stuver, S.O.; Okayama, A.; Tsubouchi, H.; Mueller, N.E.; Tabor, E. *The minimum number of clones necessary to sequence in order to obtain the maximum information about hepatitis C virus quasispecies: a comparison of subjects with and without liver cancer*. **J. Viral Hepat.** 2005, 12: 46-50.

Garcia, T.J.; Lara, P.H.S.; Morimoto, T.P.; Higasiaraguti, M.; Perejão, A.M.; Ayub, M.A. *Efeitos colaterais do tratamento da hepatite C no polo aplicado do ABC*. *Revista da Associação Médica Brasileira* 2012; 58(5): 543-549.

Gaudieri, S.; Rauch, A.; Pfafferott, K.; Barnes, E.; Cheng, W.; McCaughan, G.; Shackel, N.; Jeffrey, G.P.; Mollison, L.; Baker, R.; Furrer, H.; Günthard, H.F.; Freitas, E.; Humphreys, I.; Klenerman, P.; Mallal, S.; James, I., Roberts, S.; Nolan, D.; Lucas, M. *Hepatitis C virus Drug Resistance and Immune-Driven Adaptations: Relevance to New Antiviral Therapy*. **Hepatology**. 2009, 49 (4): 1069-82.

Ghany, M.G.; Strader, D.B.; Thomas, D.L.; Seeff, L.B. **AASLD practice guidelines: diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update.** *Hepatology*. 2009; 49(4):1335-74.

Gosert, R.; Egger, D.; Lohmann, V.; Bartenschlager, R.; Blum, H.E.; Bienz, K.; Moradpour, D. **Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons.** *J Virol*. 2003; 77:5487-92.

Gottwein, J.M.; Scheel, T.K.; Hoegh, A.M.; Lademann, J.B.; Eugen-Olsen, J.; Lisby, G.; Bukh, J. **Robust hepatitis C genotype 3 a cell culture releasing adapted intergenotypic 3a/2a (S52/JFH1) viruses.** *Gastroenterology*. 2007; 133:1614-26.

Grakoui, A.; McCourt, D.W.; Wychowski, C.; Feinstone, S.M.; Rice, C.M. **Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites.** *J. Virol*. 1993, 67 (5): 2832-2843.

Hahn, T.V. and Rice, C.M. **Hepatitis C virus entry.** *J Biol Chem*. 2008; 283:3689-93.

Hayashi, N. and Takehara, T. **Review: Antiviral therapy for chronic hepatitis C: past, present, and future.** *J. Gastroenterol*. 2006, 41: 17-27.

He, Y.; King, M.S.; Kempf, D.J.; Lu, L.; Lim, H.B.; Krishnan, P.; Kati, W.; Middleton, T.; Molla, A. **Relative replication capacity and selective advantage profiles of protease inhibitor-resistant hepatitis C virus (HCV) NS3 protease mutants in the HCV genotype 1b replicon system.** *Antimicrob. Agents Chemother*. 2008, 52 (3): 1101-10.

Hoffmann, Luísa. **Diversidade Genética da Protease NS3 do Vírus da Hepatite C em pacientes crônicos submetidos a tratamento com Interferon e Ribavirina.** 2012. 179f. Tese de doutorado - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Hoffmann, L.; Ramos, J. A.; Valentin, E. de S.; Araújo, A. L.R.; Nogueira, C.A.V.; Ürményi, T.P.; Tanuri, A.; Rondinelli, E.; Silva, R. **Dynamics of resistance mutations**

to NS3 protease inhibitors in a cohort of Brazilian patients chronically infected with hepatitis C virus (genotype 1) treated with pegylated interferon and ribavirin: a prospective longitudinal study. Virology Journal. 2013, 10:57.

Hsu, M.; Zhang, J.; Flint, M.; Logvinoff, C.; Cheng-Mayer, C.; Rice, C.M.; Mckeating, J.A. *Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2003; 100:7271-6.

Iacovacci, S.; Sargiacomo, M.; Parolini, I.; Ponzetto, A.; Peschle, C.; Carloni, G. *Replication and multiplication of hepatitis C virus genome in human foetal liver cells. Res. Virol.* 1993. 144: 275-9.

Ikeda, M.; Kato, N.; Mizutani, T.; Sugiyama, K.; Tanaka, K.; Shimotohno, K. *Analysis of the cell tropism of HCV by using in vitro HCV-infected human lymphocytes and hepatocytes. J. Hepatol.* 1997; 27:445-54.

Ito, T., Mukaigawa, J., Zuo, J., Hirabayashi, Y., Mitamura, K., Yasui, K. *Cultivation of hepatitis C virus in primary hepatocyte culture from patients with chronic hepatitis C results in release of high titre infectious virus. J. Gen. Virol.* 1996; 77:1043-54.

Jacobson, I.M.; McHutchison, J.G.; Dusheiko, G.; Di Bisceglie, A.M.; Reddy, K.R.; Bzowej, N.H.; Marcellin, P.; Muir, A.J.; Ferenci, P.; Flisiak, R.; George, J.; Rezzetto, M.; Shouval, D.; Sola, R.; Terg, R.A.; Yoshida, E.M.; Adda, N.; Bengtsson, L.; Sankoh, A.J.; Kieffer, T.L.; George, S.; Kauffman, R.S.; Zeuzem, S. *Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. N. Engl. J. Med.* 2011; 364:2405-16.

Kato, N.; Nakazawa, T.; Mizutani, T.; Shimotohno, K. *Susceptibility of human T-lymphotropic virus type I infected cell line MT-2 to hepatitis C virus infection. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995; 206:863-9.

Kato, T.; Furusaka, A.; Miyamoto, M.; Date, T.; Yasui, K.; Hiramoto, J.; Nagayama, K.; Tanaka, T.; Wakita, T. *Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. J. Med. Virol.* 2001; 64.

Kato, T.; Date, T.; Miyamoto, M.; Furusaka, A.; Tokushige, K.; Mizokami, M.; Wakita, T. *Efficient replication of the genotype 2 a hepatitis C virus subgenomic replicon*. **Gastroenterology**. 2003; 125:1808-17.

Kim, D.W.; Gwack, Y.; Han, J.H.; Choe, J. *C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 1995, 215 (1): 160-6.

Kim, W.R. *Global epidemiology and burden of hepatitis C*. **Microbes Infect** 4. 2002: 1219-25.

Kolykhalov, A.A.; Mihalik, K.; Feinstone, S.M.; Rice, C.M. *Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo*. **J. Virol.** 2000, 74: 2046-51.

Koutsoudakis, G.; Kaul, A.; Steinmann, E.; Kallis, S.; Lohmann, V.; Pietschmann, T.; Bartenschlager, R. *Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses*. **J Virol.** 2006; 80:5308-20.

Koutsoudakis, G.; Perez-del-Pulgar, S.; Coto-Llerena, M.; Gonzalez, P.; Dragun, J.; Mensa, L.; Crespo, G.; Navasa, M.; Forns, X. *Cell culture replication of a genotype 1 b hepatitis C virus isolate cloned from a patient who underwent liver transplantation*. **PLoS One**. 2011; 6: e23587.

Kuntzen, T.; Timm, J.; Berical, A.; Lennon, N.; Berlin, A.M.; Young, S.K.; Lee, B.; Heckerman, D.; Carlson, J.; Reyor, L.L.; Kleyman, M.; McMahon, C.M.; Birch, C.; Schulze Zur Wiesch, J.; Ledlie, T.; Koehrsen, M.; Kodira, C.; Roberts, A.D.; Lauer, G.M.; Rosen, H.R.; Bihl, F.; Cerny, A.; Spengler, U.; Liu, Z.; Kim, A.Y.; Xing, Y.; Schneidewind, A.; Madey, M.A.; Fleckenstein, J.F.; Park, V.M.; Galagan, J.E.; Nusbaum, C.; Walker, B.D.; Lake-Bakaar, G.V.; Darr, E.S.; Jacobson, I.M.; Gomperts, E.D.; Edlin, B.R.; Donfield, S.M.; Chung, R.T.; Talal, A.H.; Marion, T.; Birren, B.W.; Henn, M.R.; Allen, T.M. *Naturally Occurring Dominant Resistance Mutations to Hepatitis C Virus Protease and Polymerase Inhibitors in Treatment-Naïve Patients*. **Hepatology**. 2008, 48 (6):1769-78.

Kwo, P.Y.; Lawitz, E.J.; McCone, J.; Schiff, E.R.; Vierling, J.M.; Pound, D.; Davis, M.N.; Galati, J.S.; Gordon, S.C.; Ravendhran, N.; Rossaro, L.; Anderson, F.H.; Jacobson, I.M.; Rubin, R.; Koury, K.; Pedicone, L.D.; Brass, C.A.; Chaudhri, E.; Albrecht, J.K. *Efficacy of boceprevir, an NS3 protease inhibitor, in combination with peginterferon alfa-2b and ribavirin in treatment-naïve patients with genotype 1 hepatitis C infection (SPRINT-1): an open-label, randomized, multicentre phase 1 trial.* **Lancet.** 2010, 376: 705-16.

Lagacé, L.; White, P.W.; Bousquet, C.; Dansereau, N.; Dô, F.; Llinas-Brunet, M.; marquis, M.; Massariol, M. J.; Maurice, R.; Splickler, C.; Thibeault, D.; Triki, I.; Zhao, S.; Kukoli. *In Vitro Resistance Profile of Hepatitis C Virus NS3 Protease Inhibitor BI 201335.* **Antimicrob. Agents Chemother.** 2012,56 (1): 569-72.

Lauer, G.M. and Walker, B.D. *Medical progress: hepatitis C virus infection (review article).* **N. Engl. J. Med.** 2001, 345 (1): 41-52.

Lee, C.M.; Lu, S.N.; Hung, C.H.; Tung, W.C.; Wang, J.H.; Tung, H.D.; Chen, C.H.; Hu, T.H.; Changchien, C.S.; Chen, W.J. *Hepatitis C virus genotypes in Southern Taiwan: prevalence and clinical implications.* **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 2006, 100: 767-74.

Li, Y.P.; Gottwein, J.M.; Scheel, T.K.; Jensen, T.B.; Bukh, J. *MicroRNA-122 antagonism against hepatitis C virus genotypes 1-6 and reduced efficacy by host RNA insertion or mutation in the HCV 5'UTR.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 2011; 108:4991-6.

Lin, C.; Prágai, B.M.; Grakoui, A.; Xu, J.; Rice, C. *Hepatitis C virus NS3 serine proteinase: trans-cleavage requirements and processing kinetics.* **J. Virol.** 1994, 68 (12): 8147-57.

Lin, K.; Perni, R.B.; Kwong, A.D.; Lin, C. *VX-950, a novel hepatitis C virus (HCV) NS3-4A protease inhibitor, exhibits potent antiviral activities in HCV replicon cells.* **Antimicrob. Agents Chemother.** 2006; 50:1813-22.

Lindenbach, B. D.; Evans, M.J.; Syder, A.J.; Wolk, B.; Tellinghuisen, T. L.; Liu, C. C.; Maruyama, T.; Hynes, R.O.; Burton, D.R.; Mckeating, J. A. *Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. Science.* 2005; 309: 623-6.

Liu-Young, G. and Kozal, M.J. *Review: Hepatitis C protease and polymerase inhibitors in development. AIDS Patient Care STDs.* 2008, 22 (6): 449-57.

Lohmann, V.; Korner, F.; Koch, J.; Herian, U.; Theilmann, L.; Bartenschlager, R. *Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. Science.* 1999; 285:110-3.

Ma, Y.; Yates, J.; Liang, Y.; Lemon, S.M.; Yi, M. *NS3 helicase domains involved in infectious intracellular hepatitis C virus particle assembly. J. Virol.* 2008, 82 (15): 7624-39.

Manns, M.P.; Foster, G.R.; Rockstroh, J.K.; Zeuzem, S.; Zoulim, F.; Houghton, M. *The way forward in HCV treatment finding the right path. Nature Reviews.* 2007, 6: 991-1.000.

Martell, M.; Esteban, J.I.; Quer, J.; Genesca, J.; Weiner, A.; Esteban, R.; Guardia, J.; Gómez, J. *Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. J. Virol.* 1992, 66 (5): 3225-9.

Mcgarvey, M.J.; Houghton, M.; Weiner, A.J. Structure and molecular virology. In: Lau JYN. *Hepatitis C protocols: methods in molecular medicine. Totowa: Humana Press,* cap.19, p. 253-70. 1998.

McLauchlan, J.; Lemberg, M.K.; Hope, G.; Martoglio, B. *Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis c virus core protein to lipid droplets. EMBO J.* 2002, 21: 3980-8.

McPhee, F.; Friborg, J.; Levine, S.; Chen, C.; Falk, P.; Yu, F.; Hernandez, D.; Lee, M. S.; Chaniewski, S.; Sheaffer, A.K.; Pasquinellib, C. **Resistance Analysis of the Hepatitis C Virus NS3 Protease Inhibitor Asunaprevir. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** 3670–3681. July 2012. Volume 56. Number 7.

Ministério da Saúde. **Hepatites Virais: O Brasil está atento.** 2^a ed. Série B. Textos Básicos de Saúde. Brasília, 2005.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico: hepatites virais.** 2010. (A)

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. BRASIL. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Relatório técnico do estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil: dados preliminares.** Recife. Ministério da Saúde. Fev. 2010. (B)

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite viral C e Coinfecções.** Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília – DF. Julho de 2011.

Mizokami, M.; Gojobori, T.; Ohba, K.I.; Ikeo, K.; Ge, X.M.; Ohno, T.; Orito, R.; Lau, J.Y.N. **Hepatitis C virus types 7, 8 and 9 should be classified as type 6 subtypes. Journal of Hepatology** 24, 622-624. 1996.

Modi, A.A.; Liang, T.J. **Hepatitis C: a clinical review. Oral Dis.** 2008; 14(1):10-4.

Nakajima, N.; Hijikata, M.; Yoshikura, H.; Shimizu, Y.K. **Characterization of long-term cultures of hepatitis C virus. J. Virol.** 1996; 70:3325-9.

Njoroge, F.G.; Chen, K.X.; Shih, N.Y.; Piwinski, J.J. **Challenges in modern drugs discovery: a case study of boceprevir, an HCV protease inhibitor for the treatment of hepatitis C virus infection. Acc. Chem. Res.** 2008, 41 (1): 50-9.

Organização Mundial de Saúde (OMS). *Hepatitis C*. 2002. Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsrlyo2003/en/> Acesso em: 28 out. 2013.

Organização Mundial de Saúde (OMS). *Hepatitis C*. 2012. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>. Acesso em: 18 out. 2012.

Paltanin, L. F. and Reiche, E. M. *Seroprevalence of anti-hepatitis C virus antibodies among blood donors, Brazil. Revista de Saúde Pública*, [S.l.], v. 36, p. 393-399, 2002.

Penin, F.; Brass, V.; Appel, N.; Ramboarina, S.; Montserret, R.; Ficheux, D.; Blum, H.E.; Bartenschlager, R.; Moradpour, D. *Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. J. Biol. Chemistry*. 2004, 279 (39): 40835-43.

Pereira, L.M.; Spinelli, V.; Ximenes, R.A.; Cavalcanti, M.S.; Melo, R.; Juca, N.; Mizokami, M. *Chronic hepatitis C infection: influence of the viral load, genotypes, and GBV-C/HGV coinfection on the severity of the disease in a Brazilian population. J. Med. Virol.* 2002, 67: 27-32.

Peres da Silva, A.; de Almeida, A.J.; Lampe, E. *Mutations in hepatitis C virus NS3 protease domain associated with resistance to specific protease inhibitors in antiviral therapy naïve patients. Arch. Virol.* 2010, 155: 807-11.

Pietschmann, T.; Lohmann, V.; Rutter, G.; Kurpanek, K.; Bartenschlager, R. *Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. J. Virol.* 2001; 75:1252-64.

Pietschmann, T.; Lohmann, V.; Kaul, A.; Krieger, N.; Rinck, G.; Rutter, G.; Strand, R.; Bartenschlager, R. *Persistent and transient replication of fulllength hepatitis C virus genomes in cell culture. J. Virol.* 2002; 76: 4008-21.

Pietschmann, T.; Kaul, A.; Koutsoudakis, G.; Shavinskaya, A.; Kallis, S.; Steinmann, E.; Abid, K.; Negro, F.; Dreux, M.; Cosset, F.L.; Bartenschlager, R. *Construction and*

characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. Proc. Natl. Acad. Sci. 2006, 103 (19): 7408-13.

Pietschmann, T.; Zayas, M.; Meuleman, P.; Long, G.; Appel, N.; Koutsoudakis, G.; Kallis, S.; Leroux-Roels, G.; Lohmann, V.; Bartenschlager, R. *Production of infectious genotype 1 b virus particles in cell culture and impairment by replication enhancing mutations. PLoS Pathog.* 2009; 5: e1000475.

Pileri, P.; Uematsu, Y.; Campagnoli, S.; Galli, G.; Falugi, F.; Petracca, R.; Weiner, A.J.; Houghton, M.; Rosa, D.; Grandi, G.; Abrignani, S. *Binding of hepatitis C virus to CD81. Science.* 1998, 282: 938-41.

Ploss, A.; Evans, M.J.; Gaysinskaya, V.A.; Panis, M.; De Jong, Y.P.; Rice, C. M. *Human occluding is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. Nature*, vol. 457, no.7231, pp.882-886, 2009.

Puoti, C.; Bellis, L.; Guarisco, R.; Dell'Unto, O.; Spilabotti, L.; Costanza, O.M. *HCV carriers with normal alanine aminotransferase levels: healthy persons or severely ill patients? Dealing with an everyday problem. Eur. J. Intern. Med.* 2010; 21 (2): 57-61.

Rubin, A.; Aguilera, V.; Berenguer, M. *Mini Review: Liver transplantation and hepatitis C. Clin. Res. Hepat. Gastroenterol.* 2011, 35: 805-12.

Ruiz, F.J.G. and Zylbergeld, N. D. *Tratamento assistido e compartilhado da hepatite C com interferon peguilado alfa-2b: a perspectiva do paciente. Rev. Bras. Med.* 2004, 61 (11): 719-25.

Sakai, A.; Claire, M.S.; Faulk, K.; Govindarajan, S.; Emerson, S.U.; Purcell, R.H.; Bukh, J. *The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003, 100: 11646-51.

Sambrook, J. and Russel, D. W. *Molecular Cloning*. 3rd edition. 3 vol. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York. 2001.

Sarrazin, C and Zeuzem, S. *Resistance to Direct Antiviral Agents in Patients with Hepatitis C Virus Infection*. **Gastroenterology**. 2010, 138:447-62.

Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R., Acali, S. *The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus*. **EMBO J**. 2002, 21: 5017-25.

Schaller, T.; Appel, N.; Koutsoudakis, G.; Kallis, S.; Lohmann, V.; Pietschmann, T.; Bartenschlager, R. *Analysis of hepatitis C virus superinfection exclusion by using novel fluorochrome gene-tagged viral genomes*. **J. Virol**. 2007; 81:4591-603.

Seden, K.; Back, D.; Khoos, S. *New directly acting antivirals for hepatitis C: potential for interaction with antiretrovirals*. **J. Antimicrob. Chemother**. 2010; 65: 1079-1085.

Seipp, S.; Mueller, H.M.; Pfaff, E.; Stremmel, W.; Theilmann, L.; Goeser, T. *Establishment of persistent hepatitis C virus infection and replication in vitro*. **J. Gen. Virol**. 1997; 78: 2467-76

Sherlock, S. and Dooley, J. Hepatite pelo vírus C. In: Gayotto L.C.C., Alves V.A.F. *Doenças do fígado e vias biliares*. São Paulo. **Editora Atheneu**. Cap.18, v.1, p.263-75. 2001.

Sherlock, S. and Dooley, J. Características gerais das hepatites crônicas e hepatite crônica autoimune. In: Sherlock, S. and Dooley, J. (editores). **Doenças do fígado e do sistema biliar**, 11ª ed. Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan**. P.277-88. 2004.

Simmonds, P.; Alberti, A.; Alter, H. J.; Bonino, F.; Bradley, D. W.; Brechot, C.; Brouwer, J. T.; Chan, S.W.; Chayama, K.; Chen, D.S.; Choo, Q.L.; Colombo, M.; Cuyppers, H. T. M.; Date, T.; Dusheiko, G. M.; Esteban, J. I.; Fay, O.; Hadzlyannis, S. J.; Han, J.; Hatzakis, A.; Holmes, E. C.; Hotta, H.; Houghton, M.; Irvine, B.; Kohara, M.; Kolberg, J. A.; Kuo, G.; Lau, J. Y. N.; Lelie, P. N.; Maertens, G.; McOmish, F.;

Miyamura, T.; Mizokami, M.; Nomoto, A.; Prince, A. M.; Reesink, H. W.; Rice, C.; Roggendorf, M.; Schalm, S. W.; Shikata, T.; Shimotohno, K.; Stuyver, L.; Trepo, C.; Weiner, A.; Yap, P. L.; Urdea, M. S. *A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. Hepatology* **19**, 1321-1324. 1994.

Shimizu, Y.K.; Iwamoto, A.; Hijikata, M.; Purcell, R.H.; Yoshikura, H. *Evidence for in vitro replication of hepatitis C virus genome in a human T-cell line. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992; 89: 5477-81.

Shimizu, Y.K, Purcell, R.H.; Yoshikura, H. *Correlation between the infectivity of hepatitis C virus in vivo and its infectivity in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. 90:6037-41.

Sociedade Brasileira de Infectologia. *I Consenso da Sociedade Brasileira de Infectologia para o Manuseio e Terapia da Hepatite C.* São Paulo, 2008.

Stempniak, M.; Hostomska, Z.; Nodes, B.R.; Hostomsky, Z. *The NS3 proteinase domain of hepatitis C virus is a zinc-containing enzyme. J Virol* **71**, 2881–2886. 1997.

Strauss, E. *Hepatite C.* Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2001; 34 (1): 69-82.

Tellinghuisen, T.L.; Evans, M.J.; Von Hahn, T.; You, S.; Rice, C.M. *Minireview: Studying HCV: Making the Best of a Bad Virus. J.Virol.* 2007, 81 (17): 8853-67.

Tilg, H. *New Insights Into the Mechanisms of Interferon Alfa: An Immunoregulatory and Anti-inflammatory Cytokine. Gastroenterology*, 1997, 112: 1017-21

Timpe, J.M. and McKeating, J.A. *Hepatitis C virus entry: possible targets for therapy. Gut*, vol.57, no.12, pp.1728-1737, 2008.

Tokita, H.; Okamoto, H.; Tsuda, F.; Song, P.; Nakata, S.; Chosa, T.; Iizuka, H.; Mishiro, S.; Miyakawa, Y.; Mayumi, M. *Hepatitis C virus variants from Vietnam are classifiable into the seventh, eighth, and ninth major genetic groups. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **91**, 11022-11026. 1994.

Tokita, H.; Okamoto, H.; Luengrojanakul, P.; Vareesangthip, K.; Chainuvati, T.; Iizuka, H.; Tsuda, F.; Miyakawa, Y.; Mayumi, M. *Hepatitis C virus variants from Thailand classifiable into novel genotypes in the sixth (6b), seventh (7c, 7d) and ninth (9b, 9c) major genetic groups. Journal of General Virology* **76**, 2329-2335. 1995.

Tokita, H.; Okamoto, H.; Iizuka, H.; Kishimoto, J.; Tsuda, F.; Lesmana, L. A.; Miyakawa, Y.; Mayumi, M. *Hepatitis C virus variants from Jakarta, Indonesia classifiable into novel genotypes in the second (2e and 2f), tenth (10a) and eleventh (11a) genetic groups. Journal of General Virology* **77**, 293-301. 1996.

Tong, X.; Bogen, S.; Chase, R.; Girijavallabhan, V.; Guo, Z.; Njoroge, F.G.; Prongay, A.; Saksena, A.; Skelton, A.; Xia, E.; Ralston, R. *Characterization of resistance mutations against HCV ketoamide protease inhibitors. Antiviral. Res.* 2008, **77** (3): 177-85.

Universidade de Pernambuco. Núcleo de Pós Graduação. **Estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil.** Relatório de Pesquisa. Brasil, 2010.

Vermehren, J. and Sarrazin, C. *New Hepatitis C therapies in Clinical Development. European Journal of Medical Research.* 2011, **16**: 303-314.

Vermehren, J.; Susser, S.; Lange, C.M.; Forestier, N.; Karey, U.; Hughes, E.; Ralston, R.; Tong, X.; Zeuzem, S.; Sarrazin, C. *Mutations selected in the hepatitis C virus NS3 protease domain during sequential treatment with boceprevir with and without pegylated interferon alfa-2b. J. Viral Hepat.* 2012, **19**(2):120-7.

Vicenti, I.; Rosi, A.; Saladini, F.; Meini, G.; Pippi, F.; Rossetti, B.; Sidella, L.; di Giambenedetto, S.; Almi, P.; de Luca, A.; Caudai, C.; Zazzi, M. *Naturally occurring hepatitis C virus (HCV) NS3/4A protease inhibitor resistance-related mutations in HCV genotype 1-infected subjects in Italy. J. Antimicrob. Chemother.* 2012, **67** (4): 984-7.

Wakita, T.; Pietschmann, T.; Kato, T.; Date T.; Miyamoto, M.; Zhao, Z.; Habermann, A.; Kräusslich, H.G.; Bartenschlager, R.; Liang, T.J. *Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. Nat. Med.* 2005; 11:791-6.

Wenjuan, Z.; Yuan, Z.; Yang, Z. *Using maximum likelihood method to detect adaptative evolution of HCV envelope protein coding genes. Chinese Science Bulletin.* 2006, 51(18): 2236-42.

Wölk, B.; Sansonno, D.; Kräusslich, H.G.; Dammacco, F.; Rice, C.M.; Blum, H.E.; Moradpour, D. *Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. J. Virol.* 2000; 74: 2293-304.

Yi, M.; Ma, Y.; Yates, J.; Lemon, S.M. *Compensatory mutations in E1, p7, NS2, and NS3 enhance yields of cell culture infectious intergenotypic chimeric hepatitis C virus. J. Virol.* 2007; 81:629-38.

Zeisel, M.B.; Fofana, I.; Fafi-Kremer, S.; Baumert, T.F. *Hepatitis C virus entry into hepatocytes: molecular mechanisms and targets for antiviral therapies. Journal of Hepatology.* Vol. 54, n.3, pp. 566-576, 2011.

Zeuzem, S.; Andreone, P.; Pol, S.; Lawitz, E.; Diago, M.; Roberts, S.; Focaccia, R.; Younossi, Z.; Foster, G.R.; Horban, A.; Ferenci, P.; Nevens, F.; Millhaupt, B.; Pockros, P.; Terg, R.; Shouval, D; Hoek, B.V.; Weiland, O.; Heeswijk, R.V.; De Mayer, S. Luo, D.; Boogaerts, G.; Polo, R.; Picchio, G. Beumont, M. *Telaprevir for retreatment of HCV infection. N. Engl. J. Med.* 2011; 364: 2417-28.

Zhong, J.; Gastaminza, P.; Cheng, G.; Kapadia, S.; Kato, T.; Burton, D.R.; Wieland, S.F.; Uprichard, S.L.; Wakita, T.; Chisari, F.V. *Robust hepatitis C virus infection in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005; 102:9294-9.

Zubay, G. *A Theory on the Mechanism of Messenger RNA Synthesis. Biology Department, Brookhaven National Laboratory, Upton.* New York. 1962.

Anexos

1. Aprovação no Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
Comissão de Investigação Científica/11E49/DG

CI-229/05 – CIC/DG

Rio de Janeiro, 14 de dezembro de 2005

Do : Coordenador da CIC (Prof.Armando Nogueira)

Ao:(a) Profa. Cristiane Alves Villela Nogueira

Serviço: **Hepatologia**

Prezado Pesquisador (a),

Tendo o seu projeto de pesquisa com o título “ Hepatite Crônica C- Avaliação da resposta viral ao tratamento pelo método do PCR real time. Importância da diversidade genética do HCV e de polimorfismo gênicos no diagnóstico, prognósticos, tratamento e no custo para o sistema de saúde.” (Aprovado) no CEP e Cadastrado na CIC, com as seguintes numerações, CEP:166/05 e CIC:148/05.

Com isso, a CIC, oferece os seguintes serviços ao pesquisador, posters e consultoria estatística, para projetos desenvolvidos totalmente ou parcialmente no HUCFF.

Agradecemos o envio do projeto a esta Comissão e contamos com sua visita para que possamos trabalhar em equipe, para o enriquecimento da pesquisa científica no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho.

Obs: Gostaríamos de ressaltar que a partir de abril/03 a CIC, vem realizando o serviço de PLOTAGEM, pelo qual é cobrado a quantia de R\$ 50,00 (cinquenta reais) para o papel fosco, e R\$ 60,00 (sessenta reais) para o papel brilhoso com o fundo branco, e R\$ 70,00(setenta reais) brilhoso com o fundo colorido, para maiores informações telefonar para o ramal 2594.

Atenciosamente,

Prof. Armando Nogueira
Coordenador da CIC
RDC. 6071A/4
CIN. 62.2346-5

2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF)

SERVIÇO DE HEPATOLOGIA

R. Rodolpho Paulo Rocco, 255 - Ilha do Fundão - Rio de Janeiro – RJ - CEP:
21941-913

Sala 9E 36

Tel.: (21) 2562-2731

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

INFORMAÇÕES AO PACIENTE

Antes que você decida participar deste estudo é importante que você leia com atenção as informações abaixo. Esta folha e as seguintes contêm informações sobre coletas de sangue que você poderá vir a fazer. O responsável pelo estudo discutirá com você e responderá a qualquer dúvida que possa ter.

Sua participação no estudo é voluntária e você está livre para retirar-se do mesmo a qualquer momento.

Título do Estudo: Hepatite Crônica C - Avaliação da resposta viral ao tratamento pelo método do PCR real time. Importância da diversidade genética do HCV e dos polimorfismos gênicos no diagnóstico, prognósticos, tratamento e no custo para o sistema de saúde.

EXPLICAÇÃO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo que tem por objetivo avaliar a característica do vírus C da hepatite e de algumas características dos pacientes que podem influenciar na resposta para a doença que você está sendo tratado: a hepatite C. Durante o seu tratamento você será acompanhado pelo serviço de Hepatologia do HUCFF-UFRJ através de exames clínicos e laboratoriais em conformidade com a portaria do Ministério da Saúde para o tratamento da hepatite C pelo SUS. Através deste termo você está autorizando a realização de seus marcadores genéticos como por exemplo a sua tipagem HLA, polimorfismos no gene da interleucina-10 (IL-10), além da determinação de

características virais e sua quantificação durante o acompanhamento e tratamento da hepatite C.

OBJETIVOS

O objetivo deste estudo é verificar se marcadores moleculares como as moléculas HLA que estão na superfície das suas células e substâncias que atuam na resposta imunológica apresentam características particulares em um grupo de pacientes que possam influenciar na sua resposta ao tratamento da hepatite C. Este estudo poderá ajudar a definir um melhor tratamento para os pacientes que apresentarem estas características particulares em relação aos seus marcadores genéticos. Além disso, o vírus será estudado e permitirá identificar vírus que sejam mais resistentes ao tratamento.

PROCEDIMENTOS

Serão realizadas coletas de seu sangue para o acompanhamento laboratorial da evolução do tratamento. Uma amostra do seu sangue será utilizada na determinação da sua tipagem HLA e de polimorfismos gênicos, além dos exames habituais para avaliação da quantificação viral.

RISCOS

Os riscos de participar do estudo clínico-laboratorial serão aqueles decorrentes da probabilidade de você apresentar efeitos colaterais ao uso do interferon e da ribavirina durante o seu tratamento para hepatite C (Termo de Consentimento específico padronizado pelo Ministério da Saúde). Durante os procedimentos de coleta de sangue, você poderá apresentar um hematoma (mancha roxa) no local da punção venosa para retirada do sangue a ser examinado.

EU TEREI DE FAZER VISITAS EXTRAS AO MÉDICO?

Durante o seu tratamento você terá que realizar uma visita quinzenal no primeiro mês e visitas mensais nos meses subseqüentes até o 12º mês. Antes, durante e após o seu tratamento você será solicitado a realizar exames de sangue. As coletas de sangue se realizarão nas seguintes datas: antes do início do tratamento, 48 hs, 7, 30, 90, 180, 360 e 540 dias após o início do tratamento.

POSSÍVEIS BENEFÍCIOS

Você poderá não se beneficiar por participar deste estudo, porém você estará ajudando os pesquisadores a compreender melhor esta infecção, o que

poderá resultar, no futuro, no aperfeiçoamento e/ou desenvolvimento de novos tratamentos para as pessoas com esta doença.

Este estudo será submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa desta Instituição. Sua realização está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções 196/6 e 251/97) que assegura proteção aos voluntários envolvidos em pesquisas biomédicas.

ORIENTAÇÕES GERAIS

- Você não é obrigado a participar deste estudo. Você pode recusar-se a participar do mesmo podendo deixá-lo a qualquer momento, sem ter que fornecer as razões para tanto. Sua decisão não afetará seu direito à assistência médica.
- O médico pesquisador estará a sua disposição para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir a respeito do estudo. Você poderá comunicar-se com:
 - Dra Cristiane A. Villela Nogueira e Dr. Jorge André Segadas Soares pelo telefone 2562-2731 para dúvidas sobre o seu acompanhamento clínico ou
 - Dr. Edson Rondinelli para dúvidas sobre marcadores genéticos, pelo telefone 2564-7364.
- As informações pessoais obtidas a seu respeito durante o estudo permanecerão confidenciais.
- Se você decidir participar, será necessário um consentimento por escrito.

CONSENTIMENTO FINAL DO PACIENTE

Título do Estudo: Hepatite Crônica C - Avaliação da resposta viral ao tratamento pelo método do PCR real time. Importância da diversidade genética do HCV e de polimorfismos gênicos no diagnóstico, prognósticos, tratamento e no custo para o sistema de saúde.

1. Li o documento de consentimento livre e esclarecido para este estudo. Recebi as informações necessárias sobre a natureza, proposta do procedimento e o que será esperado de mim. Minhas dúvidas foram devidamente esclarecidas.
2. Concordo em participar deste estudo de forma totalmente voluntária.
3. Informe ao médico sobre todas as doenças e medicamentos anteriores ou atuais e sobre qualquer consulta com outro médico nos últimos três meses.
4. A minha participação neste estudo é voluntária, podendo recusar-me a participar ou retirar-me do estudo a qualquer momento, sem penalidade ou perda dos benefícios aos quais tenha direito.
5. Concordo que os resultados do estudo podem ser comunicados à comunidade científica e publicados em revistas científicas, mantendo em sigilo o meu nome e o meu endereço.
6. Autorizo comitês de ética, autoridades regulatórias locais ou estrangeiras, a examinarem, se assim o desejarem, estes registros médicos para confirmação das informações coletadas.

Nome do paciente _____

Assinatura _____ Data _____

Médico _____

Eu confirmo haver pessoalmente explicado, para o paciente acima identificado, a natureza e o propósito do procedimento.

Assinatura _____ Data _____

Nome da Testemunha _____

Assinatura da Testemunha _____ Data _____

3. Artigo publicado

RESEARCH

Open Access

Dynamics of resistance mutations to NS3 protease inhibitors in a cohort of Brazilian patients chronically infected with hepatitis C virus (genotype 1) treated with pegylated interferon and ribavirin: a prospective longitudinal study

Luísa Hoffmann^{1,2}, Juliene Antonio Ramos^{2,3}, Elizabeth Valentin de Souza², Ana Lucia de Araújo Ramos⁴, Cristiane Alves Villela-Nogueira⁴, Turán Péter Ürményi^{1,2}, Amilcar Tanuri⁵, Edson Rondinelli^{1,2,4} and Rosane Silva^{1,2*}

Abstract: About sixty thousand new cases of Hepatitis C virus (HCV) infection are recorded in Brazil each year.

These cases are currently treated with pegylated interferon (PEG-IFN) and ribavirin (RBV) with an overall success rate of 50%. New compounds for anti-HCV therapy targeted to the HCV NS3 protease are being developed and some already form the components of licensed therapies. Mapping NS3 protease resistance mutations to protease inhibitors or anti-viral drug candidates is important to direct anti-HCV drug treatment.

Methods: Sequence analysis of the HCV NS3 protease was conducted in a group of 68 chronically infected patients harboring the HCV genotype 1. The patients were sampled before, during and after a course of PEG-IFN-RBV treatment.

Results: Resistance mutations to the protease inhibitors, Boceprevir and Telaprevir were identified in HCV isolated from three patients (4.4%); the viral sequences contained at least one of the following mutations: V36L, T54S and V55A. In one sustained virological responder, the T54S mutation appeared during the course of PEG-IFN and RBV therapy. In contrast, V36L and V55A mutations were identified in virus isolated from one relapsing patient before, during, and after treatment, whereas the T54S mutation was identified in virus isolated from one non-responding patient, before and during the treatment course.

Conclusions: The incidence and persistence of protease resistance mutations occurring in HCV from chronically infected patients in Brazil should be considered when using protease inhibitors to treat HCV disease. In addition, patients treated with the current therapy (PEG-IFN and RBV) that are relapsing or are non-responders should be considered candidates for protease inhibitor therapy.

Keywords: HCV NS3 protease, Drug resistance persistency, Selection pressure, Antiviral drugs, Chronic Hepatitis C infection

* Correspondence: silvaros@biof.ufrj.br

¹Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

²Instituto Nacional para Pesquisa Translacional em Saúde e Ambiente na Região Amazônica, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/MCT, Rio de Janeiro, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

Background

Infection with hepatitis C virus (HCV) is a global health problem. The World Health Organization (WHO) [1] estimates that 3% of world's population is infected with HCV. Chronic HCV can lead to complications like cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC), which are the main reasons for liver transplantation [2]. There are three million people infected with HCV in Brazil, with regional differences in the infection rates observed across the country [3]; these differences range from 0.28% in central and western regions to 0.62% in the north. According to the National Information System on Disease Notification (SINAN) of the Brazilian Ministry of Health, between 1999 and 2009, 60,908 new cases of hepatitis C were recorded [4].

Treatment of chronic hepatitis C infections with pegylated interferon (PEG-IFN) and ribavirin (RBV) results in a sustained virological response (SVR) in only about 50% of the patients treated. SVR is characterized by undetectable levels of HCV RNA when patients are assessed 24 weeks post-treatment. Lower response rates are found in individuals infected with the HCV genotype 1, the most common genotype worldwide [5]. In Brazil, some studies have described the prevalence of genotype 1 [3,6,7]. Hence, many direct-acting antiviral compounds are being considered for anti-HCV therapy [8]. The main targets are the viral protein RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) [9] and the serine protease NS3/4A. Treatment success has been obtained with the NS3 protease inhibitors (PIs) Telaprevir [10,11] and Boceprevir [12,13], both of which have been approved for clinical use by the US Food and Drug Administration (FDA) and the Brazilian National Agency for Sanitary Vigilance (ANVISA). Studies on Serine Protease Inhibitor Therapy (SPRINT) have aimed to establish the safety and efficacy of boceprevir or telaprevir when added to standard peginterferon and ribavirin therapy; such studies have shown that sustained virological responses in patients can reach 70% [14-16]. However, resistance mutations against HCV PIs can limit the effectiveness of such treatments. Genetic variants that confer resistance to PIs are being found in treatment-naïve patients [17-23].

Because of the lack of a proofreading mechanism during HCV genome replication, extensive sequence variability in the viral population can be found in the sera of HCV-infected patients. The genetic variability of circulating HCVs can affect the treatment and persistence of the virus, and poses a great challenge for vaccine development [24]. Nevertheless, few studies have shown the presence of primary resistance mutations in the Brazilian population [25].

In this study, we analyzed the dynamics of the appearance of primary resistance mutations to NS3 protease inhibitors and identified specific mutations in the NS3 protease gene in a cohort of Brazilian patients chronically infected with HCV genotype 1. We investigated the presence of such resistance mutations

in the cohort before, during, and after treatment with PEG-IFN and RBV.

Results

Genetic variability of the HCV isolates

Blood samples were taken from 81 patients before treatment (naïve) with PEG-IFN and RBV. However, 13 patients were removed from the study due to their loss at follow up. Viral RNA was extracted from the serum of the remaining 68 patients from which the NS3 protease gene region was amplified and sequenced. Of the 68 patients analyzed, 26 achieved a sustained virological response (SVR) (38.2%), 10 were relapsing (REL) (14.7%), while 32 were non-responders (NR) (47.1%). Table 1 summarizes the main characteristics of the study population. The 38 men and 30 women (median age 55) possessed body mass indices ranging from 25 to 27.

The evolutionary parameters, dN and dS, along with dN/dS ratios were calculated to evaluate whether evolutionary selective pressures had acted on the predominant HCV sequences. The results of these tests showed negative selective pressure on the sequences as all of the dN/dS ratios were <1 (0.05 – 0.06). No statistically significant differences in genetic diversity were observed in the study groups using AMOVA and Fst analysis (data not shown).

Monitoring NS3 protease resistance mutations over time

Despite the presence of NS3 amino acid mutations in viruses isolated from the 68 patients studied, 3 (4.4%) had well-known resistance mutations to NS3 protease inhibitors, namely, V36L, T54S and V55A mutations. The temporal dynamics of these mutations were monitored before, during and after treatment with PEG-IFN and RBV in the patients (Table 2). The T54S mutation was detected on the seventh day of treatment in one SVR patient. In contrast, the V36L and V55A mutations in one REL patient were detected before, during and after treatment. There was a period where HCV RNA became undetectable during treatment. Six months after the treatment ended, however, the mutations became detectable once more as a result of relapse responses. Otherwise, one NR patient had the NS3 T54S mutation at all of the time points until the treatment was interrupted.

Table 1 Characteristics of the study groups

Patient Characteristics	SVR (n = 26)	REL (n = 10)	NR (n = 32)	Total (n = 68)
Median Age	54.00	56.00	56.00	55.00
Median BMI	25.96	27.15	24.58	25.49
Male (%)	62	40	56	56

REL, Relapsing; NR, Non-Responder; SVR, Sustained Virological Response; BMI, Body Mass Index.

No statistically significant differences were observed between the SVR, REL and NR groups ($p > 0.4$, G-test and Chi-square test).

Table 2 Dynamics of well-known protease inhibitor resistance mutations in the viral NS3 protease gene over time from patients infected with the Hepatitis C virus

Treatment	Time	Patient ID		
		(Genotype – Treatment response – Mutation)		
		Pat A	Pat B	Pat C
		(1b – SVR – T54S)	(1a – REL – V36L/V55A)	(1a – NR – T54S)
PEG-IFN/RBV				
Before		T	36L/55A	S
During	48 h	T*	36L/55A	S
	7d	S**	36L/55A	S
	30d	***	***	S
	3 m	-	***	S
	6 m	-	-	S
	12 m	-	-	Nb
After	18 m	-	36L/55A	Nb

SVR, Sustained Virological Responder; REL, Relapsing; NR, Non-Responder, -, Undetectable HCV RNA; Nb, No blood was collected. h, hours; d, days; m, months.

Viral loads ranged from 4×10^4 to 4×10^6 unless indicated by *. Viral load: * 7.0×10^2 , ** 2.6×10^3 , and *** <500 IU/ml.

No amino acid substitutions in the catalytic triad H57, D81, and S139 of the NS3 protease (which leads to nonfunctional enzymes) were detected in any of the isolates studied (data not shown).

Discussion

This study evaluated heterogeneity in the HCV NS3 protease sequences isolated from HCV from a group of Brazilian patients with chronic hepatitis C whose responses to PEG-IFN and RBV treatment (SVR, REL and NR) were being monitored. We assessed genetic variability and the presence of protease inhibitor resistance mutations in the NS3 protease in the isolates before, during, and after treatment in patients with viral loads > 500 IU/ml. We investigated specific protease inhibitor resistance mutations, namely, V36A/L/M/G, Q41R, F43C/S, T54S/A, V55A, Q80R/K, S138T, R155K/T/G/I/Q/M/S/L and A156S/T/V/I. Of the 68 patients analyzed 3 (4.4%), had at least one of the mutations known to confer telaprevir and boceprevir resistance (V36L, T54S and V55A). These resistance mutations have been described previously [17-22]. In Brazil, knowledge is lacking about the temporal changes that occur in PI resistance mutations during the course of IFN/RBV treatment. One report [25] described the presence of V36L and T54S in HCVs in a group of Brazilian patients chronically infected with HCV. Recent studies have also highlighted the presence of naturally occurring mutations in the NS3 protease in patients. For example, a study of four Spanish patients identified V36A, T54A, V55A, R155S, and A156T/V mutations in the NS3 protease [26]. In addition, a Japanese study identified T54S, Q80K, I153V and D168E

NS3 protease mutations among 261 patients (13.4% had a single mutation, while 2.3% had double mutations) [27]. NS3 protease mutations (V36L, T54S, V55A/I, and Q80K/L) were also observed in 29% of genotype 1a patients in an Italian population [28].

In the present study, V36L, T54S and V55A mutations were identified in Brazilian patients treated with PEG-IFN and RBV. To assess the maintenance of protease mutation variants, this analysis was performed before, during and after treatment completion, thus allowing us to determine the fate of the genetic variants over an 18 months period. Negative selective pressure was observed acting on the NS3 protease region analyzed here. In addition, the observed mutations may confer resistance to telaprevir and boceprevir, making it possible to predict that patients harboring viruses with such mutations may not benefit from a future treatment with these drugs; therefore, the null responder patients should be engaged in the new Protease Therapy Protocol [10,12,16,29]. These two drugs (Boceprevir and Telaprevir), already approved by FDA and by ANVISA in Brazil [30], are now components of licensed therapies. Thus, mapping NS3 protease resistance mutations to protease inhibitors may be an important tool to direct anti-HCV treatment.

Methods

Study population

Patients were recruited between April 2006 and August 2008 at the Hepatology Clinic of the Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), Rio de Janeiro (RJ), Brazil. Patients chronically infected with HCV showing liver disease and detectable HCV RNA were treated with PEG-interferon α -2b (1.5 μ g/kg once a week) and ribavirin (1,000-1,250 mg/day according to body weight and patients weighing more than 75 kg received 1,250 mg/day) for 12 months. Patients with undetectable serum HCV RNA 6 months after treatment were considered to have sustained virological responses (SVR). REL are patients that have undetectable viral loads (serum) during treatment and relapses after 6 months of treatment. Patients who fail to suppress serum HCV RNA by at least 2 logs after three months of treatment were considered to be non-responders (NR). Blood samples were collected from 68 patients infected with the HCV genotype 1a (n = 37) or 1b (n = 31) before (treatment-naïve), during (48 hours, 7 days, 30 days, 3 months, 6 months, 12 months) and 6 months after the end of treatment to evaluate SVR.

Ethical approval

Written informed consent was obtained from every patient, previously approved by the ethics committee of the Hospital of Federal University of Rio de Janeiro by the number 166/05 in 2005.

Viral RNA isolation

HCV RNA was isolated from 100 μ L of serum using a QIAamp[®] MinElute[®] Virus Spin kit (Qiagen Inc., Valencia, CA). Isolation was performed according to manufacturer's instructions.

RT-PCR amplification of the NS3 protease gene

Reverse transcription (RT) was done using the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Inc., Foster City, California, USA) according to manufacturer's instructions. A nested PCR was done to amplify the NS3 protease gene using degenerate external forward (5' GC DCCYATYACRGCBTAYKCYCARCAGAC 3') and reverse (5' ACYTTRGTGCTYTTRCCGCTRCCRGTGGG 3') primers and internal forward (5' CBTAYKCYCARCAGACR MGRGGC 3') and reverse (5' GGRGWBGARTTRTCY GWRAABACCGG 3') primers. The PCR mixture for both rounds of nested PCR contained 0.15 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 0.3 mM forward and reverse primers and 1 unit of Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The PCR protocol consisted of 5 min at 94°C, 30 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 55°C and 60 s at 72°C, and a final 10 min at 72°C. The resulting 555-bp PCR products were purified using the Montage PCR Centrifugal Filter Devices (Millipore, Bedford, MA, USA) before sequencing.

Sequence analyses of the viral NS3 protease gene

Purified PCR products were directly sequenced using internal forward and reverse primers. Amplicons were sequenced using a Big Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Inc., Foster City, California, USA) and ABI Genetic Analyzer 3130. Sequence analysis was done using Geneious 4.7.5 [31] and MEGA 4.1 software. All of the sequences obtained were submitted to GenBank under the following consecutive accession numbers: JX106306 to JX106345. Amino acid sequences were aligned and compared to the HCV reference sequence (1a genotype H77) (accession number AF009606) [32,33]. Evidence of evolutionary selective pressure on several aligned predominant sequences was determined by calculating the dN/dS ratio, where dN represents a non-synonymous site in which the nucleotide alteration leads to an amino acid change, while dS is a synonymous site in which the nucleotide alteration does not change the corresponding amino acid. dN/dS ratios were calculated using the Synonymous Non-Synonymous Analysis Program (SNAP) [34]. Genetic diversity (d) between the most common sequences was assessed using MEGA 4.1 software with the nucleotide model Maximum Composite Likelihood. An Analysis of Molecular Variance (AMOVA) and population pairwise *F*_{st} values were assessed using Arlequin software with the Tamura 3 parameter as the distance method.

Abbreviations

ANVISA: National Agency for Sanitary Vigilance; BMI: Body mass index; DAAs: Direct antiviral agents; FDA: Food and Drug Administration; HCC: Hepatocellular carcinoma; HCV: Hepatitis C virus; IFN: Interferon; ORF: Open reading frame; PEG: Pegylated; PIs: Protease inhibitors; RBV: Ribavirin; REL: Relapsing; SINAN: National Information System on Disease Notification; SVR: Sustained virological responder; WHO: World Health Organization.

Competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

LH contributed to the study design, data acquisition and analysis and drafted the manuscript; JAR was involved in data acquisition and revision of the manuscript; EVS, was involved in data acquisition and analysis; ALAR worked on aspects of the study relating to the cohort of patients with chronic hepatitis C; CAVN worked on aspects of the study relating to the cohort of patients with chronic hepatitis C; TPU was involved in data acquisition and revision of the manuscript; AT: contributed to the study design and drafted the manuscript; ER contributed to the study design, data-analysis, and drafted the manuscript. RS: contributed to the study design, data acquisition and analysis, and revised the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank Claudio Nunes Pereira, César Félix Schmidt and Jorge Luiz de Albuquerque Coutinho for their technical support. This work was supported by grants from Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ/ Programa de Pesquisa para o Sistema Unico de Saúde - PPSUS/ Ministério da Saúde - MS, Instituto Nacional de Ciencia e Tecnologia, Pesquisa Translacional em Saúde e Ambiente na Região Amazônica INCT-INPeTam/ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq/Ministerio da Ciencia e Tecnologia - MCT, and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES.

Author details

¹Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. ²Instituto Nacional para Pesquisa Translacional em Saúde e Ambiente na Região Amazônica, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/MCT, Rio de Janeiro, Brazil. ³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. ⁴Departamento de Clínica Médica, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. ⁵Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Received: 21 August 2012 Accepted: 11 February 2013

Published: 14 February 2013

References

1. WHO: [http://www.who.int/immunization/topics/hepatitis_c/en/].
2. Ray Kim W: **Global epidemiology and burden of hepatitis C.** *Microbes Infect* 2002, **4**:1219–1225.
3. Alvarado-Mora MV, Moura IM, Botelho-Lima LS, Azevedo RS, Lopes E, Carrilho FJ, Pinho JRR: **Distribution and molecular characterization of hepatitis C virus (HCV) genotypes in patients with chronic infection from Pernambuco State, Brazil.** *Virus Res* 2012, **169**:8–12.
4. Brazilian Ministry of Health - Disease Notification: [<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>].
5. Wasley A, Alter MJ: **Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends.** *Semin Liver Dis* 2000, **20**:1–16.
6. Codes L, de Freitas LAR, Santos-Jesus R, Vivitski L, Silva LK, Trepo C, Reis MG, Paraná R: **Comparative study of hepatitis C virus genotypes 1 and 3 in Salvador, Bahia Brazil.** *Braz J Infect Dis* 2003, **7**:409–417.
7. Pereira LMMB, Spinelli V, Ximenes RA, Cavalcanti MS, Melo R, Jucá N, Mizokami M, McFarlane IG: **Chronic hepatitis C infection: influence of the viral load, genotypes, and GBV-C/HGV coinfection on the severity of the disease in a Brazilian population.** *J Med Virol* 2002, **67**:27–32.

8. Burney T, Dusheiko G: Overview of the PROVE studies evaluating the use of telaprevir in chronic hepatitis C genotype 1 patients. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011, **9**:151–160.
9. Kneteman NM, Howe AYM, Gao T, Lewis J, Pevear D, Lund G, Douglas D, Mercer DF, Tyrrell DLJ, Immermann F, Chaudhary I, Speth J, Villano SA, O'Connell J, Collett M: HCV796: A selective nonstructural protein 5B polymerase inhibitor with potent anti-hepatitis C virus activity in vitro, in mice with chimeric human livers, and in humans infected with hepatitis C virus. *Hepatology* 2009, **49**:745–752.
10. Zeuzem S, Andreone P, Pol S, Lawitz E, Diago M, Roberts S, Focaccia R, Younossi Z, Foster GR, Horban A, Ferenci P, Nevens F, Mullhaupt B, Pockros P, Terg R, Shouval D, van Hoek B, Weiland O, Van Heeswijk R, De Meyer S, Luo D, Boogaerts G, Polo R, Picchio G, Beumont M: Telaprevir for retreatment of HCV infection. *N Engl J Med* 2011, **364**:2417–2428.
11. Esteban R, Buti M: Triple therapy with boceprevir or telaprevir for treatment naive HCV patients. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2012, **26**:445–453.
12. Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, Marcellin P, Vierling JM, Zeuzem S, Poordad F, Goodman ZD, Sings HL, Boparai N, Burroughs M, Brass CA, Albrecht JK, Esteban R, HCV RESPOND-2 Investigators: Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2011, **364**:1207–1217.
13. Garnock-Jones KP: Boceprevir: a review of its use in the management of chronic hepatitis C genotype 1 infection. *Drugs* 2012, **72**:2431–2456.
14. Fontaine H, Pol S: Antiviral activity of telaprevir and boceprevir for the treatment of hepatitis C virus infection in treatment-experienced patients. *Aquat Toxicol* 2011, **35**:559–563.
15. Kwo PY, Lawitz EJ, McCone J, Schiff ER, Vierling JM, Pound D, Davis MN, Galati JS, Gordon SC, Ravendhran N, Rossaro L, Anderson FH, Jacobson IM, Rubin R, Koury K, Pedicone LD, Brass CA, Chaudhri E, Albrecht JK: Efficacy of boceprevir, an NS3 protease inhibitor, in combination with peginterferon alfa-2b and ribavirin in treatment-naïve patients with genotype 1 hepatitis C infection (SPRINT-1): an open-label, randomised, multicentre phase 2 trial. *Lancet* 2010, **376**:705–716.
16. Poordad F, McCone J, Bacon BR, Bruno S, Sulkowski MS, Jacobson IM, Reddy KR, Goodman ZD, Boparai N, DiNubile MJ, Sniukiene V, Brass CA, Albrecht JK, Bronowicki J-P, SPRINT-2 Investigators: Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2011, **364**:1195–1206.
17. Tong X, Chase R, Skelton A, Chen T, Wright-Minogue J, Malcolm BA: Identification and analysis of fitness of resistance mutations against the HCV protease inhibitor SCH 503034. *Antiviral Res* 2006, **70**:28–38.
18. Bartels DJ, Zhou Y, Zhang EZ, Marcial M, Byrn RA, Pfeiffer T, Tigges AM, Adiwijaya BS, Lin C, Kwong AD, Kieffer TL: Natural prevalence of hepatitis C virus variants with decreased sensitivity to NS3.4A protease inhibitors in treatment-naïve subjects. *J Infect Dis* 2008, **198**:800–807.
19. Cubero M, Esteban JI, Otero T, Sauleda S, Bes M, Esteban R, Guardia J, Quer J: Naturally occurring NS3-protease-inhibitor resistant mutant A156T in the liver of an untreated chronic hepatitis C patient. *Virology* 2008, **370**:237–245.
20. Kuntzen T, Timm J, Berical A, Lennon N, Berlin AM, Young SK, Lee B, Heckerman D, Carlson J, Reyor LL, Kleyman M, McMahon CM, Birch C, Schulze Zur Wiesch J, Ledlie T, Koehrsen M, Kodira C, Roberts AD, Lauer GM, Rosen HR, Bihl F, Cerny A, Spengler U, Liu Z, Kim AY, Xing Y, Schneidewind A, Madey MA, Fleckenstein JF, Park VM, et al: Naturally occurring dominant resistance mutations to hepatitis C virus protease and polymerase inhibitors in treatment-naïve patients. *Hepatology* 2008, **48**:1769–1778.
21. Gaudieri S, Rauch A, Pfafferoth K, Barnes E, Cheng W, McCaughan G, Shackel N, Jeffrey GP, Mollison L, Baker R, Furrer H, Günthard HF, Freitas E, Humphreys I, Klenerman P, Mallal S, James I, Roberts S, Nolan D, Lucas M: Hepatitis C virus drug resistance and immune-driven adaptations: relevance to new antiviral therapy. *Hepatology* 2009, **49**:1069–1082.
22. Lenz O, Verbinnen T, Lin T-I, Vijgen L, Cummings MD, Lindberg J, Berke JM, Dehertogh P, Franssen E, Scholliers A, Vermeiren K, Ivens T, Raboisson P, Edlund M, Storm S, Vrang L, de Kock H, Fanning GC, Simmen KA: In vitro resistance profile of the hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor TMC435. *Antimicrob Agents Chemother* 2010, **54**:1878–1887.
23. Vallet S, Viron F, Henquell C, Le Guillou-Guillemette H, Lagathu G, Abravanel F, Trimoulet P, Soussan P, Schvoerer E, Rosenberg A, Gouriou S, Colson P, Izopet J, Payan C, ANRS AC11 HCV Group: NS3 protease polymorphism and natural resistance to protease inhibitors in French patients infected with HCV genotypes 1–5. *Antivir Ther (Lond)* 2011, **16**:1093–1102.
24. Forns X, Purcell RH, Bukh J: Quasispecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus. *Trends Microbiol* 1999, **7**:402–410.
25. Peres-da-Silva A, de Almeida AJ, Lampe E: Mutations in hepatitis C virus NS3 protease domain associated with resistance to specific protease inhibitors in antiviral therapy naïve patients. *Arch Virol* 2010, **155**:807–811.
26. Fonseca-Coronado S, Escobar-Gutierrez A, Ruiz-Tovar K, Cruz-Rivera MY, Rivera-Osorio P, Vazquez-Pichardo M, Carpio-Pedroza JC, Ruiz-Pacheco JA, Cazares F, Vaughan G: Specific detection of naturally occurring hepatitis C virus mutants with resistance to telaprevir and boceprevir (protease inhibitors) among treatment-naïve infected individuals. *J Clin Microbiol* 2012, **50**:281–287.
27. Shindo H, Maekawa S, Komase K, Sueki R, Miura M, Kadokura M, Shindo K, Amemiya F, Kitamura T, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Okada S-I, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Enomoto N: Characterization of naturally occurring protease inhibitor-resistance mutations in genotype 1b hepatitis C virus patients. *Hepatol Int* 2011, **6**:482–490.
28. Paolucci S, Fiorina L, Piralla A, Gulminetti R, Novati S, Barbarini G, Sacchi P, Gatti M, Dossena L, Baldanti F: Naturally occurring mutations to HCV protease inhibitors in treatment-naïve patients. *Virol J* 2012, **9**:245.
29. Chayama K, Hayes CN, Ohishi W, Kawakami Y: Treatment of chronic hepatitis C virus infection in Japan: update on therapy and guidelines. *J Gastroenterol* 2013, **48**:1–12.
30. *Inibidores de Protease (Boceprevir e Telaprevir) para o tratamento da Hepatite Crônica C*, Brasil: Ministério da Saúde, Secretaria de Ciencia, Tecnologia e Insumos Estratégicos; www.saude.gov.br/scie.
31. Geneious v. 4.7 created by Biomatters. Available from <http://www.geneious.com/>.
32. Kuiken C, Combet C, Bukh J, Shin IT, Deleage G, Mizokami M, Richardson R, Sablon E, Yusim K, Pawlotsky J: A comprehensive system for consistent numbering of HCV sequences, proteins and epitopes. *Hepatology* 2006, **44**:1355–1361.
33. Fan X, Mao Q, Zhou D, Lu Y, Xing J, Xu Y, Ray SC, Di Bisceglie AM: High diversity of hepatitis C viral quasispecies is associated with early virological response in patients undergoing antiviral therapy. *Hepatology* 2009, **50**:1765–1772.
34. Korber B: *HIV signature and sequence variation analysis*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2000:55–72.

doi:10.1186/1743-422X-10-57

Cite this article as: Hoffmann et al.: Dynamics of resistance mutations to NS3 protease inhibitors in a cohort of Brazilian patients chronically infected with hepatitis C virus (genotype 1) treated with pegylated interferon and ribavirin: a prospective longitudinal study. *Virology Journal* 2013 **10**:57.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

