



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

ÁGABO MACÊDO DA COSTA E SILVA

**GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA HEPATITE C E AVALIAÇÃO DA
RESPOSTA AO TRATAMENTO EM GOIÂNIA-GOIÁS, COM ÊNFASE NO
POLIMORFISMO RELACIONADO AO GENE *IL28B***

Goiânia

2014

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):		Ágabo Macêdo da Costa e Silva	
E-mail:		agabomacedo@hotmail.com	
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? ☒ Sim ☐ Não			
Vínculo empregatício do autor		Universidade Federal de Goiás	
Agência de fomento:		Fundação de Amparo à Pesquisa Estado de Goiás	Sigla: FAPEG
País:	Brasil	UF:	GO CNPJ: 08.156.102/0001-02
Título: Genotipagem do vírus da hepatite C e avaliação da resposta ao tratamento em Goiânia-Goiás, com ênfase no polimorfismo relacionado ao gene <i>IL28B</i>			
Palavras-chave: Vírus da hepatite C, genótipos, tratamento			
Título em outra língua: Genotyping of hepatitis C virus and evaluation of treatment response in Goiânia-Goiás, with emphasis on the polymorphism upstream of <i>IL28B</i> gene			
Palavras-chave em outra língua: Hepatitis C virus, genotypes, treatment			
Área de concentração:		Microbiologia	
Data defesa: (dd/mm/aaaa)		28/02/2014	
Programa de Pós-Graduação:		Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública	
Orientador (a):		Profª. Drª. Regina Maria Bringel Martins	
E-mail:		rbringel.iptsp.ufg@gmail.com	
Co-orientador(a):*			
E-mail:			

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Data: ____ / ____ / ____

Assinatura do (a) autor (a)

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

ÁGABO MACÊDO DA COSTA E SILVA

**GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA HEPATITE C E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA AO
TRATAMENTO EM GOIÂNIA-GOIÁS, COM ÊNFASE NO POLIMORFISMO
RELACIONADO AO GENE *IL28B***

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Medicina
Tropical e Saúde Pública da Universidade
Federal de Goiás para obtenção do Título de
Mestre em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Regina Maria Bringel Martins

Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás/FAPEG - processo: 201210267000387.

Goiânia

2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

S586g Silva, Ágabo Macêdo da Costa e.
Genotipagem do vírus da hepatite C e avaliação da resposta ao tratamento em Goiânia-Goiás, com ênfase no polimorfismo relacionado ao gene *IL28B* [manuscrito] / Ágabo Macêdo da Costa e Silva. - 2014.
xvi, 116 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Regina Maria Bringel Martins.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2014.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, quadros e tabelas.

1. Hepatite C – Tratamento – Goiânia 2. Hepatite C – Epidemiologia – Goiânia 3. Hepatite C – Genótipos – Soroepidemiologia 4. Hepatite C – Virus I. Título.

CDU: 616.36-002(817.3)

**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública
da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: Ágabo Macêdo da Costa e Silva

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Regina Maria Bringel Martins

Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Regina Maria Bringel Martins

2. Prof^a. Dr^a. Carmen Luci Rodrigues Lopes

3. Prof^o Dr^o. Rodrigo Sebba Aires

Data: 28/02/2014

DEDICATÓRIA

À Deus, que me escolheu antes de minha formação, me separou antes do nascimento e me chamou pelo nome. Amor maior não há!

À minha esposa, Elaine de Oliveira, sem a qual momentos dedicação, disposição e inspiração não seriam possíveis. Prova de amor em minha vida!

Aos meus pais, Eurides e Nilva, que merecem toda honra por ensinar o caminho certo, investir no meu futuro e dedicar amor, muito amor.

Aos meus irmãos, Janaina Macêdo, Jonas Macêdo e Larissa Macêdo, que comigo trilham um caminho inseparável de aprendizado, amor, felicidade e crescimento.

Aos cunhados, Gleiston e Vanessa, companheiros e dedicados em minha jornada.

À Pitanga, enviada para me ensinar o conceito de fidelidade e companheirismo em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Durante a jornada para a realização de um sonho, nos deparamos com momentos de dificuldades e lutas. A realização desta conquista não seria possível sem o apoio incondicional e incentivo daqueles que ficaram ao meu lado. Meus agradecimentos...

À Deus, que renovou minhas forças durante o meu árduo caminho e permitiu a concretização de um sonho. Sempre permitiu a realização de infinitamente mais do que tudo o que eu mereço. O que sou devo a ti!

À minha orientadora, Profª Drª Regina Maria Bringel Martins, pela oportunidade de crescimento profissional e acadêmico, pelos valiosos ensinamentos, esforço incondicional para a concretização deste trabalho e pela confiança depositada desde o ingresso na UFG. Exemplo de dedicação, profissionalismo e competência.

À Profª Drª Megmar Aparecida dos Santos Carneiro, pela alegre convivência, pelos valiosos ensinamentos no Laboratório de Virologia e durante o estágio docência.

À Profª Drª Márcia Alves Dias de Matos, pela sua colaboração na realização do sequenciamento dos isolados virais e na construção da árvore filogenética, bem como no acompanhamento do estágio docência.

À Profª Drª Sheila Araújo Teles, pelo auxílio e apoio demonstrados, principalmente, durante a construção do banco de dados.

À Profª Drª Carmen Luci Rodrigues Lopes, pela contribuição durante as correções da dissertação e palavras de incentivo proferidas.

Ao Profº Drº Rodrigo Sebba Aires, pelo apoio profissional na coleta de dados e disponibilidade sempre que solicitados.

À Dr^a Nádia Rúbia da Silva Reis, sem a qual este trabalho não seria realizado. Imprescindível mesmo antes do surgimento deste, desde as coletas, padronização de técnicas moleculares, bem como na alimentação e análise do banco de dados, durante as primeiras dúvidas na arte de escrever uma dissertação, dentre outras tarefas que se eu for enumerar, poderei cair no esquecimento. Meus sinceros agradecimentos!

À todos companheiros do Laboratório de Virologia IPTSP/UFG: Marina Pedroso, Lyriane Apolinário, Nativa Helena, Lorena Santana, Juliana Menara, Andréia Alves, Kamilla Nogueira, Andréia Vidica, Lorraine Lira, Brunna Rodrigues, Gabryella Teixeira e Raphael Henrique, que contribuíram para a realização deste sonho devido a um trabalho em equipe. Obrigado em especial pela ajuda nas coletas, realização de exames moleculares, conferência de referências, na prontidão nos momentos de dúvidas e nas tarefas cotidianas. Mais do que isso, o relacionamento com cada pessoa tem contribuído com o trabalho diário prestado ao serviço público, e isso é fruto da boa convivência da família virologia formada.

À todos ex-companheiros do Laboratório de Virologia IPTSP/UFG, não menos importantes: Renata Carneiro, Aline Garcia, Marcos André, Nara Rúbia, Laura Branquinho, Viviane Rodrigues, Pollyanne Sousa, Láiza Alencar, Dulce Helena, Thaís Marinho, Tamiris Marinho, Tássia Marinho, Fernanda Araújo, Matheus Farah, Aline Pereira, Lilian Samantha e Rhaydrick Sandokhan, que deixaram sua contribuição ao longo de sua permanência no laboratório, seja na coleta, alimentação de banco de dados, realização de exames moleculares, ou pelo incentivo que um dia eu iria trilhar este caminho.

Aos pacientes encaminhados pela Secretaria Municipal de Saúde ao Laboratório Prof^a Margarida Dobler Komma do IPTSP/UFG, que demonstram determinação e superação em face ao sofrimento. São exemplos de motivação à vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública do IPTSP/UFG e todo seu quadro de funcionários e professores, pela dedicação, apoio e incentivo durante a realização em todas as etapas deste trabalho.

Aos demais professores e funcionários do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG, pela boa convivência e palavras de encorajamento durante a realização desta dissertação.

Aos meus pais, Eurides e Nilva, pelo amor e apoio incondicional durante as adversidades vivenciadas para a conclusão deste projeto em minha vida. Obrigado pela oportunidade de tê-los como pais, pois vocês me ensinaram o valor de amar a Deus, de ser um homem que se dedica à família, de estudar e crescer profissionalmente.

Aos melhores irmãos que se poderia imaginar: Janaína, Jonas e Larissa, compartilhando desde o início os momentos de tristezas e de alegrias durante minha caminhada.

Aos demais familiares, pelo apoio constante mesmo na ausência. Em especial, aos sogros José Coelho e Sonia, aos tios José Antônio e Diolina Rosa e padrinhos Carlos e Vilma Laura, pela confiança.

À todos aqueles que oraram por mim durante a realização deste trabalho, em especial ao casal Marden e Midian, modelo de Deus em minha vida.

À minha esposa, Elaine de Oliveira Coelho Silva, por sua compreensão nos momentos de ausência e dificuldades nessa jornada. Inspiração em minha vida para escrever esta dissertação!

À banca do exame de qualificação, composta pelos professores: Dr^a Megmar Aparecida dos Santos Carneiro, Dr^a Sheila Araújo Teles e Dr^o Rodrigo Sebba Aires, pelas valiosas sugestões apresentadas que contribuíram grandemente para a finalização desta dissertação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), pelo apoio financeiro para execução deste trabalho.

“E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda tivesse toda fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.” 1 Co 13:2

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE QUADROS E TABELAS	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Considerações Iniciais	1
1.2. Vírus da Hepatite C.....	2
1.2.1. Classificação e Estrutura	2
1.2.2. Variabilidade	9
1.3. Diagnóstico da Infecção pelo HCV	11
1.4. Aspectos Clínicos da Infecção pelo HCV.....	16
1.5. Tratamento da Hepatite C	18
1.5.1. Antivirais e Diretrizes Terapêuticas no Brasil	18
1.5.2. Fatores que Influenciam a Resposta ao Tratamento.....	22
1.6. Aspectos Epidemiológicos da Infecção pelo HCV	25
1.6.1. Transmissão do HCV	25
1.6.2. Prevalência	27
1.6.3. Distribuição Geográfica dos Genótipos do HCV	32

1.7. Prevenção e Controle da Infecção pelo HCV	34
2. JUSTIFICATIVA	36
3. OBJETIVOS	37
3.1. Objetivo Geral.....	37
3.2. Objetivos Específicos	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1. Delineamento, Local e População de Estudo.....	38
4.2. Entrevista e Coleta de Sangue	39
4.3. Detecção do RNA-HCV	40
4.3.1. Extração e Transcrição do RNA-HCV	40
4.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	41
4.3.3. Eletroforese em Gel de Agarose.....	41
4.4. Genotipagem do HCV	42
4.4.1. Genotipagem por LiPA (<i>Line probe assay</i>)	42
4.4.2. Sequenciamento e Análise Filogenética da Região NS5B.....	43
4.5. Análise de Polimorfismo Próximo ao Gene <i>IL28B</i>	45
4.6. Processamento e Análise de Dados	47
5. RESULTADOS	48
5.1. Detecção do RNA-HCV	48
5.2. Características Sociodemográficas dos Pacientes RNA-HCV Positivos.....	48
5.3. Características de Risco Relatadas por Portadores do HCV	50

5.4. Distribuição de Genótipos/Subtipos do HCV	52
5.5. Avaliação do Polimorfismo Relacionado ao Gene <i>IL28B</i> e Resposta ao Tratamento para Hepatite C	55
5.5.1. Características Relacionadas ao HCV e ao Hospedeiro	55
5.5.2. Avaliação da Resposta ao Tratamento da Hepatite C	57
6. DISCUSSÃO	60
6.1. Pacientes RNA-HCV Positivos	60
6.2. Portadores do Genótipo 1 do HCV Selecionados para Avaliação do Polimorfismo Relacionado ao Gene <i>IL28B</i> e Resposta ao Tratamento para Hepatite C	63
7. CONCLUSÕES	67
8. REFERÊNCIAS	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do vírus da hepatite C (modificada).....	2
Figura 2 – Representação esquemática do genoma do vírus da hepatite C (modificada)	3
Figura 3 – Árvore filogenética dos genótipos e subtipos do HCV (modificada)	10
Figura 4 – Perfil sorológico da hepatite C aguda (a) e hepatite C crônica (b) (modificada).....	12
Figura 5 – Esquema da região do gene da IL28 no cromossomo 19.....	25
Figura 6 – Endemicidade mundial da infecção pelo HCV (modificado)	29
Figura 7 – Distribuição geográfica dos genótipos do HCV (modificada).....	32
Figura 8 – Fluxograma do estudo	39
Figura 9 – Representação esquemática da discriminação dos genótipos CC, TC e TT (rs12979860).....	47
Figura 10 – Distribuição dos genótipos/subtipos do HCV em 894 portadores do vírus da hepatite C em Goiânia, Goiás	52
Figura 11 – Árvore filogenética da região NS5B do HCV, incluindo 18 sequências provenientes de portadores do vírus da hepatite C em Goiânia-GO, 17 sequências de referência para os genótipos de 1 a 7 e seus principais subtipos extraídas do GenBank.	53
Figura 12 – Distribuição dos genótipos/subtipos do HCV, considerando o relato do uso de drogas injetáveis e transfusão de sangue antes de 1994, em portadores do vírus da hepatite C em Goiânia, Goiás.....	54
Figura 13 – Distribuição genotípica pela análise do polimorfismo próximo ao gene <i>IL28B</i> (rs12979860) em 101 portadores do genótipo 1 do HCV selecionados para avaliação da resposta ao tratamento para hepatite C em Goiânia, Goiás	57

Figura 14 – Resposta após o tratamento para hepatite C em 101 pacientes infectados com o genótipo 1 do HCV em Goiânia, Goiás 58

Figura 15 – Distribuição dos genótipos pela análise do polimorfismo relacionado ao gene *IL28B* por tipo de resposta ao tratamento para hepatite C em 101 portadores do genótipo 1 do HCV em Goiânia, Goiás 59

ÍNDICE DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Taxas de prevalência do HCV em Goiânia-Goiás, segundo a população estudada	31
Tabela 1 – Características sociodemográficas de 894 portadores do vírus da hepatite C estudados em Goiânia, Goiás.....	49
Tabela 2 – Características de risco relatadas por portadores do vírus da hepatite C estudados em Goiânia, Goiás.....	51
Tabela 3 – Características virológicas e dos 101 portadores do genótipo 1 do HCV selecionados para avaliação do polimorfismo relacionado ao gene <i>IL28B</i> e resposta ao tratamento para hepatite C em Goiânia, Goiás	56

RESUMO

A hepatite C representa um problema de saúde pública mundial. O vírus da hepatite C (HCV) é classificado em sete genótipos e vários subtipos. Além da importância epidemiológica, os genótipos desse vírus influenciam a resposta ao tratamento da hepatite C, assim como outros fatores relacionados ao vírus e ao hospedeiro, como o polimorfismo relacionado ao gene da interleucina (*IL*) 28*B*. Apesar da importância desses fatores na resposta ao tratamento da hepatite C, não existem dados sobre o tema na Região Centro-Oeste. O presente estudo teve como objetivos identificar os genótipos do HCV em pacientes atendidos em laboratório de referência em Goiânia-GO e avaliar a resposta ao tratamento com interferon peguilado (PEG IFN) e ribavirina (RBV) em portadores do genótipo 1, com ênfase no polimorfismo relacionado ao gene *IL28B* (rs 12979860). Foi realizado um estudo de corte transversal para genotipagem do HCV em pacientes anti-HCV reagentes atendidos em laboratório de referência em Goiânia-GO, em um período de 10 anos (2003 a 2012) (n = 1300). Entre janeiro/2012 e dezembro/2013 (n = 101), foi formada uma coorte de portadores do genótipo 1 do HCV submetidos ao tratamento da hepatite C com PEG IFN e RBV, para avaliação de sua resposta. Os pacientes foram entrevistados e amostras sanguíneas coletadas para detecção do RNA viral por reação em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores complementares a região 5' não codificante (NC) do HCV. Todas as amostras RNA-HCV positivas foram genotipadas por *line probe assay* – LiPA, e as tipadas como 1a/1b, 2 e 4 foram sequenciadas para a região NS5B do genoma viral. A análise do *single nucleotide polymorphism* (SNP) rs12979860 C/T foi realizada por *restriction fragment length polymorphism* (RFLP). Das 1300 amostras testadas para RNA-HCV, 894 foram positivas, sendo identificados os genótipos 1 (76,3%), 2 (1,9%), 3 (21,6%) e 4 (0,2%). Estes dados mostram o predomínio do genótipo 1, seguido do 3 e 2, e corroboram os de outros estudos realizados em Goiânia, com a adição do genótipo 4 na população estudada. Em relação ao SNP rs12979860 C/T, o genótipo TC foi o mais frequente (57,4%), seguido por CC (23,8%) e TT (18,8%). A taxa de resposta virológica sustentada (RVS) foi de 28,7%, sendo superior nos portadores do genótipo CC (54,2%) em relação aos genótipos TC e TT (22,4% e 15,8%, respectivamente). Estes resultados indicam que a análise do SNP rs12979860 é importante preditor de RVS ao tratamento com PEG IFN e RBV em pacientes infectados com o genótipo 1 do HCV em nossa região.

ABSTRACT

Hepatitis C represents a public health problem worldwide. Hepatitis C virus (HCV) is classified into seven genotypes and many subtypes. Besides their epidemiological importance, these genotypes have influence on the response to hepatitis C treatment, as well as other factors related to the virus and its host, such as polymorphisms upstream of interleukin (IL) 28B locus. Despite the importance of these factors in the response to treatment of hepatitis C, there are no data regarding the subject in the Midwest Region of Brazil. The present study aimed to identify the genotypes of HCV among patients attended at a reference laboratory in Goiânia-GO, and also to assess response to treatment of patients infected with genotype 1 with pegylated interferon (PEG-IFN) and ribavirin (RBV), with emphasis on the polymorphism upstream of IL28B gene (rs 12979860). For HCV genotyping, a cross-sectional study was conducted in an anti-HCV positive patients in a reference laboratory in Goiânia-GO, during in a period of 10 years (2003 to 2012) (n = 1300). From January/2012 to December/2013 (n = 101), a cohort was conducted among patients infected with HCV genotype 1 treated with PEG-IFN and RBV in order to evaluate treatment response. Patients were interviewed and blood samples collected for detection of viral RNA by polymerase chain reaction (PCR) with primers complementary to the region 5' noncoding (NC) of HCV. All HCV RNA positive samples were genotyped by line probe assay – LiPA, and the samples typed as 1a/1b, 2 and 4 were sequenced in the NS5B region of the viral genome. The analysis of single nucleotide polymorphism (SNP) rs12979860 C/T was performed by restriction fragment length polymorphism (RFLP). Of the 1300 samples tested for HCV RNA, 894 were positive. Among these, genotypes 1 (76.3%), 2 (1.9%), 3 (21.6%) and 4 (0.2%) were found. These data show the predominance of genotype 1, followed by 3 and 2, and support the results of other studies in Goiânia. In addition, genotype 4 was found in the studied population. Regarding to SNP rs12979860 C/T, the TC genotype was the most common (57.4%), followed by CC (23.8%) and TT (18.8%). The rate of sustained virologic response (SVR) was 28.7%, being higher in individuals with the CC genotype (54.2%) when compared to those with CT and TT genotypes (22.4% and 15.8%, respectively). These results indicate that analysis of SNP rs12979860 is an important predictor of SVR following PEG-IFN and RBV treatment in patients infected with HCV genotype 1 in our region.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Iniciais

As hepatites virais são infecções causadas por cinco agentes etiológicos com tropismo pelo tecido hepático: vírus da hepatite A (HAV) (Feinstone *et al.* 1973), vírus da hepatite B (HBV) (Dane *et al.* 1970), vírus da hepatite C (HCV) (Choo *et al.* 1989), vírus da hepatite D ou delta (HDV) (Rizzeto *et al.* 1977) e vírus da hepatite E (HEV) (Balayan *et al.* 1983).

No início da década de 70, com a identificação do HAV e do HBV, houve o desenvolvimento dos respectivos testes sorológicos (Feinstone *et al.* 1975). A partir daí, suspeitava-se de que havia um terceiro agente viral ainda desconhecido que causava hepatite em pacientes transfundidos (Prince *et al.* 1974, Feinstone *et al.* 1975). Esses pacientes não apresentavam reatividade aos marcadores sorológicos para os agentes já conhecidos, sendo que a infecção recebeu o nome de hepatite não-A não-B pós-transfusional, e permaneceu por mais de 10 anos sem a caracterização do agente etiológico (Shih *et al.* 1986).

Choo e colaboradores, em 1989, utilizando técnicas de biologia molecular conseguiram clonar e caracterizar parte do genoma desse agente viral, sendo o mesmo denominado de vírus da hepatite C (HCV) (Choo *et al.* 1989). No mesmo ano, foram desenvolvidos os primeiros testes sorológicos para detecção de anticorpos contra o HCV (Kuo *et al.* 1989), confirmando que esse era o principal agente responsável pelas infecções antes denominadas de hepatite não-A não-B pós-transfusional (Alter *et al.* 1989, Kiyosawa *et al.* 1990).

Apesar da hepatite C ser geralmente assintomática em sua fase aguda, mais da metade dos casos tendem a se cronificar, podendo ainda evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC) (Lavanchy 2011, WHO 2013).

A hepatite C afeta pessoas de todas as idades, gêneros, raças e regiões do mundo, cuja prevalência global é de 2 a 3% (Lavanchy 2011). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima em 150 milhões o número de pessoas cronicamente infectadas pelo HCV, sendo que, anualmente, de 3 a 4 milhões são infectadas por esse vírus e mais

de 350.000 morrem de doenças relacionadas à hepatite C (WHO 2013). Portanto, esforços são necessários para prevenção e controle da infecção pelo HCV, incluindo o desenvolvimento de vacinas e de novos fármacos para reduzir a carga de doença hepática crônica e melhorar a sobrevida de quem já tem evidência de doença hepática (Hanafiah *et al.* 2012).

1.2. Vírus da Hepatite C

1.2.1. Classificação e Estrutura

O vírus da hepatite C é classificado na família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivirus* (ICTV 2012). A partícula viral, esférica com aproximadamente 60 nm de diâmetro, apresenta internamente um nucleocapsídeo icosaédrico contendo material genético do tipo RNA, e externamente um envelope, derivado do retículo endoplasmático (RE) da célula hospedeira (Kaito *et al.* 2006, Suzuki *et al.* 2007, Sharma 2010) (Figura1).

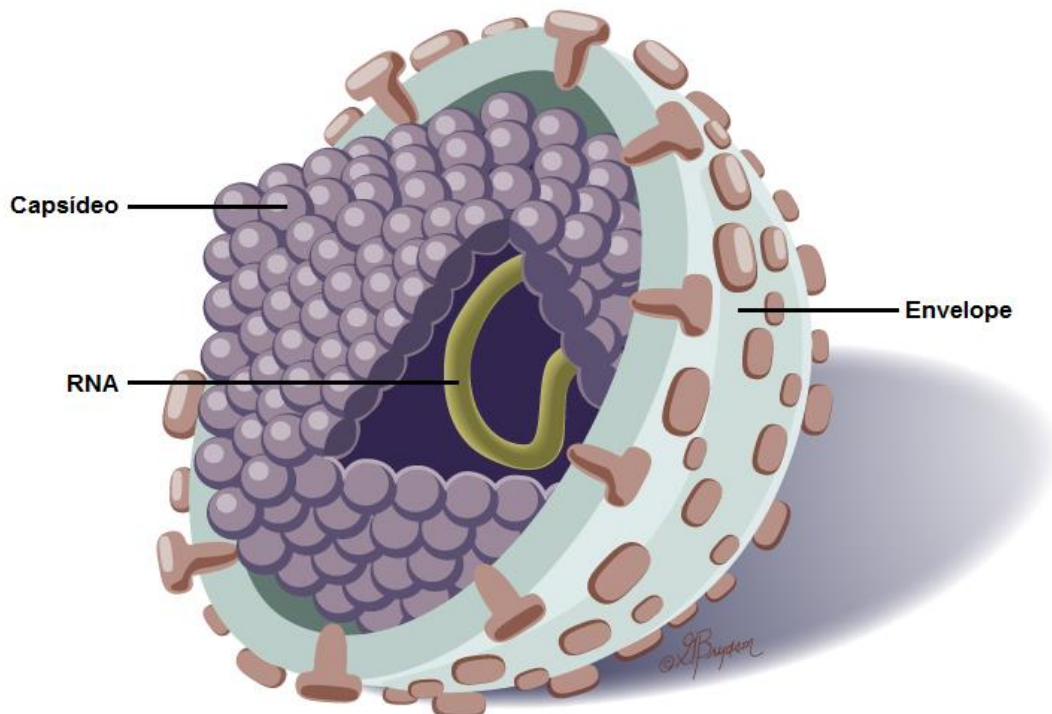


Figura 1 – Representação esquemática do vírus da hepatite C (modificada)

Fonte: http://hepatite-tema.blogspot.com.br/2011_12_01_archive.html

O genoma do HCV é formado por uma molécula de RNA fita simples de polaridade positiva com aproximadamente 9500 nucleotídeos (nt), apresentando regiões conservadas não codificantes (NC) nas extremidades 5' e 3' e, entre elas, uma longa região aberta de leitura (ORF - *open reading frame*), de aproximadamente 9000 nt. Essa codifica uma poliproteína com cerca de 3.000 aminoácidos (aa), que é clivada por proteases celulares e virais, resultando em proteínas estruturais (*core*, E1, E2) e não-estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B), além da proteína p7 (Major & Feinstone 1997, Suzuki *et al.* 2007, Sharma 2010, Bartenschlager *et al.* 2011) (Figura 2).

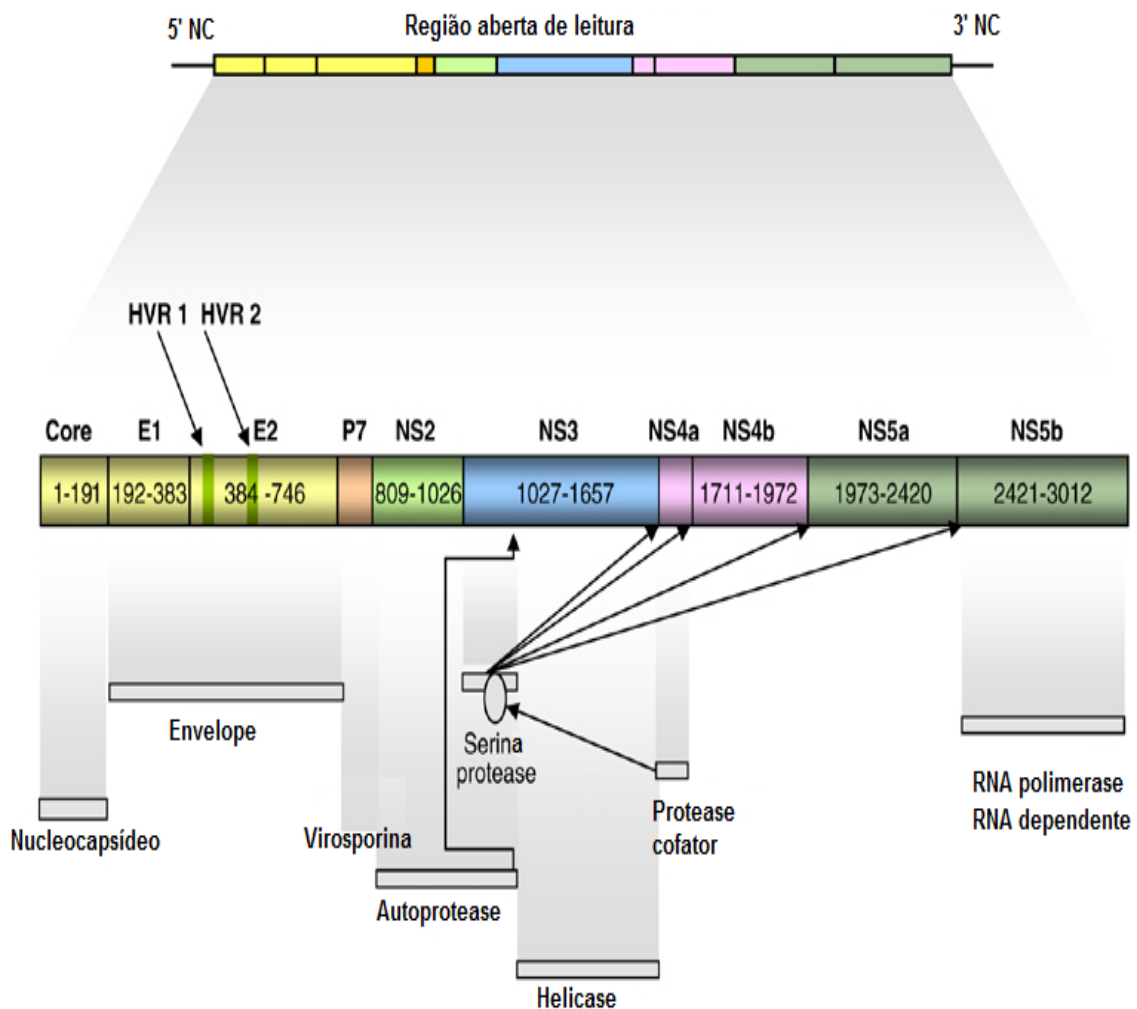


Figura 2 – Representação esquemática do genoma do vírus da hepatite C (modificada)
Fonte: Lloyd *et al.* (2007)

A região 5' não codificante (NC) é constituída por aproximadamente 340 nt, sendo considerada a região mais conservada do genoma do HCV, propriedade que a torna importante para a detecção do RNA e identificação do genótipo viral. A região 5' NC possui uma estrutura secundária complexa, com formação de quatro alças encurvadas (*stem-loops*), contendo um sítio de entrada interno para ribossomos (IRES - *internal ribosome entry site*), direcionando a iniciação e controle da tradução do RNA viral (Friebe *et al.* 2001, Gallego & Varani 2002, Penin *et al.* 2004, Suzuki *et al.* 2007, Sharma 2010).

A região 3' NC, constituída por aproximadamente 200 nt, é heterogênea, tendo uma estrutura dividida em três partes distintas. A parte inicial com 40 nt localiza-se perto do códon de parada da região de leitura e apresenta variabilidade entre os genótipos. A segunda parte é formada por uma sequência de polipirimidina (poli U/UC) de extensão em torno de 90 nt. A terceira é a parte terminal, constituída por uma sequência de 98 nt altamente conservada, denominada cauda 3'X. A presença dessa sequência conservada na região 3' NC é necessária para iniciação da replicação viral (Friebe *et al.* 2002, Penin *et al.* 2004, Friebe *et al.* 2005, Suzuki *et al.* 2007, Poenisch & Bartenschlager 2010, Sharma 2010).

As proteínas estruturais estão localizadas na região amino ou N-terminal, ao passo que, as proteínas não estruturais estão situadas na extremidade carboxi ou C-terminal (Clarke 1997, Tang & Grisé 2009). As proteínas do HCV são geradas a partir da clivagem da poliproteína por proteases celulares e virais (Major & Feinstone 1997). Peptidases de sinal celular, localizadas no lúmen do retículo endoplasmático, catalisam a clivagem das proteínas estruturais, as quais apresentam domínios hidrofóbicos (Major & Feinstone 1997).

A proteína do *core*, com 191 aa, é formada pela primeira clivagem da poliproteína. A proteína do *core*   considerada altamente conservada, apresentando vários epítopos  -celulares lineares próximos   porção amino-terminal, o que confere imunogenicidade e antigenicidade, e a torna importante para a detecção de anticorpos em pacientes infectados pelo HCV (Penin *et al.* 2004, Irshad & Dhar 2006, Sharma 2010). A principal função da proteína do *core*   a de encapsidação do genoma, formando, assim, o nucleocapsídeo viral (Irshad & Dhar 2006, Dubuisson 2007, Sharma 2010, Khaliq *et al.* 2011).

A proteína do *core* tem a capacidade de se associar com diferentes componentes celulares, podendo agir, por exemplo, na modulação da transcrição gênica, na sinalização, proliferação e morte celular, e assim na oncogênese do CHC. Essa proteína pode interferir no metabolismo lipídico com o desenvolvimento da esteatose hepática (Kato 2001, Penim *et al.* 2004, Irshad & Dhar 2006, Roingeard & Hourieux 2008, Khaliq *et al.* 2011). Em relação ao tratamento, estudos mostram que a mutação no aa 70 e/ou 91 da referida proteína é caracterizada por uma baixa resposta virológica precoce (na 12ª semana) durante o tratamento com interferon peguillado (PEG IFN) e ribavirina (RBV) (Enomoto & Maekawa 2010, Chayama & Hayes 2011).

Alguns estudos têm relatado a síntese de uma proteína codificada por uma fase de leitura alternativa, na região *core*, sendo designada ARF (*Alternative Reading Frame*) ou proteína F (*Frameshift*). Essa proteína, com aproximadamente 160 aa, é altamente conservada e pode ser expressa durante a infecção pelo HCV, sendo capaz de estimular a resposta imune específica (Xu *et al.* 2001, Brass *et al.* 2006, Wolf *et al.* 2008, Vassilaki & Mavromara 2009, Sharma 2010). Apesar do papel dessa proteína na replicação viral e na patogênese da infecção ainda não estar totalmente esclarecido, a mesma pode ser responsável por algumas das funções atribuídas à proteína do *core*, como a indução de carcinogênese e da resposta imune do hospedeiro (Walewski *et al.* 2001, Branch *et al.* 2005, Wolf *et al.* 2008, Vassilaki & Mavromara 2009, Sharma 2010).

As outras duas proteínas estruturais são as proteínas do envelope E1 e E2, que apresentam respectivamente 165 aa e 335 aa. Essas proteínas, transmembrana tipo I, altamente glicosiladas, são sintetizadas por clivagem enzimática pela sinal-peptidase da célula hospedeira e constituídas por um longo ectodomínio N-terminal e um pequeno domínio na âncora hidrofóbica C-terminal, menor do que 30 aa (Lavie *et al.* 2007, Sharma 2010, Samreen 2012). As glicoproteínas E1 e E2 apresentam, respectivamente, de 6 a 11 sítios de glicosilação, sendo muitos deles conservados, com importância no dobramento da proteína, proteção contra neutralização, entrada do vírus na célula e montagem de partículas virais infecciosas (Penin *et al.* 2004, Lavie *et al.* 2007, Helle *et al.* 2010, Samreen 2012).

A glicoproteína E1 parece estar envolvida na fusão do vírus à membrana citoplasmática, além do que vários anticorpos dirigidos contra E1 são capazes de

neutralizar a entrada na célula, presumivelmente, numa fase distinta da ligação ao receptor (Lavillete *et al.* 2007, Samreen 2012).

A glicoproteína E2 participa como um componente chave na adsorção do vírus aos seus principais receptores celulares, como o CD81, expresso em várias células como hepatócitos, macrófagos, linfócitos, monócitos, células dendríticas, *natural killer*, endoteliais e epiteliais (Rocha-Perugini *et al.* 2008, Sharma 2010, Samreen 2012).

Além disso, a glicoproteína E2 interfere na atividade antiviral do interferon (IFN), pois é capaz de interagir com a proteína quinase R (PKR - *protein kinase R*), cuja expressão é induzida pelo IFN. Durante a síntese proteica, a PKR associa-se ao fator de iniciação da tradução 2 (eIF2 – *eukaryotic translation initiation factor 2*). E2 é constituída por um domínio de 12 aa com homologia para sítios de fosforilação na PKR e no eIF2 (E2-PePHD - *PKR/eIF2alpha phosphorylation homology domain region*), o que possibilita bloquear a atividade inibitória da PKR sobre a replicação viral. Essa interação permite ao HCV escapar da ação do IFN (Taylor *et al.* 1999, Wohnsland *et al.* 2007, Afzal *et al.* 2011).

As glicoproteínas E1 e E2 possuem sequências que exibem um alto grau de variabilidade genética. A glicoproteína E2 possui três regiões hipervariáveis (Torres-Puente *et al.* 2008). A região hipervariável 1 (HVR1) está localizada na porção amino-terminal de E2, numa região composta por 27 aminoácidos (aa 1-27 de E2). Vários desses aminoácidos básicos modulam a infecciosidade do HCV, sugerindo que essa região pode estar envolvida na entrada do HCV após a adsorção do vírus à célula hospedeira. Funções específicas na conformação de glicoproteínas do HCV que proporcionam a seleção de anticorpos contra variantes e o escape do sistema imune têm sido atribuídas a essa região (Penin *et al.* 2004, Dubisson 2007, Samreen 2012). A região hipervariável 2 (HVR2) é composta por uma extensão de sete aminoácidos (aa 91-97), e participa modulando a ligação ao receptor celular de E2, possivelmente por interações intramoleculares (Penin *et al.* 2004, Torres-Puente *et al.* 2008). A terceira região hipervariável (HVR3) pode atuar na ligação ao receptor da superfície celular e no processo de entrada do vírus na célula, funções semelhantes atribuídas à HVR1 e HVR2 (Troesch *et al.* 2006, Torres-Puente *et al.* 2008).

A p7 é uma pequena proteína transmembrana hidrofóbica com 63 aa, que forma canais homo-oligoméricos de íons na bicamada lipídica com papel importante no ciclo

de replicação do vírus, em especial na montagem e liberação da partícula viral. Devido a isso, tornou-se um alvo para o desenvolvimento de antivirais inibidores dos canais iônicos. Localizada na junção entre as proteínas estruturais e não estruturais, p7 é composta por dois domínios transmembranares, com as porções N- e C-terminais orientadas para o lúmen do RE e desprendida da poliproteína pela clivagem da sinal peptidase da célula hospedeira. Devido à formação de canais iônicos, é classificada como virosporina com papel importante no controle de permeabilidade da membrana celular (Dubuisson 2007, Sharma 2010, Cook *et al.* 2011, Chandler *et al.* 2012, Li *et al.* 2012a, Gouklani *et al.* 2013).

As proteínas não estruturais, localizadas na extremidade C-terminal, são imprescindíveis para a replicação viral (Suzuki *et al.* 1999, Suzuki *et al.* 2007, Tang & Grisé 2009). NS2 é uma proteína não estrutural com 217 aa, transmembrana, metaloprotease dependente de zinco e responsável pela autoclivagem na junção NS2-NS3 dentro do seu domínio C-terminal. Outro papel para NS2 foi sugerido, isto é, na regulação da montagem de partículas infecciosas do HCV (Major & Feinstone 1997, Tang & Grisé 2009, Ma *et al.* 2011).

A proteína não estrutural NS3, com 631 aa, também responsável pela clivagem na junção NS2-NS3, apresenta atividade de serinaprotease na região N-terminal, além de helicase/NTPase na região C-terminal. Como serinaprotease, é responsável pelo processamento proteolítico da poliproteína viral atuando na clivagem nas junções NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A e NS5A/NS5B. Como helicase/NTPase, participa do processo de desenrolamento da hélice do material genético ou da cadeia dupla de RNA durante a replicação viral, e parece estar envolvida em um passo inicial de montagem viral. Além disso, NS3 tem sido alvo para o tratamento antiviral da hepatite C (Major & Feinstone 1997, Tang & Grisé 2009, Geitmann *et al.* 2011). Desse modo, inibidores de protease específicos para a serinaprotease entraram recentemente no esquema de tratamento de pacientes infectados com o genótipo 1 do HCV (Chevaliez 2011, 2012a, b, Chayama *et al.* 2012, Liang & Ghany 2013, Ministério da Saúde 2013a, Zeminian *et al.* 2013).

Para ser totalmente ativa, NS3 tem de ser estabilizada por uma interação com cofator, a proteína viral NS4A. Para tanto, a proteína NS4A, de 54aa, atua ancorando a serinaprotease às membranas intracelulares e estabilizando contra a degradação

proteolítica, por meio de um domínio transmembrana N-terminal hidrofóbico. A NS4A, com seu domínio C-terminal ácido, tem um papel importante na replicação do HCV ao regular a fosforilação da proteína viral NS5A (Major & Feinstone 1997, Tang & Grisé 2009, Shiryaev *et al.* 2011). O outro cofator, NS4B (261 aa) é uma proteína altamente hidrofóbica com quatro domínios transmembrana. Essa proteína promove alterações na membrana celular induzindo a formação de estruturas membranosas que servirão como sustentação do complexo de replicação do RNA viral, além de ter também um papel importante na montagem da partícula viral (Kato 2001, Tang & Grisé 2009, Gouttenoire *et al.* 2010).

A proteína NS5A (447 aa) é fosforilada na forma basal, e hiperfosforilada na forma celular. NS5A tem uma hélice anfipática em seu domínio N-terminal, com o qual está ancorada na membrana do RE. Essa proteína é dividida em três domínios, que são separados por regiões ligantes. O primeiro domínio (DI) tem estrutura em dobra única e cristalina, formando uma ligação ao zinco e também ao ácido nucléico. O segundo domínio (DII) é flexível e desordenado, contendo os domínios de ligação de NS5B. O terceiro domínio (DIII) parece ser necessário para a montagem e produção de partículas virais infecciosas, mas sua influência na replicação viral não é certa como DI e DII. NS5A pode estar envolvida na instabilidade cromossômica, com posterior desenvolvimento de CHC. Essa proteína também interage com outros componentes celulares e vias de sinalização que estão implicadas na replicação do HCV (Major & Feinstone 1997, Tang & Grisé 2009, Joyce & Tyrrell 2010, Sharma 2010, Jiang *et al.* 2011).

A resposta ao tratamento com IFN está relacionada com mutações em NS5A, por meio de substituições específicas de aminoácidos na região denominada de determinante da sensibilidade ao IFN (ISDR - *Interferon Sensitivity Determining Region*). Outras regiões, que apresentam substituições específicas de nucleotídeos e aminoácidos, foram posteriormente identificadas, tais como: IRRDR (*IFN/RBV resistance determining region*), PePHD (*PKR/eIF-2a phosphorylation homology domain*), PKRBD (*PKR binding domain*) e V3 (*variable region 3*) (Enomoto *et al.* 1995, Sharma 2010, Chayama & Hayes 2011, Yahoo *et al.* 2011).

A proteína NS5B (591 aa) é caracterizada como uma RNA polimerase RNA dependente (RpRd), com uma sequência altamente conservada, de estrutura cristalina

ancorada ao RE. NS5B inicia a síntese de RNA de cadeia negativa complementar utilizando o genoma do HCV como molde, e gera uma fita de RNA de cadeia positiva. Por ter um papel fundamental na replicação do genoma viral, é um alvo promissor no desenvolvimento de antivirais para o tratamento da hepatite C (Major & Feinstone 1997, Tang & Grisé 2009, Sharma 2010, Waheed *et al.* 2012).

1.2.2. Variabilidade

Uma das características marcantes que o HCV apresenta é o grau elevado de variabilidade genética, que é explicado pela incapacidade de reparo na leitura feita pela RpRd e por uma taxa alta de replicação viral. As mutações podem ser silenciosas (mudanças somente na sequência de nucleotídeos) ou não, causando alterações na sequência de aminoácidos. Devido ao polimorfismo genético elevado do HCV, o mesmo adquire capacidade em escapar à resposta imune do hospedeiro, e pode então estabelecer infecção crônica. A frequência média de mutações de nucleotídeos varia de $1,4 \times 10^{-3}$ a $1,9 \times 10^{-3}$ substituições de nucleotídeos por sítio/ano, gerando, assim, a alta diversidade genética (Simmonds *et al.* 1993, Le Guillou-Guillemette *et al.* 2007, Chayama & Hayes 2011).

As regiões do genoma apresentam graus diferentes de variabilidade. A região 5' NC é a região mais conservada, com identidade de mais de 90% entre as sequências de isolados. A região do *core* também é conservada, com identidade entre 81% e 88%. Por outro lado, as regiões mais variáveis do genoma são E1 e E2, sendo que as sequências das regiões hipervariáveis de E2 podem diferir em mais de 50% entre isolados (Major & Feinstone 1997, Purcell 1997, Le Guillou-Guillemette *et al.* 2007, Sharma 2010).

O polimorfismo genético resultante desse processo define uma classificação preconizada em genótipos, subtipos, isolados e *quasispecies* (Le Guillou-Guillemette *et al.* 2007, Chayama & Hayes 2011). Simmonds *et al.* (1993) classificaram o HCV em seis genótipos principais e em uma série de subtipos relacionados, a partir da análise filogenética da região NS5. Buscando a padronização para um sistema unificado de nomenclatura de genótipos e variantes do HCV, foi publicado um consenso de classificação que considerou a existência dos seis genótipos, designados por números arábicos (1 a 6), e múltiplos subtipos, denominados por letras minúsculas, como

exemplos 1a, 1b, etc (Simmonds *et al.* 2005). Amostras do HCV de três indivíduos residentes no Canadá e Bélgica de origem africana (Congo) formaram um cluster, porém, distinto dos seis genótipos existentes, o que levou Murphy *et al.* (2007) a proporem que essa variante fosse denominada de genótipo 7 (subtipo 7a). A Figura 3 representa a árvore filogenética dos diferentes genótipos e subtipos do HCV.

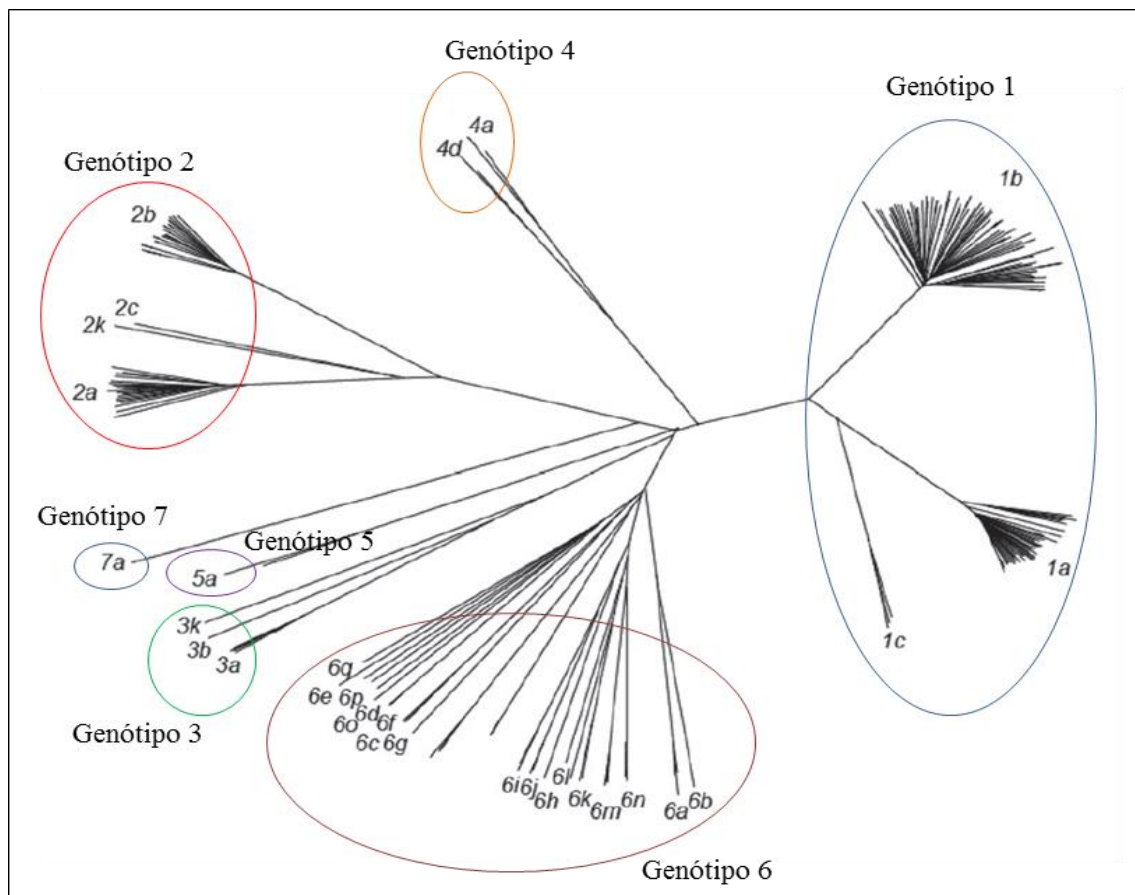


Figura 3 – Árvore filogenética dos genótipos e subtipos do HCV (modificada)

Fonte: Chayama & Hayes (2011)

Os genótipos do HCV diferem entre si de 31 a 33% nas sequências dos nucleotídeos, enquanto os subtipos de 20 a 25% e, os isolados até 15%. As *quasispecies*, definidas como uma população heterogênea de variantes autoreplicativas que se evoluem como resultado de uma certa competição seletiva no mesmo indivíduo, podem divergir de 1 a 5% entre as sequências do HCV (Zein 2000, Simmonds *et al.* 2005).

A variabilidade elevada do HCV tem dificultado o desenvolvimento de vacinas e favorece a persistência viral no organismo do hospedeiro (Lyra *et al.* 2004, Strahotin & Babich 2012). A diversidade dos genótipos é importante epidemiologicamente e, principalmente, em relação ao tratamento da hepatite C. Assim, os mesmos consistem em um dos parâmetros utilizados para definir a estratégia de tratamento e as chances de sucesso terapêutico (Le Guillou-Guillemette *et al.* 2007). Além disso, a variabilidade genética do HCV, com o surgimento de novas variantes virais e seleção das mais adaptadas às condições do ambiente, tem implicações relevantes também no diagnóstico, curso clínico e prevenção da infecção pelo HCV (Zein 2000, Chayama & Hayes 2011).

1.3. Diagnóstico da Infecção pelo HCV

Desde 1989, com o desenvolvimento dos primeiros testes sorológicos para detecção de anticorpos contra o HCV (Kuo *et al.* 1989), houve uma busca no aperfeiçoamento de técnicas visando o diagnóstico correto da hepatite C. Esse conjunto de ferramentas virológicas incluem os ensaios sorológicos, que são capazes de detectar os anticorpos anti-HCV e detectar/quantificar o antígeno do *core*, e os ensaios baseados em biologia molecular, que são usados para detectar e quantificar o RNA viral, bem como para determinar os genótipos do HCV (Chevaliez & Pawlotsky 2007, Chevaliez 2011, 2012a).

Na infecção aguda com cura espontânea (Figura 4a), o marcador anti-HCV pode ser detectado a partir de sete a oito semanas após a exposição ao vírus, e persiste por muitos anos, enquanto o RNA viral pode ser detectado de uma a duas semanas após a infecção e desaparece até o sexto mês. Simultaneamente, há redução dos níveis de alanina aminotransferase (ALT) (Rodés & Tapias 2000, Blackard *et al.* 2008, Maheshwari & Thuluvath 2010, Chevaliez 2011). Os pacientes com suspeita de hepatite C aguda devem ser submetidos a detecção de anti-HCV por testes sorológicos e do RNA do HCV por uma técnica sensível de biologia molecular. A presença do RNA, na ausência de anticorpos anti-HCV, é fortemente indicativa de infecção aguda, que será confirmada por soroconversão (isto é, o aparecimento de anticorpos anti-HCV) de alguns dias a semanas mais tarde (Chevaliez & Pawlotsky 2006, 2007, Chevaliez 2011).

A persistência do RNA do HCV por mais de seis meses define a infecção crônica pelo HCV. Também nota-se flutuações nos níveis de ALT e os anticorpos anti-HCV permanecem detectáveis (Hoofnagle 2002, Chevaliez 2011) (Figura 4b). Assim, o diagnóstico da infecção crônica pelo HCV é baseado na detecção de anticorpos anti-HCV, por testes sorológicos, e do RNA do HCV, por uma técnica sensível de biologia molecular (Chevaliez 2012a, b).

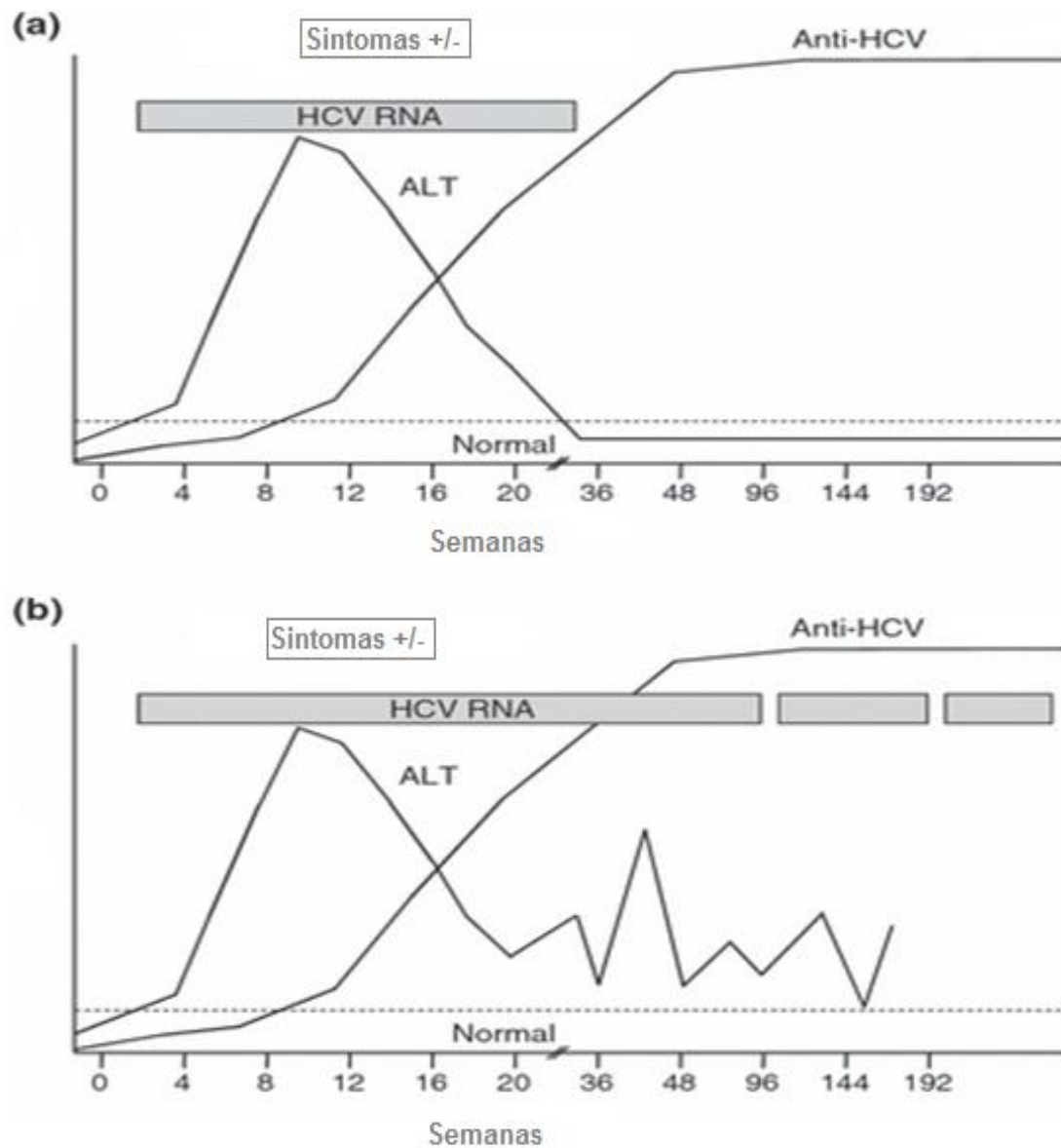


Figura 4 – Perfil sorológico da hepatite C aguda (a) e hepatite C crônica (b) (modificada)
Fonte: Chevaliez (2011)

Desde a década de 90, o ensaio imunoenzimático (ELISA) é o teste sorológico rotineiramente mais utilizado no diagnóstico da hepatite C, visando à detecção de anticorpos anti-HCV contra antígenos específicos. No decorrer dos anos, foram desenvolvidas três gerações de testes, utilizando proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos na captura de anticorpos anti-HCV (Erensoy 2001, Ferreira-Gonzalez & Shiffman 2004).

O ELISA de primeira geração utilizava como alvo, para a captura de anti-HCV, somente o polipeptídeo c100-3, correspondente à região NS4 do genoma viral. No entanto, o mesmo apresentava baixa sensibilidade e especificidade, deixando de ser empregado na prática clínica (Kuo *et.al.* 1989, Erensoy 2001, Ferreira-Gonzalez & Shiffman 2004, Gretch 1997).

O ELISA de segunda geração surgiu em 1992 com a incorporação de outras duas proteínas recombinantes antigênicas, a c22-3 e a c33-c, respectivamente, correspondentes das regiões *core* e NS3. Com essa incorporação, houve um aumento na sensibilidade e especificidade, reduzindo de 16 para 10 semanas o tempo médio de detecção da soroconversão (Erensoy 2001, Ferreira-Gonzalez & Shiffman 2004).

O ELISA de terceira geração incorporou o antígeno correspondente à região NS5, o antígeno 5-1-1, além das proteínas recombinantes antigênicas anteriores da região *core* e NS3. Com isso, foi alcançada uma sensibilidade de 97%, reduzindo o tempo médio de detecção da soroconversão para sete a oito semanas (Erensoy 2001, Ferreira-Gonzalez & Shiffman 2004). A especificidade do ELISA de terceira geração para anti-HCV pode ser superior a 99% em pacientes imunocompetentes (Chevaliez & Pawlotsky 2007, Albeldawi *et al.* 2010).

A presença de anticorpos anti-HCV não necessariamente indica infecção ativa, sendo considerado um marcador de exposição ao vírus, uma vez que pacientes que eliminam o mesmo permanecem como anti-HCV reagentes (Albeldawi *et al.* 2010, Chevaliez 2011). Resultados falso-positivos podem ocorrer em casos de interações inespecíficas entre imunoglobulinas e antígenos, como em pacientes com doenças autoimunes, enquanto resultados falso-negativos são observados em pacientes imunocomprometidos, como coinfectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), transplantados que recebem medicamentos imunossupressores e pacientes em hemodiálise (Ferreira-Gonzalez & Shiffman 2004, Albeldawi *et al.* 2010).

Os testes tipo *immunoblot* surgiram para confirmar a positividade para anti-HCV no teste de ELISA, sobretudo devido aos resultados falso-positivos. Para tanto, apresentam alta especificidade, apesar de sensibilidade mais baixa. Dentre os testes confirmatórios mais utilizados, estão o RIBA (*Recombinant Immunoblot Assay*) e o LIA (*Line Immuno Assay*). Esses testes visam identificar anticorpos para antígenos recombinantes individuais ou peptídeos sintéticos do HCV. Devido ao seu custo elevado, a sensibilidade do ELISA de terceira geração e os ensaios moleculares serem considerados padrão-ouro, os testes tipo *immunoblot* são pouco utilizados rotineiramente (Erensoy 2001, Ferreira-Gonzalez & Shiffman 2004, Chevaliez & Pawlotsky 2007).

Os testes rápidos, baseados em imunocromatografia, surgiram como alternativa de praticidade na execução e rapidez na obtenção dos resultados, sendo muito utilizados em pesquisas de campo. Esses ensaios são capazes de detectar anticorpos específicos para o HCV em amostras de sangue total, plasma ou soro, empregando antígenos recombinantes das regiões *core*, NS3, NS4 e NS5. Os testes rápidos apresentam especificidade acima de 99%, e a sensibilidade variando de 86% a 99% (Smith *et al.* 2011a, 2011b, Kamili *et al.* 2012).

A detecção/quantificação do antígeno *core* por análise sorológica (ELISA) foi desenvolvida, visando minimizar o problema da janela imunológica, com um custo menor do que os testes moleculares. Apesar de existir uma forte correlação entre o nível de RNA do HCV e esse antígeno, a detecção/quantificação do mesmo não é sensível o suficiente para monitorar o tratamento antiviral, de acordo com as diretrizes da prática clínica, sendo necessários os testes moleculares (Erensoy 2001, Ferreira-Gonzalez & Shiffman 2004, Chevaliez 2011, 2012a, 2012b).

As técnicas de biologia molecular são consideradas padrão ouro no diagnóstico da infecção pelo HCV, por serem capazes de detectar, quantificar e caracterizar o RNA viral, sendo importantes na definição e monitoramento do tratamento da infecção pelo HCV. Elas incluem os métodos de amplificação do RNA e de sequenciamento, além de outras técnicas (Erensoy 2001, Chevaliez 2011, 2012a, 2012b).

Os ensaios qualitativos visam detectar a presença do RNA viral, sendo que o mais frequentemente utilizado é a RT-PCR (transcrição reversa - reação em cadeia da polimerase), que apresenta índices maiores do que 96% de sensibilidade e 99% de

especificidade, permitindo a detecção de pequenas quantidades de cópias de RNA-HCV (10-15 UI/ml). Outro ensaio qualitativo usado é a amplificação mediada por transcrição (TMA -*Transcription Mediated Amplification*), com sensibilidade superior a 98%, detectando menores concentrações de RNA-HCV em relação à PCR (5 UI/ml) (Erensoy 2001, Scott & Gretch 2007, Albedawi *et al.* 2010, Chevaliez 2012a).

Os ensaios quantitativos objetivam quantificar com reprodutibilidade o RNA viral. O *branched DNA* (bDNA) detecta e quantifica a presença de ácido nucléico por hibridização de sondas múltiplas para sequência alvo, sendo reprodutível com especificidade variando de 96% a 98,8% (detecção de 615 a 7,7 milhões de UI/mL, *Quantiplex bDNA v.3.0 assay Bayer Diagnostic*) (Ferreira-Gonzalez & Shiffman 2004, Chevaliez & Pawlotsky 2007, Scott & Gretch 2007). A RT-PCR, na forma quantitativa, também pode ser empregada, porém apresenta menor faixa de detecção (detecção de 500 a 600.000 UI/mL, *Monitor v.2.0, Roche Diagnostic*). A PCR em tempo real se destaca pela sensibilidade comparável a dos testes qualitativos, além de quantificar com precisão os níveis de RNA-HCV num intervalo linear e com ampla faixa de detecção (10 a 100 milhões de UI/mL, *TaqMan Real Time Roche Molecular Systems*). Esse ensaio promove a redução do risco de contaminação por ser um sistema fechado com menor manipulação de amostras, possibilitando também quantificação em tempo real, tanto em baixas, como em elevadas concentrações, sem a necessidade de diluir ou concentrar o soro. Além disso, é mais rápido do que as outras técnicas, e apresenta melhor reprodutibilidade (Erensoy 2001, Ferreira-Gonzalez & Shiffman 2004, Scott & Gretch 2007, Chevaliez 2012a, b).

Em relação à genotipagem do HCV, vários métodos podem ser utilizados, tais como: análise do polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP – *restriction fragment length polymorphism*), amplificação com iniciadores tipo específicos (para região *core*) e hibridização reversa com sondas de oligonucleotídeos genótipo específicas (LiPA - *line probe assay*) (Erensoy 2001, Ferreira-Gonzalez & Shiffman 2004, Chevaliez & Pawlotsky 2007). O sequenciamento de nucleotídeos, seguido por análise filogenética, é o padrão ouro para genotipagem, e pode ser feito do genoma viral completo ou das regiões 5' NC, *core*, E1 ou NS5B (Erensoy 2001, Chevaliez 2012a).

No transcurso da infecção, a ALT pode apresentar níveis elevados devido a atividade inflamatória hepática, mas a normatização da ALT não significa recuperação, nem tampouco eliminação do vírus, pois existem pacientes virêmicos com níveis normais ou flutuações dessa enzima. Assim, esse marcador não pode ser usado como referência no diagnóstico ou monitoramento da infecção pelo HCV, apesar de ser indicador de dano do parênquima hepático (Hoofnagle 2002).

A biópsia hepática avalia o grau de fibrose e atividade inflamatória no fígado, sendo de importante valor diagnóstico para confirmação da hepatite C crônica, e indicada na positividade dos marcadores virais e aumento de ALT, para a definição do tratamento (Poynard *et al.* 2003, Dienstag & McHutchison 2006, Ahmad *et al.* 2011, Ministério da Saúde 2011). Por ser considerado um procedimento invasivo, há casos em que a biópsia do fígado é contraindicada ou facultativa. Assim, métodos não invasivos têm sido utilizados, fornecendo resultados equivalentes à classificação do grau de fibrose verificado na biópsia hepática. Dentre esses métodos, destacam-se o Fibrotest, que combina os resultados de marcadores séricos, e o Fibroscan, o qual se baseia em elastografia, medindo a velocidade de propagação de ondas elásticas através do fígado (Ngo *et al.* 2006, Friedrich-Rust *et al.* 2010, Ministério da Saúde 2011, 2013a, Poynard *et al.* 2013).

1.4. Aspectos Clínicos da Infecção pelo HCV

A história natural da infecção pelo HCV é de difícil avaliação, principalmente, por ser silenciosa em sua fase aguda e também pela escassez de sintomas no início da infecção crônica. Os mecanismos envolvidos na persistência viral ainda não estão totalmente esclarecidos, mas sabe-se que a variabilidade do vírus e o escape viral à resposta imunológica do hospedeiro são fatores importantes na história natural da infecção (Thomson & Finch 2005, Chen & Morgan 2006).

O período de incubação da infecção pelo HCV é geralmente de seis a oito semanas, podendo variar entre duas e 26 semanas. A infecção aguda é na maioria dos casos assintomática. Os sintomas, quando presentes, se apresentam de forma inespecífica e variável, incluindo anorexia, náuseas, vômitos, fadiga, artralgia, mialgia, dentre outros. O paciente pode apresentar hepatomegalia, esplenomegalia e adenopatia

cervical. A concentração de ALT pode aumentar mais de dez vezes em relação ao normal. A eliminação viral espontânea é variável, ocorrendo em 23 a 44% dos pacientes dentro de 12 semanas após o diagnóstico. Pacientes sintomáticos com icterícia têm uma maior probabilidade de cura espontânea do que os assintomáticos, assim devem ser monitorados antes da terapia antiviral. A infecção aguda pelo HCV pode ser grave, mas dificilmente causa insuficiência hepática fulminante (Rodés & Tapias 2000, Maheshwari *et al.* 2008, Maheshwari & Thuluvath 2010, Martínez-Rebollar *et al.* 2011, Ministério da Saúde 2011).

A taxa de cronicidade varia de 60% a 80%, dependendo da idade, sexo, raça, resposta imune viral e fatores genéticos do hospedeiro. De igual forma, a taxa de progressão para cirrose também é variável, sendo de 20% a 30% nos primeiros 10-30 anos. Vários fatores podem influenciá-la, tais como: duração da infecção pelo HCV, grau de inflamação e fibrose hepática, coinfeção com HBV e/ou HIV, condições de imunossupressão, consumo de álcool, idade avançada e sexo masculino. Pessoas com cirrose estão em risco aumentado de desenvolvimento de CHC, cujo índice é de 1% a 4% ao ano. Mortes associadas com a hepatite C crônica geralmente resultam das complicações da cirrose descompensada e do carcinoma hepatocelular (Lauer & Walker 2001, Chen & Morgan 2006, Modi & Liang 2008, Thomas *et al.* 2009, WHO 2013). Obesidade, esteatose hepática e diabetes aumentam o risco de progressão para fibrose hepática em pacientes com HCV (Poynard *et al.* 2003, Modi & Liang 2008).

Durante a progressão para a infecção crônica, ocorre o risco de desenvolvimento de numerosas manifestações extra-hepáticas, incluindo renais, dermatológicas, hematológicas e reumatológicas. As manifestações clínicas parecem ser causadas por deposição de imunocomplexos nos diversos órgãos. A condição extra-hepática mais comum é a crioglobulinemia mista. Essa pode vir acompanhada de sintomas clínicos como fadiga, erupções cutâneas, púrpura trombocitopênica idiopática, artralgias, vasculite, doença renal e neuropatias periféricas. Ainda outras manifestações podem ser encontradas como porfiria cutânea tardia, síndrome de Sjogren, síndrome de Raynaud, vitiligo, linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin, artrite, doenças autoimunes e linfoproliferativas. Não está totalmente esclarecido se essas doenças associadas são causadas diretamente pela infecção pelo HCV, ou a partir da estimulação imune subjacente causada pela infecção crônica (Lauer & Walker 2001, Chen & Morgan 2006,

Modi & Liang 2008, Latt *et al.* 2012). Outras síndromes clinicamente importantes incluem coinfeções com outros vírus, especialmente o HIV e HBV, sendo que o curso da infecção pelo HCV é acelerado na coinfeção com esses vírus (Lauer & Walker 2001, Kim *et al.* 2008, Reiberger 2010).

1.5. Tratamento da Hepatite C

1.5.1. Antivirais e Diretrizes Terapêuticas no Brasil

O objetivo do tratamento da hepatite C é controlar a progressão da doença hepática pela inibição da replicação viral, evitando, assim, a progressão da infecção aguda para crônica e dessa para cirrose e/ou CHC, bem como reduzir as manifestações extra-hepáticas, além de prevenir a transmissão do HCV para outros indivíduos (Poynard *et al.* 2003, Seeff & Ghany 2010, Ministério da Saúde 2011).

Os antivirais disponíveis provocam efeitos colaterais importantes e precisam ser administrados por períodos prolongados. O tratamento depende de uma série de fatores, sendo os mais importantes o estadiamento da doença hepática e a identificação do genótipo. Assim, os pacientes necessitam de acompanhamento médico especializado para avaliação e indicação do esquema terapêutico a ser utilizado, e monitoramento clínico durante o mesmo. Além disso, outras condições podem interferir no tratamento e devem ser investigadas, tais como: doença cardíaca, renal, psiquiátrica, autoimune, anemia, insuficiência renal, gravidez e consumo de álcool (Rodés & Tapias 2000, Heathcote & Main 2005, Dienstag & McHutchison 2006, Chevaliez 2011, Ministério da Saúde 2011).

Fazem parte do arsenal terapêutico para o tratamento da hepatite C: interferon convencional (IFN) alfa-2a e alfa-2b, interferon peguilado (PEG IFN) alfa-2a e alfa-2b e a ribavirina (RBV) (Ministério da Saúde 2011). Inicialmente, utilizou-se o IFN alfa, mas o uso da monoterapia não alcançou resposta satisfatória, apesar do uso por vários anos. As taxas de respostas aumentaram após a adição da RBV ao esquema terapêutico. Outro avanço foi o surgimento do PEG IFN (interferon conjugado a uma molécula de polietilenoglicol). O PEG IFN melhorou a tolerância, reduzindo a degradação e taxa de

eliminação permitindo a administração em doses semanais, ocasionando maior adesão ao tratamento (Pearlman 2004, Bezerra & Oliveira 2007, Sharma 2010). Além desses, dois novos fármacos foram recentemente integrados ao arsenal terapêutico: o telaprevir (TVR) e o boceprevir (BVR), inibidores de proteases (Ministério da Saúde 2012a, 2013a).

Os tipos de resposta virológica ao tratamento da hepatite C incluem:

- (i) resposta virológica rápida (RVR), definida como o RNA-HCV indetectável na 4ª semana de tratamento;
- (ii) resposta virológica precoce (RVP), avaliada pela redução de pelo menos duas escalas logarítmicas ou 100 vezes em relação ao valor do RNA-HCV pré-tratamento (RVP parcial), ou sua não detecção na 12ª semana de tratamento (RVP total);
- (iii) resposta virológica ao final do tratamento (RVF), definida como o RNA-HCV indetectável ao final do tratamento;
- (iv) resposta virológica sustentada (RVS), isto é, o RNA-HCV indetectável na 24ª semana de seguimento após o término do tratamento;
- (v) recidiva virológica (recidivante), observada pela ausência do RNA-HCV ao final do tratamento, mas detectável 24 semanas após o término do tratamento;
- (vi) respondedor lento, ou indivíduo que apresenta RVP parcial e RNA-HCV indetectável na 24ª semana de tratamento;
- (vii) não respondedor parcial, ou aquele que apresenta RVP parcial e RNA-HCV detectável na 24ª semana de tratamento;
- (viii) nulo de resposta, definido como o indivíduo que não apresenta tampouco RVP parcial (Ministério da Saúde 2011).

O tratamento efetivo busca alcançar RVS, para manter a ausência da replicação viral por tempo indefinido e apresentar melhora bioquímica e histológica (Poynard 2004, Asselah *et al.* 2007).

O “Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C no Brasil” estabelece as condições para o início do tratamento e o decorrer desse nas infecções aguda e crônica dos diferentes genótipos do HCV. Após a detecção de anti-HCV, o diagnóstico é confirmado pela presença do RNA viral, seguida da genotipagem, para definição do esquema de tratamento, e de exames hepáticos para avaliação do estadiamento da doença (elastografia ou biópsia), dentre outros. Além disso, há

necessidade de exames para avaliação geral do paciente, como hemograma para verificação do número de neutrófilos e plaquetas (Ministério da Saúde 2011, 2013a).

O tratamento da infecção aguda da hepatite C tem como objetivo reduzir o risco de progressão para hepatite crônica. A terapia é bem tolerada e tem alcançado índices de RVS de 80-98% em pacientes mono infectados tratados durante 24 semanas. Para os pacientes sintomáticos, recomenda-se aguardar 12 semanas após o início dos sintomas, nos casos de não ter havido eliminação viral espontânea (RNA-HCV negativos). Já para os assintomáticos, a recomendação é iniciar o tratamento imediatamente após o diagnóstico, em média quatro semanas após a exposição. O esquema recomendado, independentemente do genótipo, é: (i) monoterapia com IFN convencional em dose diária de indução (alfa-2a na dose de 6 MUI ou alfa-2b na dose de 5 MUI), por via subcutânea (SC), nas primeiras quatro semanas, seguido de 3 MUI três vezes por semana por 20 semanas, ou seja, até completar 24 semanas de tratamento; ou (ii) IFN convencional alfa-2a ou alfa-2b, 3 MUI, SC, três vezes por semana, associado a RBV 15 mg/kg/dia, por via oral (VO), por 24 semanas, para pacientes com maior risco de intolerância e/ou má adesão a doses mais elevadas de IFN convencional (Ministério da Saúde 2011).

O esquema recomendado para portadores de hepatite C crônica com genótipo 1 é a associação de PEG IFN e RBV, durante 48 semanas com possibilidade de prolongamento até 72 semanas, sendo PEG IFN alfa-2a, 180 mcg, uma vez por semana, SC ou PEG IFN alfa-2b, 1,5 mcg/kg, uma vez por semana, SC, ambos associados à RBV 15 mg/kg/dia, dose diária, VO de 12 em 12 horas. Considerar duração do tratamento de 72 semanas para pacientes que apresentem RVP na 12ª semana e RNA-HCV indetectável na 24ª semana, levando em consideração aspectos de adesão, tolerabilidade e aceitabilidade (Ministério da Saúde 2011).

Recentemente, o Ministério da Saúde publicou a Portaria nº 20, incorporando os inibidores TVR e BVR para tratamento da hepatite C crônica no Sistema Único de Saúde (SUS) (Ministério da Saúde 2012a), e o suplemento 2 do “Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C no Brasil” (Ministério da Saúde 2013a), no qual a utilização desses medicamentos está condicionada aos seguintes critérios: monoinfecção pelo genótipo 1 do HCV; fibrose hepática avançada (Metavir = F3 ou F4) ou evidência menos invasiva de cirrose; doença hepática compensada (*Child-Pugh* ≤ 6,

classe A), sem histórico de descompensação prévia e ausência de tratamento prévio com os inibidores TVR e BVR. O esquema recomendado para o TVR é 750 mg (dois comprimidos) e para BVR é 800 mg (quatro cápsulas), sendo ambos ingeridos VO a cada 8 horas juntamente com a alimentação, sempre associado ao PEG IFN e RBV (Ministério da Saúde 2013a). Com base em um estudo de fase 3, o uso de TVR duas vezes ao dia em pacientes com infecção crônica pelo genótipo 1 do HCV (incluindo aqueles com cirrose) pode ser feito juntamente com a RBV de 12 em 12 horas, resultando em níveis semelhantes de RVS, segurança e tolerabilidade aos observados no esquema anterior (a cada 8 horas), facilitando, assim, a administração do esquema terapêutico (Buti *et al.* 2013).

O esquema recomendado para pacientes com hepatite C crônica portadores do genótipo 2 ou 3 é a associação de IFN convencional e RBV, durante 24 semanas: IFN convencional alfa-2a ou alfa-2b, 3 MUI, SC, três vezes por semana associado a RBV 15 mg/kg/dia, VO, dose diária de 12 em 12 horas. Pacientes com fatores preditores de RVS baixa como Metavir $\geq$ F3 (septos numerosos sem cirrose), manifestações clínicas de cirrose hepática e/ou carga viral (CV) superior a 600.000 UI/ml devem receber tratamento com PEG IFN. Para pacientes com CV superior a 600.000 UI/ml e/ou Metavir = F3, o esquema recomendado é a associação de PEG IFN e RBV durante 24 semanas, enquanto para aqueles com cirrose (Metavir = F4), independentemente da CV, devem tratar-se por 48 semanas com PEG IFN alfa-2a ou alfa-2b, SC, uma vez por semana associado a RBV 15 mg/kg/dia, VO, dose diária de 12 em 12 horas (Ministério da Saúde 2011).

Para portadores de hepatite C crônica com genótipo 4 ou 5, o esquema recomendado é o mesmo considerado para portadores do genótipo 1, incluindo a indicação de prolongar o tratamento para 72 semanas (Ministério da Saúde 2011).

No caso de retratamento, o recomendado é a associação de PEG IFN e RBV durante 72 semanas para os genótipos 1, 4 ou 5 e, durante 48 semanas, para os genótipos 2 ou 3: PEG IFN alfa-2a, 180 mcg, SC, uma vez por semana ou PEG IFN alfa-2b, 1,5 mcg/kg, SC, uma vez por semana, ambos associados a RBV 15 mg/kg/dia, VO, dose diária de 12 em 12 horas (Ministério da Saúde 2011). Para os pacientes portadores do genótipo 1 nulos de resposta prévia ao tratamento anterior (PEG IFN e RBV), com fibrose hepática avançada (Metavir = F3 ou F4) ou cirrose hepática

compensada (*Child-Pugh* ≤ 6), o retratamento recomendado inclui o TVR ou BVR. Nos pacientes com diagnóstico histológico Metavir = F2 há mais de três anos, previamente tratados com PEG IFN e RBV, recomenda-se avaliação criteriosa, preferencialmente não invasiva, considerando-se uma possível evolução para Metavir = F3 e, com isso, sua inclusão na terapia tripla (Ministério da Saúde 2013a).

Para o tratamento/retratamento dos portadores do genótipo 6, recomenda-se o mesmo esquema terapêutico indicado para os genótipos 1, 4 e 5 (Bruijne *et al.* 2008, Modi & Liang 2008, Al Naamani *et al.* 2013).

O “Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C no Brasil” ainda relata algumas situações que podem necessitar de tratamento e cuidados especiais, tanto da terapêutica, quanto em relação ao grupo em risco em que estão inseridos, tais como: coinfectados HIV/HCV, HCV/HBV, pacientes com transtornos mentais, crianças, pacientes com insuficiência renal, gestantes, pacientes com cirrose, hemoglobinopatias e com supressão da medula óssea (Ministério da Saúde 2011).

1.5.2. Fatores que Influenciam a Resposta ao Tratamento

A resposta ao tratamento da hepatite C pode ser influenciada por vários fatores relacionados ao vírus e ao próprio hospedeiro. Em relação aos primeiros, destacam-se a carga viral e os genótipos do HCV (Heathcote & Main 2005, Modi & Liang 2008, Asselah *et al.* 2010, Seeff & Ghany 2010, Ministério da Saúde 2011). Níveis de RNA-HCV pré-tratamento superiores a 800.000 UI/mL estão associados com taxa baixa de resposta ao tratamento (Heathcote & Main 2005, Modi & Liang 2008, Asselah *et al.* 2010). Os pacientes infectados com o genótipo 1 apresentam RVS entre 45% e 52% ao tratamento com PEG IFN e RBV (Fried *et al.* 2002, Fried & Hadziyannis 2004, Moreno-Otero 2005, Maekawa & Enomoto 2009, Asselah *et al.* 2010, Munir *et al.* 2010, Azevedo *et al.* 2012, Al Naamani *et al.* 2013), de 70 a 75% para a combinação tripla de PEG INF e RBV com o TVR ou BVR, em indivíduos não tratados e de 50 a 60% nos pacientes com falha na terapia anterior (Chevaliez 2011, 2012a, b, Chayama *et al.* 2012, Liang & Ghany 2013, Zeminian *et al.* 2013). Os portadores do genótipo 2 ou 3 apresentam taxa de RVS entre 75% e 90%. Pacientes infectados com genótipos 4, 5 ou 6 apresentam faixas intermediárias de respostas em relação aos anteriores (Fried *et al.*

2002, Fried & Hadziyannis 2004, Moreno-Otero 2005, Maekawa & Enomoto 2009, Asselah *et al.* 2010, Munir *et al.* 2010, Azevedo *et al.* 2012, Al Naamani *et al.* 2013).

Os fatores relacionados ao hospedeiro incluem idade, raça, sexo masculino, presença de esteatose hepática, índice alto de massa corporal (IMC), resistência à insulina, consumo de álcool, fibrose avançada, coinfeção com o HIV e/ou HBV, uso de drogas ilícitas e fatores genéticos (Heathcote & Main 2005, Modi & Liang 2008, Asselah *et al.* 2010, Seeff & Ghany 2010, Ministério da Saúde 2011). Em relação à idade, o tratamento deve ser considerado o mais cedo possível, de modo a evitar a redução da RVS com o decorrer do tempo de infecção (Heathcote & Main 2005). Quanto à raça, afro-americanos respondem mal ao tratamento antiviral, provavelmente por polimorfismos genéticos relacionados a proteínas associadas à resposta ao IFN (Heathcote & Main 2005, Modi & Liang 2008). Sexo masculino foi identificado como preditor de resposta baixa em pacientes submetidos ao tratamento, assim esse fator deve ser analisado juntamente com os demais (Modi & Liang 2008, Ministério da Saúde 2011). Dados indicam que resistência à insulina, obesidade e esteatose hepática influenciam a resposta à terapia com PEG IFN e RBV, provavelmente por aumentar a progressão da fibrose em portadores de hepatite C (Asselah *et al.* 2010, Seeff & Ghany 2010). Análises mostraram que o consumo de álcool, antes e durante o tratamento, pode influenciar o resultado do mesmo, além de ocasionar rápida progressão da doença. Quanto maior o grau de fibrose hepática e atividade inflamatória, menor a resposta à terapia antiviral (Heathcote & Main 2005, Asselah *et al.* 2010, Seeff & Ghany 2010).

A coinfeção com o HIV e/ou HBV exacerba as manifestações produzidas pelo HCV e aumenta o risco de progressão para cirrose, insuficiência hepática e CHC. O uso de antirretrovirais pode ainda contribuir para a agressão hepática, ocasionando quadros de hepatotoxicidade medicamentosa que acentuam as manifestações dos vírus hepatotrópicos. Há ainda relatos de interações indesejáveis entre a ribavirina e componentes da terapia contra o HIV, relacionadas à concorrência para o metabolismo intracelular, podendo causar lesão mitocondrial, esteatose e até insuficiência hepática (Heathcote & Main 2005, Moreno-Otero 2005, Ministério da Saúde 2011). O uso de drogas ilícitas pode estar associado ao risco de reinfecção pelo HCV, e tais usuários, quando em tratamento para hepatite C, necessitam de monitoramento, devido ao risco da medicação e dos efeitos adversos que as drogas provocam (Heathcote & Main 2005).

Estudos têm demonstrado que a resposta terapêutica em pacientes tratados com PEG IFN e RBV está fortemente associada com polimorfismos de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphisms* - SNPs) localizados perto do gene *IL28B*. Esse gene está localizado no cromossomo 19q13 e codifica a interleucina 28, também conhecida como IFN-lambda tipo 3 (IFN- λ 3), que se constitui um mensageiro químico das reações imunológicas e apresenta também atividade antiviral quando estimulada, como é o caso do HCV (Ge *et al.* 2009, Suppiah *et al.* 2009, Tanaka *et al.* 2009). Os SNPs se constituem como polimorfismos de dois alelos de base única no DNA genômico, caracterizados por substituição de um nucleotídeo em pontos bem localizados no DNA humano (Brookes 1999, NCBI 2011). Os “*reference SNP cluster*” ou “RefSNP” (rs #) são mapeados e depositados no banco de dados (dbSNP) do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia – NCBI (NCBI 2011).

O SNP rs12979860 C/T (citosina/timina) está localizado em uma região a 3 kilobases (kb) *upstream* do gene *IL28B* (Figura 5) e tem como alelos C e T, sendo possíveis os genótipos CC, CT e TT. Uma taxa maior do que duas vezes na RVS foi observada para o genótipo CC quando comparado ao TT, bem como do primeiro em relação ao CT em pacientes tratados com PEG IFN e RBV. Como CC é mais frequente em indivíduos de ancestralidade européia, esse achado pode explicar os índices de resposta mais elevados quando comparados às populações de origem africana (Ge *et al.* 2009). Além disso, esse polimorfismo está associado à eliminação espontânea do HCV, com taxas de *clearance* aproximadamente três vezes maiores do genótipo CC em relação aos outros (Thomas *et al.* 2009).

O SNP rs8099917 T/G (timina/guanina) está localizado em uma região a 8 kb *upstream* do gene *IL28B* (Figura 5) e cerca de 5 kb do rs12979860, e tem como alelos T e G, sendo possíveis os genótipos TT, TG e GG. Os genótipos GG e GT apresentam maior risco de falha ao tratamento em comparação ao TT, que tem sido associado a taxa mais alta de RVS. Assim, o alelo G é indicador de não resposta ao tratamento, sendo mais encontrado em populações asiáticas, quando comparadas às africanas, européias e americanas (Suppiah *et al.* 2009, Tanaka *et al.* 2009, Rauch *et al.* 2010).

Outros estudos têm confirmado a relação dos SNPs rs12979860 e rs8099917 com a resposta ao tratamento para a hepatite C (McCarthy *et al.* 2010, Montes-Cano *et al.* 2010, Thompson *et al.* 2010, Fabris *et al.* 2011, Ridruejo *et al.* 2011, Venegas *et al.*

2011, Kobayashi *et al.* 2012). Apesar de não serem conhecidos os mecanismos pelos quais essas variações possam influenciar a eliminação viral e a resposta ao tratamento, a genotipagem de *IL28B* é relativamente de baixo custo, possibilitando, assim, informações adicionais para a tomada de decisões quanto ao tratamento da hepatite C (Thompson 2012).

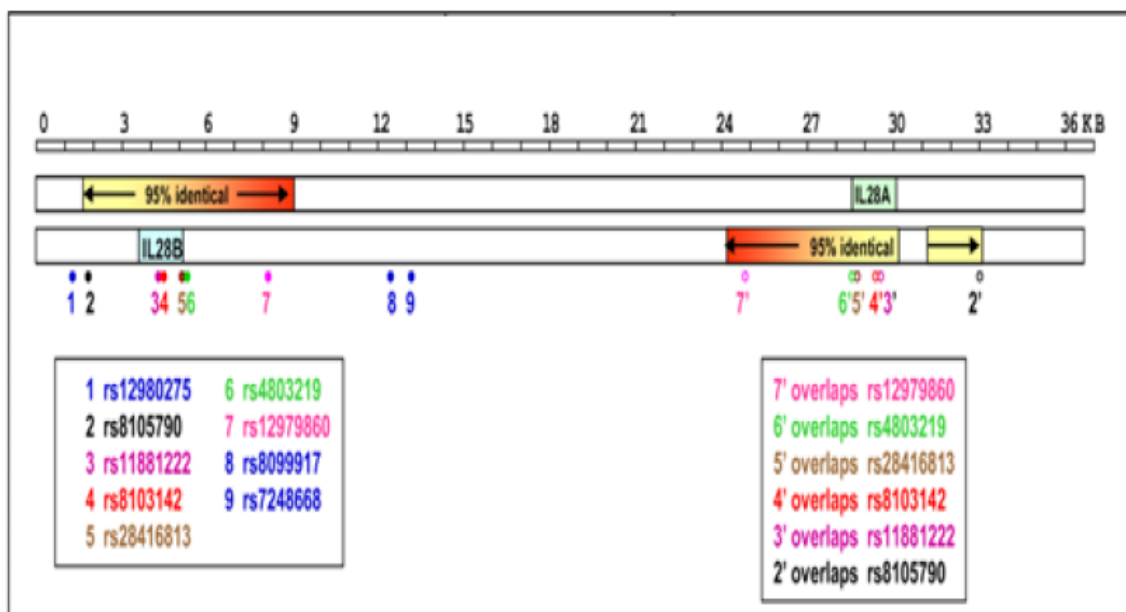


Figura 5 – Esquema da região do gene da IL28 no cromossomo 19

Fonte: Reynolds *et al.* (2012)

1.6. Aspectos Epidemiológicos da Infecção pelo HCV

1.6.1. Transmissão do HCV

A principal via de transmissão do HCV é a parenteral. A infecção é mais eficiente por repetidas ou grandes exposições percutâneas, principalmente de forma direta por transfusão de sangue, hemodiálise, transplante de órgãos e consumo de drogas injetáveis (Shepard *et al.* 2005, Alter 2007, 2012).

A transfusão sanguínea foi a principal forma de transmissão do HCV até a implantação dos testes sorológicos nos bancos de sangue (Prati 2006, Shepard *et al.* 2005, Alter 2007, 2012). No entanto, em alguns países em desenvolvimento, a

transusão continua a ser uma importante fonte de infecção, principalmente, pela escassez de recursos para realização da triagem de doadores de sangue (Prati 2006, Alter 2012).

A forma mais importante de transmissão do HCV é o uso de drogas injetáveis, principalmente, pelo compartilhamento de seringas/agulhas e outros instrumentos usados durante o consumo dessas drogas. Práticas de utilização de drogas ilícitas não injetáveis também têm sido associadas com a transmissão do HCV, como a veiculação desse vírus por meio de equipamentos contaminados por fluídos nasais e/ou orais desses usuários, bem como pela via parenteral devido à escarificação da mucosa nasal (Rodés & Tapias 2000, Shepard *et al.* 2005, Alter 2007, 2012).

Em relação a outros mecanismos de disseminação parenteral, incluem-se as injeções terapêuticas aplicadas por profissionais não habilitados. Aproximadamente 2 milhões de infecções pelo HCV são adquiridos anualmente a partir de injeções contaminadas. Em muitos países, o fornecimento de seringas estéreis é inadequado, o que resulta em infecções nosocomiais (Shepard *et al.* 2005, Alter 2007, 2012). A transmissão ocupacional da infecção pelo HCV acontece basicamente em profissionais da saúde após acidente com agulha ou outros objetos perfurocortantes contaminados, sendo que o risco médio de transmissão é de 0,5% (Shepard *et al.* 2005, Deuffic-Burban *et al.* 2011).

Uma variedade de atividades envolve o risco potencial de exposição percutânea a fluídos corporais com sangue ou hemoderivados, existindo, assim, diversas formas biologicamente plausíveis de transmissão, incluindo práticas médicas como cirurgias, tratamento odontológico e de medicina popular, além de procedimentos cosméticos, práticas religiosas ou culturais, tais como: tatuagem, *piercing*, circuncisão, escarificação, acupuntura, dentre outros, quando normas de controle de infecção e de biossegurança não são seguidas (Shepard *et al.* 2005, Alter 2007, 2012). A transmissão intrafamiliar, de pessoas infectadas a seus familiares, também é possível pelo compartilhamento de objetos cortantes de higiene pessoal (escova de dentes, lâmina de barbear, alicate de cutícula, etc.), ou pela exposição de ferimentos abertos (Memon & Memon 2002, Mohamed *et al.* 2005).

A transmissão vertical ocorre em uma parcela pequena dos casos, e está relacionada a alguns fatores como carga viral alta (maior que 10^6 cópias/ml), coinfeção

com HIV, trabalho de parto com rompimento de membranas uterinas, exposição ao sangue materno infectado decorrentes das lacerações do parto vaginal, infecção de células mononucleares maternas e histórico de uso de drogas injetáveis. Não há associação entre o tipo de parto, vaginal ou cesariano, e o aleitamento materno com a transmissão do vírus (Roberts & Yeung 2002, Shepard *et al.* 2005, Indolfi & Resti 2009, Alter 2012).

A transmissão sexual do HCV ainda é controversa, mas as evidências epidemiológicas indicam que esse vírus pode ser transmitido por relações sexuais com parceiro infectado, provavelmente pela exposição ano-genital a fluídos infecciosos. A transmissão sexual ainda está relacionada com tempo de convivência com o parceiro, números de parceiros, relação sexual sem proteção, doenças sexualmente transmissíveis (DST) e carga viral alta (Shepard *et al.* 2005, Alter 2007, 2012, Cavalheiro 2007, Tohme & Holmberg 2010). Ainda em relação à disseminação sexual do HCV, surtos de hepatite C têm ocorrido entre os homens que fazem sexo com homens (HSH) em várias regiões do mundo, principalmente, devido à prática de sexo anal desprotegido, embora possam existir outros fatores relacionados (CDC 2011, Alter 2012, Bradshaw *et al.* 2013).

No Brasil, considerando os casos notificados, observa-se que a maior proporção está relacionada ao uso de drogas (27,4%), seguida de transfusão de sangue e/ou hemoderivados (26,9%), transmissão sexual (18,5%), acidente ocupacional (1,2%), contato domiciliar (1,1%), hemodiálise (0,9%), transmissão vertical (0,3%), dentre outros (23,7%) (Ministério da Saúde 2012b).

1.6.2. Prevalência

A prevalência global estimada da infecção pelo HCV no mundo é de aproximadamente 2 a 3% (Lavanchy 2011), com 150 milhões de pessoas infectadas, sendo que 3 a 4 milhões são expostas anualmente a esse vírus (WHO 2013). Devido ao fato de que a maioria das investigações é realizada em grupos populacionais selecionados como doadores de sangue, a prevalência dessa infecção pode ser subestimada (Lavanchy 2011).

De acordo com a localização geográfica, pode haver variações nos padrões de distribuição da infecção pelo HCV, assim como de acordo com a faixa etária e nível socioeconômico (Thomson & Finch 2005, Alter 2007, Lavanchy 2011, Hanafiah *et al.* 2012).

Os dados publicados sugerem que a maioria da população dos países das Américas, Europa Ocidental e sudeste da Ásia apresenta prevalência para infecção pelo HCV (anti-HCV) abaixo de 2,5%. Na Europa Oriental, a média observada varia de 1,5% a 5%; na região ocidental do Pacífico, de 2,5% a 4,9%, e no Oriente Médio, África e Ásia Central, esses índices vão de 1% a mais de 10% (Figura 6). Os maiores percentuais estão presentes em países dessas regiões, incluindo Egito (20%), Camarões (13,8%), Mongólia (10,7%), São Tomé e Príncipe (10%) e Congo (6,4%). Na Índia, a hepatite C pode ser considerada uma infecção emergente, com taxa de até 7,89%, mas o Egito é o país com maior prevalência no mundo (média de aproximadamente 20%). Percentuais intermediários foram observados na África do Sul (1,7%), Estados Unidos (1,8%), China (2,2%), Emirados Árabes (2,3%), Japão (2,4%) e Itália (3,2%). Por outro lado, os índices mais baixos foram verificados em países da Europa como Suécia (0,5%), Finlândia (0,5%), Dinamarca (0,5%), Noruega (0,55%) e Alemanha (0,75%); países das Américas Central e do Norte incluindo a Nicarágua (0,35%), Groenlândia (0,5%), Costa Rica (0,75%), República Dominicana (0,75%) e Panamá (0,75%); além de países da Oceania como a Nova Zelândia (0,3%) e Samoa (0,75%) (Lavanchy 2011, Hanafiah *et al.* 2012).

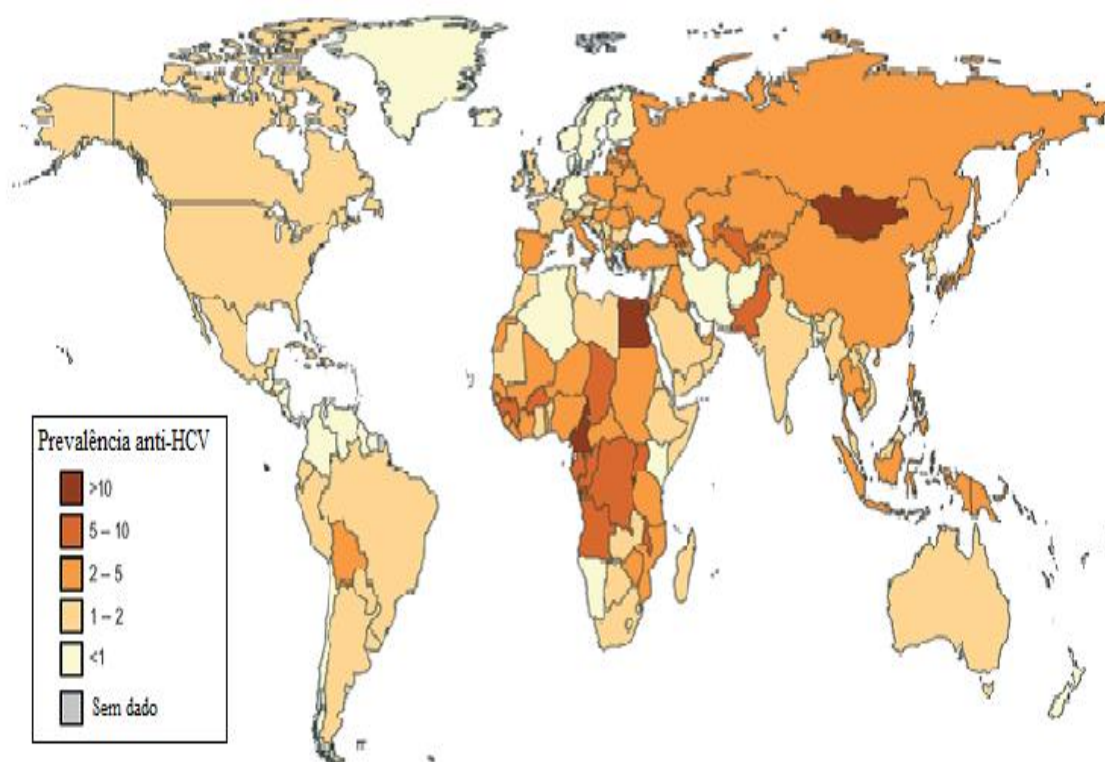


Figura 6 – Endemicidade mundial da infecção pelo HCV (modificado)

Fonte: Lavanchy (2011)

Nas Américas, existem variações entre as regiões do próprio continente, assim como entre os países e regiões dentro de um mesmo país (Te & Jensen 2010, Lavanchy 2011, Hanafiah *et al.* 2012). Em uma revisão sistemática para analisar o impacto da hepatite C, o continente americano foi dividido em várias partes e as prevalências de anti-HCV estimadas (Hanafiah *et al.* 2012). Na América do Norte (Estados Unidos, Canadá, Ilhas São Pedro e Miquelão), a prevalência média foi de 1,3%, variando de 1,1% a 1,6%. Na América Latina como um todo, a prevalência média estimada foi de 1,23%, sendo: (i) na região central (México, Colômbia, Costa Rica, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Panamá, El Salvador e Venezuela), de 1,6% (1,3%-1,9%); (ii) na parte andina (Peru, Equador e Bolívia), de 2% (1,4%-2,7%); (iii) no sul (Argentina, Chile, Uruguai e Ilhas Malvinas), de 1,6% (1,1%-2,2%), e (iv) na parte tropical (Brasil e Paraguai), de 1,2% (1,0%-1,4%) (Ono-Nita 2006, Te & Jensen 2010, Kershenobich *et al.* 2011, Lavanchy 2011, Hanafiah *et al.* 2012).

O Brasil por se tratar de um país continental com características demográficas, sociais e culturais distintas entre suas regiões, há variação também nas taxas de prevalência do HCV (Martins *et al.* 2011). Um estudo de base populacional realizado em todas as regiões brasileiras, entre 2005 e 2009, com 19.503 indivíduos entre 10 e 69 anos, representando as 26 capitais estaduais e o Distrito Federal, encontrou uma prevalência global de anti-HCV de 1,38% (IC 95% 1,12%-1,64). Na faixa etária de 20 a 69 anos, as seguintes taxas foram estimadas: 3,22% (IC 95% 2,02-4,41) na Região Norte, 0,97% (IC 95% 0,48-1,47) no Nordeste, 1,64% (IC 95% 1,14-2,13) no Centro-Oeste, 1,09% (IC 95% 0,50-1,68) no Distrito Federal, 1,63% (IC 95% 1,07-2,18) no Sudeste e 1,70% (IC 95% 1,08-2,32) no Sul (Pereira *et al.* 2013). De acordo com o Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais, os casos confirmados de hepatite C registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) somam 82.041 casos, entre 1999 e 2011, e foram confirmados 49.291 casos do sexo masculino e 32.734 do feminino. Em relação à faixa etária, o diagnóstico foi mais frequente em indivíduos de 55 a 59 anos de idade (taxa de detecção de 15,8 por 100 mil habitantes). A maioria dos casos (68,1%) foi da raça branca, seguida pela parda (23,4%). Com relação à escolaridade, 25,5% dos casos notificados tinham entre a 5ª série e o ensino fundamental, e 22,5% o ensino médio, completo ou incompleto. Do total de casos, 55.222 (67,3%) ocorreram em residentes da Região Sudeste. Em 2010, a incidência no País foi de 5,4 em 100 mil habitantes, sendo que o Estado do Acre se destacou por apresentar uma taxa de 18,1 por 100 mil habitantes, superando os Estados de São Paulo (12,1), Rio Grande do Sul (12,1), Santa Catarina (9,3), Rio de Janeiro (5,8), Paraná (5,4) e Distrito Federal (5,4), todos superiores à média nacional para o ano (Ministério da Saúde 2012b).

Em Goiás, 1.178 casos foram confirmados de 1999 a 2011, sendo 93 em 2010 e 49 na análise preliminar do último ano. Em 2010, a taxa de detecção por 100 mil habitantes foi de 1,5 (Ministério da Saúde 2012b). Em Goiânia, as taxas de prevalência da infecção pelo HCV variam de 0 a 63,3%, de acordo com a população estudada e ano de realização do estudo, conforme listadas no Quadro 1.

Quadro 1 – Taxas de prevalência do HCV em Goiânia-Goiás, segundo a população estudada

Referência	População	Prevalência (%)
Martins <i>et al.</i> (1994)	Doadores de sangue	1,4
Martins <i>et al.</i> (1995a)	Crianças provenientes de creches	0,0
Martins <i>et al.</i> (1995a)	Escolares	0,2
Martins <i>et al.</i> (1995a)	Meninos na/de rua, respectivamente	1,0/3,0
Martins <i>et al.</i> (1995b)	Gestantes	0,9
Rosa <i>et al.</i> (1996)	Pacientes com hanseníase	1,8
Carneiro <i>et al.</i> (2001)	Pacientes em hemodiálise	46,1
Barbosa <i>et al.</i> (2002)	Hemofílicos	63,3
Lopes <i>et al.</i> (2002)	Profissionais de hemodiálise	0,7
Barbosa <i>et al.</i> (2005)	Indivíduos com doença reumática	1,9
Carneiro <i>et al.</i> (2005)	Pacientes em hemodiálise	16,5
Pereira <i>et al.</i> (2006)	Usuários anônimos de um centro de testagem para HIV	2,5
Botelho <i>et al.</i> (2008)	Transplantados renais	16,1
Costa <i>et al.</i> (2009)	Gestantes	0,15
Del Rios (2011)	Pacientes HIV positivos virgens de tratamento	4,6
França (2011)	Profissionais do sexo	0,7
Reis <i>et al.</i> (2011)	Pacientes com tuberculose	7,5
Barros <i>et al.</i> (2013)	Reeducandas	6,1
Marinho <i>et al.</i> (2013a)	Catadores de materiais recicláveis	1,6
Marinho (2013b)	Portadores de doenças oncohematológicas	0,83

1.6.3. Distribuição Geográfica dos Genótipos do HCV

A distribuição dos genótipos do HCV varia de acordo com a localização geográfica (Simmonds *et al.* 2005, Lavanchy 2011, Torres 2012), conforme mostrado na Figura 7. Os genótipos 1, 2 e 3 apresentam distribuição mundial, sendo o primeiro identificado na maioria das infecções por todo o mundo. Os subtipos 1a e 1b são responsáveis por 60% dos casos (Te & Jensen 2010, Lavanchy 2011). O subtipo 1a é encontrado predominantemente no norte da Europa e América do Norte, enquanto 1b no Japão, além do sul e leste europeu. O genótipo 2 é mais frequente na Europa e Japão do que na América do Norte, sendo endêmico na África ocidental. Os subtipos 2a e 2b são prevalentes na América do Norte, Europa e Japão, enquanto o 2c no norte da Itália. O genótipo 3 é endêmico no sudeste da Ásia, sendo frequentemente detectado na Índia. O genótipo 4 circula, principalmente, no Oriente Médio, Egito e partes central e centro-oeste da África. O genótipo 5 é quase exclusivamente encontrado na África do Sul, enquanto o 6 no sudoeste da Ásia e Hong Kong (Zein 2000, Te & Jensen 2010, Lavanchy 2011).

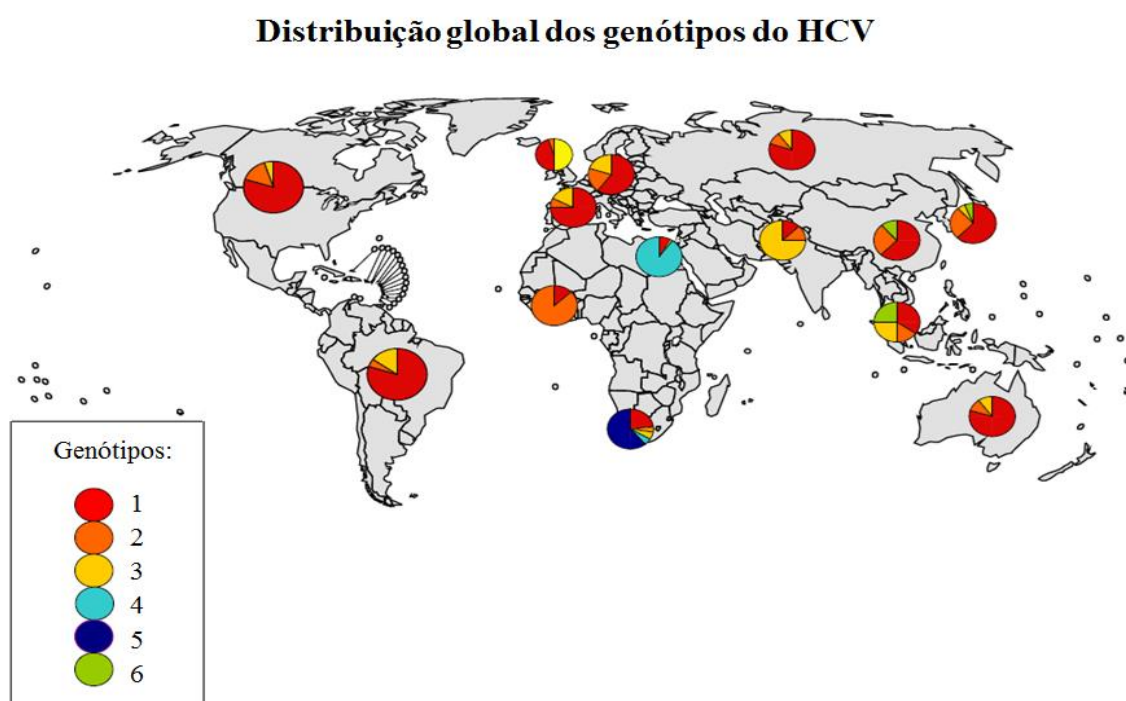


Figura 7 – Distribuição geográfica dos genótipos do HCV (modificada)

Fonte: WHO (2009)

A distribuição dos genótipos e dos subtipos do HCV também está fortemente associada com rotas particulares de transmissão (Nakano *et al.* 2004, Simmonds *et al.* 2005, Antaki *et al.* 2010, Keskin *et al.* 2010). Assim, na Europa e Estados Unidos, os subtipos 1a e 3a geralmente são encontrados em indivíduos mais jovens, que muitas vezes têm como fator de risco o uso de drogas injetáveis (Nakano *et al.* 2004), enquanto o subtipo 1b é comum em indivíduos idosos com histórico de transfusão de sangue, na Europa e Turquia (Nakano *et al.* 2004, Keskin *et al.* 2010). A presença de isolados dos subtipos 2a e 2c em Madagascar e Martinica sugere que a exposição parenteral durante as campanhas de saúde pública pode ter desempenhado importante papel na distribuição desses subtipos (Lavanchy 2011). O genótipo 4 foi associado ao uso de drogas injetáveis na Europa, enquanto o 5 ao histórico de transfusão de sangue na África do Sul (Antaki *et al.* 2010). A presença do subtipo 5a em um distrito no centro da França foi sugestiva de transmissão por injeção contaminada antes de 1972, seguida por disseminação do HCV por transfusão (Abergel *et al.* 2007, Lavanchy 2011).

No Brasil, foram encontrados os genótipos 1, 2, 3, 4 e 5 (Campiotto *et al.* 2005, Lampe *et al.* 2013). As frequências podem divergir entre as regiões no País, mas os genótipos 1, 2 e 3 estão distribuídos em todas elas. O genótipo 1 é o mais frequente em todas as regiões brasileiras, enquanto o 3 é mais comum na Região Sul (Campiotto *et al.* 2005). Os genótipos 4 e 5 foram inicialmente detectados na Região Sudeste (Levi *et al.* 2002, Moreira *et al.* 2003, Campiotto *et al.* 2005). Outros estudos nessa região corroboram a presença dos mesmos (Arrais *et al.* 2008, Vigani *et al.* 2008, Grotto *et al.* 2011). O genótipo 4 foi ainda encontrado em Salvador (Zarife *et al.* 2006) e Belo Horizonte (Perone *et al.* 2008), e o 5 (subtipo 5a) em Mato Grosso (Ribeiro *et al.* 2009).

No Estado de Goiás, foram detectados os subtipos 1a, 1b, 2b e 3a em hemofílicos e doadores de sangue (Barbosa *et al.* 2000, Martins *et al.* 2006). Nos estudos conduzidos em pacientes com doenças reumáticas, hemodialisados, transplantados renais, indivíduos coinfectados com HIV, pacientes com tuberculose e em reeducandas, verificou-se a presença dos subtipos 1a, 1b e 3a (Barbosa *et al.* 2005, Espírito-Santo *et al.* 2007, Botelho *et al.* 2008, Del Rios 2011, Reis *et al.* 2011, Barros *et al.* 2013). Em catadores de materiais recicláveis, foram identificados os subtipos 1a e 1b (Marinho *et al.* 2013a).

1.7. Prevenção e Controle da Infecção pelo HCV

O Brasil apresentou à Organização Mundial da Saúde (OMS), durante a 63^a Assembleia Mundial da Saúde, realizada em 2010, uma proposta de reconhecimento do impacto das hepatites virais na saúde mundial. Foi aprovada, portanto, uma resolução que estabeleceu o dia 28 de julho como o Dia Mundial de Luta contra as Hepatites Virais (Ministério da Saúde 2011).

Para reduzir a infecção e as doenças relacionadas, torna-se necessária a implementação de atividades de prevenção primária, secundária e terciária. As medidas de prevenção primária visam diminuir o risco de disseminação da infecção e da incidência da mesma, enquanto a secundária e terciária da progressão da doença em uma pessoa já infectada, diminuindo o risco de evolução para hepatopatia crônica e de outras doenças relacionadas (Ferreira & Silveira 2004, Kew *et al.* 2004, Ministério da Saúde 2005, Hanafiah *et al.* 2012, WHO 2013). A prevenção deve focar o aconselhamento de pessoas em risco, como usuários de drogas, indivíduos em prisões, pacientes de clínicas de DST, HIV soropositivos, doentes neurológicos e mentais (Ferreira & Silveira 2004, Kew *et al.* 2004).

Segundo a OMS, na prevenção primária, o risco de infecção pode ser reduzido evitando as seguintes situações: injeções desnecessárias e não seguras, recebimento de órgãos e sangue de paciente portador do HCV, manuseio de material contaminado não adotando os procedimentos de biossegurança, uso de drogas e compartilhamento de material injetável, sexo desprotegido com pessoa infectada pelo vírus, compartilhamento de itens pessoais cortantes, além da realização de tatuagens, *piercings* e acupuntura com equipamentos que possam estar contaminados (WHO 2013).

As medidas de prevenção secundária e terciária incluem o tratamento dos indivíduos infectados, não consumo de álcool, não exposição a substâncias hepatotóxicas e controle de índices de saúde como peso, colesterol e glicemia (Ministério da Saúde 2005). Segundo a OMS, na prevenção secundária e terciária, as recomendações são: educação e aconselhamento sobre as opções de tratamento, imunização contra as hepatites A e B, além do tratamento precoce, se for o caso, e

acompanhamento regular visando o diagnóstico da doença hepática crônica o mais cedo possível (WHO 2013).

Em novembro de 1993, a implantação da triagem do marcador anti-HCV nos bancos de sangue passou a ser obrigatória no Brasil, com a publicação da Portaria nº 1376 (Ministério da Saúde 1993). A partir de 2004, o Ministério da Saúde editou a Portaria nº 112, recomendando a implantação gradativa do teste de amplificação e detecção do ácido nucléico viral (NAT) na triagem do HCV em doadores de sangue (Ministério da Saúde 2004). Essa medida diminuiria o risco residual de transmissão, que ocorre em função da janela imunológica (Prati 2006), porém o custo dispendioso e pessoal qualificado na realização dos exames têm dificultado a implantação de tal triagem nos bancos de sangue, sobretudo no serviço público de saúde (Wendel *et al.* 2009). Contudo, essa medida entrou em vigor em alguns países desenvolvidos da Europa, Canadá e nos Estados Unidos, reduzindo de forma substancial o risco de transmissão por transfusão (Saldanha *et al.* 1999, Prati 2006). No Brasil, recentemente o Ministério da Saúde publicou a Portaria nº 25, incorporando o NAT para detecção do HIV e HCV na testagem de amostras de sangue de doadores no âmbito do Sistema Nacional de Sangue, Componentes e Hemoderivados do SUS (Ministério da Saúde 2013b).

O desenvolvimento de vacinas tem sido dificultado, principalmente, pela variabilidade genética do HCV e falta de modelos animais apropriados. No entanto, existem algumas vacinas em desenvolvimento, o que representará um componente importante no controle da infecção do HCV, especialmente, em populações onde a prevalência é alta e os antivirais não são acessíveis (Fauvelle *et al.* 2013).

2. JUSTIFICATIVA

Estudos sobre a infecção pelo HCV são importantes tendo em vista que a hepatite C representa um problema de saúde mundial, ocasionando mais de 350.000 mortes a cada ano (Lavanchy 2011, WHO 2013). Em Goiás, 1.178 casos foram confirmados de 1999 a 2011, sendo 48 nesse último ano (Ministério da Saúde 2012b). Por ser uma doença silenciosa, ressalta-se a necessidade de estudos para compreensão do cenário dessa infecção, subsidiando a elaboração de intervenções individuais e coletivas com a finalidade de reduzir a infecção na população.

O monitoramento da distribuição de genótipos é relevante na definição de tendências epidemiológicas sobre introdução de novos genótipos, taxa de recombinações genéticas e expansão geográfica do vírus em rotas de transmissão recentes (Simmonds *et al.* 2005, Lavanchy 2011, Torres 2012). Além da importância epidemiológica, os genótipos do HCV são os principais preditores de resposta ao tratamento da hepatite C (Heathcote & Main 2005, Modi & Liang 2008, Asselah *et al.* 2010, Seeff & Ghany 2010, Ministério da Saúde 2011). Outro fator relacionado ao vírus é a carga viral. Em relação ao hospedeiro, vários fatores têm sido evidenciados, tais como: idade, raça, sexo masculino, presença de esteatose hepática, IMC, resistência à insulina, consumo de álcool, estágio de fibrose avançado, coinfeções com o HIV e/ou HBV, uso de drogas ilícitas e fatores genéticos (Heathcote & Main 2005, Modi & Liang 2008, Asselah *et al.* 2010, Seeff & Ghany 2010, Ministério da Saúde 2011). Apesar da importância desses fatores na resposta ao tratamento da hepatite C, na Região Centro-Oeste, para o nosso conhecimento, não existem dados sobre o tema em questão.

Portanto, este estudo foi proposto com o intuito de identificar os genótipos circulantes em pacientes com hepatite C na cidade de Goiânia-GO, analisar o polimorfismo genético próximo ao gene *IL28B* em pacientes infectados com o genótipo 1 e relacioná-lo à resposta ao tratamento para hepatite C. Acredita-se que os resultados aqui encontrados, juntamente com os de outros estudos brasileiros, contribuirão para o melhor acompanhamento e manejo clínico dos pacientes portadores do genótipo 1 do HCV, o que certamente refletirá na melhor assistência e qualidade de vida desses indivíduos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Investigar os genótipos do HCV nos pacientes atendidos em laboratório de referência em Goiânia-GO e a resposta ao tratamento para hepatite C em portadores do genótipo 1, com ênfase no polimorfismo relacionado ao gene *IL28B*.

3.2. Objetivos Específicos

- Identificar os genótipos do HCV em pacientes com hepatite C em Goiânia-GO;
- Determinar a frequência do polimorfismo próximo ao gene *IL28B* (rs12979860) no grupo de pacientes infectados com o genótipo 1 submetidos ao tratamento para hepatite C;
- Verificar a taxa de resposta virológica sustentada neste grupo de pacientes, e relacioná-la com o polimorfismo próximo ao gene *IL28B* (rs12979860).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Delineamento, Local e População de Estudo

Inicialmente, foi realizado um estudo de corte transversal em pacientes infectados com o vírus da hepatite C atendidos em laboratório de referência em Goiânia-GO, em um período de 10 anos, compreendendo de janeiro de 2003 a dezembro de 2012 (Figura 8). Os pacientes com sorologia reagente para o marcador anti-HCV foram encaminhados pela Secretaria Municipal de Saúde ao Laboratório Prof^a Margarida Dobler Komma do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG), para realização dos testes moleculares (detecção do RNA-HCV e genotipagem). Esses pacientes foram convidados a participar da presente investigação, tendo sido observados os seguintes critérios de inclusão: ser reagente para o marcador anti-HCV e não ter participado da mesma previamente. Todos os pacientes elegíveis (n = 1300) aceitaram participar do estudo.

Entre janeiro de 2012 e dezembro de 2013, foi formada uma coorte de portadores do genótipo 1 do HCV submetidos ao tratamento da hepatite C para avaliação de sua resposta, com ênfase no polimorfismo relacionado ao gene *IL28B* (rs12979860) (Figura 8). Os pacientes foram selecionados, considerando os seguintes critérios de inclusão: ser portador crônico do genótipo 1 do HCV e ter indicação para tratamento da hepatite C com PEG IFN e RBV. O critério de exclusão foi: ser portadores do HIV e/ou HBV. Os pacientes selecionados foram esclarecidos sobre os objetivos e procedimentos do estudo, e todos aceitaram participar da presente investigação, totalizando 101 indivíduos. Para análise da avaliação da resposta ao tratamento para hepatite C, os pacientes foram classificados em dois grupos: (i) aqueles que alcançaram RVS e (ii) os não respondedores (NR), incluindo os recidivantes.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás.

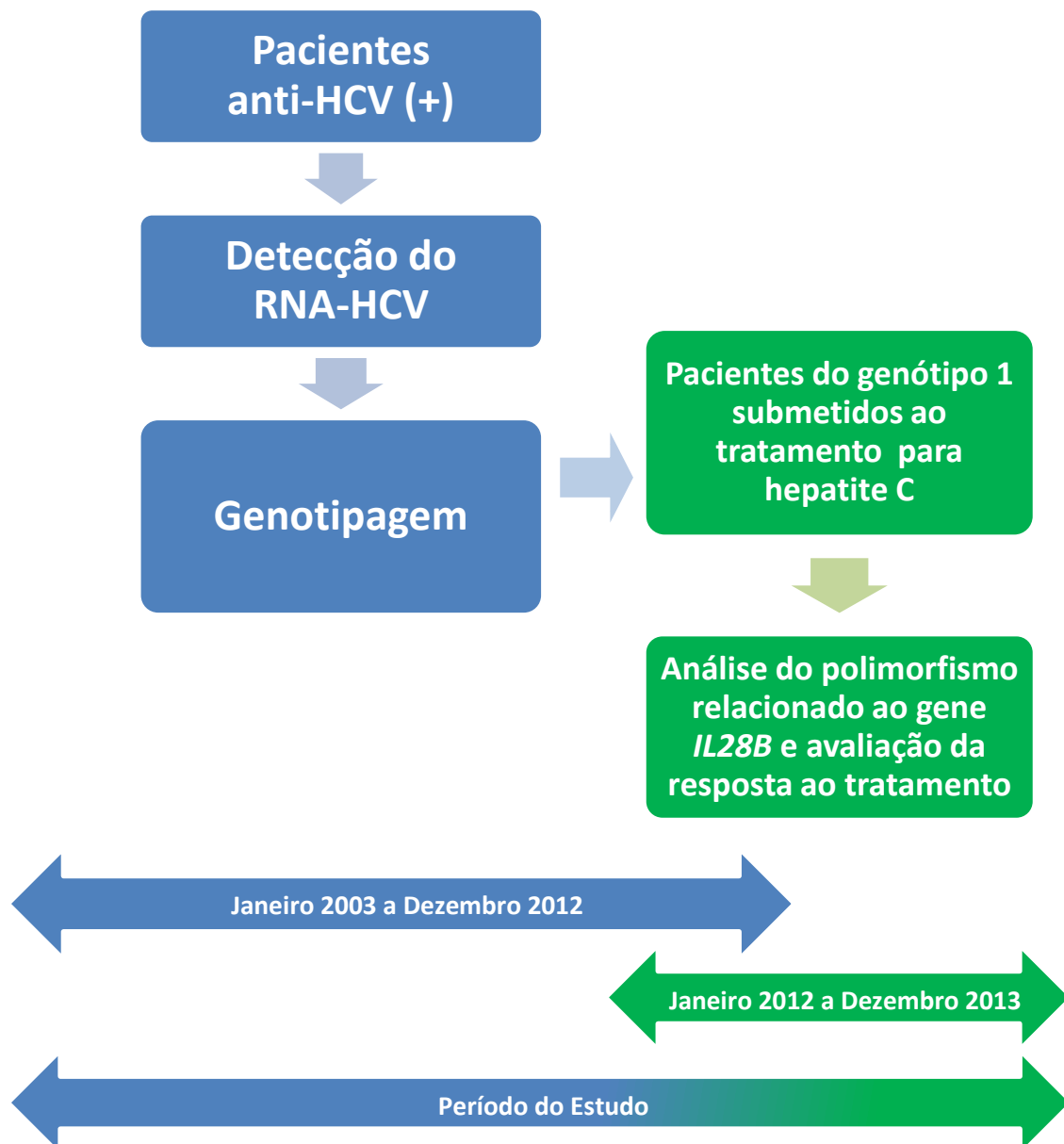


Figura 8 – Fluxograma do estudo

4.2. Entrevista e Coleta de Sangue

Após os participantes serem esclarecidos sobre os objetivos e procedimentos do estudo, foi solicitada a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), ou coleta de impressão digital dos analfabetos. Para os menores de idade, o referido termo foi assinado pelos pais ou responsáveis. Posteriormente, os pacientes foram submetidos à entrevista sobre características sociodemográficas (idade, sexo,

estado civil, naturalidade, escolaridade e renda familiar) e de risco para infecção pelo HCV (transfusão de sangue, cirurgia, acupuntura, tatuagem, tratamento odontológico, hemodiálise, uso de drogas ilícitas, atividade sexual, número de parceiros sexuais e história de DST). Para os portadores do genótipo 1 do HCV selecionados para avaliação da resposta ao tratamento para hepatite C, foram coletados adicionalmente os seguintes dados: raça, altura, peso, presença de *piercing*, relação com parceiro do mesmo sexo e não uso/uso irregular de preservativo. Para estes pacientes, foram coletados ainda dados em prontuários referentes à fibrose hepática e carga viral do HCV.

Foram coletados 10 mL de sangue de cada paciente e as amostras foram transportadas para o Laboratório de Virologia do IPTSP/UFG, onde foram centrifugadas e, após separação, as alíquotas de soro estocadas a -20°C. Para análise do polimorfismo próximo ao gene *IL28B*, uma alíquota de sangue (1 mL) foi colocada em tubo com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). As amostras de sangue total foram estocadas a -20°C.

4.3. Detecção do RNA-HCV

4.3.1. Extração e Transcrição do RNA-HCV

Todas as amostras foram testadas para a detecção do RNA viral pela RT-PCR. A extração do RNA foi realizada pelo método trizol/clorofórmio a partir de 200 µL de soro, que foi concentrado por centrifugação a 16.000 rpm a 4°C por 90 minutos. Um volume de 150 µL de soro foi retirado, e adicionou-se igual volume de trizol (*Life Technologies*), aos 50 µL de soro concentrado. Após homogeneizar em vórtex, foram acrescentados 40 µL de clorofórmio (Merck) para separação de fases e, em seguida, homogeneizou-se por inversão. Após centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos, a fase superior incolor (menos densa) foi transferida para tubos contendo 20 µL de dextran (1 µg/µL) (*GE Healthcare Life Sciences*) e 100 µL de isopropanol (Merck). Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e 200 µL de etanol a 80% (Merck) foram adicionados, para purificação e precipitação, com formação do sedimento (*pellet*). Novamente o sobrenadante foi descartado, e os tubos secos com o auxílio de uma

bomba de vácuo. O RNA obtido foi ressuspensão em 12 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (Sigma) (inativador de ribonuclease).

Para a transcrição reversa, foi preparada uma mistura contendo o iniciador randômico (*Life Technologies*), RNAGuard ou RNase Inhibitor (*GE Healthcare Life Sciences*), 200 U da transcriptase reversa do vírus de leucemia murina de Moloney (*Life Technologies*) e 0,2 mM de cada dNTP (*GE Healthcare Life Sciences*), em um volume final de 24 µL (12 µL da mistura da reação de transcrição + 12 µL do RNA), a qual foi incubada a 42°C, durante 90 minutos.

4.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O cDNA foi submetido a reação de amplificação por *nested* PCR com iniciadores específicos para a região 5' NC. Na primeira PCR (PCR-1), foram utilizados 8 µL do cDNA e iniciadores externos {(CACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTC) homólogo à posição -305 e (ATGGTGCACGGTCTACGAAGACCTCC) homólogo à posição 2}, em um volume final de 50 µL, na presença de 0,2 mM de cada dNTP (*Life Technologies*), 3 mM de MgCl₂ e 1 U da enzima Taq DNA polimerase (*Life Technologies*). Os tubos com essa mistura foram colocados no termociclador, onde o DNA foi desnaturado por aquecimento a 94°C por dois minutos, amplificado durante 35 ciclos a 94°C por 15 segundos, a 50°C por 45 segundos e a 72°C por um minuto, seguidos por um alongamento de sete minutos a 72°C.

Na segunda PCR (PCR-2), 2 µL do produto obtido foi amplificado novamente utilizando iniciadores internos {(TTCACGCAGAAAGCGTCTAGCC) homólogo à posição -279 e (GGGCACTCGCAAGCACCTATCAGG) homólogo à posição -26}, em um volume final de 50 µL, nas mesmas condições da PCR-1 descritas acima, exceto pelo aumento da concentração do MgCl₂ para 5 mM, segundo Ginabreda *et al.* (1997).

4.3.3. Eletroforese em Gel de Agarose

Os produtos da PCR-2 (253 pb) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (*Life Technologies*) em TBE (tampão tris-borato-EDTA), contendo

brometo de etídio (*GE Healthcare Life Sciences*). Após misturados ao azul de bromofenol (*GE Healthcare Life Sciences*), aplicados no gel e submetidos à eletroforese, foram visualizados sob luz ultravioleta em um transluminador.

Para evitar a contaminação, a extração e transcrição reversa do RNA, a preparação de reagentes pré-PCR, a amplificação do cDNA e a eletroforese em gel dos produtos da PCR-2 foram realizados em salas separadas e com cuidados inerentes à cada etapa.

4.4. Genotipagem do HCV

4.4.1. Genotipagem por LiPA (*Line probe assay*)

Todas as amostras positivas para RNA-HCV foram submetidas ao método *line probe assay* – LiPA (*Versant HCV Genotype Assay, Bayer*). Inicialmente, as sequências genômicas de cDNA foram amplificadas novamente por *nested* PCR com iniciadores biotinilados complementares à região 5' NC do genoma do HCV. Foram adicionados 10 µL da PCR-2 e 10 µL de solução desnaturante em canaletas identificadas com os números das amostras, incubando-se por 5 minutos. Adicionou-se a solução de hibridização (2 mL) e as fitas teste, incubando-se em banho-maria a 50°C sob agitação de 80 rpm por uma hora. Após a hibridização, as fitas foram lavadas com solução de lavagem por 30 minutos em temperatura ambiente sob agitação. Foram adicionados 2 mL do conjugado (solução de estreptoavidina marcada com fosfatase alcalina), incubando-se por 30 minutos sob agitação a temperatura ambiente. Logo após, foram realizadas duas lavagens, cada uma por um minuto, seguidas da adição de 2 mL de substrato (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/BICP e azul de nitrotetrazólio/NBT), com incubação por 30 minutos. Após a lavagem com água destilada, as fitas foram secas. A visualização da reatividade dos fragmentos amplificados em uma ou mais linhas sobre as tiras permitiu a identificação dos genótipos e subtipos do HCV, conforme as instruções do fabricante.

4.4.2. Sequenciamento e Análise Filogenética da Região NS5B

As amostras subtipadas como 1a/1b pelo LiPA, bem como as dos genótipos 2 e 4 do HCV foram submetidas à genotipagem por sequenciamento e análise filogenética da região NS5B do genoma viral, a partir das seguintes etapas: amplificação, purificação, sequenciamento e análise filogenética.

Amplificação - Foi realizada uma *semi-nested* PCR para a região NS5B, conforme Sandres-Sauné *et al.* (2003). Na primeira PCR (PCR-1), foram utilizados 8 µL do cDNA e iniciadores externos *sense* (PR3) (5'-TATGAYACCCGCTGYTTTGACTC-3') na posição 8256-8278 e *antisense* (PR4) (5'-GCNGARTAYCTYGTTCATAGCCTC-3') na posição 8622-8644. A PCR-1 foi realizada num volume final de 50 µL, na presença de 0,2 mM de cada dNTP, 3 mM de MgCl₂ e 1 U de enzima Taq DNA polimerase (*Life Technologies*). A reação foi incubada a 50°C por 30 minutos, e submetida a cinco ciclos de 93°C por 30 segundos, 60°C por 45 minutos e 72°C por 1 minuto, seguidos de 35 ciclos a 93°C por 30 segundos, 60°C com diminuição de - 0,3°C entre cada ciclo e 72°C por 1 minuto. Finalizando, com alongamento a 72°C por 5 minutos.

A segunda amplificação (PCR-2) foi realizada com 5 µL do produto obtido da PCR-1, o qual foi novamente amplificado com iniciadores internos *sense* (PR3) (5'-TATGAYACCCGCTGYTTTGACTC-3') na posição 8256-8278 e *antisense* (PR5) (5'-GCTAGTCATAGCCTCCGT-3') na posição 8619-8636, em um volume total de 110 µL. Após a incubação a 95°C por 5 minutos, o DNA foi amplificado durante 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, seguidos por alongamento a 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados (341 pb) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo brometo de etídeo, e visualizados sob luz ultravioleta em um transluminador.

Purificação - Os produtos da segunda amplificação da região NS5B foram purificados utilizando o *kit QIAquick PCR purification (QIAGEN)*, seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, em tubo tipo *ependorf*, foram adicionados cinco volumes (500 µL) do tampão (PBI) e um volume (100 µL) do produto obtido da

PCR-2 de cada amostra. Esta mistura foi homogeneizada e, em seguida, aplicada na coluna fornecida pelo *kit*, a qual foi centrifugada por um minuto a 13.000 rpm. Posteriormente, o líquido centrifugado foi descartado e, logo após, 750 µL do tampão de lavagem (PE) foram adicionados à coluna, sendo esta, igualmente submetida à centrifugação. Depois dessa etapa, o líquido residual foi descartado e o tubo mais uma vez centrifugado para tirar o excesso de tampão. Em seguida, a coluna *QIAquick* foi colocada em um tubo tipo *ependorf*, onde foram adicionados 50 µL do tampão de eluição (EB) no centro da membrana da coluna e processou-se a centrifugação por um minuto a 13.000 rpm. Ao final do processo, a coluna foi desprezada e o DNA coletado em tubo tipo *ependorf*, o qual foi armazenado a -20°C.

Quantificação - Cada amostra (4 µL) foi aplicada em um gel de agarose a 2%, bem como 4 µL do marcador de massa e peso molecular *Low DNA mass ladder* (Life Technologies), afim de comparar a intensidade das bandas e calcular a concentração de DNA a ser utilizada na técnica de sequenciamento.

Sequenciamento - Foi feita uma pré-mistura de reação para cada iniciador utilizado na reação de sequenciamento, contendo: água MilliQ (6 µL), tampão MgCl₂ 5X (3 µL), iniciadores específicos (concentração de 2,0 pmol em um volume de 3 µL) para a região NS5B, “sense” (5’-TATGAYACCCGCTGYTTTGACTC-3’) na posição 8256-8278 e “antisense” (5’- GCTAGTCATAGCCTCCGT-3’) na posição 8619-8636 e 1 µL do *BigDye* (Kit *BigDye Terminator* versão v.3.01 *Cycle Sequencing Kit* - Applied Biosystems), que contém ddNTPs (trifosfatos de didesoxinucleotídeos) marcados, totalizando 13 µL. Em seguida, foram adicionados 2 µL de DNA na concentração de 30 a 40 ng/mL e distribuídos na placa de sequenciamento de acordo com o mapa da reação. As reações de sequenciamento foram realizadas no termociclador C1000 *Thermal Cycler* (BIO-RAD), com programa específico para a síntese da fita complementar e incorporação dos ddNTPs marcados (25 ciclos de 95°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos).

As amostras foram precipitadas utilizando-se 65 µL de isopropanol a 65%. A placa foi incubada por 20 minutos a temperatura ambiente em lugar escuro e, logo após, centrifugada por 45 minutos a 2000 rcf (3488 rpm) a 20°C. A seguir, o sobrenadante foi

descartado, e acrescidos 250 µL de etanol a 60%. Após centrifugação por 10 minutos a 2000 rcf a 20°C, o sobrenadante foi descartado e mais uma vez acrescidos 100 µL de etanol 60%, e novamente realizada centrifugação a 2000 rcf por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado, e o sedimento foi seco no termociclador a 95°C por 2 minutos. Em seguida, foi realizada a desnaturação. O DNA foi ressuspense em 10 µL de formamida Hi-Di (*Applied Biosystems*), e a placa colocada no termociclador a 95° C por 5 minutos. Imediatamente após a incubação, a mesma foi colocada em gelo por dois minutos e logo depois no sequenciador automático ABI 3130 (*Applied Biosystems*).

Análise filogenética - Para a análise das sequências, um consenso das fitas *sense* e *antisense* foi montado utilizando-se o programa *SeqMan II* versão 5.01 (DNASTAR). Para a identificação do genótipo viral, as sequências consenso de cada amostra foram alinhadas, empregando-se o programa *Clustal X* (Thompson *et al.* 1997) juntamente com sequências dos diferentes genótipos e subtipos do HCV obtidas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). O programa *BioEdit* foi utilizado para edição do alinhamento. A classificação dos genótipos foi realizada por análise filogenética, utilizando-se o programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versão 4 (Tamura *et al.* 2007). A árvore foi construída empregando-se o método de *Neighbor-Joining* e o modelo de substituição de nucleotídeos Kimura 2 parâmetros. Finalmente, a robustez dos grupos filogenéticos foi avaliada utilizando *bootstrap* de 1025 repetições.

4.5. Análise de Polimorfismo Próximo ao Gene *IL28B*

As amostras de sangue total dos pacientes com genótipo 1 submetidas ao tratamento para hepatite C foram analisadas pelo polimorfismo próximo ao gene *IL28B* (SNP rs12979860 C/T), incluindo os seguintes processos: extração de DNA, PCR e genotipagem por RFLP.

Extração do DNA - A extração do DNA genômico foi realizada empregando-se o *Qiamp DNA Blood Mini Kit* (QIAGEN), conforme instruções do fabricante. Resumidamente, em tubo tipo *ependorf*, foram adicionados 40 µL de Proteinase K, 400 µL do sangue total e 400 µL do tampão AL. Após homogeneização, a solução foi

incubada a 50°C por 1 hora. Adicionou-se etanol (400 µL) e centrifugou-se por 1 minuto a 8.000 rpm. Transferiu-se o DNA para a coluna de filtro com tubo coletor fornecidos pelo *kit*, centrifugando-o novamente. Após renovação do tubo coletor, foram adicionados 500 µL de tampão AW1, e nova centrifugação realizada nas mesmas condições. Substituiu-se o tubo coletor, e o tampão AW2 (500 µL) foi acrescido, centrifugando a 14.000 rpm por 3 minutos, seguidos por mais 1 minuto para retirar o excesso. Colocou-se a coluna de filtro em tubo *eppendorf* e, ao centro da mesma, foram adicionados 150 µL do tampão AE para a eluição. Aguardados 15 minutos, centrifugou-se por 2 minutos a 8.000 rpm. Ao final do processo, a coluna foi desprezada, o DNA coletado em tubo tipo *eppendorf* e armazenado a -20°C.

PCR - O DNA foi submetido à reação de amplificação por PCR com iniciadores específicos para região de interesse no cromossomo 19, conforme Fabris *et al.* (2011). Na PCR, foram utilizados 20 µL do DNA e iniciadores *sense* (IL1) (5'-GCTTATCGCATACGGCTAGG -3') e *antisense* (IL2) (5'-AGGCTCAGGGTCAATCACAG -3'), em um volume final de 50 µL, na presença de 0,2 mM de cada dNTP (*Life Technologies*), 2 mM de MgCl₂ e 1 U da enzima Taq DNA polimerase (*Life Technologies*). Após esta mistura, a reação foi colocada no termociclador, onde o DNA foi desnaturado por aquecimento a 95°C por três minutos, amplificado durante 35 ciclos a 95°C por 1 minuto, a 58°C por 45 segundos e a 72°C por 45 segundos, seguidos por um alongamento de três minutos a 72°C, resultando em um produto de 242 pb.

Genotipagem por RFLP - Para a análise do polimorfismo, realizou-se a genotipagem por RFLP, conforme Fabris *et al.* (2011). Em um volume total de 20 µL, 10 µL da PCR foram digeridos com 1 U da endonuclease BstU-I (*New England Biolabs*) a 60°C *overnight*. Os fragmentos foram misturados ao azul de bromofenol (*GE Healthcare Life Sciences*) e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 3% (*Life Technologies*) em TBE (tampão tris-borato-EDTA), contendo brometo de etídio (*GE Healthcare Life Sciences*). Logo após, foram visualizados sob luz ultravioleta em um transluminador.

Os fragmentos digeridos para os genótipos CC, TT e TC foram, respectivamente, 135 + 82 + 25 pb, 160 + 82 pb e 160 + 135 + 82 + 25 pb (Figura 9).

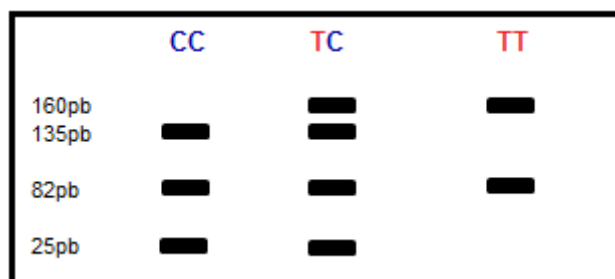


Figura 9 – Representação esquemática da discriminação dos genótipos CC, TC e TT (rs12979860).

4.6. Processamento e Análise de Dados

Os dados das entrevistas, bem como os resultados dos testes moleculares e do polimorfismo próximo ao gene *IL28B*, foram digitados e analisados no programa “Epi Info versão 3.5.4” (*Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA*). Procedeu-se a análise descritiva para as características da população estudada, por meio de distribuição de frequências, cálculo da média de idade e seu desvio padrão. A Taxa de RVS foi calculada com intervalo de confiança de 95% (IC 95%). O teste de χ^2 foi utilizado quando apropriado e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS

5.1. Detecção do RNA-HCV

Inicialmente, todas as amostras dos pacientes anti-HCV reagentes foram testadas para a detecção do RNA viral, sendo 68,8% (894/1300) positivas para este marcador.

5.2. Características Sociodemográficas dos Pacientes RNA-HCV Positivos

A Tabela 1 mostra as características sociodemográficas dos 894 portadores do vírus da hepatite C estudados em Goiânia, Goiás. A média de idade foi de 43,2 anos (dp 11,4), sendo a maior frequência de indivíduos com idade entre 40 e 49 anos (36,9%). Observou-se predomínio do sexo masculino (62,3%).

Mais da metade da população (52,5%) era casada ou relatou união consensual, 30,3% eram solteiros e 17,2% separados ou viúvos. A maioria (70,0%) informou ter nascido em Goiás.

Quanto ao nível de escolaridade, 50,0% declararam ter cursado o primeiro grau, 38,4% o segundo grau e 8,9% o terceiro grau. Ainda, 2,7% mencionaram ser analfabetos.

Dos entrevistados, 4,8% referiram renda familiar inferior a um salário mínimo (sm), 55,2% de um a dois sm, 29,8% de três a cinco sm e 10,2% superior a cinco sm.

Tabela 1 – Características sociodemográficas de 894 portadores do vírus da hepatite C estudados em Goiânia, Goiás

Característica	N	%
Idade (média $\pm$ dp: 43,2 $\pm$ 11,4)		
$\leq$ 18 anos	16	1,8
19 - 29 anos	84	9,4
30 - 39 anos	214	23,9
40 - 49 anos	330	36,9
$\geq$ 50 anos	250	28,0
Sexo		
Feminino	337	37,7
Masculino	557	62,3
Estado civil		
Solteiro	271	30,3
Casado/União consensual	469	52,5
Viúvo/Separado	154	17,2
Naturalidade		
Goiás	626	70,0
Outro Estado	268	30,0
Escolaridade		
Nenhuma	24	2,7
$\leq$ 9 anos (1º grau)	447	50,0
10 – 12 anos (2º grau)	343	38,4
$\geq$ 13 anos (3º grau)	80	8,9
Renda familiar		
< 1 sm*	41	4,8
1 - 2 sm	471	55,2
3 - 5 sm	254	29,8
> 5 sm	87	10,2
Sem informação	41	

dp: Desvio padrão * Salário mínimo

5.3. Características de Risco Relatadas por Portadores do HCV

As características de risco relatadas pelos indivíduos infectados pelo vírus da hepatite C em Goiânia-Goiás são apresentadas na Tabela 2. Dos entrevistados, 35,8% relataram transfusão sanguínea antes de 1994, 68,0% foram submetidos a algum procedimento cirúrgico, 4,0% realizaram acupuntura, 20,7% apresentavam tatuagem e 38,5% referiram tratamento odontológico com profissional não graduado. Apenas 26 (2,9%) eram pacientes renais crônicos em hemodiálise.

Em relação ao consumo de drogas ilícitas, 13,3% fizeram uso de drogas não injetáveis, 9,8% de injetáveis e 12,7% de ambas.

A maioria dos indivíduos com idade acima de 16 anos (98,8%) informou atividade sexual, sendo que destes, 69,3% tiveram múltiplos parceiros sexuais na vida e 41,4% história de DST.

Tabela 2 – Características de risco relatadas por portadores do vírus da hepatite C estudados em Goiânia, Goiás

Característica	N	%
Transfusão sanguínea (n = 873)		
Não	490	56,1
1994 ou após	71	8,1
Antes de 1994	312	35,8
Cirurgia (n = 891)		
Não	285	32,0
Sim	606	68,0
Acupuntura (n = 891)		
Não	855	96,0
Sim	36	4,0
Tatuagem (n = 892)		
Não	707	79,3
Sim	185	20,7
Tratamento odontológico (n = 857)		
Sem tratamento	9	1,1
Com profissional graduado	518	60,4
Com profissional não graduado	330	38,5
Hemodiálise (n = 893)		
Não	867	97,1
Sim	26	2,9
Uso de drogas ilícitas (n = 891)		
Não	572	64,2
Não injetável	119	13,3
Injetável	87	9,8
Ambas	113	12,7
Atividade Sexual* (n = 883)		
Não	11	1,2
Sim	872	98,8
Múltiplos parceiros sexuais (≥5)** (n = 860)		
Não	264	30,7
Sim	596	69,3
Doenças Sexualmente Transmissíveis** (n = 865)		
Não	507	58,6
Sim	358	41,4

* Foram considerados indivíduos acima de 16 anos.

** Foram considerados indivíduos que relataram atividade sexual.

5.4. Distribuição de Genótipos/Subtipos do HCV

Na Figura 10, observa-se a distribuição dos genótipos/subtipos do HCV em 894 portadores do HCV em Goiânia, Goiás. Foram identificados os genótipos 1 (76,3%), 2 (1,9%), 3 (21,6%) e 4 (0,2%) pelo LiPA, bem como os subtipos 1a (n = 343), 1b (n = 326) e 1a/1b (n = 13). Ao realizar o sequenciamento e análise filogenética da região NS5B do genoma viral, verificou-se que, dentre as amostras tipadas como 1a/1b, nove foram do subtipo 1a e quatro do 1b. Dos infectados com o genótipo 2, foram subtipadas 4/17 amostras: três do subtipo 2b e uma do subtipo 2j. Um dos dois portadores do genótipo 4 apresentou o subtipo 4a (Figura 11).

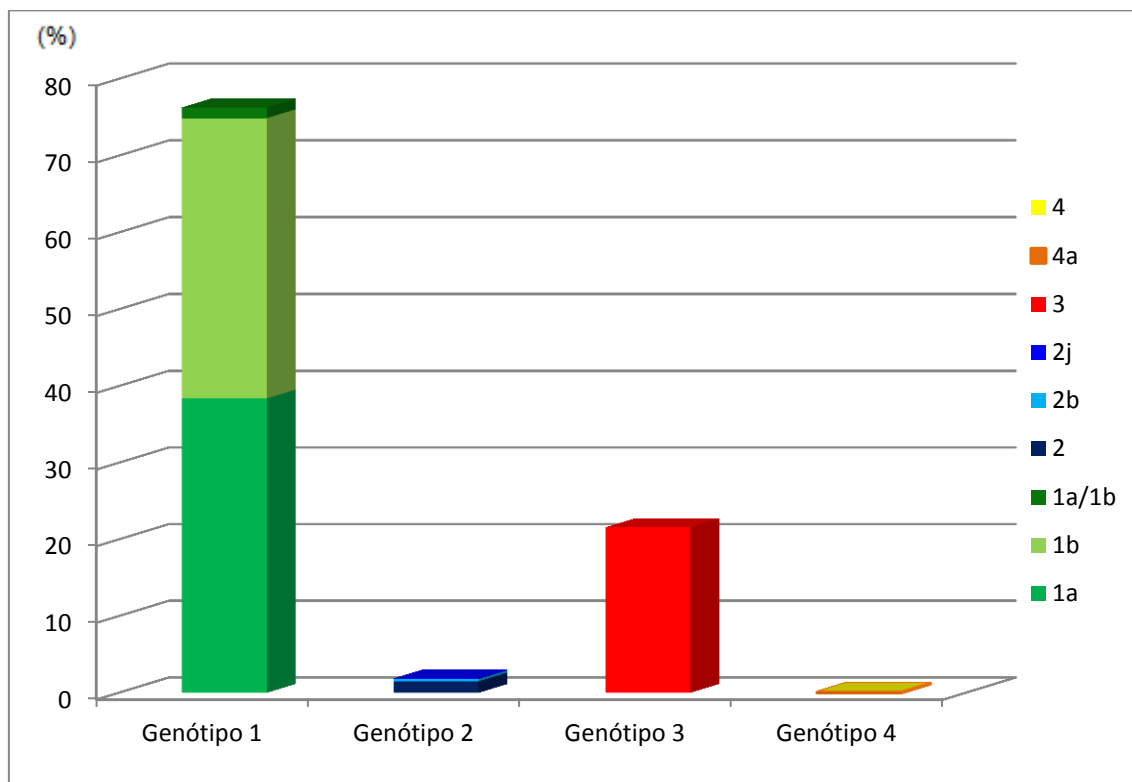


Figura 10 – Distribuição dos genótipos/subtipos do HCV em 894 portadores do vírus da hepatite C em Goiânia, Goiás

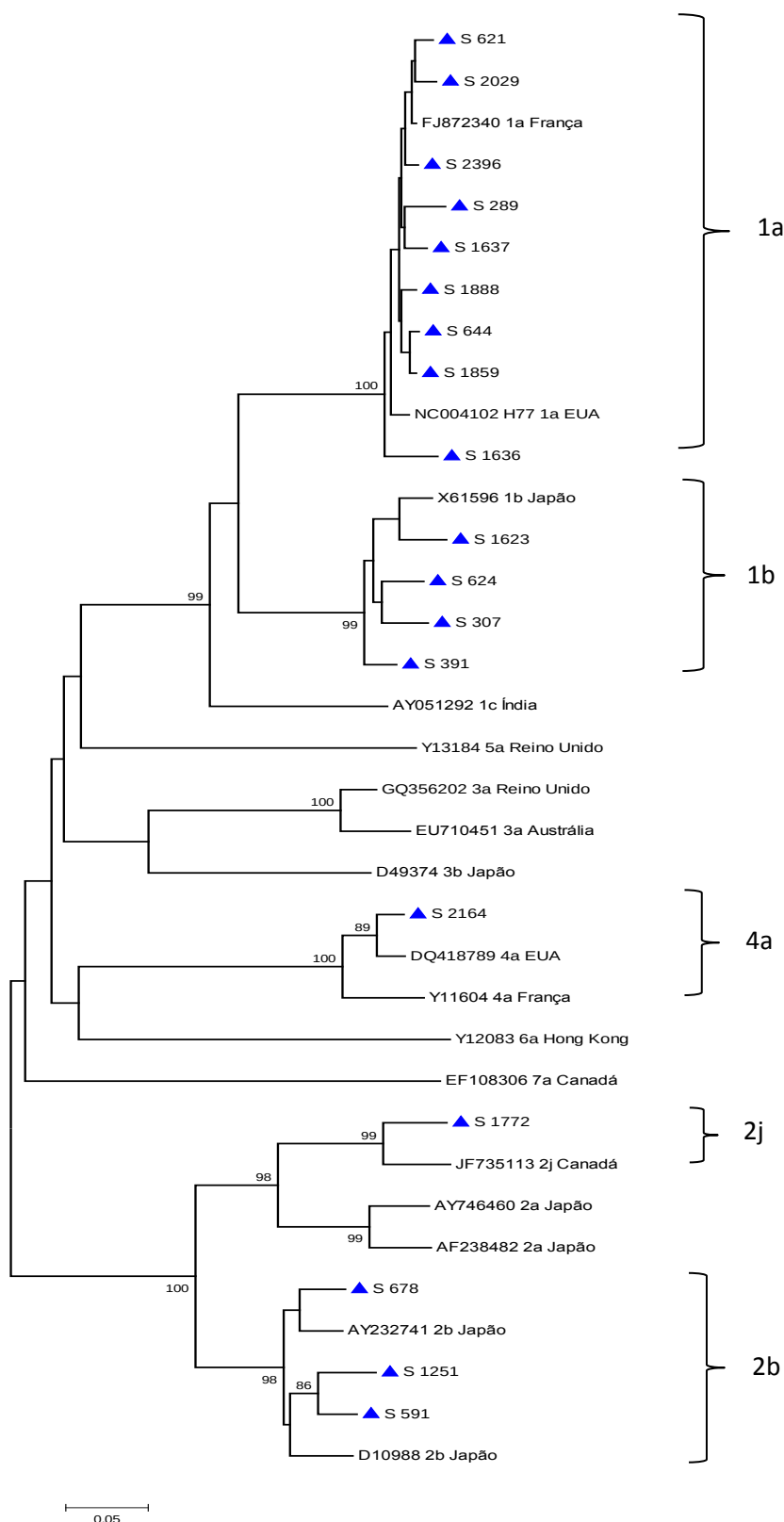


Figura 11 – Árvore filogenética da região NS5B do HCV, incluindo 18 sequências provenientes de portadores do vírus da hepatite C em Goiânia-GO, 17 sequências de referência para os genótipos de 1 a 7 e seus principais subtipos obtidas do GenBank.

Dos 312 portadores do HCV que relataram transfusão antes de 1994, a maioria (66,1%) foi infectada com o subtipo 1b. Por outro lado, dos 200 indivíduos que informaram o uso de drogas injetáveis (incluindo 87 injetáveis e 113 injetáveis/não injetáveis), 149 (74,5%) eram portadores do subtipo 1a (Figura 12).

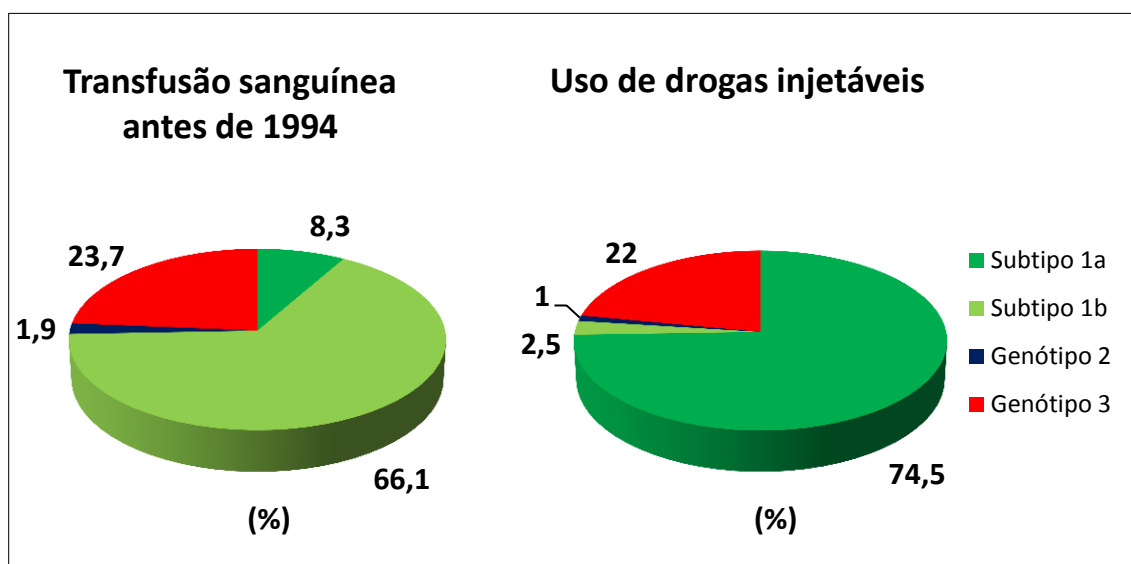


Figura 12 – Distribuição dos genótipos/subtipos do HCV, considerando o relato do uso de drogas injetáveis e transfusão de sangue antes de 1994, em portadores do vírus da hepatite C em Goiânia, Goiás.

5.5. Avaliação do Polimorfismo Relacionado ao Gene *IL28B* e Resposta ao Tratamento para Hepatite C

5.5.1. Características Relacionadas ao HCV e ao Hospedeiro

A Tabela 3 apresenta as características virológicas e dos 101 portadores do genótipo 1 do HCV selecionados para avaliação do polimorfismo relacionado ao gene *IL28B* e da resposta ao tratamento para hepatite C em Goiânia, Goiás. A média de idade foi de 48,2 anos (variação de 11 a 67 anos), sendo 55 (54,5%) do sexo masculino e 46 (45,5%) do feminino. Quanto à raça, 62,4% se autodeclararam pardos, 30,7% brancos e 6,9% pretos.

Os indivíduos relataram uma ou mais características de risco relacionadas à transmissão parenteral do HCV, tais como: cirurgia (87,1%), tratamento odontológico com profissional não graduado (42,6%), transfusão sanguínea antes de 1994 (36,6%), uso de drogas ilícitas não injetáveis (27,7%), tatuagem/*piercing* (25,7%), uso de drogas ilícitas injetáveis (15,8%), dentre outros. Ainda, vários pacientes informaram características relacionadas à transmissão sexual, incluindo múltiplos parceiros sexuais ao longo da vida (71,7%), uso de preservativo de forma irregular ou não uso (71,7%) e história de DST (40,4%).

Mais da metade (55,4%) dos indivíduos estudados possuíam IMC considerado acima do peso. A intensidade de fibrose hepática foi leve/moderada (Metavir = F0-F2) em 50,5% dos pacientes, e acentuada (Metavir = F3-F4) em 25,7%. A maioria (79%) dos pacientes apresentou carga viral do HCV elevada (≥ 600.000 UI/mL), sendo a média de $2,2 \times 10^6$ UI/mL (variação $2,9 \times 10^5 - 2,1 \times 10^7$ UI/mL). O subtipo 1a foi identificado em 53,5% dos pacientes, seguido de 1b em 46,5%. Em relação ao tratamento para hepatite C, a maioria dos pacientes (73,3%) era virgem (*naïve*).

Tabela 3 – Características virológicas e dos 101 portadores do genótipo 1 do HCV selecionados para avaliação do polimorfismo relacionado ao gene *IL28B* e resposta ao tratamento para hepatite C em Goiânia, Goiás

Características	
Idade (anos)	
Média ± dp (variação)	48,2 ± 10,6 (11–67)
Sexo (%)	
Masculino	54,5%
Feminino	45,5%
Raça (%)	
Branca	30,7%
Preta	6,9%
Parda	62,4%
Características de risco (%)	
Cirurgia	87,1%
Tratamento odontológico com profissional não graduado	42,6%
Transfusão sanguínea antes de 1994	36,6%
Uso de drogas ilícitas não injetáveis	27,7%
Tatuagem/ <i>piercing</i>	25,7%
Uso de drogas ilícitas injetáveis	15,8%
Acupuntura	5,9%
Hemodiálise	3,0%
Múltiplos parceiros sexuais (≥5)*	71,7%
Uso irregular ou não uso de preservativo*	71,7%
DST (doença sexualmente transmissível)*	40,4%
Relação com parceiro do mesmo sexo*	5,1%
IMC** (%)	
Abaixo do peso (<18,5)	2,0%
Peso normal (18,5-24,9)	42,6%
Acima do peso (≥25)	55,4%
Fibrose (Metavir) (%)	
F0-F2	50,5%
F3-F4	25,7%
Sem informação	23,8%
Carga viral do HCV (UI/mL)	
Média (variação)	2,2 x 10 ⁶ (2,9 x 10 ⁵ – 2,1 x 10 ⁷)
< 600.000 (%)	21%
≥ 600.000 (%)	79%
Subtipos do HCV (%)	
1a	53,5%
1b	46,5%
Tratamento prévio para hepatite C (%)	
Sim	26,7%
Não	73,3%

dp: Desvio padrão * Foram considerados indivíduos acima de 16 anos que relataram atividade sexual (n = 99).

** Segundo OMS (http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html).

Ao realizar a genotipagem para o polimorfismo próximo ao gene *IL28B* (rs12979860) (Figura 13), observou-se que o genótipo TC foi o mais frequente (57,4%), seguido por CC (23,8%) e TT (18,8%).

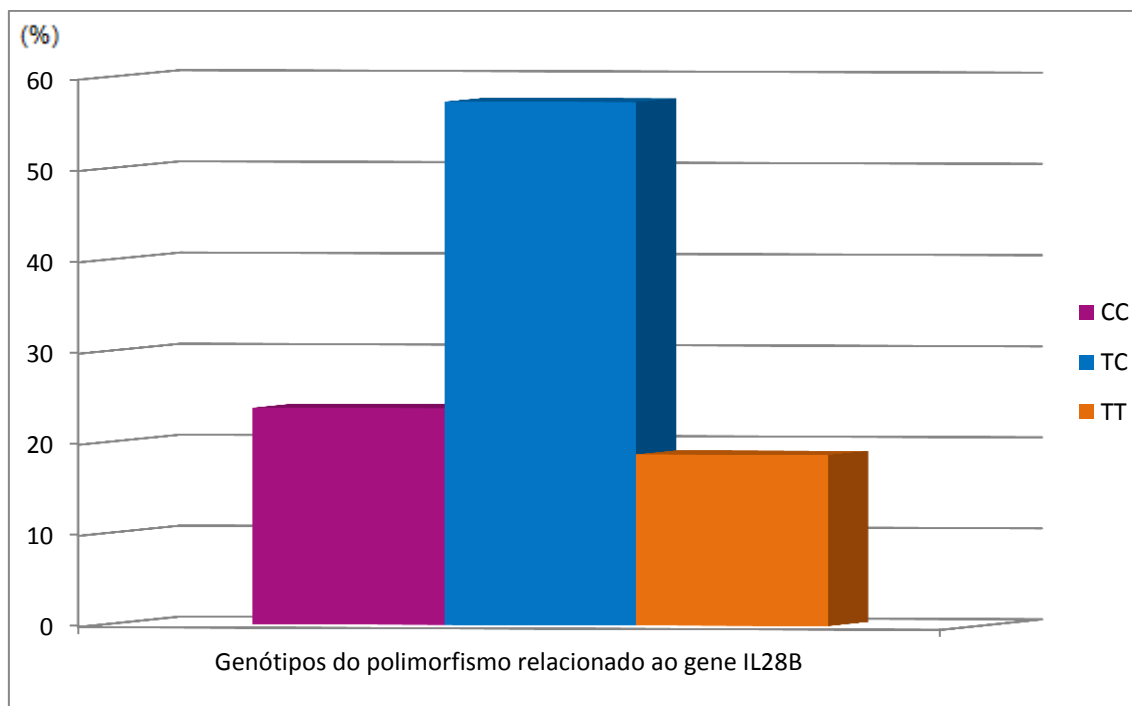


Figura 13 – Distribuição genotípica pela análise do polimorfismo próximo ao gene *IL28B* (rs12979860) em 101 portadores do genótipo 1 do HCV selecionados para avaliação da resposta ao tratamento para hepatite C em Goiânia, Goiás

5.5.2. Avaliação da Resposta ao Tratamento da Hepatite C

Dentre os 101 pacientes infectados com o genótipo 1 do HCV avaliados após o tratamento com PEG IFN e RBV, 28,7% (n = 29) apresentaram RVS e 71,3% (n = 72) foram não respondedores (Figura 14). A taxa de RVS foi de 32,4% nos pacientes virgens de tratamento (*naïve*) e de 18,5% naqueles com tratamento prévio para hepatite C.

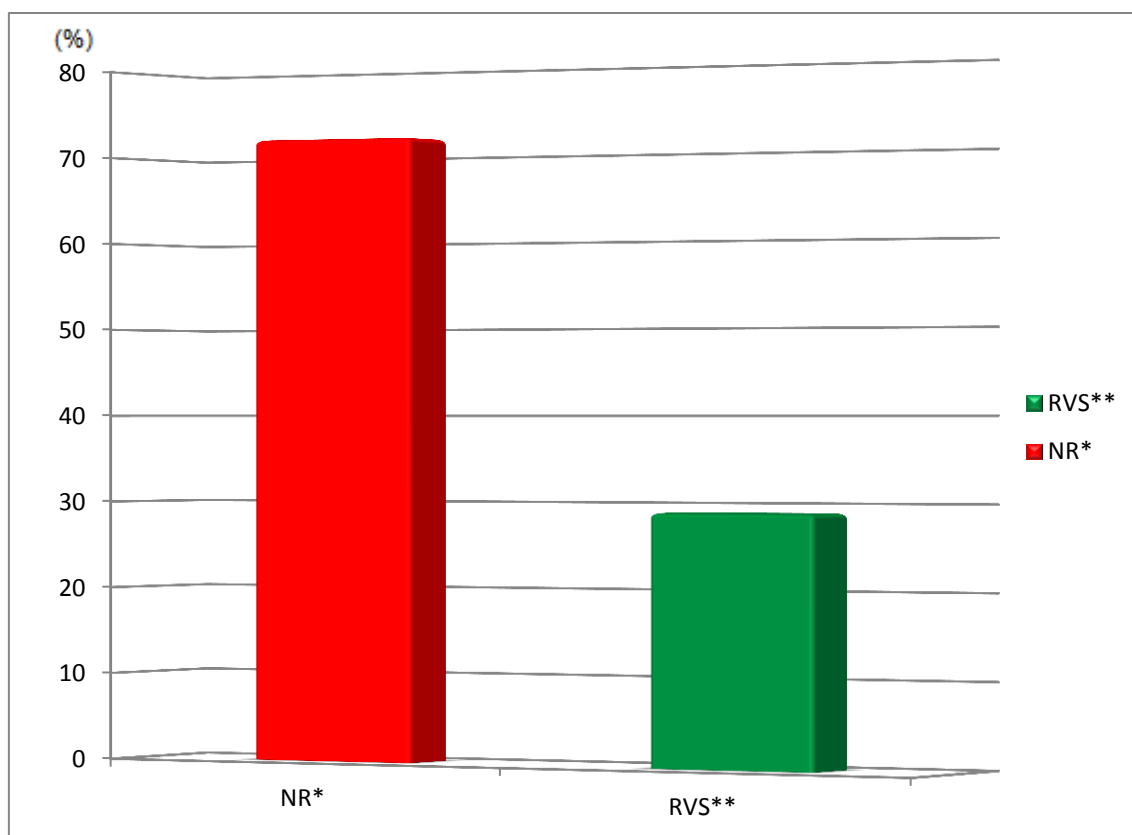


Figura 14 – Resposta após o tratamento para hepatite C em 101 pacientes infectados com o genótipo 1 do HCV em Goiânia, Goiás

* Não respondedores

** Resposta virológica sustentada

A distribuição dos genótipos pela análise do polimorfismo relacionado ao gene *IL28B* (rs12979860) por tipo de resposta ao tratamento para hepatite C em 101 portadores do genótipo 1 do HCV em Goiânia, Goiás, é apresentada na Figura 15. Em relação aos pacientes com o genótipo CC, 54,2% (13/24) apresentaram RVS e 45,8% (11/24) foram NR. Por outro lado, dentre aqueles com genótipo TT, apenas 15,8% (3/19) atingiram RVS e 84,2% (16/19) foram NR. Quanto ao genótipo TC, índices intermediários de RVS (22,4%; 13/58) e de não resposta (77,6%; 45/58) ao tratamento para hepatite C foram encontrados. Assim sendo, a taxa de RVS para o genótipo CC foi maior em relação às observadas para TC e TT ($\chi^2 = 10,27$; $p = 0,00$).

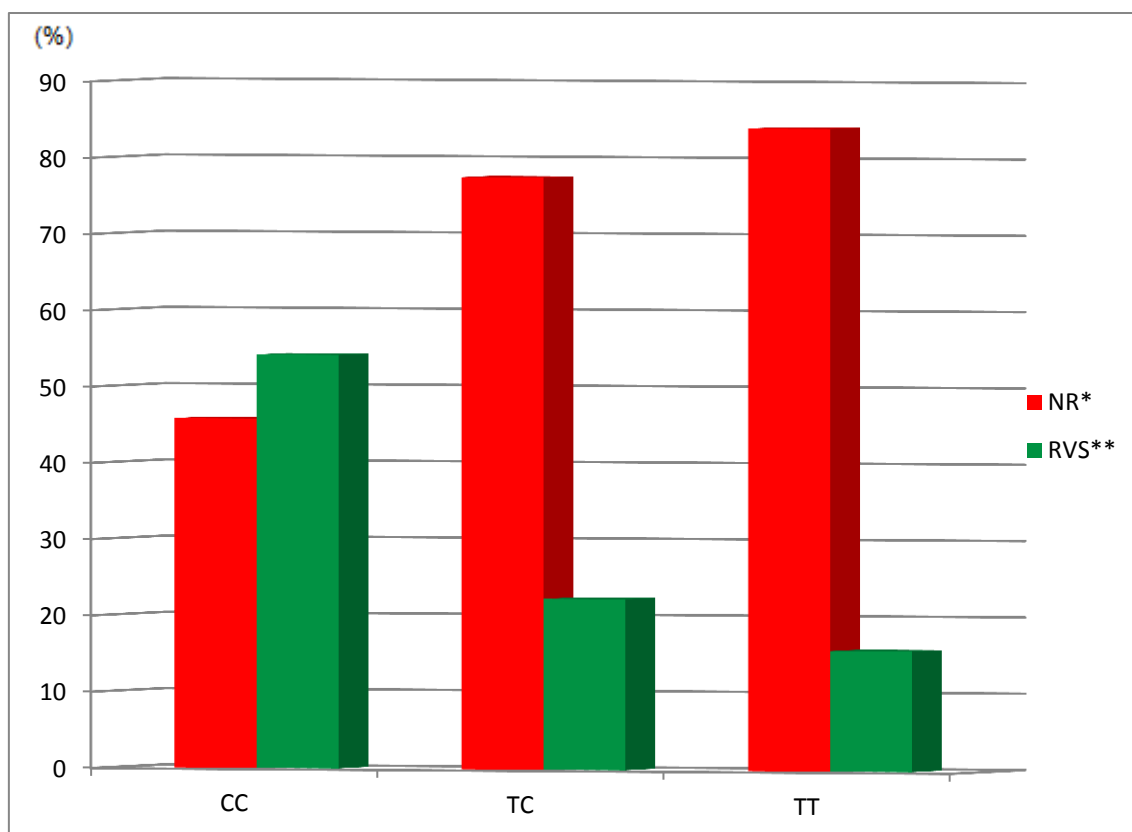


Figura 15 – Distribuição dos genótipos pela análise do polimorfismo relacionado ao gene *IL28B* por tipo de resposta ao tratamento para hepatite C em 101 portadores do genótipo 1 do HCV em Goiânia, Goiás

* Não respondedores

** Resposta virológica sustentada

6. DISCUSSÃO

A partir da identificação dos genótipos do HCV em um laboratório de referência na cidade de Goiânia-Goiás, portadores do genótipo 1 foram selecionados para análise do polimorfismo genético próximo ao gene *IL28B*, relacionando-o à resposta ao tratamento para hepatite C. No Brasil, poucos estudos foram realizados sobre o tema em questão (Araujo *et al.* 2011, Cavalcante *et al.* 2012, Ferreira *et al.* 2012, Moreira *et al.* 2012, Ramos *et al.* 2012, Garcia *et al.* 2013, Grandi *et al.* 2013) e, para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo na Região Centro-Oeste que investiga o SNP rs12979860 C/T em pacientes submetidos ao tratamento da hepatite C. Assim, os resultados apresentados podem contribuir para acompanhamento e manejo clínico dos pacientes infectados com o genótipo 1 do HCV.

6.1. Pacientes RNA-HCV Positivos

Ao analisar o perfil sociodemográfico dos 894 pacientes RNA-HCV positivos, verificou-se que características como idade, sexo, escolaridade e renda familiar foram semelhantes às observadas em outros estudos sobre a infecção pelo HCV no Brasil, que mostraram frequências maiores de indivíduos adultos (Souto *et al.* 1999, 2001, Ivantes *et al.* 2010, Reis *et al.* 2011), do sexo masculino (Mussi *et al.* 2007, Oliveira-Filho *et al.* 2010a, 2010b, Reis *et al.* 2011, Paraboni *et al.* 2012, Rodrigues Neto *et al.* 2012) e de nível baixo a médio de escolaridade e de renda familiar (Lopes *et al.* 2009), dentre os indivíduos infectados por esse vírus. Os casos notificados de hepatite C no SINAN entre 1999 e 2011 foram também concordantes aos deste estudo em relação à predominância de indivíduos adultos, do sexo masculino e de nível baixo a médio de escolaridade (Ministério da Saúde 2012b).

Tendo em vista que o HCV é transmitido, principalmente, pela via parenteral (Shepard *et al.* 2005, Alter 2007, 2012, Lavanchy 2011), vale ressaltar que, neste estudo, características de risco relacionadas à transmissão desse vírus por essa via, tais como: cirurgia, uso de drogas ilícitas, tratamento odontológico com profissional não graduado, transfusão sanguínea antes de 1994 e tatuagem foram relatadas em

frequências consideráveis pelos participantes. Semelhantemente, outras investigações realizadas no Brasil encontraram frequências substanciais de cirurgia (Souto *et al.* 1999, 2012, Lopes *et al.* 2009, Rodrigues Neto *et al.* 2012, Paraboni *et al.* 2012, Pereira *et al.* 2013), uso de drogas ilícitas (Rodrigues Neto *et al.* 2012, Souto *et al.* 2012, Barros *et al.* 2013, Pereira *et al.* 2013), tratamento odontológico com profissional não graduado (Paraná *et al.* 2007), transfusão sanguínea antes de 1994 (Carneiro *et al.* 2007, Botelho *et al.* 2008, Freitas *et al.* 2008) e tatuagem (Mussi *et al.* 2007, Rodrigues Neto *et al.* 2012, Oliveira-Filho *et al.* 2013), ao considerar os infectados com o HCV. Procedimentos como cirurgia, tratamento odontológico e tatuagem, quando não seguem as normas de controle de infecção e de biossegurança, podem propiciar a disseminação do HCV (Shepard *et al.* 2005, Alter 2007, 2012, Lavanchy 2011). A transmissão desse vírus por transfusão sanguínea tem sido reportada, principalmente, antes da implantação da triagem para anti-HCV nos bancos de sangue, o que no Brasil se deu em novembro de 1993 (Ministério da Saúde 1993). O uso de drogas ilícitas é um dos principais mecanismos de transmissão do HCV, tanto pelo compartilhamento de seringas/agulhas, quanto de outros instrumentos usados durante o consumo dessas drogas (Rodés & Tapias 2000, Shepard *et al.* 2005, Alter 2007, 2012). Ainda, relatos de múltiplos parceiros sexuais e história de DST foram observados em frequências elevadas neste estudo. No entanto, a transmissão sexual do HCV é considerada como de baixa eficiência (Shepard *et al.* 2005, Alter 2007, 2012, Cavaleiro 2007, Tohme & Holmberg 2010).

Sabe-se que a distribuição dos genótipos do HCV varia de acordo com a localização geográfica, e o monitoramento desta distribuição é importante na definição de tendências epidemiológicas da infecção sobre introdução de novos genótipos e expansão geográfica do vírus em rotas de transmissão recentes (Simmonds *et al.* 2005, Lavanchy 2011, Torres 2012). Após genotipagem das 894 amostras RNA-HCV positivas, foram identificados os genótipos 1 (76,3%), 2 (1,9%), 3 (21,6%) e 4 (0,2%). Estes dados mostram o predomínio do genótipo 1, seguido do 3, e corroboram os resultados de outros estudos realizados em Goiás, incluindo populações como pacientes com doenças reumáticas, hemodialisados, transplantados renais, indivíduos coinfectados com HIV, pacientes com tuberculose e reeducandas (Barbosa *et al.* 2005, Espírito-Santo *et al.* 2007, Botelho *et al.* 2008, Del Rios 2011, Reis *et al.* 2011, Barros

et al. 2013), além de hemofílicos e doadores de sangue, os quais revelaram o predomínio do genótipo 1, seguido do 3 e 2 (Barbosa *et al.* 2000, Martins *et al.* 2006). Diferentemente desses estudos, o genótipo 4 foi identificado na população estudada. Esse genótipo foi detectado também na Região Sudeste (Moreira *et al.* 2003, Campiotto *et al.* 2005, Arrais *et al.* 2008, Perone *et al.* 2008, Vigani *et al.* 2008, Grotto *et al.* 2011) e em Salvador (Zarife *et al.* 2006).

Essa distribuição genotípica, com predomínio do genótipo 1, seguido de 3, 2 e 4, foi semelhante às observadas em estudos multicêntricos conduzidos no Brasil (Campiotto *et al.* 2005, Lampe *et al.* 2013), tendo reflexo importante na determinação do esquema terapêutico para hepatite C (Le Guillou-Guillemette *et al.* 2007, Ministério da Saúde 2011). Assim, a presença do genótipo 1 na maioria dos pacientes estudados indica a necessidade de realização de tratamento com PEG IFN e RBV por um período mais longo, ou da combinação tripla (PEG IFN, RBV e inibidor de protease: TVR ou BVR), recentemente incorporada ao tratamento da hepatite C crônica no SUS (Ministério da Saúde 2012a, 2013a).

No presente estudo, os subtipos 1a e 1b foram frequentemente encontrados. Esses subtipos também foram prevalentes em outras investigações realizadas em Goiás, como em hemofílicos, pacientes com doenças reumáticas, doadores de sangue, hemodialisados, transplantados renais, indivíduos coinfectados com HIV, pacientes com tuberculose, reeducandas e catadores de materiais recicláveis (Barbosa *et al.* 2000, 2005, Martins *et al.* 2006, Espírito-Santo *et al.* 2007, Botelho *et al.* 2008, Del Rios 2011, Reis *et al.* 2011, Barros *et al.* 2013, Marinho *et al.* 2013a). Nesta investigação, os subtipos 2b, 2j e 4a foram identificados, embora em percentuais baixos. O subtipo 2b foi previamente citado em frequências baixas em Goiás (Barbosa *et al.* 2000, Martins *et al.* 2006) e nas capitais brasileiras (Pereira *et al.* 2013). De forma semelhante, o subtipo 4a foi raramente detectado no Brasil (Moreira *et al.* 2003, Arrais *et al.* 2008, Grotto *et al.* 2011). Quanto ao subtipo 2j, não há relato de sua presença no País. No entanto, o mesmo foi encontrado na Venezuela, dentre os portadores do genótipo 2 (Sulbaran *et al.* 2010, Jaspe *et al.* 2012), e em um paciente residente no Canadá de origem africana (Egito) (Li *et al.* 2012b).

Uma limitação deste estudo foi a realização de genotipagem por sequenciamento da região NS5B do genoma viral apenas das amostras identificadas pelo LiPA como

1a/1b, 2 e 4. Justifica-se o sequenciamento das amostras subtipadas como 1a/1b, devido à importância de estabelecer corretamente a distribuição subtípica do genótipo 1, o de maior prevalência em nossa Região. Por outro lado, os genótipos 2 e 4 são raros e a caracterização por sequenciamento destes isolados ainda não havia sido realizada em Goiás. Apesar de várias tentativas, algumas destas amostras não foram amplificadas para a região NS5B. Embora não tenha sido realizado o sequenciamento das amostras caracterizadas como do genótipo 3 pelo LiPA, a maioria dos estudos conduzidos em Goiás mostraram a circulação do subtipo 3a (Martins *et al.* 2006, Espírito-Santo *et al.* 2007, Botelho *et al.* 2008, Lopes *et al.* 2009, Del Rios 2011, Reis *et al.* 2011, Barros *et al.* 2013). Ainda, vale ressaltar as dificuldades em relação à questão operacional e técnica envolvida no sequenciamento das amostras.

Como a distribuição dos genótipos e de subtipos do HCV está associada a rotas particulares de transmissão (Silini *et al.* 1995, Cochrane *et al.* 2002, Nakano *et al.* 2004, 2006, Pybus *et al.* 2005, Simmonds *et al.* 2005, Abergel *et al.* 2007, Antaki *et al.* 2010, Keskin *et al.* 2010, Mora *et al.* 2010, Lavanchy 2011, Torres 2012), no presente estudo, verificou-se que a maioria dos portadores do HCV que relataram o uso de drogas injetáveis e transfusão de sangue antes de 1994 foi infectada com os subtipos 1a (74,5%) e 1b (66,1%), respectivamente. Semelhantemente, alguns estudos realizados no Brasil observaram que o subtipo 1a é proveniente de infecções recentes com maiores taxas de transmissão pelo uso de drogas, enquanto o subtipo 1b é mais prevalente entre indivíduos com histórico de transfusão sanguínea (Nakano *et al.* 2004, Oliveira *et al.* 2009, Romano *et al.* 2010).

6.2. Portadores do Genótipo 1 do HCV Selecionados para Avaliação do Polimorfismo Relacionado ao Gene *IL28B* e Resposta ao Tratamento para Hepatite C

Ao analisar as características dos 101 portadores do genótipo 1 do HCV selecionados para avaliação do polimorfismo relacionado ao gene *IL28B* versus resposta ao tratamento para hepatite C, a média de idade de 48,2 anos (dp 10,6) foi próxima às observadas por Ramos *et al.* (2012), Garcia *et al.* (2013) e Grandi *et al.* (2013) (53, 55,5

e 50,4 anos) em estudos similares no Brasil. A maior frequência do sexo masculino em relação ao feminino foi semelhantemente relatada por esses autores, bem como por outros que também avaliaram o polimorfismo próximo ao gene *IL28B* (Araujo *et al.* 2011, Cavalcante *et al.* 2012, Ferreira *et al.* 2012, Ramos *et al.* 2012, Garcia *et al.* 2013, Grandi *et al.* 2013). Em relação à raça, 62,4% se autodeclararam pardos, seguidos por 30,7% brancos. Taxas diferentes das encontradas por Garcia *et al.* (2013) (19,2% e 75,7%, respectivamente), bem como pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, no censo realizado em 2010 (43,1% e 47,7%, respectivamente) (IBGE 2010).

Mais da metade dos pacientes estudados possuíam IMC acima do peso, resultando em uma média de 25,6 Kg/m² (dado não mostrado), sendo semelhante à verificada em um estudo realizado no Rio de Janeiro-RJ (26) (Ramos *et al.* 2012). Em relação à intensidade de fibrose hepática, 50,5% (IC 95%: 40,4-60,5) dos pacientes apresentaram Metavir F0-F2 (leve/moderada), o que é concordante com o resultado mostrado em um estudo multicêntrico (Joinville-SC, Rio de Janeiro-RJ, Pelotas-RS, Porto Alegre-RS e São Luis-MA) (F0-F2: 54,9%; IC 95%: 46,4-63,1) (Garcia *et al.* 2013).

As características de risco relatadas por este grupo de pacientes corroboram às observadas nos 894 portadores do HCV estudados, assim como em outras investigações conduzidas no Brasil (Souto *et al.* 1999, 2012, Carneiro *et al.* 2007, Mussi *et al.* 2007, Paraná *et al.* 2007, Botelho *et al.* 2008, Freitas *et al.* 2008, Lopes *et al.* 2009, Rodrigues Neto *et al.* 2012, Oliveira-Filho *et al.* 2013, Pereira *et al.* 2013).

Em relação às características virológicas, a carga viral elevada (igual ou superior a 600.000 UI/mL), presente na maioria dos casos (79%), foi também observada por Grandi *et al.* (2013) (78,2%) e Garcia *et al.* (2013) (51,5%), em pacientes cronicamente infectados com o genótipo 1. As frequências dos subtipos 1a e 1b refletem a circulação dos mesmos em Goiás, onde esses subtipos são prevalentes (Barbosa *et al.* 2000, 2005, Martins *et al.* 2006, Espírito-Santo *et al.* 2007, Botelho *et al.* 2008, Del Rios 2011, Reis *et al.* 2011, Barros *et al.* 2013, Marinho *et al.* 2013a).

Ao proceder a genotipagem por RFLP rs12979860 C/T, a maior frequência do genótipo TC (57,4%), seguido por CC (23,8%) e TT (18,8%), foi semelhante à distribuição encontrada por Ramos *et al.* (2012) (TC = 44%, CC = 32% e TT = 24%) e Garcia *et al.* (2013) (TC = 44,9%, CC = 30,3% e TT = 24,8%). O genótipo TC também

foi o mais frequente, porém seguido por TT e CC nos estudos realizados por Cavalcante *et al.* (2012) (TC = 53,1%, TT = 25,2% e CC = 21,7%) e Grandi *et al.* (2013) (TC = 48,7%, TT = 36,9% e CC = 14,4%).

Ao avaliar a resposta ao tratamento da hepatite C nos pacientes estudados, notou-se que 28,7% (IC 95%: 20,4-38,7) obtiveram RVS. Índice semelhante aos apresentados por Azevedo *et al.* (2012) (27,8%; IC 95%: 19,1-38,4), Ferreira *et al.* (2012) (25%; IC 95%: 9,7-44,0), Araujo *et al.* (2011) (15,4%; IC 95%: 2,7-46,3), Cavalcante *et al.* (2012) (36,1%; IC 95%: 28,9-44,0) e Garcia *et al.* (2013) (39%; IC 95%: 30,3-46,7), em pacientes brasileiros infectados pelo genótipo 1 do HCV. Ao considerar apenas os pacientes virgens de tratamento (*naïve*), a taxa de RVS de 32,4% (IC 95%: 22,3-44,4) foi semelhante às mostradas por Ramos *et al.* (2012) (38%; IC 95%: 26,5-50,7) e Grandi *et al.* (2013) (43,3%; IC 95%: 37,3-49,6).

A taxa de RVS de 54,2% nos portadores do genótipo CC foi maior em relação às encontradas nos pacientes com os genótipos TC e TT (22,4% e 15,8%, respectivamente) ($\chi^2 = 10,27$; $p = 0,00$). Assim, os pacientes do genótipo CC têm maior probabilidade de atingirem RVS do que aqueles com genótipo TC e, principalmente, TT. Estes resultados são concordantes com os demais estudos brasileiros que avaliaram o SNP rs12979860 C/T *versus* resposta ao tratamento em pacientes infectados com o genótipo 1 do HCV (Araujo *et al.* 2011, Cavalcante *et al.* 2012, Ferreira *et al.* 2012, Ramos *et al.* 2012, Garcia *et al.* 2013, Grandi *et al.* 2013).

Considerando as investigações realizadas em outros países, taxas maiores de RVS foram observadas para o genótipo CC em relação ao CT e, principalmente, ao TT (Ge *et al.* 2009, McCarthy *et al.* 2010, Thompson *et al.* 2010, Kobayashi *et al.* 2012). Vale a pena ressaltar que a frequência do alelo C pode sofrer variações nos diferentes grupos étnicos e, assim, influenciar as taxas de RVS em populações distintas. Como o genótipo CC é mais frequente em indivíduos de ancestralidade européia, esse achado pode explicar os índices de resposta mais elevados nos europeus em relação aos africanos, embora taxas maiores têm sido documentadas em pacientes do leste asiático (Ge *et al.* 2009, McCarthy *et al.* 2010, Montes-Cano *et al.* 2010, Thompson *et al.* 2010, Ridruejo *et al.* 2011, Venegas *et al.* 2011, Kobayashi *et al.* 2012).

Portanto, os resultados apresentados nos portadores do genótipo 1 do HCV aqui estudados, isto é, uma frequência elevada do genótipo TC (57,5%) e taxa baixa de RVS

(22,4%), indicam a necessidade de regime de tratamento mais prolongado com PEG IFN e RBV, ou baseado em terapias novas. Assim, busca-se a combinação tripla (PEG IFN, RBV e inibidor de protease: TVR ou BVR) recentemente incorporada ao tratamento dos pacientes cronicamente infectados com o genótipo 1 no Brasil (Ministério da Saúde 2012a, 2013a), ou ainda, a inclusão de antivirais mais potentes e com menos efeitos colaterais, como o Simeprevir e Sofosbuvir (Jacobson *et al.* 2013, Shiffman *et al.* 2013, 2014, Asselah *et al.* 2014, Schinazi *et al.* 2014).

Por fim, os resultados dessa dissertação, como os de outros estudos conduzidos em nossa região e no País, mostram a predominância do genótipo 1 do HCV. Os achados indicam que a análise do SNP rs12979860 C/T é importante preditor de RVS ao tratamento com IFN e RBV em pacientes infectados com esse genótipo em nossa região. Espera-se que estes resultados contribuam na avaliação/acompanhamento desses pacientes na busca do sucesso terapêutico e, conseqüentemente, melhor qualidade de vida dos mesmos.

7. CONCLUSÕES

- O genótipo 1 foi predominante, seguido do 3 e 2 em pacientes atendidos em laboratório de referência em Goiânia-GO, o que corrobora os achados de outras investigações realizadas em nossa região. Adicionalmente, o genótipo 4 foi encontrado neste estudo;
- Ao realizar a genotipagem para o polimorfismo próximo ao gene *IL28B* (SNP rs12979860 C/T), o genótipo TC foi o mais frequente (57,4%), seguido por CC (23,8%) e TT (18,8%);
- Após o tratamento com PEG IFN e RBV, 28,7% dos pacientes infectados com o genótipo 1 apresentaram RVS. Esta taxa foi superior nos portadores do genótipo CC (54,2%) em relação às encontradas nos pacientes com os genótipos TC e TT (22,4% e 15,8%, respectivamente).

8. REFERÊNCIAS

- Abergel A, Ughetto S, Dubost S, Bonny C, Aublet-Cuvelier B, Delarocque-Astagneau E, Bailly JL, Bommelaer G, Casanova S, Delteil J, Deny P, Laurichesse H, Odent-Malaure H, Roussel J, Peigue-Lafeuille H, Henquell C 2007. The epidemiology and virology of hepatitis C virus genotype 5 in central France. *Aliment Pharmacol Ther* 26(10): 1437–1446.
- Afzal S, Idrees M, Ali M, Ilyas M, Hussain A, Akram M, Butt S, Saleem S, Rehman IU, Ali L, Shahid M 2011. Envelope 2 protein phosphorylation sites S75 & 277 of hepatitis C virus genotype 1a and interferon resistance: a sequence alignment approach. *Virol J* 8(71): 2-6.
- Ahmad W, Ijaz B, Gull S, Asad S, Khaliq S, Jahan S, Sarwar MT, Kausar H, Sumrin A, Shahid I, Hassan S 2011. A brief review on molecular, genetic and imaging techniques for HCV fibrosis evaluation. *Virol J* 8(53): 1-16.
- Al Naamani K, Al Sinani S, Deschênes M 2013. Epidemiology and treatment of hepatitis C genotypes 5 and 6. *Can J Gastroenterol*.27(1): e8-e12.
- Albeldawi M, Ruiz-Rodriguez E, Carey WD 2010. Hepatitis C virus: Prevention, screening, and interpretation of assays. *Cleve Clin J Med* 77(9): 616-626.
- Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, Kuo G 1989. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 321(22): 1494-1500.
- Alter MJ 2007. Epidemiology of viral hepatitis C infection. *J Gastroenterol* 13(17): 2436-2441.

- Alter MJ 2012. HCV Routes of transmission: what goes around comes around. *Semin Liver Dis* 31(4): 340-346.
- Antaki N, Craxi A, Kamal S, Moucari R, Van der Merwe S, Haffar S, Gadano A, Zein N, Lai CL, Pawlotsky JM, Heathcote EJ, Dusheiko G, Marcellin P 2010. The neglected hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6: an international consensus report. *Liver Int* 30(3): 342-355.
- Araujo ES, Dahari H, Cotler SJ, Layden TJ, Neumann AU, Melo CE, Barone AA 2011. Pharmacodynamics of PEG-IFN alpha-2a and HCV response as a function of IL28B polymorphism in HIV/HCV co-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 56(2): 95-99.
- Arrais TC, Van Dooren S, Vandamme AM, Brechot C, Rimlinger F, Silva AE, Perez RM, Ferraz ML, Thiers V 2008. Change in hepatitis C virus genotype in hemodialysis patients after end-of-treatment response to interferon monotherapy-relapse or re-infection? *J Med Virol*. 80(1): 80-86.
- Asselah T, Bieche I, Paradis V, Bedossa P, Vidaud M, Marcellin P 2007. Genetics,genomics, and proteomics: implications for the diagnosis and the treatment of chronic hepatitis C. *Semin Liver Dis* 27(1): 13-27.
- Asselah T, Estrabaud E, Bieche I, Lapalus M, De Muynck S, Vidaud M, Saadoun D, Soumelis V, Marcellin P 2010. Hepatitis C: viral and host factors associated with non-response to pegylated interferon plus ribavirin. *Liver Int* 30(9): 1259-1269.
- Asselah T, Marcellin P 2014. Second-wave IFN-based triple therapy for HCV genotype 1 infection: simeprevir, faldaprevir and sofosbuvir. *Liver Int*. 34(1): 60-68.
- Azevedo FK, Azevedo CC, Souto FJ 2012. Assessment of the treatment of chronic hepatitis C in the state of Mato Grosso, central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107 (2): 217-223.

- Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP, Poleschuk VF 1983. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via fecal-oral route. *Interviol* 20: 23-31.
- Barbosa AP, Martins RMB, Oliveira JM, Vanderborght B, Yoshida CFT 2000. Genotype analysis of hepatitis C virus in Brazilian hemophiliacs and blood donors. *Vox Sang* 78: 255.
- Barbosa AP, Martins RMB, Teles SA, Silva SA, Oliveira JM, Yoshida CFT 2002. Prevalence of hepatitis C virus infection among hemophiliacs in Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97(5): 643-644.
- Barbosa VS, Silva NA, Martins RMB 2005. Hepatitis C virus seroprevalence and genotypes in patients with diffuse connective tissue diseases and spondyloarthropathies. *Braz J Med Biol Res* 38: 801-805.
- Barros LAS, Pessoni GC, Teles SA, Souza SMB, Matos MA, Martins RMB, Del-Rios NHA, Matos MAD, Carneiro MAS 2013. Epidemiology of the viral hepatitis B and C in female prisoners of Metropolitan Regional Prison Complex in the State of Goiás, Central Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 46(1): 24-29.
- Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V, André P 2011. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol* 19(2): 95-103.
- Bezerra CA, Oliveira JS 2007. Comparação do interferon alfa convencional com o interferon alfa peguilado no tratamento de pacientes com hepatite C crônica. *ConScientiae Saúde* 6(1): 19-28.
- Blackard JT, Shata MT, Shire NJ, Sherman KE 2008. Acute hepatitis C vírus infection: a chronic problem *Hepatology* 47(1): 321-331.

- Botelho SM, Ferreira RC, Reis NRS, Kozlowski A, Carneiro MA, Teles SA, Yoshida CF 2008. Epidemiological aspects of hepatitis C virus infection among renal transplant recipients in Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103(5): 472-476.
- Bradshaw D, Matthews G, Danta M 2013. Sexually transmitted hepatitis C infection: the new epidemic in MSM? *Curr Opin Infect Dis.*26(1): 66-72.
- Branch AD, Stump DD, Gutierrez JA, Eng F, Walewski JL 2005. The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Semin Liver Dis* 25(1): 105-117.
- Brass V, Moradpour D, Blum HE 2006. Molecular virology of hepatitis C virus (HCV): 2006 Update. *Int J Med Sci* 3(2): 29-34.
- Brookes AJ 1999. The essence of the SNPs. *Gene*, 234(2): 177-186.
- Bruijne J, Buster EH, Gelderblom HC, Brouwer JT, de Knecht RJ, van Erpecum KJ, Schalm SW, Bakker CM, Zaaijer HL, Janssen HL, Reesink HW; Netherlands Association of Gastroenterologists and Hepatologists 2008. Treatment of chronic hepatitis C virus infection - Dutch national guidelines. *Neth J Med* 66 (7): 311-322.
- Buti M, Agarwal K, Horsmans Y, Sievert W, Janczewska E, Zeuzem S, Nyberg L, Brown RS Jr, Hezode C, Rizzetto M, Parana R, De Meyer S, De Masi R, Luo D, Bertelsen K, Witek J 2013. Telaprevir Twice Daily is Noninferior to Telaprevir Every 8 hrs for Patients with Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology* 5085(13): 1728-1729.
- Campiotto S, Pinho JRR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJD, Spinelli V, Pereira LMMB, Coelho HSM, Silva AO, Fonseca JC, Rosa H, Lancet CMC, Bernardin AP 2005. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res* 38: 41-49.

- Carneiro MAS, Martins RMB, Teles SA, Silva SA, Lopes CL, Cardoso DDP, Vanderborcht BOM, Yoshida CFT 2001. Hepatitis C prevalence and risk factors in hemodialysis patients in Central Brazil: A survey by polymerase chain reaction and serological methods. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 765-769.
- Carneiro MAS, Teles SA, Dias MA, Ferreira RC, Naghettine AV, Silva SA, Lampe E, Yoshida CF, Martins RMB 2005. Decline of hepatitis C infection in hemodialysis patients in Central Brazil: a ten years of surveillance. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100(4): 345-349.
- Carneiro MAS, Teles AS, Lampe E, Espírito-Santo MP, Gouveira-Oliveira R, Reis NRS, Yoshida CFT, Martins RMB 2007. Molecular and epidemiological study on nosocomial transmission of HCV in hemodialysis patients in Brazil. *J Med Virol* 79: 1325-1333.
- Cavalcante LN, Abe-Sandes K, Angelo AL, Machado TM, Lemaire DC, Mendes CM, Pinho JR, Malta F, Lyra LG, Lyra AC 2012. IL28B polymorphisms are markers of therapy response and are influenced by genetic ancestry in chronic hepatitis C patients from an admixed population. *Liver Internacional* 32(3): 476-486.
- Cavalheiro NP 2007. Sexual transmission of hepatitis C. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 49(5): 271-277.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2011. Sexual transmission of hepatitis C virus among HIV-infected men who have sex with men - New York City, 2005-2010. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report* 22;60(28): 945-950.
- Chandler DE, Penin F, Schulten K, Chipot C 2012. The p7 protein of hepatitis C virus forms structurally plastic, minimalist ion channels. *PLoS Comput Biology* 8(9): 1-10.

- Chayama K, Hayes CN 2011. Hepatitis C virus: How genetic variability affects pathobiology of disease. *J Gastroenterol Hepatol* 26(Suppl 1): 83-95.
- Chayama K , Hayes CN , Ohishi W , Y Kawakami 2012. Treatment of chronic hepatitis virus infection in Japan: update on therapy and guidelines. *J Gastroent.* 48(1): 1-12.
- Chen SL, Morgan TR 2006. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci* 3(2): 47-52.
- Chevaliez S, Pawlotsky JM 2006. Hepatitis C virus serologic and virologic tests and clinical diagnosis of HCV-related liver disease. *Int J Med Sci* 3(2): 35-40.
- Chevaliez S, Pawlotsky JM 2007. Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 13(17): 2461-2466.
- Chevaliez S 2011. Virological tools to diagnose and monitor hepatitis C virus infection. *Clin Microbiol Infect* 17(2): 116-121.
- Chevaliez S 2012a. Virology of hepatitis C virus infection. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 26(4): 381–389.
- Chevaliez S 2012b. New virologic tools for management of chronic hepatitis B and C. *Gastroenterology* 142(6): 1303–1313.
- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A non-B viral hepatitis genome. *Science* 244: 359-362.
- Clarke B 1997. Molecular virology of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 78: 2397-2410.

- Cochrane A, Searle B, Hardie A, Robertson R, Delahooke T, Cameron S, Tedder RS, Dusheiko GM, Lamballerie X, Simmonds P 2002. A genetic analysis of hepatitis C virus transmission between injection drug users. *J Infect Dis.*186(9): 1212-1221.
- Cook GA, Stefer S, Opella SJ 2011. Expression and purification of the membrane protein p7 from hepatitis C virus. *Biopolymers* 96(1): 32-40.
- Costa Z, Machado GC, Avelino MM, Gomes Filho C, Macedo Filho JV, Minuzzi AL, Turchi MD, Stefani MMA, Souza WV, Martelli CMT 2009. Prevalence and risk factors for Hepatitis C and HIV-1 infections among pregnant women in Central Brazil. *BMC Infect Dis* 9(116): 1-9.
- Dane DS, Cameron CH, Briggs M 1970. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated. *Lancet* 1(7649): 695-698.
- Del Rios NH 2011. Estudo Epidemiológico e Molecular da Infecção pelo Vírus da Hepatite C em Indivíduos Infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana em Goiânia-Goiás. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical; Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, 73p.
- Deuffic-Burban S, Delarocque-Astagneau E, Abiteboul D, Bouvet E, Yazdanpanah Y 2011. Blood-borne viruses in health care workers: prevention and management. *J Clin Virol* 52(1): 4-10.
- Dienstag JL, McHutchison JG 2006. American Gastroenterological Association technical review on the management of hepatitis C. *Gastroenterol* 130 (1): 231-264.
- Dubuisson J 2007. Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol* 13(17): 2406-2415.

- Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Izumi N, Marumo F, Sato C 1995. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis-C virus 1b - Sensitivity to interferon is conferred by amino-acid substitutions in the Ns5a region. *J. Clin. Invest.* 96: 224–230.
- Enomoto N, Maekawa S 2010. HCV genetic elements determining the early response to peginterferon and ribavirin therapy. *Intervirology* 53(1): 66-69.
- Erensoy S 2001. Diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection and laboratory monitoring of its therapy. *J Clin Virol* 21: 271-281.
- Espírito-Santo MP, Carneiro MAS, Reis NRS, Kozłowski AG, Teles SA, Lampe E, Yoshida CFT, Martins RMB 2007. Genotyping hepatitis C virus from hemodialysis patients in Central Brazil by line probe assay and sequence analysis. *Braz J Med Biol Res* 40: 545-550.
- Fabris C, Falletti E, Cussigh A, Bitetto D, Fontanini E, Bignulin S, Cmet S, Fornasiere E, Fumolo E, Fangazio S, Cerutti A, Minisini R, Pirisi M, Toniutto P 2011. IL-28B rs12979860 C/T allele distribution in patients with liver cirrhosis: role in the course of chronic viral hepatitis and the development of HCC. *J Hepatol* 54(4): 716-722.
- Fauvel C, Lepiller Q, Felmlee DJ, Fofana I, Habersetzer F, Stoll-Keller F, Baumert TF, Fafi-Kremer S 2013. Hepatitis C virus vaccines-progress and perspectives. *Microb Pathog.* 58: 66-72.
- Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH 1973. Hepatitis A: detection by immunoelectron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science* 182(116): 1026-1028.
- Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV 1975. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B 1975. *Rev Med Virol* 11: 3-8.

- Ferreira-Gonzalez A, Shiffman ML 2004. Use of diagnostic testing for managing hepatitis C virus infection. *Semin Liver Dis* 24(Suppl 2): S9-S17.
- Ferreira CT, Silveira TR 2004. Viral Hepatitis: epidemiological and preventive aspects. *Rev Bras Epidemiol* 7(4): 473-487.
- Ferreira PRA, Santos C, Côrtes R, Reis A, Tenore SB, Silva MH, Vilhena C, Diaz RS 2012. Association between IL28B gene polymorphisms and sustained virological response in patients coinfecting with HCV and HIV in Brazil. *J Antimicrob Chemothe.* 67(2): 509-510.
- França DDS 2011. Infecção pelo vírus da hepatite C em mulheres profissionais do sexo em Goiânia, Goiás. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Enfermagem) – Faculdade de Enfermagem da Universidade Federal de Goiás: 1-96.
- Freitas SZ, da Cunha RV, Martins RM, Teles SA, Ibanhes ML, Motta-Castro AR 2008. Prevalence, genotypes and risk factors associated with hepatitis C virus infection in hemodialysis patients in Campo Grande, MS, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103(4): 405-408.
- Friebe P, Lohmann V, Krieger N, Bartenschlager R 2001. Sequences in the 5'nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* 75(24): 12047-12057.
- Friebe P, Bartenschlager R 2002. Genetic analysis of sequences in the 3'nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol* 76(11): 5326-5338.
- Friebe P, Boudet J, Simorre JP, Bartenschlager R 2005. Kissing-Loop interaction in the 3'End of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *J Virol* 79(1): 380-392.

- Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçalves FL Jr, Häussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J 2002. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 347(13): 975-982.
- Fried MW, Hadziyannis SJ 2004. Treatment of chronic hepatitis infection with peginterferon plus ribavirin. *Semin Liver Dis* 24(Suppl.2): S45-S54.
- Friedrich-Rust M, Rosenberg W, Parkes J, Herrmann E, Zeuzem S, Sarrazin C 2010. Comparison of ELF, FibroTest and FibroScan for the non-invasive assessment of liver fibrosis. *BMC Gastroenterol* 10(103): 1-8.
- Gallego J & Varani G 2002. The hepatitis C virus internal ribosome-entry site: a new target for antiviral research. *Bioch Soc Trans* 30(2): 140-145.
- Garcia RF, Moreira S, Ramos ALA, Ferreira LE, Mattos AA, Tovo CV, Nader LA, Ramos JA, Rondinelli E, Dominici AJ, Garcia CE, Pinho MSL, Brandão-Mello CE, Villela-Nogueira CA, França PH 2013. Interleukin 28B-related polymorphisms: a pathway for understanding hepatitis C virus infection? *World J Gastroenterol* 19(42): 7399-7404.
- Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, Sulkowski M, McHutchison JG, Goldstein DB 2009. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 461(7262): 399-401.
- Geitmann M, Dahl G, Danielson UH 2011. Mechanistic and kinetic characterization of hepatitis C virus NS3 protein interactions with NS4A and protease inhibitors. *J Mol Recognit* 24(1): 60-70.

- Ginabreda MGP, Yoshida CFT, Niel C 1997. Genomic characterization of Brazilian hepatitis C virus genotypes 1a and 1b. *Braz J Med and Biol Res* 30: 339-345.
- Gouklani H, Beyer C, Drummer H , Gowans EJ , Netter HJ , Haqshenas G 2013. Identification of specific regions in hepatitis C virus core, NS2 and NS5A that genetically interact with p7 and co-ordinate infectious virus production. *Journal of Viral Hepatitis* 20(4): 66-71.
- Gouttenoire J, Penin F, Moradpour D 2010. Hepatitis C virus nonstructural protein 4B: a journey into unexplored territory. *Rev Med Virol* 20(2): 117-129.
- Grandi T, Silva CM, Amaral KM, Picon PD, Costi C, Fré NN, Fiegenbaum M, Niel C, Rossetti ML 2013. Response to treatment in Brazilian patients with chronic hepatitis C is associated with a single-nucleotide polymorphism near the interleukin-28B gene. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108(1): 48-53.
- Gretch DR 1997. Diagnostic tests for hepatitis C. *Hepatology* 26(Suppl.1): S43-S47.
- Grotto RM, Corvino SM, Padovani JL, Siqueira SM, Pardini MI 2011. HCV genotype 4 circulating in the city of Franca, São Paulo state, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 15(3): 300.
- Hanafiah KM , Groeger J , Flaxman AD , Wiersma ST 2012. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age-specific antibody to hepatitis C virus seroprevalence. *Hepatology* 2012(26141): 1-10.
- Heathcote EJ, Main J 2005. Treatment of hepatitis C. *J Viral Hepatitis* 12: 223-235.
- Helle F, Vieyres G, Elkrif L, Popescu CI, Wychowski C, Descamps V, Castelain S, Roingeard P, Duverlie G, Dubuisson J 2010. Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope proteins incorporated into infectious virions. *J Virol* 84(22): 11905-11915.

Hoofnagle JH 2002. Course and Outcome of Hepatitis C. *Hepatology* 36(5): 21-29.

IBGE 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Censo Demográfico 2010. Características gerais da população, religião e pessoas com deficiência. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Rio de Janeiro-RJ, Brasil: 1-215.

ICTV 2012. Hepatitis C virus. In: Virus Taxonomy: 2012 Release - The Universal Virus Database, version 2012. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2012>>. Acesso em: 03 de julho de 2013.

Indolfi G, Resti M 2009. Perinatal transmission of hepatitis C virus infection. *J Medical Virol* 81: 836-843.

Irshad M, Dhar I 2006. Hepatitis C virus core protein: an update on its molecular biology, cellular functions and clinical implications. *Med Princ Pract* 15: 405–416.

Ivantes CA, Silva D, Messias-Reason I 2010. High prevalence of hepatitis C associated with familial history of hepatitis in a small town of south Brazil: efficiency of the rapid test for epidemiological survey. *Braz J Infect Dis* 14(5): 483-488.

Jacobson IM, Sanford J, Medical College da Cornell University New York 2013. A special meeting review edition: advances in the treatment of hepatitis C virus infection from EASL. *Gastroenterol Hepatol* 9 (6): 1-18.

Jaspe RC, Sulbarán YF, Sulbarán MZ, Loureiro CL, Rangel HR, Pujol FH 2012. Prevalence of amino acid mutations in hepatitis C virus core and NS5B regions among Venezuelan viral isolates and comparison with worldwide isolates. *Virol J* 9(214): 1-7.

- Jiang Y, He B, Li NP, Ma J, Gong GZ, Zhang M 2011. The oncogenic role of NS5A of hepatitis C virus is mediated by up-regulation of survivin gene expression in the Hepatocellular cell through p53 and NF-KB pathways. *Cell Biol Int* 35(12): 1225-1232.
- Joyce MA, Tyrrell DLJ 2010. The cell biology of hepatitis C virus. *Microbes Infect* 12: 263-271.
- Kaito M, Ishida S, Tanaka H, Horiike S, Fujita N, Adachi Y, Kohara M, Konishi M, Watanabe S 2006. Morphology of hepatitis C and hepatitis B virus particles as detected by immunogold electron microscopy. *Med Mol Morphol* 39: 63-71.
- Kamili S, Drobeniuc J, Araujo AC, Hayden TM 2012. Laboratory diagnostics for hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* 55 (1): 43-48.
- Kato N 2001. Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama* 55(3): 133-159.
- Kershenobich D, Razavi HA, Sánchez-Avila JF, Bessone F, Coelho HS, Dagher L, Gonçalves FL, Quiroz JF, Rodriguez-Perez F, Rosado B, Wallace C, Negro F, Silva M 2011. Trends and projections of hepatitis C virus epidemiology in Latin America. *Liver Int (Suppl 2)*: 18-29.
- Keskın F, Çiftçi S, Türkoğlu S, Badur S 2010. Transmission routes of chronic hepatitis C and their relation to HCV genotypes. *Turk J Gastroenterol* 21(4): 396-400.
- Kew M, François G, Lavanchy D, Margolis H, Van Damme P, Grob P, Hallauer J, Shouval D, Leroux-Roels G, Meheus A; Viral Hepatitis Prevention Board 2004. Prevention of hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 11(3): 198-205.

- Khaliq S, Jahan S, Pervaiz A 2011. Sequence variability of HCV Core region: important predictors of HCV induced pathogenesis and viral production. *Infect Genet Evol* 11(3): 543-556.
- Kim JH, Psevdos Junior G, Suh J, Sharp VL 2008. Co-infection of hepatitis B and hepatitis C virus in human immunodeficiency virus-infected patients in New York City, United States. *World J Gastroenterol* 14(43): 6689-6693.
- Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, Gibo Y, Yoshizawa K, Nakano Y, Furuta S, Akahane Y, Nishioka K, Purcell RH 1990. Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology* 12: 671-675.
- Kobayashi M, Suzuki F, Akuta N, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kawamura Y, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Chayama K, Miyakawa Y, Kumada H 2012. Association of two polymorphisms of the IL28B gene with viral factors and treatment response in 1,518 patients infected with hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 47 (5): 596-605.
- Kuo G, Choo Q, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE, Tegtmeier GE, Bonino F, Colombo M, Lee WS, Kuo C, Berger K, Shuster JR, Overby Lr, Bradley DW, Houghton M 1989. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A non-B hepatitis. *Science* 244: 362-364.
- Lampe E, Lewis-Ximenez L, Espírito-Santo MP, Delvaux NM, Pereira SA, Peres-da-Silva A, Martins RMB, Soares MA, Santos AF, Vidal LL, Germano FN, de Martinez AM, Basso R, Pinho JR, Malta FM, Gomes-Gouvêa M, Moliterno RA, Bertolini DA, Fujishima MA, Bello G 2013. Genetic diversity of HCV in Brazil. *Antivir Ther* 18(3 Pt B): 435-444.

- Latt N, Alachkar N, Gurakar A 2012. Hepatitis C Virus and Its Renal Manifestations: A Review and Update. *Gastroenterol Hepatol* 8 (7): 434-445.
- Lauer, GM, Walker BD 2001. Hepatitis C virus infections. *N Engl J Med* 345: 41-52.
- Lavanchy D 2011. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect* 17(2): 107-115.
- Lavie M, Goffard A, Dubuisson J 2007. Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer. *Curr Issues Mol Biol* 9(2): 71-86.
- Lavillette D, Pecheur EI, Donot P, Fresquet J, Molle J, Corbau R, Dreux M, Penin F, Cosset FL 2007. Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus. *J. Virol* 81(16): 8752-8765.
- Le Guillou-Guillemette H, Vallet S, Gaudy-Graffin C, Payan C, Pivert A, Goudeau A, Lunel-Fabiani F 2007. Genetic diversity of the hepatitis C virus: impact and issues in the antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 13(17): 2416-2426.
- Levi JE, Takaoka DT, Garrini RH, Fachini RM, Focaccia R, Santos EB, Mitre HP, Mendonça JS, Cavaleiro NP, Barone AA, Wendel S 2002. Three cases of infection with hepatitis C virus genotype 5 among brazilian hepatitis patients. *J Clin Microbiol* 40(7): 2645-2647.
- Li H , Atkins E, Bruckner J, McArdle S, Qiu WC, Thomassen LV, Scott J, Shuhart MC, Livingston S, Townshend-Bulson L, McMahon BJ, Harris M, Griffin S, Gretch DR 2012a. Genetic and functional heterogeneity of the hepatitis C virus p7 ion channel during natural chronic infection. *Virology* 423(1): 30-37.
- Li C, Cao H, Lu L, Murphy D 2012b. Full-length sequences of 11 hepatitis C virus genotype 2 isolates representing five subtypes and six unclassified lineages with

- unique geographical distributions and genetic variation patterns. *J Gen Virol*. 93(6): 1173-1184.
- Liang TJ, Ghany MG 2013. Current and future therapies for hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 16;368(20): 1907-1917.
- Lloyd AR, Jagger E, Post JJ, Crooks LA, Rawlinson WD, Hahn YS, Ffrench RA 2007. Host and viral factors in the immunopathogenesis of primary hepatitis C virus infection. *Immunol Cell Biol* 85(1): 24-32.
- Lopes CLR, Martins RBM, Carneiro MAS, Teles SA, Maggi PS, Oliveira LA, Cardoso DDP, Yoshida CFT 2002. Soroprevalência da infecção pelo vírus da hepatite C em profissionais das unidades de hemodiálise de Goiânia. *Rev Pat Trop* 31(1): 129-133.
- Lopes CLR, Teles SA, Espírito-Santo MP, Lampe E, Rodrigues FP, Motta-Castro ARC, Marinho TA, Reis NR, Silva AMC, Martins RMB 2009. Prevalence, risk factors and genotypes of hepatitis C virus infection among drug users, Central-Western Brazil. *Rev Saude Publica* 43(Suppl 1): 43-50.
- Lunge VR, Rocha DB, Béria JU, Tietzmann DC, Stein AT, Simon D 2012. IL28B polymorphism associated with spontaneous clearance of hepatitis C infection in a Southern Brazilian HIV type 1 population. *AIDS Res Hum Retroviruses* 28(2): 215-219.
- Lyra AC, Fan X, Bisceglie AM 2004. Molecular biology and clinical implication of hepatitis C virus. *Braz J Med Biol Res* 37(5): 691-695.
- Ma Y, Anantpadma M, Timpe JM, Shanmugam S, Singh SM, Lemon SM, Yi M 2011. Hepatitis C virus NS2 protein serves as a scaffold for virus assembly by interacting with both structural and nonstructural proteins. *J Virol* 85(1): 86-97.

- Maekawa S & Enomoto N 2009. Viral factors influencing the response to the combination therapy of peginterferon plus ribavirina in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 44: 1009-1015.
- Maheshwari A, Ray S, Thuluvath PJ 2008. Acute hepatitis C. *Lancet* 372: 321-332.
- Maheshwari A, Thuluvath PJ 2010. Management of acute hepatitis C. *Clin Liver Dis* 14: 169-176.
- Major ME, Feinstone SM 1997. The molecular virology of hepatitis C. *Hepatol* 25(6): 1527-1538.
- Marinho TA, Lopes CLR, Teles SA, Reis NR, Carneiro MAS, Andrade AA, Martins RMB 2013a. Prevalence of hepatitis C virus infection among recyclable waste collectors in Central-West Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108(4): 519-522.
- Marinho TA 2013b. Prevalência da infecção pelo vírus da hepatite c em indivíduos portadores de doenças oncohematológicas em Goiânia-GO. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical; Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás: 1-108.
- Martínez-Rebollar M, Larrousse M, Calvo M, Muñoz A, González A, Loncà M, Martínez E, Blanco JL, Mallolas J, Laguno M 2011. Current status of acute hepatitis C. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 29(3): 210-215.
- Martins RMB, Vanderborght BOM, Rouzere CD, Santana CL, Santos CO, Mori DN 1994. Anti-HCV related to HCV PCR and risk factors analysis in a blood donor population of Central Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 36(6): 501-506.
- Martins RMB, Porto SOB, Vanderborght BOM, Rouzere CD, Queiroz DAO, Cardoso DDP, Yoshida CFT 1995a. Short report: prevalence of hepatitis C viral antibody

among Brazilian children, adolescents, and street youths. *Am J Med Hyg* 53: 654-655.

Martins RMB, Vanderborght BOM, Rouzere CD, Santana CL, Santos CO, Mori DN 1995b. Anti-HCV prevalence and risk factors analysis in pregnant women in Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90(1): 11.

Martins RMB, Teles SA, Freitas NR, Motta-Castro ARC, Souto FJD, Mussi A, Amorim RMS, Martins CRF 2006. Distribution of hepatitis C virus genotypes among blood donors from mid-west region of Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 48(1): 53-55.

Martins T, Narciso-Schiavon JL, Schiavon L de L 2011. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *Rev Assoc Med Bras* 57(1): 107-112

McCarthy JJ, Li JH, Thompson A, Suchindran S, Lao XQ, Patel K, Tillmann HL, Muir AJ, McHutchison JG 2010. Replicated association between an IL28B gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin. *Gastroenterology* 138(7): 2307-2314.

Memon MI, Memon MA 2002. Hepatitis C: an epidemiological review. *J Viral Hepat* 9: 84-100.

Ministério da Saúde 1993. Portaria nº 1.376, de 19 de novembro de 1993. Aprova as normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados. Diário Oficial da União. Brasília-DF, Brasil.

Ministério da Saúde 2004. Portaria nº 112, 29 de janeiro de 2004. Recomenda a implantação gradativa do NAT na triagem do HCV em doadores de sangue. Diário Oficial da União. Brasília-DF, Brasil.

- Ministério da Saúde 2005. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. A, B, C, D, E de hepatites para comunicadores. Brasília-DF, Brasil.
- Ministério da Saúde 2011. 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, Brasil.
- Ministério da Saúde 2012a. Portaria nº 20, 25 de julho de 2012. Torna pública a decisão de incorporar os inibidores de protease telaprevir e boceprevir para tratamento da hepatite crônica C no SUS. Diário Oficial da União. Brasília-DF, Brasil.
- Ministério da Saúde 2012b. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Boletim Epidemiológico: Hepatites Virais. Ano III nº 01. Brasília-DF, Brasil.
- Ministério da Saúde 2013a. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Suplemento 2. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções (Genótipo 1 do HCV e fibrose avançada). Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília-DF, Brasil.
- Ministério da Saúde 2013b. Portaria n. 25, 12 de junho de 2013. Incorpora o NAT para detecção de HIV e HCV na testagem de amostras de sangue de doadores no âmbito do Sistema nacional de sangue, componentes e hemoderivados do Sistema Único de Saúde. Diário Oficial da União. Brasília-DF, Brasil.
- Modi AA, Liang TJ 2008. Hepatitis C: a clinical review. *Oral Dis* 14: 10-14.
- Mohamed MK, Abdel-Hamid M, Mikhail NN, Abdel-Aziz F, Medhat A, Magder LS, Fix AD, Strickland 2005. Intrafamilial transmission of hepatitis C in Egypt. *Hepatology* 42(3): 683-687.

- Montes-Cano MA, García-Lozano JR, Abad-Molina C, Romero-Gómez M, Barroso N, Aguilar-Reina J, Núñez-Roldán A, González-Escribano MF 2010. Interleukin-28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes. *Hepatology* 52(1): 33-37.
- Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouvêa MS, Gutiérrez MF, Carrilho FJ, Pinho JR 2010. Molecular characterization, distribution, and dynamics of hepatitis C virus genotypes in blood donors in Colombia. *J Med Virol* 82(11): 1889-1898.
- Moreira R, Pinho JR, Fares J, Oba IT, Cardoso MR, Saraceni CP, Granato C 2003. Prospective study of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients by monthly analysis of HCV RNA and antibodies. *Can J Microbiol* 49(8): 503-507.
- Moreira S, Garcia RF, Gutberlet A, Bertol BC, Ferreira LE, Pinho SM, França PH 2012. A straightforward genotyping of the relevant IL28B SNPs for the prediction of hepatitis C treatment outcome. *J Virol Methods* 184(1-2): 93-97.
- Moreno-Otero R 2005. Therapeutic modalities in hepatitis C: challenges development. *J Viral Hepatitis* 12: 10-19.
- Munir S, Saleem S, Idrees M, Tariq A, Butt S, Rauff B, Hussain A, Badar S, Naudhani M, Fatima Z, Ali M, Ali L, Akram M, Aftab M, Khubaib B, Awan Z 2010. Hepatitis C Treatment: current and future perspectives. *J Virol* 7(296): 1-6.
- Murphy D, Chamberland J, Dandavino R, Sablon E 2007. A new genotype of hepatitis C virus originating from central Africa. *Hepatology* 46(4): AASLD abstract: A623-A624.
- Mussi AD, Pereira RA, Silva VAC, Martins RMB, Souto FJ 2007. Epidemiological aspects of hepatitis C virus infection among HIV-infected individuals in Mato Grosso State, Central Brazil. *Acta Trop* 104(2-3): 116-121.

- Nakano T, Lu L, Liu P, Pybus OG 2004. Viral gene sequences reveal the variable history of hepatitis C virus infection among countries. *J Infect Dis* 190(6): 1098-1108.
- Nakano T, Lu L, He Y, Fu Y, Robertson BH, Pybus OG 2006. Population genetic history of hepatitis C virus 1b infection in China. *J Gen Virol* 87(1): 73-82.
- NCBI 2011. The NCBI Handbook. C virus. Chapter 5: The Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) of Nucleotide Sequence Variation. Jo McEntyre and Jim Ostell (Ed). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (USA). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21088/>>. Acesso em: 15 de junho de 2013.
- Ngo Y, Munteanu M, Messous D, Charlotte F, Imbert-Bismut F, Thabut D, Lebray P, Thibault V, Benhamou Y, Moussalli J, Ratzu V, Poynard T 2006. A prospective analysis of the prognostic value of biomarkers (FibroTest) in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 52(10): 1887-1896.
- Oliveira-Filho AB, Pimenta AS, Rojas MF, Chagas MC, Crescente JA, Crespo DM, Lemos JA 2010a. Prevalence and genotyping of hepatitis C virus in blood donors in the state of Pará, Northern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105 (1): 103-106.
- Oliveira-Filho AB, Pimenta Ado S, Rojas Mde F, Chagas MC, Crespo DM, Crescente JA, Lemos JÁ 2010b. Likely transmission of hepatitis C virus through sharing of cutting and perforating instruments in blood donors in the State of Pará, Northern Brazil. *Cad Saude Publica* 26(4): 837-844.
- Oliveira-Filho AB, Sawada L, Pinto LC, Locks D, Bahia SL, Brasil-Costa I, Lemos JÁ 2013. HCV infection among cocaine users in the state of Pará, Brazilian Amazon. *Arch Virol* 158(7): 1555-1560.

- Oliveira ML, Bastos FI, Telles PR, Hacker MA, Oliveira SA, Miguel JC, Yoshida CF 2009. Epidemiological and genetic analyses of Hepatitis C virus transmission among young/short- and long-term injecting drug users from Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Virol* 44(3): 200-206.
- Ono-Nita SK, Nita ME, Carrilho FJ 2006. Hepatitis C: facts in numbers. *Arq Gastroenterol* 43(2): 71-72.
- Paraboni ML, Sbeghen MD, Wolff FH, Moreira LB 2012. Risk factors for infection with different hepatitis C virus genotypes in southern Brazil. *Scientific World Journal* (946954): 1-6.
- Paraná R, Paiva T, Leite MR, Oliveira FN, Kali N, Lobato C, Dantas T, Neto JT 2007. Infection with hepatitis C virus among health care workers in the Brazilian Western Amazon region (Rio Branco, State of Acre). *Am J Trop Med Hyg* 76(1): 165-169.
- Pearlman BL 2004. Hepatitis C treatment update. *Am J Med* 117: 344-350.
- Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM 2004. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 39(1): 5-19.
- Pereira GAS, Stefani MMA, Martelli CMT, Turchi MD, Siqueira EMP, Carneiro MAS, Martins RMB 2006. Human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus co-infection and viral subtypes at an HIV testing center in Brazil. *J Med Virol* 78: 719-723.
- Pereira LMMB, Martelli CMT, Moreira RC, Merchan-Hamman E, Stein AT, Cardoso MRA, Figueiredo GM, Montarroyos UR, Braga C, Turchi MD, Coral G, Crespo D, Lima MLC, Alencar LCA, Costa M, Santos AA, Ximenes RAA 2013. Prevalence and risk factors of Hepatitis C virusinfection in Brazil, 2005 through 2009: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis* 13(60): 1-12.

- Perone C, Castillo DM, Pereira GL, Carvalho NO, Januário JN, Teixeira R 2008. High prevalence of genotype 1 in individuals with hepatitis C in Belo Horizonte, MG. *Rev Soc Bras Med Trop* 41(3): 238-242.
- Poenisch M, Bartenschlager R 2010. New insights into structure and replication of the hepatitis C virus and clinical implications. *Semin Liver Dis* 30(4): 333-347.
- Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL 2003. Viral hepatitis C. *Lancet* 362: 2095-2100.
- Poynard T 2004. Treatment of hepatitis C virus: the first decade. *Semin Liver Dis* 24(Suppl.2): S19-S24.
- Poynard T, Vergniol J, Ngo Y, Foucher J, Munteanu M, Merrouche W, Colombo M, Thibault V, Schiff E, Brass CA, Albrecht JK, Rudler M, Deckmyn O, Lebray P, Thabut D, Ratziu V, Ledinghen VD 2013. Staging chronic hepatitis C in seven categories using fibrosis biomarker (FibroTest) and transient elastography (FibroScan). *J Hepatol* 8278(13): 817-819.
- Prati D 2006. Transmission of hepatitis C virus by blood transfusions and other medical procedures: a global review. *J Hepatology* 45: 607-616.
- Prince AM, Brotman B, Grady GF, Kuhns WJ, Hazzi C, Levine RW, Millian SJ 1974. Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. *Lancet* 2: 241-246.
- Purcell R 1997. The hepatitis C virus: overview. *Hepatol* 26(3): 11S-14S.
- Pybus OG, Cochrane A, Holmes EC, Simmonds P 2005. The hepatitis C virus epidemic among injecting drug users. *Infect Genet Evol* 5(2): 131-139.

- Ramos JA, Ramos AL, Hoffmann L, Perez RM, Coelho HS, Urményi TP, Silva R, Rondinelli E, Villela-Nogueira CA 2012. A single nucleotide polymorphism, rs129679860, in the IL28B locus is associated with the viral kinetics and a sustained virological response in a chronic, monoinfected hepatitis C virus genotype-1 Brazilian population treated with pegylated interferon-ribavirin. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107(7): 888-892.
- Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, Cai T, Di Iulio J, Mueller T, Bochud M, Battegay M, Bernasconi E, Borovicka J, Colombo S, Cerny A, Dufour JF, Furrer H, Gunthard HF, Heim M, Hirschel B, Malinverni R, Moradpour D, Müllhaupt B, Witteck A, Beckmann JS, Berg T, Bergmann S, Negro F, Telenti A, Bochud PY, Swiss Hepatitis C Cohort Study, Swiss HIV Cohort Study 2010. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology* 138(4): 1338-1345.
- Reiberger T, Ferlitsch A, Sieghart W, Kreil A, Breitenecker F, Rieger A, Schmied B, Gangl A, Peck-Radosavljevic M 2010. HIV–HCV co-infected patients with low CD4+ cell nadirs are at risk for faster fibrosis progression and portal hypertension. *J Viral Hepat* 17: 400-409.
- Reis NR, Lopes CL, Teles SA, Matos MA, Carneiro MA, Marinho TA, Filho JA, Espírito-Santo MP, Lampe E, Martins RM 2011. Hepatitis C virus infection in patients with tuberculosis in Central Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis*. 15 (10): 1397-402.
- Reynolds JM, Paciga SA, Sanders FA, Hyde CL, Loomis AK, Johnston GI 2012. Sequence analysis of the IL28A/IL28B inverted gene duplication that contains polymorphisms associated with treatment response in hepatitis C patients. *PLoS One* 7(1): 1-8.

- Ribeiro LC, Souto FJ, Espírito-Santo MP, Oliveira RG, Lampe E 2009. An autochthonous case of hepatitis C virus genotype 5a in Brazil: phylogenetic analysis. *Arch Virol* 154 (4): 665-670.
- Ridruejo E, Solano A, Marciano S, Galdame O, Adrover R, Cocozzella D, Delettieres D, Martinez A, Gadano A, Mando OG, Silva MO 2011. Genetic variation in interleukin-28B predicts SVR in hepatitis C genotype 1 Argentine patients treated with PEG IFN and ribavirin. *Ann Hepatol* 10(4): 452-457.
- Rizzeto M, Canesse MG, Arico S, Crivelli O, Trepo C, Bonino F, Verme G 1977. Immunofluorescence detection of a new antigen/antibody system (delta/antidelta) associated with hepatitis B virus in liver and serum of HBsAg carriers. *Gut* 18: 998-1003.
- Roberts EA, Yeung L 2002. Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatol* 36(5): 106-113.
- Rocha-Perugini V, Montpellier C, Delgrange D, Wychowski C, Helle F, Pillez A, Drobecq H, Le Naour F, Charrin S, Levy S, Rubinstein E, Dubuisson J, Cocquerel L 2008. The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry. *PLoS One* 3(4): 1-12.
- Rodés J, Tapias JMS 2000. Hepatitis C. *Nephrol Dial Transplant* 18(8): 2-11.
- Rodrigues Neto J, Cubas MR, Kusma SZ, Olandoski M 2012. Prevalence of hepatitis C in adult users of the public health service of São José dos Pinhais - Paraná. *Rev Bras Epidemiol* 15(3): 627-638.
- Roingeard P, Hourieux C 2008. Hepatitis C virus core protein, lipid droplets and steatosis. *J Viral Hepat* 15: 157-161.

- Romano CM, Carvalho-Mello IMGV, Jamal LF, Melo FL, Iamarino A, Motoki M, Pinho JR, Holmes EC, Zanotto PMA; VGDN Consortium 2010. Social networks shape the transmission dynamics of hepatitis C virus. *PLoS One* 5(6): 1-9.
- Rosa H, Martins R, Vanderborght B 1996. Short report: association between leprosy and hepatitis C infection: a survey in a region of central Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 55(1): 22-23.
- Saldanha J, Lelie N, Heath A 1999. Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. *Vox Sang* 76: 149-158.
- Samreen B, Khaliq S, Ashfaq UA, Khan M, Afzal N, Shahzad MA, Riaz S, Jahan S 2012. Hepatitis C virus entry: role of host and viral factors. *Infect Genet Evol* 12: 1699-1709.
- Sandres-Sauné K, Deny P, Pasquier C, Thibaut V, Duverlie G, Izopet J 2003. Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of the NS5b region. *J Virol Methods* 109: 187-193.
- Schinazi R, Halfon P, Marcellin P, Asselah T 2014. HCV direct-acting antiviral agents: the best interferon-free combinations. *Liver Int* 34(1): 69-78.
- Scott JD, Gretch DR 2007. Molecular diagnostics of hepatitis C infection. *Jama* 297(7): 724-773.
- Seeff LB, Ghany MG 2010. Management of untreated and nonresponder patients with chronic hepatitis C. *Semin Liver Disease* 30(4): 348-360.
- Sharma SD 2010. Hepatitis C virus: molecular biology & current therapeutic options. *Indian J Med Res* 131: 17-34.

- Shepard CW, Finelli L, Alter MJ 2005. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 5: 558-567.
- Shiffman ML, Benhamou Y 2013. Patients with HCV and F1 and F2 fibrosis stage: treat now or wait? *Liver Int* 33(1): 105-110.
- Shiffman ML, Benhamou Y 2014. HCV F1/F2 patients: treat now or continue to wait. *Liver Int* 34(1): 79-84.
- Shih JWK, Esteban Mur JJ, Alter HJ 1986. Non-A, non-B hepatitis: advances and unfulfilled expectations of the first decade. *Prog Liver Dis* 8: 433-452.
- Shiryaev SA, Chernov AV, Shiryaeva TN, Aleshin AE, Strongin AY 2011. The acidic sequence of the NS4A cofactor regulates ATP hydrolysis by the HCV NS3 helicase. *Arch Virol* 156(2): 313-318.
- Silini E, Bono F, Cividini A, Cerino A, Maccabruni A, Tinelli C, Bruno S, Bellobuono A, Mondelli M 1995. Molecular epidemiology of hepatitis C virus infection among intravenous drug users. *J Hepatol* 22(6): 691-695.
- Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS 1993. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 74(Pt 11): 2391-2399.
- Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspé G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin-I T, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis c virus genotypes. *Hepatol* 42(4): 962-973.

- Smith BD, Teshale E, Jewett A, Weinbaum CM, Neaigus A, Hagan H, Jenness SM, Melville SK, Burt R, Thiede H, Al-Tayyib A, Pannala PR, Miles IW, Oster AM, Smith A, Finlayson T, Bowles KE, Dinunno EA 2011a. Performance of premarket rapid hepatitis C virus antibody assays in 4 national human immunodeficiency virus behavioral surveillance system sites. *Clin Infect Dis* 53(8): 780-786.
- Smith BD, Drobeniuc J, Jewett A, Branson BM, Garfein RS, Teshale E, Kamili S, Weinbaum CM 2011b. Evaluation of three rapid screening assays for detection of antibodies to hepatitis C virus. *J Infect Dis* 204(6): 825-831.
- Souto FJ, Fontes CJ, Gaspar AM, Lyra LG. 1999. Hepatitis C virus prevalence among an immigrant community to the southern Amazon, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 719– 723.
- Souto FJ, Fontes CJ, Gaspar AM 2001. Prevalence of hepatitis B and C virus markers among malaria-exposed gold miners in Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96(6): 751-755.
- Souto FJ, Fontes CJ, Pignati LT, Pagliarini ME, Menezes VM, Martinelli AL, Figueiredo JF, Donadi EA, Passos AD 2012. Risk factors for hepatitis C virus infection in Inland Brazil: an analysis of pooled epidemiological sectional studies. *J Med Virol* 84(5): 756-762.
- Strahotin CS & Babich M 2012. Hepatitis C variability, patterns of resistance, and impact on therapy. *Adv Virol.*: 1-10.
- Sulbaran MZ, Di Lello FA, Sulbarán Y, Cosson C, Loureiro CL, Rangel HR, Cantaloube JF, Campos RH, Moratorio G, Cristina J, Pujol FH 2010. Genetic history of hepatitis C virus in Venezuela: high diversity and long time of evolution of HCV genotype 2. *PLoS One* 5(12): 1-15.

- Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, Bassendine M, Spengler U, Dore GJ, Powell E, Riordan S, Sheridan D, Smedile A, Fragomeli V, Muller T, Bahlo M, Stewart GJ, Booth DR, George J 2009. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 41(10): 1100-1104.
- Suzuki R, Suzuki T, Ishii K, Matsuura Y, Miyamura T 1999. Processing and functions of hepatitis C virus proteins. *Intervirology* 42: 145-152.
- Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, Wakita T 2007. Molecular biology of hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 42: 411-423.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mole Biol Evol* 24: 1596-1599.
- Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugauchi F, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. 2009. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 41(10): 1105-1109.
- Tang H, Grisé H 2009. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. *Clin Sci* 117: 49-65.
- Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MMC 1999. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 285: 107-110.
- Te HS, Jensen DM 2010. Epidemiology of hepatitis B and C viruses: a global overview. *Clin Liver Dis* 14(1): 1-21.

- Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, Kidd J, Kidd K, Khakoo SI, Alexander G, Goedert JJ, Kirk GD, Donfield SM, Rosen HR, Tobler LH, Busch MP, McHutchison JG, Goldstein DB, Carrington M 2009. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 461(7265): 798-801.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882.
- Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS, Ge D, Fellay J, Shianna KV, Urban T, Afdhal NH, Jacobson IM, Esteban R, Poordad F, Lawitz EJ, McCone J, Shiffman ML, Galler GW, Lee WM, Reindollar R, King JW, Kwo PY, Ghalib RH, Freilich B, Nyberg LM, Zeuzem S, Poynard T, Vock DM, Pieper KS, Patel K, Tillmann HL, Noviello S, Koury K, Pedicone LD, Brass CA, Albrecht JK, Goldstein DB, McHutchison JG 2010. Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus. *Gastroenterology* 139(1): 120-129.
- Thompson AJ 2012. Genetic factors and hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 142(6): 1335-1339.
- Thomson BJ, Finch RG 2005. Hepatitis C virus infection. *Clin Microbiol Infect* 11: 86-94.
- Tohme RA, Holmberg SD 2010. Is sexual contact a major mode of hepatitis C virus transmission? *Hepatology* 52 (4): 1497-1505.
- Torres-Puente M, Cuevas JM, Jiménez-Hernández N, Bracho MA, García-Robles I, Wrobel B, Carnicer F, del Olmo J, Ortega E, Moya A, González-Candelas F 2008. Using evolutionary tools to refine the new hypervariable region 3 within the envelope 2 protein of hepatitis C virus. *Infect Genet Evol* 8(1): 74-82.

- Torres HA, Nevah MI, Barnett BJ, Mahale P, Kontoyiannis DP, Hassan MM, Raad II 2012. Hepatitis C virus genotype distribution varies by underlying disease status among patients in the same geographic region: A retrospective multicenter study. *J Clin Virol* 54 (3): 218-222.
- Troesch M, Meunier I, Lapierre P, Lapointe N, Alvarez F, Boucher M, Soudeyns H, 2006. Study of a novel hypervariable region in hepatitis C virus (HCV) E2 envelope glycoprotein. *Virology* 352(2): 357–367.
- Vassilaki N, Mavromara P 2009. The HCV ARFP/F/core+1 protein: production and functional analysis of an unconventional viral product. *IUBMB Life* 61(7): 739-752.
- Venegas M, Villanueva RA, Gonzalez K, Brahm J 2011. IL28B polymorphisms associated with therapy response in Chilean chronic hepatitis C patients. *World J Gastroenterol* 17(31): 3636-3639.
- Vigani AG, Pavan MH, Tozzo R, Gonçalves ES, Feltrin A, Fais VC, Lazarini MS, Gonçalves NS, Gonçalves FL Jr 2008. Comparative study of patients with chronic hepatitis C virus infection due to genotypes 1 and 3 referred for treatment in southeast Brazil. *BMC Infect Dis* 8(164): 1-5.
- Waheed Y, Bhatti A, Ashraf M 2012. RNA dependent RNA polymerase of HCV: A potential target for the development of antiviral drugs. *Infect Genet Evol* 14: 247-257.
- Walewski JL, Keller TR, Stump DD, Branch AD 2001. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA* 7: 710-721.
- Wendel S, Levi JE, Almeida PT, Neto GF 2009. Introdução do NAT no Brasil: algumas considerações adicionais. *Rev Bras Hematol Hemoter* 31(2): 112-113.

- WHO (World Health Organization) 2009. Global distribution of HCV genotypes. Disponível em <http://www.who.int/vaccine_research/documents/Viral_Cancers.pdf> Acessado em: 25/03/2013.
- WHO (World Health Organization) 2013. Hepatitis C. Hepatitis C: media centre. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>> Acessado em: 11/07/2013.
- Wohnsland A, Hofmann WP, Sarrazin C 2007. Viral determinants of resistance to treatment in patients with hepatitis C. *Clin Microbiol Rev* 20(1): 23-38.
- Wolf M, Dimitrova M, Baumert TF, Schuster C 2008. The major form of hepatitis C virus alternate reading frame protein is suppressed by core protein expression. *Nucleic Acids Res* 36(9): 3054-3064.
- Xu Z, Choi J, Yen TSB, Lu W, Strohecker A, Govindarajan S, Chien D, Selby MJ, Ou J 2001. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J* 20(14): 3840-3848.
- Yahoo N, Sabahi F, Shahzamani K, Malboobi MA, Jabbari H, Sharifi H, Mousavi-Fard SH, Merat S 2011. Mutations in the E2 and NS5A regions in patients infected with hepatitis C virus genotype 1a and their correlation with response to treatment. *J Med Virol* 83(8): 1332-1337.
- Zarife MA, de Oliveira EC, Romeu JM, dos Reis MG 2006. Detection of genotype 4 of the hepatitis C virus in Salvador, BA. *Rev Soc Bras Med Trop* 39 (6): 567-569.
- Zein NN 2000. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev* 13(2): 223-235.

Zeminian LB, Padovani JL, Corvino SM, Silva GF, Pardini MI, Gruta RM 2013.
Variability and resistance mutations in the hepatitis C virus NS3 protease in
patients not treated with protease inhibitors. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108(1): 13-17.