

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO  
VÍRUS DA HEPATITE C EM INDIVÍDUOS  
CO-INFECTADOS COM HIV-1**

Claudiner Pereira de Oliveira

BRASÍLIA

2007

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA  
HEPATITE C EM INDIVÍDUOS CO-INFECTADOS COM  
HIV-1**

Claudiner Pereira de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Renata Fernandes Martins

Colaboradores:

Regina Maria Santos de Amorim

Luiz Sasso Filho

José Eduardo Trevizoli

BRASÍLIA

2007

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA  
HEPATITE C EM INDIVÍDUOS CO-INFECTADOS COM  
HIV-1**

Claudiner Pereira de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Renata Fernandes Martins

Banca examinadora:

Prof<sup>a</sup>. Dra. Andréa Queiroz Maranhão (Suplente) – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro – Universidade de Brasília

Prof. Dr. José Paulo Gagliardi Leite – Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido – Universidade de Brasília

BRASÍLIA

2007

**"Uma longa jornada começa com um único passo."**

Lao Tzu

*Aos meus pais, Francisco e Zenilde, que iluminaram-me e incentivaram-me a trilhar o caminho mais importante que eu poderia seguir: o estudo.*

*Aos meus irmãos, Claubert e Claudiana, por estimularem-me com o mais nobre combustível da criatividade: a curiosidade.*

*Às duas mulheres mais fascinantes que já conheci: Patrícia e Cláudia Renata. Por inspirarem-me a maior virtude das grandes pensadoras: a sabedoria.*

*Aos homens e mulheres vítimas da co-infecção que, anonimamente, tornaram possível este trabalho.*

**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

Embora uma dissertação seja, pela sua finalidade acadêmica, um trabalho individual, há contribuições de natureza diversa que merecem ser enfatizadas aqui. Por essa razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

- aos meus ilustres orientadores Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cláudia Renata Fernandes Martins e Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido que contribuíram singularmente para o sucesso da minha vida profissional e pessoal, apresentando-me um projeto de sonho, ajudando-me na sua compreensão e, principalmente, desafiando-me a construí-lo;
- à todas as amigas e amigos do Grupo de Estudos em Virologia, veteranas e veteranos do lendário HHV: Eduardo e Gegê, Tainá e Júnior, Daniela e Ugo, Daniella e Diogo, Natália e Rafael, Dra. Regina, Nazle, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marisa Xanthomonas e Mateus;
- ao Prof. Dr. José Paulo Gagliardi pelo inestimável apoio e por acreditar em nosso trabalho;
- à ‘chefa’ Dra. Regina M. Amorim pela grande amizade, pelo apoio fundamental, pela existência do grupo do HCV, e pela sábias contribuições para o realização deste trabalho;
- à Patrícia pelo amor, apoio e inspiração;
- à todos os membros da banca examinadora deste trabalho, em especial, Prof. Dr. Bergmann M. Ribeiro e Prof<sup>a</sup>. Dra. Andréa Q. Maranhão pelas relevantes contribuições para este trabalho;
- aos colaboradores do LACEN-DF: Luiz Sasso Filho, Helena T. K. Fink, Cecília M.S. Cunha, Eliane M. dos Santos, Larissa R. T. das Neves e Carlita C. Felix. Obrigado a todos vocês pela ajuda na busca das amostras, pela paciência e, principalmente, pela cordialidade;
- aos colaboradores Dr. José Eduardo Trevizoli do Hospital de Base (HBDF) e Dra. Lara Velasco do Laboratório Sabin, que viabilizaram a realização desse trabalho;

- aos amigos ex-companheiros de bancada David Neves, Márcio Rojas, Verônica Veras e Margareti Medeiros que em momentos distintos contribuíram cada um do seu jeito para a minha vida acadêmica;
- aos Professores do Departamento de Biologia Celular, em especial, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Sônia Bão e Prof. Dr. Renato Rezende e todos os colegas que trabalharam ou que ainda trabalham no Laboratório de Microscopia Eletrônica;
- ao Prof. Dr. Ricardo Titze do MMB, pela acolhida fundamental em seu laboratório para a realização de alguns experimentos do trabalho;
- a todos os Professores e Funcionários do Laboratório de Fitopatologia pela boa receptividade e convivência no dia-a-dia;
- à querida funcionária Ana da Secretaria do Departamento de Biologia Celular pela competência e dedicação ao trabalho. Sempre solucionando os problemas de ordem burocrática que permitiram o correto andamento das etapas que envolvem este trabalho;
- aos meus familiares, em especial, meus pais Francisco e Zenilde, meus irmãos Claubert e Claudiana e minha cunhada Keila, pelo apoio fundamental e pela grande harmonia;
- à minha querida sogra Fernanda e ao meu cunhado *nerd* Rafael que tanto me ajudaram nos momentos mais difíceis;
- aos grandes amigos: Prof. Aloízio (pois “a vida é a arte dos encontros...”), Prof. Clementino Neto (porque “sempre devemos usar o bom senso...”), Marcelo *Black* Padilha e Marcelo *Passa-a-Bola* Salviano, e aos grandes seres humanos que conheci na profissão (monitores, professores, empregados e alunos) e na faculdade (colegas de turma, de disciplina e de saídas de campo) durante todos esses anos;
- ao Programa de Pós-graduação da UnB;
- ao CNPq e a FINATEC pelo apoio financeiro;
- e por último, mas não menos importante, à todos àqueles que acreditam que a ousadia e o erro são caminhos para as grandes realizações.

## ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO .....	15
1.1	Histórico .....	15
1.2	O vírus da Hepatite C.....	20
1.3	O genoma do vírus da Hepatite C e as proteínas virais.....	21
1.4	A diversidade genética do vírus da Hepatite C e os subtipos virais .....	23
1.5	Epidemiologia do vírus da Hepatite C.....	25
1.6	A replicação do vírus da Hepatite C.....	28
1.7	Modelos de estudo da replicação do vírus da Hepatite C .....	29
1.8	A transmissão do vírus da Hepatite C .....	32
1.9	O diagnóstico laboratorial do vírus da Hepatite C .....	34
1.10	A genotipagem do vírus da Hepatite C .....	35
1.11	A hepatite C .....	36
1.12	O vírus da Hepatite C e a infecção crônica.....	38
1.13	Tratamento .....	40
1.14	A co-infecção HIV-1/HCV .....	41
2.	JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS .....	45
3.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	47
3.1	População Estudada.....	47
3.2	Coleta das amostras .....	47
3.3	Extração de RNA e Transcrição Reversa.....	47
3.4	Amplificação pela <i>nested</i> -PCR.....	48
3.5	Clonagem .....	50
3.6	Caracterização dos genótipos .....	51
3.6.1	Seqüenciamento automático .....	51
3.6.2	Análise das seqüências.....	51

3.6.3	Análise filogenética .....	51
4.	RESULTADOS.....	53
4.1	Caracterização da população de co-infectados .....	53
4.2	Transcrição reversa e amplificação pela <i>nested</i> -PCR.....	53
4.3	Genotipagem .....	55
4.3.1	Definição dos Genótipos do HCV com base na análise das regiões genômicas 5'UTR e NS5 .....	55
4.3.2	Análise Filogenética .....	58
5.	DISCUSSÃO .....	63
5.1	A prevalência do HCV em HIV-1 soropositivos .....	63
5.2	Os genótipos do HCV .....	65
5.3	A Diversidade Genética do HCV e a Co-infecção com o HIV-1 .....	67
6.	CONCLUSÕES .....	71
7.	PERSPECTIVAS.....	72
8.	BIBLIOGRAFIA .....	73

## RESUMO

As infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) e pelo vírus da hepatite C (HCV) são consideradas problemas de saúde pública com cerca de 40 milhões de pessoas infectadas com o HIV-1 e cerca de 170 milhões com HCV no mundo. A co-infecção HIV-1/HCV é comum em indivíduos expostos a vias de transmissão percutânea e a hepatite C tem emergido como a principal causa de morte em pacientes HIV-1 soropositivos, devido à alta prevalência do HCV nessa população. O HCV pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivirus*, e é classificado em 6 genótipos e múltiplos subtipos. Diferenças na distribuição genotípica são observadas em diferentes áreas do mundo e em um mesmo país. Alguns genótipos do HCV parecem estar relacionados a uma melhor resposta virológica sustentada após o tratamento, como os genótipos 2 e 3, que apresentam melhor resposta do que indivíduos infectados com os genótipos 1 e 4. Existem poucos dados sobre populações de co-infectados com HIV-1/HCV, a prevalência dos genótipos é relatada para as infecções separadamente nas diferentes populações. Assim, esse trabalho teve como objetivo caracterizar a prevalência dos genótipos e subtipos do HCV na população de co-infectados com HIV-1/HCV no Distrito Federal e entorno. Para isso foram analisadas 45 amostras de indivíduos co-infectados com HIV-1 e anti-HCV positivos por meio de amplificação por PCR das regiões genômicas 5'UTR e NS5B do HCV seguida de seqüenciamento e análise filogenética. O genótipo 1 foi o mais prevalente (81%), seguido dos genótipos 3 (10%), 2 (6%) e 4 (3%). Esse resultado está de acordo com relatos de outros estudos da região Centro-Oeste, onde existe maior prevalência do genótipo 1. Os genótipos 2 e 4, raros no Brasil, foram descritos pela primeira vez na população HCV positiva do Distrito Federal (DF). A concordância entre os resultados obtidos por meio da análise de homologia das seqüências pelo programa HCV-BLAST para as regiões 5'UTR e NS5B foi de 97% para os genótipos e 90% para os subtipos, corroborando o descrito na literatura sobre a necessidade da análise de mais de uma região para a correta determinação do subtipo. A análise filogenética das seqüências definiu os genótipos e subtipos divergentes. A presença de genótipos 1, 2, 3 e 4 do HCV na população de co-infectados com HIV-1 atendidos no DF indica a importância da genotipagem nessa população uma vez que esses genótipos têm importância clínica na predição da resposta ao tratamento antiviral, sendo o HCV-1 o que responde mal ao tratamento ao tratamento.

## ABSTRACT

Human immunodeficiency virus (HIV-1) and Hepatitis C virus (HCV) are considered problems of public health with about 40 millions infected by HIV-1 and 170 millions infected by HCV worldwide. The co-infection HIV-1/HCV is common in individuals exposed to percutaneous pathways and the hepatitis C has been emerging as the main cause of death in HIV-1 positive individuals due the high prevalence of HCV in this population. The HCV is classified into 6 genotypes and several subtypes. Differences in the genotypic distribution are observed in different areas worldwide and within a country. Some HCV genotypes appear to be related to a better virological response after treatment, as the genotypes 2 and 3 for example, that show better response than individuals infected with genotypes 1 and 4. There is little information about co-infected HIV-1/HCV population; the genotype prevalence is reported to the infections separately. Thus, the aim of this study was to characterize the HCV genotypes and subtypes prevalence in the co-infected HIV-1/HCV population of Federal District. Forty-five samples from co-infected patients were analyzed by PCR amplification of 5'UTR and NS5B genomic sequences followed by automatic sequencing and phylogenetic analysis. The HCV genotype 1 was the most prevalent (81%), followed by genotype 3 (10%), 2 (6%) and 4 (3%). This result is in concordance with reports from other studies from Central West region of Brazil, where there is a major prevalence of genotype 1. The genotypes 2 and 4, rare in Brazil, were described for the first time in the HCV positive population of Federal District. The agreement between the results obtained by the analysis of the sequences homology by the software HCV-BLAST to the regions 5'UTR and NS5B was of 97% for genotypes and of 90% for subtypes, corroborating with the described in literature as to the need to the analyze more than one genomic region in order to achieve correct subtype determination. The phylogenetic analysis defined the diverging genotypes and subtypes. The presence of the genotypes 1, 2, 3, and 4 in the co-infected HIV-1/HCV population attended in the Federal District indicates the importance of genotyping in this population once these genotypes have clinical importance in the prediction of the response to the antiviral treatment.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do genoma viral, .....	20
Figura 2. Organização do genoma do HCV .....	23
Figura 3. Distribuição dos diferentes genótipos do HCV no mundo. ....	26
Figura 4. Distribuição dos genótipos de hepatite C nas diferentes regiões do Brasil. .	27
Figura 5. Filogenia do HCV. ....	27
Figura 6. Ciclo de replicação hipotético do HCV. ....	29
Figura 7. Análise eletroforética dos produtos de PCR.....	54
Figura 8. Gráficos com prevalência de genótipos e subtipos de HCV no DF. ....	57
Figura 9. Análise filogenética da região 5'UTR do HCV em amostras de co-infectados com HIV-1.....	59
Figura 10. Análise filogenética da região NS5B do HCV em amostras de co-infectados com HIV-1.....	60

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Seqüência e local de alinhamento dos iniciadores .....	49
Tabela 2. Relação dos resultados de amplificação.....	54
Tabela 3. Número de amostras amplificadas .....	55
Tabela 4. Número de amostras e os respectivos genótipos do HCV encontrados .....	56
Tabela 5. Número de amostras e os respectivos subtipos do HCV encontrados.....	56
Tabela 6. Concordância na genotipagem do HCV. ....	57
Tabela 7. Amostras genotipadas somente para a região 5'UTR do HCV .....	58
Tabela 8. Genótipo das amostras de co-infectados com HIV-1/HCV.....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- ALT – Alanina Aminotransferase
- ARF-P – Proteínas de quadro de leitura alternativo - *alternative reading frame proteins*
- C – Proteína *core*
- CTLs – Linfócitos CD8<sup>+</sup> citotóxicos
- E – Proteínas estruturais
- eIF-3 – Fator eucariótico de iniciação 3
- FDA – *Food and Drug Administration*
- HAART – Terapia anti-retroviral - *Highly Active Antiretroviral Therapy*
- HAV – Vírus da hepatite A
- HBsAg - Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
- HBV – Vírus da hepatite B
- HCC – Hepatocarcinoma celular
- HCV – Vírus da hepatite C
- HCVpp – Pseudopartículas de retro- e lentivírus
- HIV-1 – Vírus da imunodeficiência humana
- HVR - Regiões hipervariáveis - *Hypervariable Regions*
- IRES – Sítios internos de entrada ribossomal - *Internal Ribosomal Entry Site*
- LACEN-DF – Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal
- NANB - hepatite não-A, não-B
- NIH - Instituto Nacional de Saúde dos EUA - *National Institute of Health*
- NS – Proteínas não estruturais
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- PCR – Reação em cadeia da polimerase – *Polymerase Chain Reaction*
- RdRP – RNA polimerase dependente de RNA
- RE – Retículo endoplasmático
- RER – Retículo endoplasmático rugoso
- ssRNA – RNA de fita simples - *single stranded RNA*
- UTR – Região não traduzida - *Untranslated Region*

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Histórico**

Vários vírus podem atingir o fígado no decurso de uma infecção sistêmica, concomitantemente com o envolvimento de outros órgãos, originando uma hepatite. Em muitos casos, a hepatite não chega a ter expressão clínica, sendo detectada ocasionalmente por alterações em exames laboratoriais. As infecções por citomegalovírus e o vírus Epstein-Barr, entre outros, são exemplos de tal eventualidade. Nas regiões tropicais e subtropicais há também um grande número de vírus, genericamente conhecidos pela designação vírus emergentes, como o vírus da Febre Amarela, vírus Ebola, vírus Lassa e o vírus Marburg, que podem provocar lesões hepáticas, por vezes de extrema gravidade, simultaneamente com lesões em outros órgãos (Freitas, 2003).

No entanto, existe um grupo de vírus que tem em comum a capacidade de se desenvolver nos hepatócitos, causando como principal manifestação, pelo menos na fase inicial, uma hepatite aguda. O termo hepatite viral é convencionalmente reservado para as doenças causadas por este restrito subgrupo de vírus hepatotrópicos (Freitas, 2003).

A história das hepatites remonta, provavelmente, aos primórdios da civilização. De fato, existem registros de surtos de icterícia na Babilônia ocorridos há mais de 2500 anos e Hipócrates no século IV a.C. fez referência nos seus escritos à icterícia epidêmica. Geralmente na Idade Média, a eclosão de epidemias de icterícia estava associada a catástrofes ou períodos de guerra que ameaçavam seriamente as condições sanitárias (Freitas, 2003). O aumento da frequência da icterícia epidêmica na Europa acompanhou o rápido aumento da população nos séculos XVII, XVIII e XIX, mas as grandes epidemias coincidiram quase sempre com as guerras. Surgiram então as designações icterícia de campanha, usada desde a Idade Média, ou doença do soldado, introduzida mais recentemente (Freitas, 2003).

As epidemias de icterícia constituíram no passado um grave problema das campanhas militares nas quais, muitas vezes, influenciavam o desfecho. Na guerra da Secessão Americana (1861-65) mais de 40 mil soldados foram atingidos. A dimensão das epidemias era proporcional à dimensão dos campos de batalha e dos exércitos

envolvidos, como foi verificado nas grandes epidemias que acompanharam as duas Guerras Mundiais da primeira metade do Século XX (Freitas, 2003).

O número de casos de hepatite durante a Segunda Grande Guerra foi estimado em cerca de 16 milhões. Posteriormente, atribuiu-se estes grandes surtos epidêmicos ao vírus da hepatite A e, eventualmente, ao vírus da hepatite E, em algumas zonas do conflito. No entanto, na época da II Guerra Mundial, ainda não estava difundido o conceito de que pudessem ser o resultado de infecções virais transmitidas por água ou alimentos contaminados (Freitas, 2003).

A confirmação da natureza infecciosa da hepatite A só foi estabelecida durante o período imediatamente a seguir à II Guerra Mundial, por meio de uma série de estudos realizados com voluntários (Freitas, 2003). Em 1973, o vírus da hepatite A (HAV) foi identificado e, em 1979, foi possível isolar o vírus em culturas de células. Em 1995, o órgão norte-americano *Food and Drug Administration* (FDA) licenciou uma vacina para prevenir a infecção pelo HAV (Swan e Raymond, 2004).

A hepatite A é endêmica em muitos países do mundo e uma vez a pessoa infectada com o HAV, a re-infecção não ocorre. Entretanto a hepatite A aguda pode ser fatal entre pessoas com infecções crônicas de hepatite B ou de hepatite C (Swan e Raymond, 2004).

Em 1965, B. S. Blumberg descobriu um antígeno, nomeado Antígeno Austrália, que posteriormente foi designado como antígeno de superfície (HBsAg) do vírus da hepatite B (HBV). Em 1968, o antígeno foi associado com o agente infeccioso responsável pelos casos de hepatite pós-transfusional. Atualmente, mais de 350 milhões de pessoas no mundo estão infectadas com hepatite B e 1,25 milhões de pessoas desenvolvem infecção crônica (Swan e Raymond, 2004).

Uma vacina para prevenir a infecção pela hepatite B tornou-se disponível em 1982 e desde 1991, o Conselho Americano para Práticas de Imunização tem recomendado a vacinação universal contra hepatite B para recém-nascidos e adolescentes. Em 2001, o FDA aprovou uma vacina combinada para proteger contra as infecções causadas pelo HAV e pelo HBV (Swan e Raymond, 2004).

Após a descoberta do HBsAg, a perspectiva de uma resolução definitiva para o grave problema da hepatite pós-transfusional foi adiada com os resultados obtidos em estudos prospectivos, onde ficou evidente que a introdução do rastreamento do antígeno na seleção de doadores de sangue reduzia somente 25% os casos de hepatite

pós-transfusional (Swan e Raymond, 2004; Freitas, 2003). E ainda, outros estudos alertaram para a elevada prevalência de hepatite quando se usava sangue de origem comercial e chamaram a atenção para o fato de o sangue do doador pago apresentar maior risco de transmissão de hepatite B pós-transfusional quando comparado com o sangue de doadores voluntários. A adoção da política de exclusão do sangue de doadores pagos teve uma repercussão muito maior na prevenção da hepatite do que o rastreio do HBsAg. A introdução de técnicas cada vez mais sensíveis na detecção deste antígenos permitiu reduzir progressivamente o risco de transmissão da hepatite B pós-transfusional até praticamente desaparecer no final dos anos 70 nos países desenvolvidos (Freitas, 2003).

No entanto, casos de hepatite continuaram a ocorrer em cerca de 5 a 10% dos doentes que recebiam sangue ou seus derivados (Freitas, 2003). A hipótese de que o responsável seria o então recém descoberto HAV foi verificada na época. A descoberta do HAV e a introdução de testes laboratoriais para sua detecção tornaram possível identificar os casos de hepatite pós-transfusional que não eram provocados pelo vírus HBV e, então, verificaram que o HAV estava ausente em todos esses casos (Freitas, 2003).

Um grupo de pesquisadores do Instituto Nacional de Saúde dos EUA (*National Institute of Health* - NIH), liderados por H. J. Alter, envolvidos no estudo desses casos decidiu então designar a doença por hepatite não-A, não-B (NANB). Na seqüência lógica da nomenclatura das hepatites, introduzida por MacCallum em 1947, chegou a ser considerado o nome de hepatite C, mas Purcell propôs que esse nome devia ser preterido enquanto não se esclarecesse se havia um ou mais vírus envolvidos. A designação hepatite NANB, introduzida em 1975, viria a manter-se durante 14 anos, tempo decorrido até a identificação do vírus da hepatite C (HCV) (Alter e Houghton, 2000; Freitas, 2003).

Estudos clínicos e epidemiológicos permitiram obter informação pormenorizada sobre muitos aspectos da hepatite NANB antes da identificação do HCV: o modo de transmissão; o freqüente aparecimento de casos esporádicos adquiridos na comunidade e sem registro de contato conhecido com sangue ou derivados; o período de incubação; a fase aguda, muitas vezes clinicamente assintomática; a elevada tendência de progressão para a hepatite crônica e para a cirrose (Freitas, 2003).

Embora a maioria das infecções NANB fosse identificada através dos aumentos nos níveis das enzimas hepáticas durante a infecção aguda, outras formas de diagnóstico envolviam os sintomas característicos desenvolvidos por parte das pessoas infectadas, como fadiga, febre, perda de apetite, náusea, vômitos e icterícia (Alter *et al.*, 1992; Koretz, 1993). Posteriormente, observou-se em muitos pacientes NANB a persistência dos valores elevados das enzimas hepáticas e, em alguns casos, graves lesões no fígado (Swan e Raymond, 2004).

Em 1978, foi demonstrado que a hepatite NANB de transmissão parentérica podia ser transmitida ao chimpanzé por meio de sangue infectado de doentes. A obtenção de um modelo animal foi determinante para o progresso dos estudos que viriam a culminar anos mais tarde na identificação do HCV (Freitas, 2003).

Pesquisadores do NIH organizaram um painel padrão de soroconversão de chimpanzés infectados e de humanos não infectados, contra os quais foram testados todos os possíveis suspeitos de serem o vírus não A, não B (Alter e Houghton, 2000). Os virologistas e imunologistas buscavam a detecção sorológica do agente causal, mas as técnicas convencionais não eram suficientemente sensíveis e específicas para tal (Freitas, 2003).

Finalmente, Michel Houghton e colaboradores (1989) da Chiron Corporation, Qui-Lim Choo, George Kuo e Daniel Bradley, após 7 anos de investigação, conseguiram, utilizando ferramentas de biologia molecular, a clonagem de fragmentos do genoma do HCV (Choo *et al.*, 1989) e o posterior desenvolvimento de um teste sorológico baseado na pesquisa de anticorpos contra antígenos do vírus (Alter *et al.*, 1989). A era pré-sorológica da hepatite NANB tinha terminado e um novo vírus, o HCV, era acrescentado ao grupo dos outros vírus hepatotrópicos até então conhecidos: HAV, HBV e HDV (vírus da Hepatite delta). A identificação do HCV por clonagem molecular direta do seu genoma, sem prévio conhecimento da natureza do agente infeccioso e da resposta imunológica envolvida, pela sua originalidade e importância, constituiu um marco na história da virologia, que abriu o caminho para a futura identificação de outros vírus (Freitas, 2003; Swan e Raymond, 2004).

Ao mesmo tempo, o estudo da infecção permitiu aprofundar o conhecimento da sua epidemiologia, vias de transmissão, história natural e outros aspectos que já tinham sido estudados relativamente à hepatite NANB. A hepatite NANB, de

transmissão parentérica, adquiriu oficialmente, em 1989, o nome que 14 anos antes, o grupo de pesquisadores do NIH tinha preterido: hepatite C. Cerca de um ano depois se identificou o vírus da hepatite NANB epidêmica, ou seja, o vírus da hepatite E (Freitas, 2003; Swan e Raymond, 2004).

No estudo pioneiro que identificou o HCV, um chimpanzé foi identificado com altos títulos de um agente que tinha capacidade de transmitir hepatite NANB. Do soro deste animal foi obtida uma suspensão que provavelmente continha o vírus causador da hepatite C. A partir do RNA extraído, foi sintetizado o DNA complementar (cDNA) e inserido em um clone vetor e expresso em *Escherichia coli*. A partir destes clones foram obtidas as proteínas expressadas e hibridizadas com soros de pacientes que apresentavam diagnóstico de hepatite NANB. Um único clone foi considerado reativo e sua clonagem e expressão em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* resultaram no antígeno C100-3. Esse antígeno foi o primeiro a ser utilizado em testes sorológicos para detecção de anticorpos contra o HCV. Novas gerações de testes, cada vez mais específicos e sensíveis têm sido descritos e pesquisados em todo o mundo (Kuo *et al.* 1989; Choo *et al.* 1991; Morton e Kelen 1998; Zein, 2000). A pesquisa por marcadores sorológicos prosseguiu, permitindo, dessa forma, avaliar parâmetros como prevalência, incidência e transmissão do HCV (Smith *et al.*, 1997; Choo *et al.*, 1989).

O desenvolvimento de testes sorológicos de grande sensibilidade e especificidade e sua implementação na seleção de doadores de sangue reduziu a zero a incidência da hepatite C pós-transfusional, nos Estados Unidos, em meados da década de 90. Estima-se que 40 000 infecções sejam evitadas anualmente. Esse teste é importante para o diagnóstico e tratamento dos pacientes com hepatite C (Freitas, 2003; Swan e Raymond, 2004).

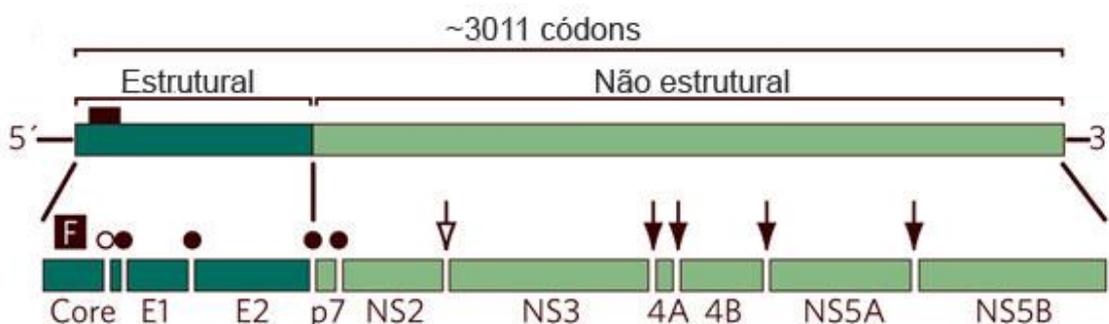
A infecção pelo HCV se torna crônica em pelo menos 80% dos pacientes e em 10% dos casos evolui para cirrose ou carcinoma hepatocelular (HCC). Aproximadamente, 20% dos portadores crônicos podem desenvolver cirrose hepática após 20 anos e 10% carcinoma hepatocelular após 30 anos do início da doença. Portanto, as conseqüências mais sérias da infecção pelo HCV se manifestam após um longo período evidenciando a necessidade de um diagnóstico precoce para esses pacientes assintomáticos. (Doorn *et al.*, 1996; Weber *et al.*, 1996).

## 1.2 O vírus da Hepatite C

O HCV é um vírus hepatotrópico, não-citopático pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Hepacivirus*. É transmitido por meio de exposição ao sangue ou derivados contaminados. Apesar de ser um flavivírus não se conhece vetor invertebrado e por ser um hepacivirus difere dos outros gêneros na sua inabilidade de ser propagado eficientemente em cultura de células (Fauquet *et al.*, 2005; Chisari, 2005).

Estudos de microscopia eletrônica demonstraram que o vírus apresenta forma esférica com aproximadamente 50 nm de diâmetro e contém um envelope lipídico. O capsídeo viral possui simetria icosaédrica e, aproximadamente, 30 nm de diâmetro (Fauquet *et al.*, 2005).

O HCV possui como material genético um RNA de fita simples (ssRNA) de polaridade positiva com aproximadamente 9,6 quilobases (kb). O genoma possui regiões não traduzidas nas porções 3' e 5' (*untranslated region* – UTR), que incluem elementos de controle necessários para a replicação e tradução (Lindenbach e Rice, 2005). As regiões UTR's flanqueiam uma fase de leitura aberta (ORF) que codifica uma única poliproteína de aproximadamente 3011 resíduos de aminoácidos. Essa poliproteína é processada por proteases do vírus e do hospedeiro em subunidades protéicas estruturais (*core*, E1, E2 e p7) e não-estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) (Penin, *et al.*, 2004) (Figura 1).



**Figura 1. Estrutura do genoma viral**, incluindo a longa fase de leitura aberta codificando genes estruturais e não-estruturais e 5' e 3'UTR's. O esquema de processamento da poliproteína são mostrados logo abaixo. Círculo claro é o sítio de atuação da peptidase celular; círculos escuros são sítios de atuação das peptidases virais; seta clara indica atuação da autoprotease NS2-NS3; e as setas escuras os locais de atuação da protease NS3-NS4A. (Adaptado de Lindenbach e Rice, 2005).

A região 5'UTR e o gene do *core* são os mais conservados, enquanto os genes do envelope, E1 e E2, apresentam regiões hipervariáveis (*Hypervariable Regions* - HVR) (Simmonds *et al.*, 1993; Doglio *et al.*, 1998; Zein, 2000).

### 1.3 O genoma do vírus da Hepatite C e as proteínas virais

A região 5'UTR possui uma seqüência de 341 nucleotídeos (nt) e apresenta estruturas secundárias e terciárias no RNA conhecidas como IRES (*Internal Ribosomal Entry Site* – Sítios internos de entrada ribossomal), essenciais para a tradução do genoma viral. Os IRES permitem a ligação direta da subunidade ribossomal 40S, não necessitando de fatores de pré-iniciação, fazendo que o códon de iniciação fique posicionado sob o sítio P (Appel *et al.*, 2006). O complexo IRES-40S recruta então o fator eucariótico de iniciação 3 (eIF-3) e o complexo ternário de Met-tRNA-eIF2-GTP para formar um intermediário 48S, antes da lenta transição cinética para o complexo traducional ativo 80S (Lindenbach e Rice, 2005).

A expressão das proteínas virais a partir do genoma monocistrônico é primariamente alcançada por meio da produção de uma poliproteína que é clivada proteoliticamente, em seguida, nas proteínas estruturais *core*, E1 e E2, no peptídeo hidrofóbico p7 e nas proteínas não estruturais NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B. As proteínas estruturais são clivadas por uma peptidase celular entre C/E1, E1/E2 e E2/p7 (Lindenbach e Rice, 2005; Appel *et al.*, 2006).

A primeira clivagem da poliproteína gera a proteína *core* (C) responsável pela formação do nucleocapsídeo. Alguns trabalhos relatam que a proteína *core* interfere no metabolismo intracelular de lipídeos e lipoproteínas, favorecendo o desenvolvimento de esteatose (Alberti e Benvegnù, 2003). Uma forma alternativa da proteína *core*, gerada por iniciação interna da tradução em uma fase alternativa de leitura, tem sido relatada. Essas proteínas, designadas ARF-P ou proteínas-F (*alternative reading frame* ou *frameshifting*), são dispensáveis para a replicação do RNA, pelo menos em cultura de células (Appel *et al.*, 2006).

Em seguida, ocorre a clivagem das proteínas do envelope E1 e E2. No gene que codifica a proteína E2, existem duas regiões hipervariáveis (HVR-1 e HVR-2) que apresentam uma grande variabilidade na seqüência devido às altas taxas de mutações (Locarnini, 2002).

p7 é um pequeno peptídeo hidrofóbico que tem atividade de canal iônico para os diferentes genótipos do HCV e sua necessidade para a replicação do HCV em chimpanzés confirma a proteína como um possível alvo para a quimioterapia antiviral, apesar de seu papel na replicação viral ser desconhecido (Sakai *et al.*, 2003).

A proteína não-estrutural NS2 associada com NS3 (Ns2/NS3 protease) é a primeira protease viral ativada no polipeptídeo e é responsável pela maturação das proteínas NS restantes (Dumoulin *et al.*, 2003). Até recentemente, algumas poucas propriedades foram atribuídas para a proteína NS2 clivada madura, visto que ela parece agir na inibição da apoptose, na modulação da expressão gênica e na fosforilação de NS5A (Franck *et al.*, 2005). A porção carboxi-terminal de NS2 possui uma tríade catalítica da enzima cisteíno-protease, necessária para a clivagem de NS2/3 (Lindenbach e Rice, 2005; Appel *et al.*, 2006).

NS3 é uma proteína multifuncional, com um domínio serino-protease na porção N-terminal e um domínio RNA helicase/ NTPase na porção C-terminal (Lindenbach e Rice, 2005; Appel *et al.*, 2006). Não se sabe qual o papel da helicase do HCV, mas possivelmente ela está envolvida na iniciação da síntese de RNA, atuando na dissociação das fitas nascentes de RNA de seus moldes ou no deslocamento de proteínas ou de outro fator *trans*-atuante do genoma de RNA (Pang *et al.*, 2002)

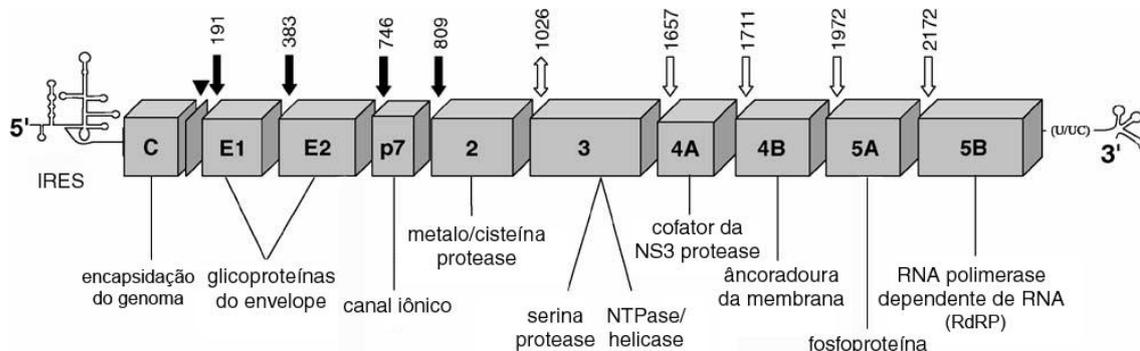
Embora NS3 possua uma atividade proteolítica intrínseca, a clivagem da poliproteína é fortemente reforçada pelo co-fator NS4. Este pequeno peptídeo ancora a protease às membranas intracelulares por meio de um segmento transmembrana N-terminal presente em NS4A; estabiliza a protease contra a degradação proteolítica; e ativa a protease mudando sua geometria e intercalando domínios de NS4A (Lindenbach e Rice, 2005).

NS5A interage com muitas proteínas celulares e sua função ainda não é completamente definida. Ela é fosforilada em vários resíduos de serina por uma cinase celular e pode ser encontrada nas formas hipofosforilada (56 kDa) e hiperfosforilada (58 kDa). Ainda não está claro quais cinases estão envolvidas, nem quais sítios de fosforilação são funcionalmente relevantes (Appel *et al.*, 2006).

NS5B é fundamental para a maquinaria de replicação do RNA viral, pois codifica a RNA polimerase dependente de RNA (RdRP). A iniciação da síntese dependente de RNA e não dependente de iniciador com um complexo multiprotéico (replicase) foi demonstrada para essa proteína (Lindenbach e Rice, 2005; Appel *et al.*, 2006).

A região 3'UTR apresenta uma região variável com aproximadamente 40nt ligada à seqüência codificante do genoma do HCV, um segmento rico em polipirimidina com aproximadamente 100nt e uma região terminal altamente

conservada de 98nt designada cauda-X (Appel *et al.*, 2006). Todas as atividades das enzimas virais, o gene p7 e as regiões 5' e 3' UTR necessárias para a replicação viral *in vivo* são apresentados na Figura 2.



**Figura 2. Organização do genoma do HCV com as funções de cada gene.** IRES, sítio interno de entrada do ribossomo. A primeira seta escura indica o sítio de clivagem de protease do hospedeiro, as demais setas escuras e claras indicam os sítios de clivagem das proteases virais. Os números acima da figura indicam as posições de aminoácidos no genoma do protótipo 1b HCV-J (Adaptado de Hofmann *et al.*, 2005)

O entendimento acerca do ciclo de replicação do HCV e da composição molecular das partículas virais ainda continua hipotético. Entretanto, detalhes do ciclo começam a emergir devido à disponibilidade de eficientes sistemas *in vitro*, mais notavelmente o sistema de *replicon* do HCV (Lohmann *et al.*, 1999; Blight *et al.*, 2000), pseudopartículas de HCV (Hsu *et al.*, 2003) e, mais recentemente, o primeiro sistema para produção eficiente de HCV infeccioso em culturas de células (Zhong *et al.*, 2005; Liendenbach *et al.*, 2005). Como os componentes mínimos necessários para a replicação e tradução do RNA-HCV estão nas regiões codantes NS3 a NS5B e das não codantes UTR's os estudos acabam se concentrando nessas regiões (Appel *et al.*, 2006).

#### 1.4 A diversidade genética do vírus da Hepatite C e os subtipos virais

A diversidade genética é um dos fatores mais importantes do genoma do HCV (Zein, 2000). O vírus da hepatite C pode ser filogeneticamente classificado em 6 clados, baseados na heterogeneidade do genoma de isolados identificados pelo mundo (Fauquet *et al.*, 2005). O HCV é classificado em genótipos e subtipos de acordo com a homologia de seqüências completas do genoma viral ou das regiões genômicas 5'UTR, *core*, E1 ou NS5B (Bukh *et al.*, 1993; Simmonds *et al.*, 1996; Thiers *et al.*, 1997). Os genótipos são numerados de 1 a 6 e divergem entre, aproximadamente, 25 e 35% nas seqüências de nucleotídeos. Genótipos de 7 a 11

foram descritos, mas análises genéticas mais extensivas concluíram que os genótipos 7, 8, 9 e 11 pertenciam ao genótipo 6 e o genótipo 10 pertencia, na verdade, ao genótipo 3. Os 6 genótipos são subdivididos em mais de 50 subtipos, que diferem entre si em, aproximadamente, 15 a 25% na seqüência de nucleotídeos (Fauquet *et al.*, 2005).

A elevada taxa de replicação viral e a ausência de mecanismos de revisão dos erros da polimerase viral explicam a modificação freqüente do RNA genômico do HCV. Uma grande população de HCV se replicando em um indivíduo infectado cronicamente produz um aglomerado de variantes genéticas denominados *quasispecies*, cada um com um genoma viral individual. A diversidade das *quasispecies* de HCV pode contribuir para o desenvolvimento de uma infecção crônica e para o escape do sistema imune. Isso porque as proteínas do envelope mudam rapidamente em resposta à pressão imune (Hoofnagle *et al.*, 2002).

Tem sido sugerido que a infecção primária por HCV constitui um evento oligoclonal no qual a adaptação do HCV para a persistência *in vivo* envolve um aumento seletivo do número de poucas variantes do amplo espectro da população de *quasispecies*, provavelmente representando a contraparte da adaptação viral para cada hospedeiro. Recentemente, a análise filogenética usando seqüências 5'UTR de isolados do genótipo 1 no Uruguai, Chile, Brasil e Costa Rica revelou uma *quasispecie* diferente das encontradas nos principais subtipos (1a e 1b), indicando um aumento da diversificação dos vírus HCV nessa região (Cristina, 2005).

A investigação da evolução das *quasispecies* do HCV na população de indivíduos co-infectados com HIV-1 (*Human immunodeficiency virus*) e com HCV tem apresentado resultados conflitantes. Quando comparados com controles infectados apenas com HCV, indivíduos co-infectados com HIV-1/HCV apresentam maior diversidade de *quasispecies* (Bowen e Walker, 2005; Cristina, 2005; Swan e Raymond, 2004).

Por outro lado, outros estudos com indivíduos co-infectados sugerem que a diversidade de *quasispecies* diminui com a imunossupressão e com menor variação das células CD4<sup>+</sup> (Bowen e Walker, 2005; Cristina, 2005).

A associação entre o aumento da carga viral de HCV e o aumento da diversidade das *quasispecies* pode ser explicada pela evolução adaptativa do HCV em resposta à pressão imune ou seja, mutantes gerados nesse ambiente que conseguem escapar do

sistema imune podem se replicar mais livremente resultando na elevação da carga viral. Por outro lado, uma resposta imune menos robusta não seleciona os mutantes que escapam por meio de seu desempenho de replicação e, então, pacientes com menor carga viral do HCV apresentam uma menor diversidade de *quasispecies* (Bowen e Walker, 2005).

O aumento da diversidade de *quasispecies* do HCV com a pressão imune está de acordo com o que já foi descrito para a evolução de *quasispecies* do HIV-1 durante o curso da mono-infecção com HIV-1. Wolinsky *et al.* (1996) demonstraram que em indivíduos HIV-1 como positivos, a rápida diminuição na contagem de células CD4<sup>+</sup> está associada com uma estagnação evolutiva do HIV-1; enquanto que uma menor perda da contagem de células CD4<sup>+</sup> está associada com um acúmulo de mutações e, em particular, substituições não-sinônimas, indicando que a pressão seletiva exerce um importante papel na evolução das *quasispecies* do HIV-1. Assim, HCV e HIV-1 agem de modo semelhante na resposta à pressão imune, ou seja, uma maior competência imunológica está associada ao aumento adaptativo na diversidade genética e evolução de ambos os vírus (Babik e Holodniy, 2003).

## **1.5 Epidemiologia do vírus da Hepatite C**

Os genótipos de HCV apresentam diferença na distribuição geográfica (Figuras 3 e 4), na progressão da doença e na resposta à terapia (Figura 5) (Zein, 2000; Feld e Hoofnagle, 2005), além de apresentar associação com grupos de risco específicos (Simmonds, 2004).

O genótipo 1 é o mais prevalente nas Américas do Sul e Central região do Caribe (Zein, 2000), os subtipos 1a e 1b os mais comuns nos Estados Unidos e Norte da Europa, os subtipos 2a e 2b são comuns na América do Norte, Europa e o genótipo 3 é mais freqüente na Índia. O genótipo 4 é o mais comum na África e no Oriente Médio. Os genótipos 5 e 6 são raros e encontrados em áreas geográficas isoladas, o genótipo 5 na África do Sul e o genótipo 6 em Hong Kong e Sudeste Asiático (Hoofnagle *et al.*, 2002; Zein, 2000). No Japão o subtipo 1b é responsável por 75% das infecções pelo HCV, mas também são encontrados os genótipos 2a e 2b. Nos Estados Unidos e Europa, os genótipos 3a e 1a são os mais freqüentes entre os usuários de drogas e o genótipo 1b parece ser o que predomina em pacientes que adquiriram HCV por meio de transfusão, na maioria dos casos evoluindo para a

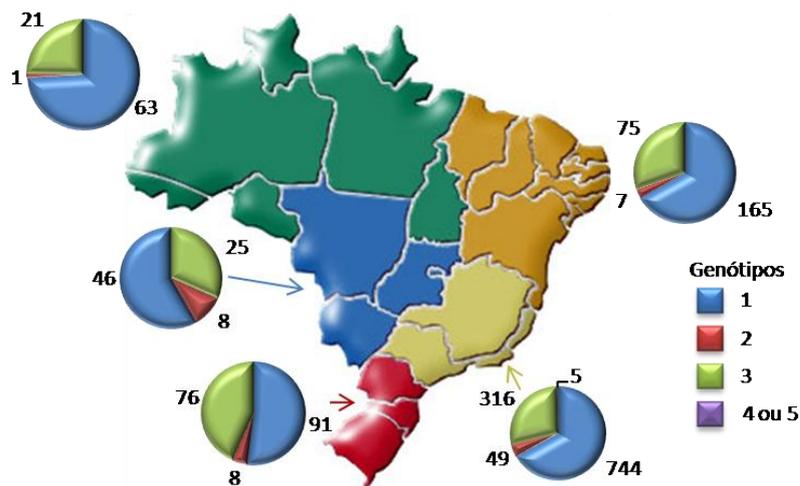
infecção crônica e resistência ao tratamento com interferon (Zein, 2000; Carvalho, 1999).



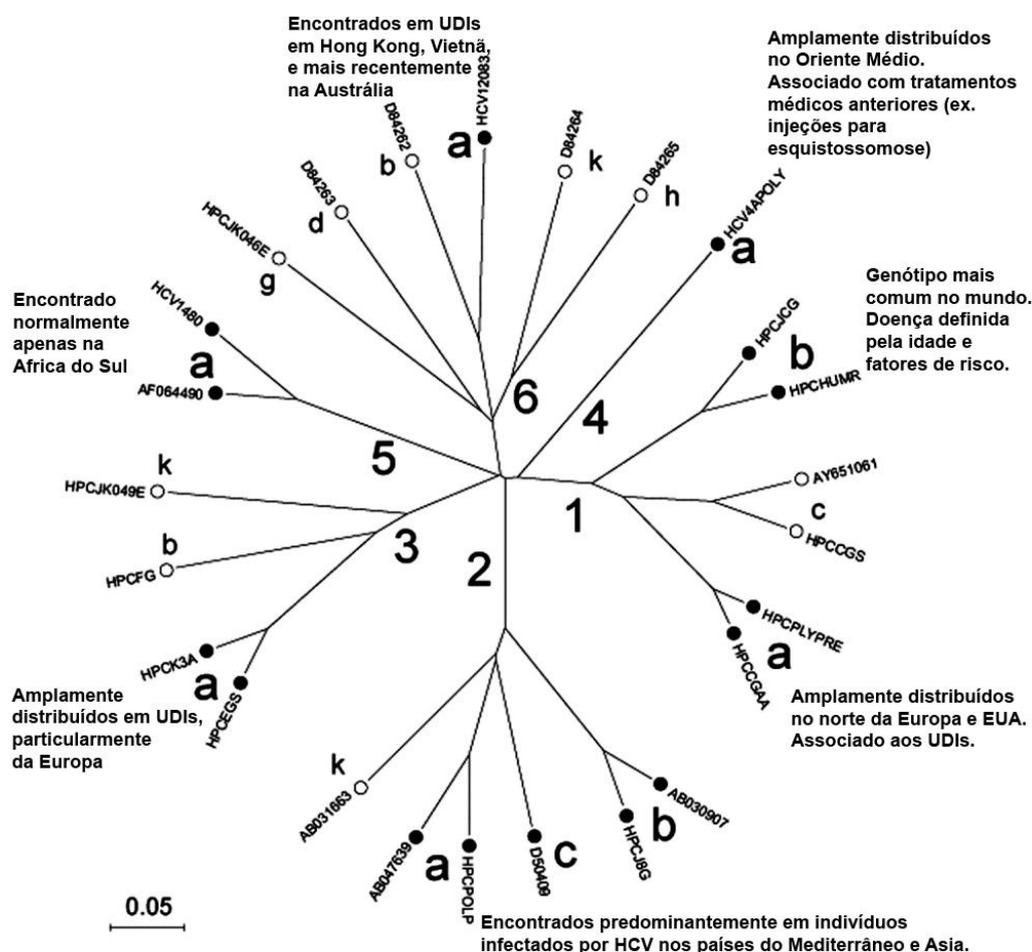
**Figura 3. Distribuição dos diferentes genótipos do HCV no mundo.** Os diferentes genótipos e subtipos do vírus da hepatite C (HCV) apresentam distribuição geográfica distinta, com os genótipos 1, 2 e 3 apresentando distribuição mundial e os outros genótipos distribuição limitada, sendo o genótipo 4 mais comum na África e Oriente Médio e os genótipos 5 e 6 raros e encontrados em áreas geográficas isoladas, o genótipo 5 na África do Sul e o genótipo 6 em Hong Kong e Sudeste Asiático. Fonte: <http://www.clevelandclinicmeded.com/hcv/print/phcvimages.htm> (com adaptações).

No entanto, diferenças na distribuição genotípica podem ser observadas em diferentes áreas da região bem como em diferentes áreas em um país. No Brasil, estudos de genotipagem foram realizados nas regiões Sudeste (Rio de Janeiro e São Paulo), Sul (Porto Alegre) e Nordeste (Natal, Salvador e Recife) (Amorim, 2003; Campiotto *et al*, 2005) encontrando diferentes prevalências do HCV nas diferentes populações anti-HCV soropositivas (Figura 4). Algumas variações são encontradas na distribuição do subtipo 3a na população jovem, principalmente entre os usuários de drogas intravenosas (Farci *et al.*, 2000; Zein, 2000; Pybus *et al.*, 2001).

Amorim (2003) caracterizou os genótipos do HCV em doadores de sangue no Distrito Federal e observou uma prevalência de 60,9% para o genótipo 1 e 39,1% para o genótipo 3 (Amorim, 2003).



**Figura 4. Distribuição dos genótipos de hepatite C nas diferentes regiões do Brasil.** Os números ao lado dos gráficos representam o número absoluto de casos de cada genótipo em cada uma das regiões. Fonte: Campiotto *et al*, 2005 (com modificações).



**Figura 5. Filogenia do HCV.** A análise filogenética foi realizada com seqüências codantes completas dos diferentes genótipos do HCV. Os grupos de risco identificados para cada genótipo (UDI's, receptores de sangue ou derivados não triados, outras exposições parenterais) foram indicados com círculos escuros e texto. A árvore foi construída por *neighbor-joining* e implementada no conjunto de programas MEGA, usando correções de distância Jukes-Cantor (Adaptado de: Simmonds *et al.*, 2005).

Outras diferenças na distribuição podem ser observadas entre isolados de HCV na América Central e do Sul, onde o genótipo 1 é o mais prevalente, em comparação com isolados da região do Caribe onde os genótipos 2 e 4 prevalecem (Zein, 2000).

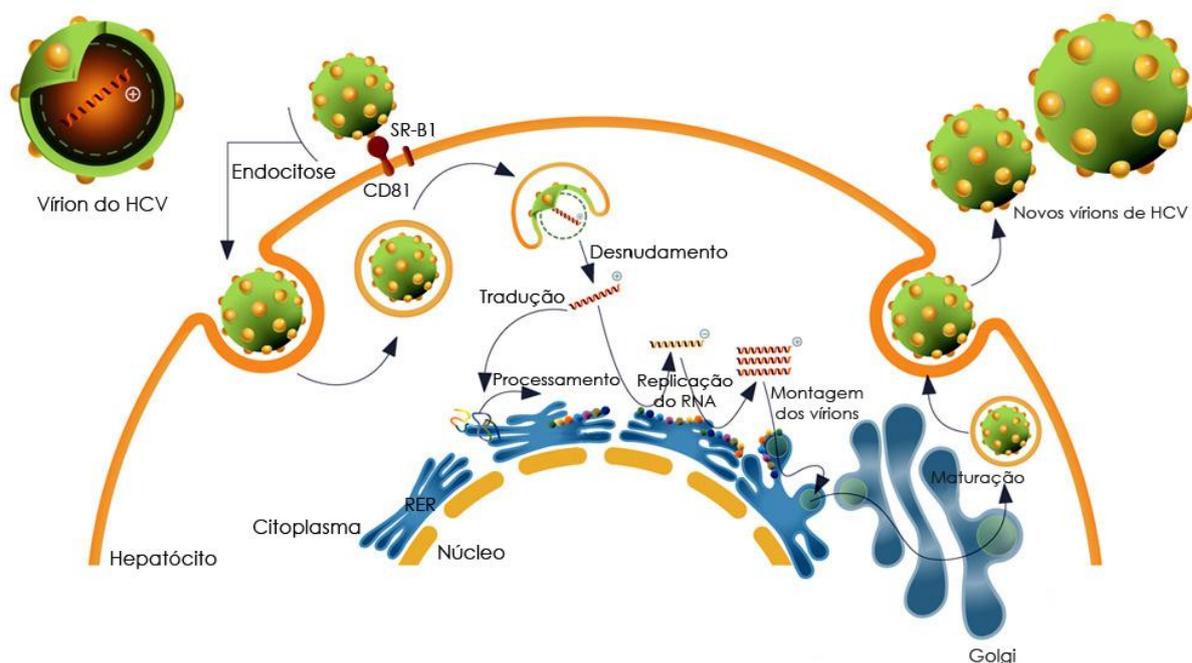
## **1.6 A replicação do vírus da Hepatite C**

Como todo vírus de RNA de fita positiva, a replicação do RNA-HCV ocorre em associação com membranas citoplasmáticas alteradas. A atividade associada do RNA-HCV, das proteínas NS e RdRP às estruturas vesiculares foi denominada *membranous web*, conforme observado em hepatócitos infectados pelo HCV e em sistemas de *replicon* do HCV. Experimentos recentes têm fornecido mais dados acerca da relação entre membranas celulares, metabolismo de lipídeos e replicação do RNA-HCV. Em cultura de células, a replicação do RNA-HCV é estimulada pelo aumento da disponibilidade de ácidos graxos saturados e monosaturados e inibida pelos ácidos graxos poliinsaturados ou por inibidores de síntese de ácidos graxos. Estes resultados sugerem que a fluidez da membrana é importante para o funcionamento da *membranous web*. (Lindenbach e Rice, 2005; Appel *et al.*, 2006).

Uma área bastante explorada atualmente tem sido a delimitação dos elementos de RNA *cis*-atuantes que orientam a replicação viral. Quase toda a região de 5'UTR é necessária para a eficiente amplificação do RNA. Como essa região apresenta os IRES, existe um interesse considerável no entendimento de como essa região pode modular a tradução e replicação, que não ocorrem simultaneamente no mesmo RNA molde (Lindenbach e Rice, 2005; Appel *et al.*, 2006).

Pouco se sabe a respeito da síntese de RNA-HCV no complexo de replicação. Por inferência, a partir do conhecimento de vírus relacionados, a síntese de RNA parece ser semiconservativa e assimétrica: a fita positiva do genoma serve de molde para a síntese de um intermediário de fita negativa que serve como molde para a produção de vários genomas nascentes. Evidências sugerem que apenas uma pequena fração das proteínas NS participa ativamente da replicação do RNA (Lindenbach e Rice, 2005; Appel *et al.*, 2006).

A figura 6 apresenta um esquema do modelo hipotético da replicação do HCV em hepatócitos.



**Figura 6. Ciclo de replicação hipotético do HCV.** Partículas de HCV se ligam à célula hospedeira via interação específica entre as glicoproteínas do envelope e receptores celulares. As partículas ligadas são então internalizadas, provavelmente por meio de endocitose mediada pelo receptor. Após a liberação do genoma viral no citoplasma (desnudamento) ocorre a tradução, no retículo endoplasmático rugoso (RER) em uma poliproteína que é clivada nas proteínas estruturais e não estruturais. As proteínas não estruturais participam da replicação viral e as estruturais fazem parte da estrutura do capsídeo e glicoproteínas do envelope. O local da montagem das partículas virais ainda não foi identificado, mas acredita-se que seja em membranas intracelulares derivadas do retículo endoplasmático ou do compartimento de Golgi. Os vírions recém-montados são então liberados da célula hospedeira possivelmente por meio da via secretória. Fonte: [http://www.tibotec.com/content/backgrounders/www.tibotec.com/hcv\\_lifecycle.html](http://www.tibotec.com/content/backgrounders/www.tibotec.com/hcv_lifecycle.html) (com adaptações).

## 1.7 Modelos de estudo da replicação do vírus da Hepatite C

Importantes questões acerca da natureza das partículas infecciosas do vírus, das vias de entrada do vírus e da montagem das proteínas estruturais e do RNA em novas partículas virais ainda não estão completamente esclarecidas. O principal obstáculo para o entendimento do ciclo de replicação do vírus e para o desenvolvimento de terapias está na inabilidade de se isolar o HCV eficientemente em cultura de células (Lindenbach *et al.*, 2005). Numerosos modelos *in vitro* para investigação da replicação do HCV têm sido desenvolvidos. Entretanto, até recentemente não existia um modelo *in vitro* no qual o ciclo de replicação do HCV pudesse ser estudado por meios bioquímicos diretos (Sheehy *et al.*, 2007).

A expressão e o processamento dos produtos de genes estruturais foram caracterizados em estudos de expressão heteróloga. A proteína E2 se liga com alta

afinidade ao receptor celular CD81, uma tetraspanina que é expressa em vários tipos de células, incluindo hepatócitos. Embora seu padrão de expressão não explique o hepatotropismo do HCV, CD81 parece estar envolvida na mediação da entrada do HCV. Vários outros receptores de HCV foram identificados, incluindo receptores de lipoproteínas de baixa densidade (Bartosch e Cosset, 2006). Vários sistemas hospedeiros têm sido desenvolvidos para examinar a relevância dessas interações e para estudar a estrutura e função de E1/E2, no entanto, o uso de pseudopartículas de lentivírus (HCVpp) fornece a melhor compreensão da entrada do HCV na célula. HCVpp infectam hepatócitos humanos primários e uma variedade de linhagens celulares hepáticas e sua entrada é dependente de CD81. A expressão de CD81 não é suficiente para a entrada do HCV em células não-hepáticas, sugerindo a existência de uma ou mais moléculas ainda não identificadas necessárias para a entrada e o hepatotropismo do HCV (Swan e Raymond, 2004; Lindenbach *et al.*, 2005; Bartosch e Cosset, 2006; Appel *et al.*, 2006;).

Vários estudos têm demonstrado que o HCV pode infectar linhagens de hepatócitos e de células T e B, porém geram uma infecção passageira e de baixo desempenho. A infecção *in vitro* de células de mamíferos com partículas do HCV não resulta em uma replicação com desempenho suficiente para os estudos identificarem agentes antivirais ou delinear as fases do ciclo de replicação do HCV. Dessa forma modelos sustentáveis para a replicação do HCV dependem de estratégias que envolvam manipulação genética do genoma do HCV (Sheehy *et al.*, 2007).

A produção de vírus infecciosos em células transfectadas com RNA foi descrito para vírus de RNA de fita positiva e, no caso do HCV, foi descrito um modelo de replicação após a transfecção de linhagens de células de hepatomas com transcritos de RNA-HCV. A construção de clones moleculares de HCV com seqüência consenso de aminoácidos do genótipo 1a (isolado Hutchinson 77 ou H77) levou à primeira demonstração da natureza infecciosa de transcritos sintéticos de RNA-HCV em chimpanzés. Apesar do pioneirismo desses estudos, limitações no curso variável da infecção do HCV e no risco requerido para realizá-los requerem o desenvolvimento de modelos mais práticos para futuros estudos da replicação do HCV (Swan e Raymond, 2004; Lindenbach *et al.*, 2005; Bartosch e Cosset, 2006; Appel *et al.*, 2006; Sheehy *et al.*, 2007).

Modelos *in vitro* onde ocorrem expressão de clones moleculares de HCV em linhagens de células de mamíferos foram obtidos nos últimos anos e esses modelos são úteis para o estudo do RNA-HCV, caracterização do efeito da expressão do mRNA celular durante a síntese das proteínas do HCV, análise da interferência do interferon na sinalização celular e investigação das propriedades/funções de várias proteínas do HCV. No entanto, algumas limitações ainda precisam ser superadas como, por exemplo, a dificuldade de transmitir a infecção para células não infectadas e tornar a expressão de proteínas não tóxica para a cultura de células (Swan e Raymond, 2004; Lindenbach *et al.*, 2005; Bartosch e Cosset, 2006; Appel *et al.*, 2006; Sheehy *et al.*, 2007).

A descrição da replicação autônoma de um *replicon* de HCV foi a primeira demonstração de uma replicação do HCV *in vitro* com bom desempenho e representa o caminho mais promissor para o delineamento de muitos processos do ciclo de replicação viral. O desenvolvimento do *replicon* de HCV fundamenta-se na capacidade de replicação autônoma *in vitro* de regiões subgenômicas do genoma de flavivírus e no uso de marcadores em clones moleculares de flavivírus que permitem a seleção de células que possuem níveis elevados de replicação viral. Várias evidências demonstraram que o *replicon* subgenômico de RNA-HCV em células Huh-7 representa um modelo para o estudo da replicação e da expressão das proteínas virais. Os níveis de replicação do HCV parecem estar ligados aos níveis de crescimento da célula hospedeira, sendo os maiores níveis de RNA-HCV encontrados nas células que crescem exponencialmente. Apesar dos bons resultados, limitações experimentais existem nesse modelo. *Replicons* de RNA-HCV somente se replicam com maior eficiência em células Huh-7, apresentam mutações adaptativas que não ocorrem freqüentemente nos genomas do HCV e que podem responder diferentemente à agentes antivirais comparado com o tipo selvagem do HCV, e podem diminuir os níveis de infectividade do HCV em chimpanzés. No entanto, ainda assim *replicons* de RNA-HCV representam o principal avanço no estudo da biologia molecular do HCV (Bartosch e Cosset, 2006; Sheehy *et al.*, 2007).

Recentemente, foram desenvolvidos *replicons* subgenômicos do HCV derivados de uma seqüência de genótipo 2a, isolado de um paciente japonês com hepatite fulminante (denominado JFH-1). Esse modelo constitui uma poderosa ferramenta para o estudo do ciclo de replicação e para o desenvolvimento de novas estratégias

antivirais contra o HCV (Lindenbach *et al.*, 2005; Bartosch e Cosset, 2006; Sheehy *et al.*, 2007). Contudo, estudos estruturais e bioquímicos das proteínas virais bem como análises moleculares da replicação do RNA viral estão entre os maiores desafios (Lindenbach e Rice, 2005; Appel *et al.*, 2006).

## **1.8 A transmissão do vírus da Hepatite C**

Os principais fatores citados associados à transmissão do HCV são as transfusões de sangue ou hemoderivados, uso de drogas injetáveis, uso de materiais perfuro-cortantes não esterilizados e uso de órgãos transplantados de doadores infectados. Em países desenvolvidos o uso de drogas injetáveis, nas últimas décadas, tem sido o principal fator de novas infecções pelo HCV. Nos países em desenvolvimento, injeções terapêuticas não esterilizadas e transfusões de sangue e derivados contaminados são os principais modos de transmissão, especialmente nos países onde as taxas de soroprevalência idade-específica sugerem um risco crescente da infecção pelo HCV. Nos países desenvolvidos com elevada prevalência do HCV em grupos de idosos, o uso de injeções terapêuticas não esterilizadas provavelmente teve um papel fundamental na transmissão 30-50 anos atrás (Zein, 2000; Shepard *et al.*, 2005).

Em muitos países em desenvolvimento, o fornecimento de seringas estéreis pode não ser adequado ou ser inexistente e, ainda, injeções não esterilizadas podem ser utilizadas para aplicar medicações que poderiam ser administradas por via oral. Neste ambiente, pessoas podem ter contato com várias injeções contaminadas ao longo do tempo, promovendo um risco cumulativo para infecção pelo HCV. Equipamentos de injeção contaminados constituem o principal fator de risco para infecção do HCV em vários países, incluindo nações populosas como Egito, Índia, Paquistão e Taiwan (Shepard *et al.*, 2005).

A transfusão de sangue é um meio extremamente eficaz de transmissão do HCV. Na maioria dos países desenvolvidos, várias medidas tomadas nas últimas quatro décadas resultaram em uma redução no risco de infecções do HCV transmitidas por meio de transfusões. Entre as medidas adotadas estão inclusas a adoção de sistema de doador voluntário, triagem do sangue doado com testes laboratoriais para doenças hepáticas, triagem de potenciais doadores baseada em respostas de questões relativas

aos fatores de risco do HIV-1, testes anti-HCV e testes para RNA do HCV, HIV-1 e HBV (Freitas, 2003; Shepard *et al.*, 2005).

Muitos países em desenvolvimento não fazem triagem para o HCV nas doações de sangue. O Banco de Dados Global para Segurança do Sangue, órgão da Organização Mundial de Saúde, estima que 43% das doações de sangue não são triadas adequadamente para as infecções transmitidas por transfusão, incluindo o HCV. Na Índia, a triagem para o HCV em produtos sanguíneos é determinada por lei, mas não é cumprida devido aos custos financeiros envolvidos. Em Gana, estima-se que um terço das 2578 doações é contaminado com HCV (Shepard *et al.*, 2005).

A transmissão do HCV por meio ocupacional, perinatal e exposição sexual ocorre com uma prevalência menor quando comparada com a transmissão por meio de grandes ou repetidas exposições percutâneas. A transmissão ocupacional do HCV entre os profissionais na área de saúde apresenta baixos níveis, em torno de 0,3% e, normalmente, envolvem contaminações por materiais perfuro-cortantes. A transmissão perinatal é estimada entre 2,7% e 8,4%; e a proporção é maior no caso de mães co-infectadas com HIV-1/HCV. A transmissão sexual entre parceiros infectados ou entre múltiplos parceiros tem sido um fator de risco para essa forma de transmissão do HCV, que é menos eficiente quando comparada com outros vírus transmitidos sexualmente. Outros modos de transmissão incluem procedimentos cosméticos e religiosos ou práticas culturais como tatuagem, *body-piercing*, barbeamento comercial, rituais de escarificação, circuncisão e acupuntura (Zein, 2000; Shepard *et al.*, 2005).

No entanto, em 20-40% das infecções não se identifica um fator clássico associado à transmissão do HCV. Em um estudo caso-controle realizado por Karmochkine *et al.* (2006), os autores identificaram 15 novos fatores de risco independentes para a infecção pelo HCV em indivíduos sem um fator de risco padrão. O estudo concluiu que internação hospitalar, endoscopia digestiva, alguns procedimentos dermatológicos e uso de cocaína por via intra-nasal são os fatores de risco mais importantes para aquisição de HCV na comunidade em geral e que outros fatores menos reconhecidos tais como prática de esportes violentos, uso regular de manicure, depilação em salão de beleza e procedimentos dermatológicos também parecem estar envolvidos. Todos esses fatores explicam 74% das rotas não identificadas de infecção pelo HCV.

## 1.9 O diagnóstico laboratorial do vírus da Hepatite C

O HCV pode ser diagnosticado por meio de testes imunoenzimáticos de segunda e terceira geração que podem detectar os anticorpos após 4-12 semanas, mas o padrão-ouro, em termos de sensibilidade e especificidade, no diagnóstico da infecção pelo HCV, particularmente em populações imunodeprimidas, é o RT-PCR. Como o RNA-HCV pode ocasionalmente não ser detectado, decisões de diagnóstico e tratamento não devem ser embasadas nos resultados de um único resultado de RT-PCR. As RT-PCRs qualitativas são ferramentas importantes porque são significativamente mais sensíveis que a maioria dos testes quantitativos. Atualmente a sensibilidade destes ensaios é de 50 cópias de UI/mL. A especificidade destes ensaios excede a 99%. Um único teste positivo para o RNA-HCV confirma a replicação ativa do HCV, mas um resultado negativo isolado não garante que o paciente não seja virêmico. Nesse caso, um seguimento clínico-laboratorial com a pesquisa do RNA-HCV deverá ser feito para confirmar a ausência de replicação ativa do HCV. Uma vez confirmada a infecção pelo HCV, a repetição do teste qualitativo para o RNA-HCV, em pacientes em seguimento clínico, porém sem tratamento, não apresenta nenhuma utilidade diagnóstica. A maioria dos pacientes permanece virêmico e um resultado negativo pode apenas refletir um declínio transiente da carga viral abaixo do limite de detecção do ensaio utilizado (Davies, 2005).

A caracterização molecular do HCV pode ser realizada pela análise direta da seqüência genômica ou pela hibridização reversa sobre sondas de oligonucleotídeos genótipo-específico. A hibridização reversa é um teste comercial que permite a determinação fácil e rápida dos seis genótipos e seus subtipos. O ensaio é baseado nas variações encontradas na região 5'UTR de diferentes genótipos do HCV. Este ensaio permite a interpretação em 100% dos casos. O teste de genotipagem apresenta importância clínica, principalmente em relação ao tempo e resposta à terapia com interferon (Zein, 2000; Davies, 2005).

Diferente dos testes de RNA-HIV-1, os testes quantitativos de RNA-HCV não fornecem informações prognósticas para a hepatite C (Davies, 2005). Tanto o nível da enzima hepática alanina aminotransferase (ALT) quanto o nível do RNA-HCV não permitem indicar ou prever com clareza a gravidade da doença hepática e ambos não apresentam o mesmo grau de confiabilidade dos marcadores do hospedeiro utilizados para guiar o tratamento do HIV-1. E ainda, pessoas com níveis normais de

ALT podem apresentar sérios danos hepáticos e mesmo as drogas anti-retrovirais podem elevar os valores de ALT (Davies, 2005).

Embora as análises por meio de ultra-som e de painéis de biomarcadores sorológicos forneçam alternativas aos procedimentos invasivos, eles ainda não foram validados em pacientes co-infectados com HIV-1/HCV. A biópsia do fígado tem sido usada para avaliar o dano hepático embora seu uso deva ser criterioso por ser um teste invasivo (Davies, 2005).

### **1.10 A genotipagem do vírus da Hepatite C**

As regiões genômicas mais utilizadas para genotipagem são 5'UTR, *core*, E1 e NS5B (Zein, 2000; Erensoy, 2001; Corbet *et al.*, 2003; Busek e Oliveira, 2003). A região 5'UTR é a mais conservada do genoma e por isso muito usada para diagnóstico e genotipagem. No entanto, essa região não diferencia o subtipo 1a do subtipo 1b, por apresentar apenas uma diferença nucleotídica na posição -99 com uma adenina (A) no subtipo 1a ou uma guanina (G) no subtipo 1b (Chen e Weck, 2002; Corbet *et al.*, 2003). Assim, a análise da seqüência de mais de uma região pode ser necessária para a discriminação dos subtipos (Erensoy, 2001).

Alguns genótipos do HCV parecem estar relacionados a uma resposta virológica sustentada após o tratamento. Indivíduos infectados com os genótipos 2 e 3 do HCV respondem melhor ao tratamento que indivíduos infectados com os genótipos 1 e 4. A genotipagem de todos os indivíduos precisa ser realizada ao tempo do primeiro diagnóstico e em casos onde a exposição ao HCV for suspeita, o genótipo pode variar ao longo do tempo por meio de re-infecção e por isso precisa ser testado periodicamente (Davies, 2005).

A genotipagem do HCV é clinicamente significativa, pois indivíduos com genótipos 1a, 1b, 4 e 5 não apresentam respostas satisfatórias ao tratamento com interferon (Zein *et al.*, 1996a; Poynard *et al.*, 1998; Mondelli e Silini, 1999; Neumann *et al.*, 2000; Fried *et al.*, 2002; Swan e Raymond, 2004). A infecção pelo genótipo 1 também está associada com altos níveis de RNA-HCV (Blatt *et al.*, 2000; Swan e Raymond, 2004). A infecção com o subtipo 1b pode aumentar a probabilidade de infecção crônica (Amoroso *et al.*, 1998; Swan e Raymond, 2004) e está associada com doenças do fígado mais agressivas e mais graves, porém essa associação apresenta resultados controversos em diferentes estudos (Takahashi *et al.*, 1996; Yano *et al.*,

1993; Yotsuyanagi *et al.*, 1995; Zein *et al.*, 1996b; Reide *et al.*, 1999; Swan e Raymond, 2004). Casos de re-infecção e co-infecção com mais de um genótipo do HCV foram documentados, embora o impacto clínico dessa infecção mista ainda não esteja claro (Swan e Raymond, 2004).

A determinação do genótipo do HCV é importante nos pacientes co-infectados com HIV-1. Em um estudo com pacientes co-infectados Fried *et al.* (2002) mostraram que a prevalência dos genótipos 1, 2, 3 e 4 foi de 60%, 12%, 28% e 8%, respectivamente. Comparativamente, em outro estudo, Torriani *et al.* (2004) evidenciaram que pacientes mono-infectados com HCV apresentaram prevalência de 65% para o genótipo 1, 12% para o genótipo 2, 19% para o genótipo 3 e 3% para o genótipo 4. Dados da influência do genótipo do HCV na doença são limitados. Pacientes hemofílicos HIV-1 soropositivos, infectados com HCV genótipo 1, apresentam maior mortalidade do que indivíduos infectados com outros genótipos do HCV (Yoo *et al.*, 2005).

As infecções com mais de um genótipo do HCV parecem ser comuns (>10%) em pacientes co-infectados com HIV-1/HCV, particularmente em usuários de drogas intravenosas e hemofílicos (Forns e Costa, 2006).

### **1.11 A hepatite C**

O curso da infecção aguda do HCV é normalmente assintomático, embora possam ser observados os sintomas típicos de hepatite como icterícia (em cerca de 20% dos pacientes), anorexia, mal-estar e elevação das enzimas transaminases hepáticas. Elevados níveis de viremia são observados, com mais de 10 trilhões de partículas virais sendo produzidas por dia (comparada com os 10 bilhões de partículas por dia do HIV-1). Se o HCV for eliminado espontaneamente e a carga viral tornar-se indetectável, os níveis de enzimas hepáticas se normalizam e os anticorpos podem persistir por muitos anos (Davies, 2005).

A infecção crônica do HCV é frequentemente assintomática, com viremia persistente e níveis normais de transaminases. A ALT tem sido considerada a enzima hepática mais sensível para a infecção com HCV, embora a gravidade da infecção não esteja diretamente correlacionada com a elevação da ALT, que pode ter suas taxas variando consideravelmente de um mês para o outro (Davies, 2005).

Embora a infecção pelo HCV possua as formas aguda e crônica, a principal morbidade associada com a infecção está relacionada ao desenvolvimento da doença crônica do fígado em um subgrupo de indivíduos infectados anos após o início da infecção. Entretanto, é difícil estabelecer a incidência da infecção do HCV porque a maioria das infecções é assintomática (Shepard *et al.*, 2005).

Visto que é impraticável medir diretamente a incidência da infecção do HCV, pesquisadores têm contado com modelos matemáticos para inferir as tendências da incidência. Isso tem ocorrido mais frequentemente em países onde dados de soroprevalência idade-específica da população estão disponíveis e levam em conta que a prevalência atual reflete o risco cumulativo de adquirir a infecção (Shepard *et al.*, 2005).

As principais descrições da epidemiologia do HCV contam apenas com estudos de soroprevalência. Esses estudos, tipicamente transversais e pontuais, são feitos em populações pouco representativas tais como a de doadores de sangue, de pacientes com infecção crônica pelo HCV ou doentes renais crônicos. Estudos baseados em populações representativas são mais eficazes, porém são impraticáveis na maioria dos países do mundo, particularmente, naqueles em desenvolvimento (Shepard *et al.*, 2005).

Os países com maior prevalência de infecção pelo HCV estão localizados na África e na Ásia, enquanto que na América do Norte, Norte e Oeste da Europa, e Austrália apresentam menor prevalência. Dentre os países com baixa prevalência a Alemanha apresenta 0,6%, Canadá 0,8%, França e Austrália 1,1%. A soroprevalência nos EUA é de 1,8%, no Japão varia entre 1,5-2,3% e na Itália é de 2,2% (Zein, 2000; Shepard *et al.*, 2005).

Existe uma grande variação nos valores estimados para a prevalência da hepatite C nos países em desenvolvimento e, geralmente, são poucos os dados disponíveis que permitem validar o impacto da doença. Essa variação na prevalência se reflete nas estimativas não confiáveis dos países em desenvolvimento que estão entre as nações mais populosas do mundo. China e Índia, que representam juntas dois quintos da população mundial, possuem registros de soroprevalência em torno de 3,2% e 0,9%, respectivamente. Para a Indonésia os valores registram 2,1%, mas são baseados na soroconversão de voluntários doadores de sangue. Dados mais precisos podem ser obtidos da soroprevalência no Paquistão com valores que variam

entre 2,4% e 6,5%. Egito, cuja população é estimada em 73 milhões de indivíduos, possui uma das maiores soroprevalências com 22% (Shepard *et al.*, 2005; Zein, 2000).

No Brasil, Focaccia *et al.* (1998) reportou uma prevalência estimada em 1,42% para a hepatite C na população geral do município de São Paulo. Dados da infecção do HCV no Brasil mostraram que a prevalência em doadores de sangue para as diferentes regiões do Brasil: 0,9% a 2,4% para a região Norte; 1,7% a 3,4% para a região Nordeste; 1,0 a 1,4% para a região Centro-Oeste; 0,8% a 2,8% para a região Sudeste; e, 1,1 a 2,1% para a região Sul (Campiotto *et al.*, 2005).

Em indivíduos portadores de HCV, vários co-fatores estão associados à acelerada progressão da fibrose hepática ou ao aumento da incidência das complicações relacionadas ao HCV como, por exemplo, as complicações da doença hepática ou hepatocarcinoma celular (HCC). Esses co-fatores incluem sexo masculino, idade avançada, forma de aquisição da infecção pelo HCV, co-infecção com HBV e consumo de álcool. São de particular interesse os co-fatores que podem ser evitados por meio de programas preventivos de saúde pública tais como infecção com HIV-1, HBV e consumo de álcool (Shepard *et al.*, 2005).

A infecção pelo HCV implicou no aumento da incidência do HCC em muitos países desenvolvidos como Japão, Espanha, França e Itália, onde a proporção de casos de HCC atribuída ao HCV varia entre 50% e 70% dos casos. A contribuição do HCV para a morbidade por HCC é particularmente evidente em países com elevada prevalência em grupos de idosos como foi verificado em 71% dos idosos infectados com HCV no Japão, 42% na Indonésia e 11% na China (Zein, 2000; Shepard *et al.*, 2005).

### **1.12 O vírus da Hepatite C e a infecção crônica**

Aproximadamente, 70% dos 85% de indivíduos que desenvolvem infecção crônica pelo HCV apresentarão um curso lento, com baixa elevação de ALT e progressão ou não para cirrose durante algumas décadas. Depressão e fadiga são os sintomas mais comuns da infecção crônica do HCV. Aproximadamente, 20% das pessoas com infecção crônica desenvolverão cirrose em um intervalo de 15 a 20 anos, alguns podem desenvolver cirrose posteriormente e outros podem não desenvolver

nenhum dano hepático significativo. A co-infecção com o HIV-1 acelera essa progressão (Davies, 2005).

As variações no genoma viral que permitem sua replicação mais eficiente à medida que cada sistema imune do hospedeiro sugere a atuação de seleção genética Darwiniana. Estudos verificaram que, quando a resposta do sistema imune enfraquece, o vírus naturalmente apresenta mutação ao longo do conjunto de 3000 aminoácidos – o estado mais favorável para o vírus. Durante a fase aguda, sob intensa pressão imune, o vírus é forçado a distanciar-se do grupo de seqüência ancestral (a seqüência consenso), usando mutações que permitem escapar do sistema imune. Uma vez que o vírus foi bem sucedido em escapar de um sistema imune em particular, ocorre reversão na sua seqüência de aminoácidos para o grupo consenso. Assim é proposto que este direcionamento genético é o mecanismo pelo qual o vírus escapa da resposta imune aguda e estabelece o estado crônico da infecção (Bowen e Walker, 2005).

O dano hepático e a oncogênese são causados por distúrbios na apoptose celular. A injúria do fígado desencadeada pelo HCV é mediada principalmente por mecanismos imunes do hospedeiro. A via pró-apoptótica pode estar envolvida no dano hepático enquanto que a inibição da apoptose, modulada por proteínas do HCV e da célula, pode contribuir para a persistência viral e desenvolvimento do HCC. Recentemente, demonstrou-se que a proteína E2, em conjunto com a glicoproteína gp120 do HIV-1 induz a apoptose em hepatócitos (Bantel e Shulze-Osthoff, 2003).

O dano nos hepatócitos não é provocado por efeitos citopáticos da infecção viral, mas por indução de apoptose nas células infectadas pelo HCV. Os mecanismos moleculares que causam a apoptose nas células hepáticas durante a infecção aguda e crônica do HCV ainda não estão completamente definidos (Davies, 2005). Uma possível explicação para a patogênese da doença hepática é que devido à resposta celular imune contra o vírus, que inclui linfócitos CD8<sup>+</sup> citotóxicos (CTLs), as células estreladas hepáticas são ativadas levando à inflamação e fibrose do tecido. Também tem sido observado que o HCV pode escapar à resposta inata anti-viral do hospedeiro de várias formas, seja inibindo os genes que estimulam a síntese de interferon ou mesmo inibindo a sinalização do interferon e bloqueando a proteínas cinases induzidas por interferon (Mercer *et al.*, 2001).

O mecanismo preciso pelo qual o HCV causa o HCC é pouco conhecido. Diferentemente do HBV, o HCV não é incorporado aos núcleos dos hepatócitos. Provavelmente, o HCC é resultado de uma série de eventos que envolvem a inflamação e regeneração, associada com a injúria do fígado devido à hepatite crônica (Davies, 2005).

Fatores que podem estar relacionados ao aumento do desenvolvimento de HCC, são: idade, sexo masculino e gravidade da doença hepática. O genótipo viral pode ser um fator importante, embora as evidências de que a infecção com o genótipo 1b é mais propensa para o desenvolvimento do HCC ainda não tenham sido confirmadas em grandes estudos. Nenhuma ligação foi estabelecida entre os níveis de RNA-HCV no soro e a progressão do HCC (Davies, 2005).

### **1.13 Tratamento**

A terapia para a infecção com HCV é baseada no uso de interferon e é um componente importante na prevenção da morbidade e mortalidade da infecção do HCV com taxas de resposta sustentada entre 80-98% (Zein, 2000). A combinação de terapias de interferon com ribavirina introduzida em 2001 induziu uma resposta sustentada em 42-82% dos pacientes com hepatite C crônica, dependendo do genótipo. Em países onde a prevenção primária da infecção foi direcionada à implementação de práticas seguras do uso de injeções e de transfusões, a prevenção secundária da morbi-mortalidade da infecção pelo HCV concentrou-se no uso de terapias baseadas em interferon para as pessoas infectadas (Shepard *et al.*, 2005).

Entretanto, os tratamentos disponíveis ainda apresentam alto custo – cerca de 25 mil dólares para uma terapia de 48 semanas para a infecção com o genótipo 1 do HCV (Shepard *et al.*, 2005; Deuffic-Burban *et al.*, 2007). Um aumento exponencial para os próximos 10-20 anos, previsto por modelos matemáticos, no número de casos de doenças hepáticas relacionadas à infecção com HCV deverá dificultar o acesso ao tratamento, tornando este um grave problema de saúde pública. Uma análise econômica recente projetou em 10,7 bilhões de dólares as despesas médicas diretas nos EUA para as doenças relacionadas com o HCV entre 2010 e 2019, baseando-se na estimativa de crescimento de duas vezes no número de casos anuais de mortes relacionadas com o HCV durante estes anos, comparado com 1991. Entretanto, de acordo com os custos envolvidos com a hepatite C nos últimos anos estas projeções

podem se exceder na próxima década (Shepard *et al.*, 2005; Deuffic-Burban *et al.*, 2007).

#### **1.14 A co-infecção HIV-1/HCV**

As infecções pelo HIV-1 e pelo HCV são consideradas problemas de saúde pública. Atualmente, estima-se que 40 milhões de pessoas estejam infectadas com o HIV-1 no mundo, e cerca de 3% da população mundial infectada pelo HCV levando a estimativa de mais de 170 milhões de indivíduos co-infectados por esse vírus (Rockstroh *et al.*, 2005). A co-infecção HIV-1/HCV é comum na Europa e nos EUA com aproximadamente 30% dos indivíduos infectados com HIV-1 e 10% dos pacientes infectados com HCV (Sherman *et al.*, 2002). Sendo assim, estima-se que 17 milhões de pessoas estejam co-infectadas com HIV-1/HCV no mundo. Como o HCV é um vírus de transmissão parenteral, sua incidência é elevada em países onde o HIV-1 se tornou uma epidemia entre usuários de drogas intravenosas, como pode ser observado em alguns países do leste europeu (Davies, 2005).

Os dois vírus compartilham vias de transmissão percutânea. Portanto, a co-infecção é comum em indivíduos expostos à essas vias de transmissão (Rockstroh e Spengler, 2004). O HCV é muito mais infeccioso que o HIV-1 na exposição percutânea ao sangue, sendo transmitido entre 15 e 30 de 1000 injúrias provocadas por materiais perfuro-cortantes, comparado com 3 de 1000 do HIV-1 (CDC, 2001). E ainda, o vírion do HCV é mais resistente podendo continuar infeccioso no ambiente por pelo menos 16 horas (Kamili *et al.*, 2007) enquanto que o HIV-1 torna-se não infeccioso em menos de 6 horas (Wei *et al.*, 2003). Além disso, as taxas de replicação do HCV são mais elevadas do que as do HIV-1, resultando em elevada viremia, o que por si só constitui um fator para a transmissão (Davies, 2005).

Dados de prevalência da co-infecção HIV-1/HCV são raros. Estimativas de prevalência da co-infecção em pessoas HIV-1 soropositivas nos EUA e na Europa variam entre 16% e 33% (Davies, 2005; Rockstroh *et al.*, 2005; Swan e Raymond, 2004; Rockstroh e Spengler, 2004).

O HCV é encontrado em 60 a 90% dos hemofílicos HIV-1 soropositivos e em 50 a 70% dos usuários de drogas intravenosas (Rockstroh e Spengler, 2004). Cerca de 30% dos indivíduos infectados pelo HIV-1 estão co-infectados pelo HCV nos Estados Unidos (Rockstroh *et al.*, 2005).

Nos países em desenvolvimento, os dados são escassos para que a prevalência da co-infecção possa ser estimada. Nessas regiões, o uso de drogas injetáveis é um comportamento menos comum e a transmissão heterossexual é responsável pela maioria dos novos casos de HIV-1. Apesar da transmissão sexual do HCV ainda não ser bem compreendida, a estimativa de prevalência da co-infecção HIV-1/HCV nos países em desenvolvimento se baseia no principal fator de risco para a transmissão do HIV-1. São poucos os estudos de soroprevalência do HCV entre indivíduos HIV-1 soropositivos que contraíram o vírus por relação heterossexual e dados sobre co-infecção HIV-1/HCV em pessoas com exposição freqüente à injeções terapêuticas não esterilizadas. No entanto, recentes estudos sobre um surto de infecção com HIV-1 e HCV ocorrido na Líbia, relacionado ao uso de equipamentos hospitalares não esterilizados, mostraram que 47% das mais de quatrocentas crianças atendidas em um hospital foram co-infectadas com ambos os vírus (de Oliveira *et al.*, 2006; Shepard *et al.*, 2005).

Na Argentina, a prevalência da co-infecção varia entre 5,8% e 88,3% (Consenso Argentino, 2005). Fainboim *et al.* (1999) ao estudar 484 pacientes HIV-soropositivos observou que 58,5% estavam co-infectados com HCV, embora 48,3% desses pacientes fossem usuários de drogas intravenosas. No Brasil, existem poucos dados sobre pacientes co-infectados por HIV-1/HCV. A prevalência da co-infecção varia entre 17,5% e 95% em diferentes estudos realizados com diferentes populações de co-infectados (Mendes-Corrêa e Barone, 2005).

Em contraste, a transmissão sexual do HCV é rara, o que explica a baixa freqüência (4 a 8%) das co-infecções em pacientes homossexuais infectados pelo HIV-1. A prevalência da transmissão sexual não é significativa entre parceiros heterossexuais monogâmicos infectados apenas com HCV (Halfon *et al.*, 2001a); no entanto, é mais expressiva entre os homossexuais masculinos HIV-1 soropositivos (Matthews-Greer *et al.*, 2001).

A co-infecção com HIV-1/HCV aumenta o risco da transmissão perinatal, e mães com alta carga viral de HCV apresentam risco maior de transmissão perinatal do HCV (Rockstroh e Spengler, 2004). O risco de transmissão vertical do HCV aumenta de 2-5% dos recém nascidos de mães infectadas com HCV para 17-20% caso a mãe esteja co-infectada com HIV-1. E ainda, diferentemente do que já foi descrito

para o HIV-1, não se observou associação entre a amamentação e aquisição do HCV (Roberts e Yeung, 2002).

As evidências sugerem que o HCV se comporta como uma infecção oportunista em indivíduos infectados com o HIV-1. Após a introdução da terapia anti-retroviral, os indivíduos co-infectados apresentaram uma maior progressão da doença hepática e, em consequência, uma menor sobrevida. O HCV pode aumentar a morbidade e mortalidade relacionada ao HIV-1. Devido ao aumento da hepatotoxicidade da terapia anti-retroviral em indivíduos co-infectados, a infecção pelo HCV pode comprometer o resultado do tratamento para o HIV-1 (Hall *et al*, 2004).

O efeito da infecção do HCV na progressão da doença do HIV-1 permanece controverso (Dorrucci *et al.*, 2004). Possivelmente, a associação entre a terapia anti-retroviral com as diferentes características da resposta imune e da doença por HCV possam explicar os resultados contraditórios que têm sido descritos até hoje (Caudai *et al.*, 2005).

Estudos realizados na era pré-HAART (Terapia anti-retroviral - *Highly Active Antiretroviral Therapy*) falharam em demonstrar que o HCV acelera a progressão da doença causada pelo HIV-1 por meio da avaliação de parâmetros clínicos e imunológicos. Apesar disso, o HCV é considerado co-fator na progressão da doença do HIV-1 estimulando a replicação do HIV-1 por meio de uma resposta imune não-específica, favorecendo a depleção do grupo de células CD4 por meio da infecção de células do sistema imune, comprometendo a recuperação imune da qual depende o sucesso da terapia anti-retroviral e, finalmente, o HCV pode comprometer o benefício da HAART elevando a incidência de hepatotoxicidade e descontinuidade do tratamento (Greub *et al.*, 2000; Swan e Raymond, 2004).

O uso da HAART tem reduzido drasticamente a morbidade e a mortalidade nos indivíduos infectados pelo HIV-1. Entretanto, paralelamente ao sucesso da terapia, a hepatite C tem emergido como a principal causa de morte em indivíduos HIV-1 soropositivos, devido à alta prevalência do HCV nessas populações e ao aumento de sua patogenicidade na co-infecção com o HIV-1 (Braitstein *et al*, 2004).

Os indivíduos co-infectados que recebem tratamento para HCV apresentam uma resposta virológica sustentada menor sendo 40% nos pacientes HIV-1 soropositivos contra 55% nos HIV-1 soronegativos. Entre os infectados com o genótipo 1 do HCV a resposta virológica sustentada é 29% quando são HIV-1

soropositivos contra 45% quando são HIV-1 soronegativos. A eficácia da resposta ao tratamento para HCV é limitada por numerosos fatores, entre os quais se incluem a contra-indicação para o tratamento, os elevados custos, o direcionamento do tratamento, a prevalência maior do genótipo 1, e a co-infecção com HIV-1 (Braitstein *et al*, 2004).

O efeito da HAART no perfil de *quasispecies* dos indivíduos co-infectados com HIV-1/HCV ainda não foi descrito. Dado o valor do potencial preditivo da variação das *quasispecies* como marcador para a doença relacionada ao HCV e à resistência ao interferon, a determinação de como a HAART afeta a diversidade genética do HCV fornece importantes implicações no entendimento do curso da doença do HCV no ambiente da infecção com HIV-1, além disso, ajuda a ter uma melhor definição do tratamento terapêutico dos indivíduos co-infectados (Swan e Raymond, 2004; Greub *et al.*, 2000).

Existe pouca evidência de que haja uma interação direta entre o HIV-1 e o HCV no fígado. O HIV-1 é linfotrópico e não infecta hepatócitos diretamente. Por outro lado, o HCV que é um vírus hepatotrópico parece ser linfotrópico visto que seqüências virais foram amplificadas a partir de células mononucleares periféricas (PBMCs) de indivíduos infectados. A infecção de células extra-hepáticas pode constituir um reservatório que poderia favorecer a seleção de variantes do HCV e dos mecanismos de persistência viral. De fato, a recorrência quase universal de infecção pelo HCV após transplantes de fígado corrobora a existência de sítios extra-hepáticos onde o HCV pode persistir e replicar (Davies, 2005).

## 2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

Pouca informação está disponível acerca da infecção pelo HCV em indivíduos HIV-1 soropositivos na América Latina e no Brasil (Mendes-Corrêa e Barone, 2005).

Existem poucos dados sobre a população de co-infectados com HIV-1/HCV e a prevalência dos genótipos é relatada para as infecções de forma separada nas diferentes populações. Alguns estudos têm relatado a co-infecção HIV-1/HCV na população de usuários de drogas injetáveis, nas quais o genótipo 1 do HCV apresenta maior prevalência (Shire e Sherman, 2005; Garten *et al.*, 2005).

A genotipagem do HCV é um importante marcador epidemiológico e, em combinação com outros métodos, pode auxiliar no controle da infecção crônica e no prognóstico da terapia com interferon (Ichimura *et al.*, 1994; Pozzato *et al.*, 1995; Martins *et al.*, 1998; Zein, 2000; Lauer *et al.*, 2001).

Dentre os fatores que interferem na resposta ao tratamento antiviral e que podem variar de acordo com genótipo ou subtipo do HCV estão a patogenicidade da infecção, o perfil demográfico dos pacientes e a detecção viral nos testes de diagnósticos (Carvalho, 1999).

Em pacientes co-infectados com HIV-1 e HCV o genótipo do HCV pode ser usado como prognóstico para resposta ao tratamento, pois as infecções com genótipos 2 e 3 apresentam uma resposta significativa quando são tratados durante um ano com interferon peguilado e ribavirina (Forns e Costa, 2006).

Na região Centro-Oeste do país existe uma carência de dados sobre a variabilidade genotípica do HCV encontrado nas diferentes populações de indivíduos mono- e co-infectados.

Em 2003 nosso grupo de pesquisa realizou a caracterização molecular do HCV em população de doadores de sangue do Distrito Federal (Amorim, 2003) e, recentemente, vem trabalhando com outras populações de mono-infectados pelo HCV, tais como as populações de doentes renais crônicos e população em geral.

No sentido de caracterizar molecularmente a infecção do HCV em populações de co-infectados com outros vírus e, com vistas a ampliar o conhecimento acerca dos genótipos e subtipos que infectam a população de co-infectados com HIV-1/HCV no Distrito Federal e Entorno o presente trabalho tem como objetivos específicos:

- Caracterizar os genótipos de HCV e sua prevalência na população de indivíduos co-infectados com HIV-1/HCV;
  
- Caracterizar os subtipos de HCV e sua prevalência na população de indivíduos co-infectados com HIV-1/HCV do Distrito Federal;
  
- Estabelecer uma correlação entre os genótipos obtidos por meio de seqüenciamento da região 5'UTR com aqueles obtidos para a região NS5B do genoma do HCV;
  
- Realizar a análise filogenética das seqüências obtidas das amostras para confirmação dos genótipos obtidos para a população de co-infectados com HIV-1/HCV;
  
- Comparar dados da prevalência de genótipos e subtipos encontrados em co-infectados com HIV-1/HCV com dados disponíveis.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 População Estudada**

A população estudada consistiu de 45 indivíduos co-infectados com HIV-1/HCV atendidos pelos serviços públicos de assistência à saúde no Distrito Federal. As amostras analisadas foram encaminhadas ao Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF) para a realização de exames qualitativos, quantitativos ou de genotipagem do HCV. O trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Distrito Federal.

Este é um estudo anônimo, transversal e descritivo, de série histórica, onde foram analisadas amostras coletadas durante o período de 2004 a 2006, de indivíduos co-infectados com HIV-1/HCV residentes do Distrito Federal e Entorno, atendidos pela rede pública de saúde do Distrito Federal.

A representatividade da população foi calculada utilizando-se o programa Statcalc (EPIINFO 6.0), para um intervalo de confiança de 99,9%. Para tanto, foi considerada a população estimada de 30% de indivíduos co-infectados com HCV (<http://www.hepatites.com.br/sc/hepatite/web/noticias/default.aspx?IDNoticia=36208>) entre o número total de indivíduos HIV-1 soropositivos do Distrito Federal (n=5000). Utilizou-se a frequência de 90% para o menor resultado de amplificação e 98% como frequência de amplificação esperada.

#### **3.2 Coleta das amostras**

As 45 amostras foram coletadas de indivíduos comprovadamente co-infectados com HIV-1/HCV atendidos no Distrito Federal e Entorno. Para a realização dos experimentos foi coletada uma alíquota de 140 µL do plasma de cada amostra que foi encaminhada ao laboratório em recipiente térmico e foi armazenada em temperatura de -80°C para posterior extração do RNA.

#### **3.3 Extração de RNA e Transcrição Reversa**

O RNA do plasma foi extraído utilizando um *kit* comercial QIAamp Viral RNA (*Qiagen*) em um volume final de 60 µL conforme o protocolo indicado pelo fabricante. A reação de transcrição reversa foi realizada em um volume final de 20 µL, a partir da extração do RNA. Inicialmente, uma solução contendo 0,02 µg de

oligonucleotídeos randômicos, 5,00 µg de RNA viral total, 0,5 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (*Invitrogen, Life Technologies*) e água Milli-Q para um volume final de 13 µL, foi mantida a 65°C por 5 minutos e, imediatamente, transferida para um recipiente com gelo por 1 minuto. Adicionou-se, em seguida, 0,75 de tampão *first-strand* (*Invitrogen, Life Technologies*), 5 mM de ditiotreitol (DTT), 100 mM de inibidor de RNase (*Pharmacia Biotech*) e 200U da enzima SuperScript® Transcriptase Reversa (*Invitrogen, Life Technologies*). Esta reação foi inicialmente incubada a 25 °C por 5 minutos e, em seguida, a 50 °C por 60 minutos. A reação foi interrompida com a inativação da enzima a 70°C por 15 minutos. O cDNA sintetizado foi armazenado a -20°C.

### 3.4 Amplificação pela *nested-PCR*

O cDNA obtido foi amplificado por meio de *nested-PCR*, utilizando-se iniciadores específicos para as regiões 5'UTR e NS5B do HCV (Tabela 1) (Ginabreda *et al.*, 1997; Chen e Weck, 2002). No primeiro ciclo foram usados os iniciadores externos e, no segundo ciclo, os iniciadores internos das respectivas regiões genômicas.

Para a amplificação do fragmento da região NS5B entre os nucleotídeos 7935 e 8266 foram utilizados no primeiro ciclo, os iniciadores S1 e AS1 (*Integrated DNA Technologies*) e, no segundo ciclo, os iniciadores S2 e AS2 (*Integrated DNA Technologies*) (Chen e Weck, 2002) (Tabela 1).

Para a amplificação do fragmento entre os nucleotídeos -258 e -50 da região 5'UTR foram utilizados no primeiro ciclo os iniciadores P7 e P8 (*Integrated DNA Technologies*) e no segundo ciclo os iniciadores P10 e P17 (*Integrated DNA Technologies*) (Ginabreda *et al.*, 1997). As seqüências e as posições de alinhamentos no genoma do HCV podem ser observadas na tabela 1.

O primeiro ciclo de amplificação para 5'UTR foi realizado em um volume final de 50,0 µL contendo, respectivamente, 1,0 µL de cDNA, 0,2 mM de dNTPs (*Invitrogen, Life Technologies*), 0,8 µM dos iniciadores externos P7/P8 (*Integrated DNA Technologies*), 1,25 U da enzima *Taq DNA* Polimerase (*Invitrogen, Life Technologies*), 1X de tampão da enzima (*Invitrogen, Life Technologies*), 5 mM de cloreto de magnésio (*Invitrogen, Life Technologies*) e água Milli-Q qsp 50,0 µL. As reações foram realizadas em termociclador (*PTC-100 Research Inc*) com os

parâmetros dos ciclos térmicos descritos na Tabela 1. Um microlitro do produto de PCR foi submetido a um segundo ciclo de amplificação usando os iniciadores internos P10/P17 (*Integrated DNA Technologies*) sob as mesmas condições de amplificação do primeiro ciclo.

O primeiro ciclo de amplificação para NS5B foi realizado em um volume final de 50,0 µL contendo, respectivamente, 5,0 µL de cDNA, 0,2 mM de dNTPs (*Invitrogen, Life Technologies*), 0,8 µM dos iniciadores externos S1/AS1 (*Integrated DNA Technologies*), 1,25 U da enzima *Taq DNA Polimerase* (*Invitrogen, Life Technologies*), 1X de tampão da enzima (*Invitrogen, Life Technologies*), 5 mM de cloreto de magnésio (*Invitrogen, Life Technologies*) e água Milli-Q qsp 50,0 µL. Os parâmetros dos ciclos térmicos estão descritos na Tabela 1. Um microlitro do produto da primeira amplificação foi submetido a um segundo ciclo usando os iniciadores internos S2/AS2 (*Integrated DNA Technologies*) nas mesmas condições do primeiro ciclo, porém, usando 25 ciclos de amplificação.

**Tabela 1. Seqüência e local de alinhamento dos iniciadores** externos e internos usados no estudo, e parâmetros dos ciclos térmicos do *nested*-PCR para as regiões genômicas NS5B e 5'UTR do HCV.

Regiões genômicas	Ciclo	Seqüências e Posição de Alinhamento dos Iniciadores	Parâmetros da PCR
NS5B	1 <sup>o</sup>	<b>S1</b> (7904 a 7922): 5'TGGGGTTCTCGTATGATACCC3' <b>AS1</b> (8295 a 8275): 5'CCTGGTCATAGCCTCCGTGAA3'	95°C - 1 min 95°C - 20 s 54°C - 30 s 72°C - 1 min 72°C - 10 min } 40 ciclos
	2 <sup>o</sup>	<b>S2</b> (7916 a 7935): 5'GATACCCGCTGCTTTGACTC3' <b>AS2</b> (8284 a 8266): 5'CCTCCGTGAAGGCTCTCAG3'	95°C - 1 min 95°C - 20 s 54°C - 30 s 72°C - 1 min 72°C - 10 min } 25 ciclos
5'UTR	1 <sup>o</sup>	<b>P7</b> (-304 a -280): 5'CACTCCCTGTGAGGAAGTACTGTC3' <b>P8</b> (+3 a -23): 5'ATGGTGCACGGTCTACGAGACCTCC3'	94°C - 2 min 94°C - 15 s 55°C - 45 s 72°C - 1 min 72°C - 7 min } 35 ciclos
	2 <sup>o</sup>	<b>P17</b> (-279 a -258): 5'TTCACGCAGAAAGCGTCTAGCC3' <b>P10</b> (-26 a -50): 5'GGGCACTCGCAAAGCACCTATCAGG3'	94°C - 2 min 94°C - 15 s 55°C - 45 s 72°C - 1 min 72°C - 7 min } 35 ciclos

As amostras amplificadas por *nested*-PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose na concentração de 1%. Brometo de etídio foi utilizado para impregnar e permitir a visualização dos fragmentos de DNA. Controles negativos foram

incluídos durante os procedimentos de amplificação para monitorar possíveis contaminações.

### 3.5 Clonagem

Para as amostras que precisaram de confirmação dos resultados de genotipagem foi realizada a reação de ligação dos produtos de PCR no plasmídeo pGEM®-T easy (Promega) seguindo as instruções do fabricante.

Os plasmídeos foram utilizados para transformar bactérias *Escherichia coli* da linhagem DH5 $\alpha$ , pelo método de choque térmico. Inicialmente, 10  $\mu$ L da solução contendo os plasmídeos foram incubados com 300  $\mu$ L das células competentes no gelo por 40 minutos. Em seguida, as células foram submetidas a 42 °C por 2 minutos, em banho-maria, e novamente transferidas para o banho de gelo por 1 minuto. Foram adicionados 700  $\mu$ L de meio líquido 2xYT (1,6 mg/mL de triptona, 1,0 mg/mL de extrato de levedura e 85,6 mM de NaCl), que em seguida foi incubado a 37 °C por 1 hora. Após a incubação, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 3000 rpm (Jouan S.A. A14/V1), e 700  $\mu$ L foram removidos por aspiração. As bactérias foram espalhadas em placas de Petri contendo meio sólido 2xYT, com 16,7  $\eta$ mol de IPTG, 800  $\eta$ g de X-Gal e 4mg/mL de ampicilina.

As placas de Petri foram incubadas *overnight* em estufa a 37 °C. Os clones recombinantes foram selecionados e incubados *overnight* a 37°C sob agitação em meio líquido 2xYT, contendo 4mg/mL de ampicilina. O DNA plasmidial foi extraído utilizando-se o *Kit Sephaglas FlexiPrep*<sup>™</sup> (GE Healthcare) seguindo as instruções do fabricante.

O DNA plasmidial foi utilizado como molde para amplificação por PCR, utilizando os iniciadores universais M13. A reação foi realizada em um volume final de 50  $\mu$ L, contendo: 1  $\mu$ L do DNA plasmidial, 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen), 0,4  $\mu$ M dos iniciadores M13F/M13R (Integrated DNA Technologies), 1,25 U da enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 1X de tampão da enzima (Invitrogen) e 1 mM de cloreto de magnésio (Invitrogen). As seguintes condições foram adotadas: desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos iniciadores a 55°C por 25 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos.

Os clones amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose na concentração de 1%. Brometo de etídio foi utilizado para permitir a visualização dos fragmentos de DNA. Controles negativos foram incluídos durante os procedimentos de amplificação, para monitorar possíveis contaminações.

### **3.6 Caracterização dos genótipos**

#### **3.6.1 Seqüenciamento automático**

Os produtos de *nested*-PCR foram seqüenciados automaticamente, pelo menos duas vezes, somente no sentido senso, utilizando-se os iniciadores internos P17 (Ginabreda *et al.*, 1997) para 5'UTR e S2 (Chen e Weck, 2002) para NS5B. As reações de seqüenciamento nucleotídico foram realizadas no laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília, utilizando-se o *Kit ET-Terminator*, no Sistema *Molecular Dynamics MegaBACE 500 plus (GE Healthcare)* e no laboratório Plataforma de Seqüenciamento de DNA da EMBRAPA-CENARGEN utilizando-se o *Kit ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* versão 3.1 (*Applied Biosystems*).

#### **3.6.2 Análise das seqüências**

A qualidade das seqüências obtidas nas reações de seqüenciamento automático foi verificada pelo programa PHRED (Ewing and Green, 1998). A homologia das seqüências nucleotídicas com seqüências depositadas no banco genômico do HCV foi determinada pelo programa HCV-BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Karlin, e Altschul, 1990; Karlin, e Altschul, 1993), disponível no sítio *HCV Sequence Database* (<http://hcv.lanl.gov>) (Kuiken *et al.*, 2005). A seqüência mais similar à amostra foi considerada.

#### **3.6.3 Análise filogenética**

Para a realização das análises filogenéticas, as seqüências dos isolados do Distrito Federal (DF) foram alinhadas com seqüências referência dos genótipos 1, 2, 3 e 4 do HCV, obtidas no sítio do *HCV Sequence Database* (<http://hcv.lanl.gov>), pela ferramenta *ClustalW Multiple Alignment* (Thompson *et al.*, 1994). As regiões com falta de informação de seqüência para qualquer uma das amostras foram descartadas

de todas as seqüências. Foi utilizado um fragmento de no mínimo 208 nucleotídeos correspondendo ao gene NS5B e 198 nucleotídeos correspondendo à região 5'UTR.

A análise de *Maximum likelihood* PHYLIP *package* (Felsenstein, 1981) foi utilizada para o estudo das relações filogenéticas de HCV. Os valores de *bootstrap* foram calculados pelo método *neighbor joining* com fator de correção de 2 parâmetros de Kimura (Kimura, 1980). A confiabilidade das árvores foi avaliada pela análise de 1000 réplicas (*bootstrap*). Foram usadas como grupo externo a seqüência referência do genótipo 5a para NS5B e 2e para 5'UTR. As árvores foram desenhadas com o programa TreeView 1.6.6 (Page, 1996).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Caracterização da população de co-infectados**

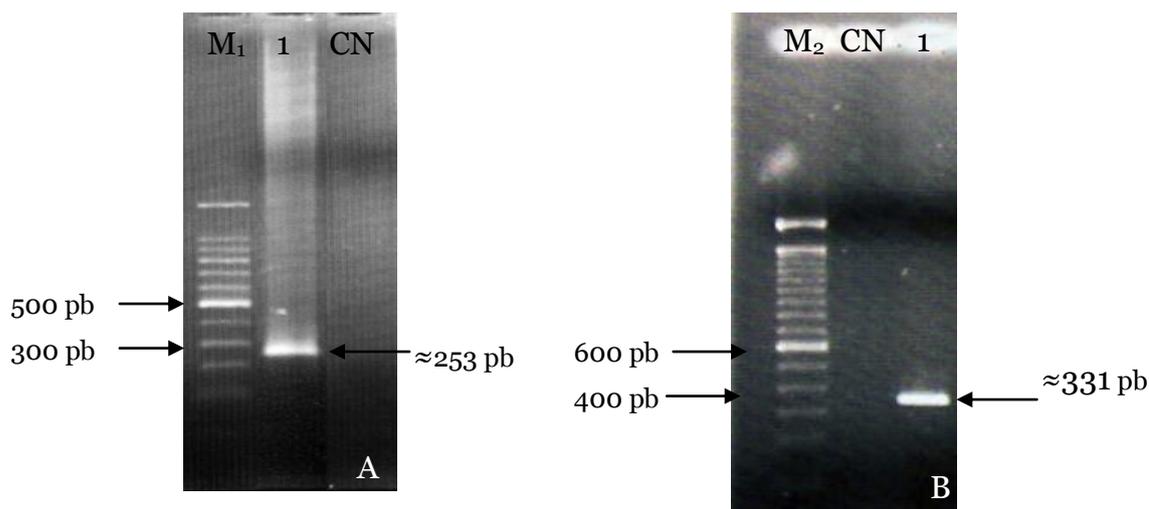
Nesse estudo foram analisadas 45 amostras de plasma de indivíduos reagentes para anti-HCV e co-infectados com HIV-1, atendidos no DF e Entorno, que realizaram exames no LACEN-DF. O cálculo dessa amostragem, representativa da população alvo, foi realizado no programa Statcalc (EPIINFO 6.0), considerando-se o total de 5000 indivíduos HIV-1 soropositivos no DF no ano de 2006 e uma soroprevalência de 30% do anti-HCV, com um intervalo de confiança de 99,9%

A faixa etária dos pacientes variou de 15 a 52 anos com média de 41 anos. A frequência de pacientes com mais de 40 anos foi de 71,11% (32/45). O sexo que predominou foi o masculino, com 60% (27/45) do total. Entre os pacientes, 77,77% (35/45) tiveram contagem de células CD4 abaixo de 200 céls/ $\mu$ L, caracterizando quadro de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida – AIDS.

A procedência da maior parte dos pacientes foi do Distrito Federal, com um percentual de 86,66% (39/45), três pacientes foram provenientes de Goiás, um de Minas Gerais e dois de São Paulo.

### **4.2 Transcrição reversa e amplificação pela *nested*-PCR**

No presente trabalho, 45 amostras de RNA total foram transcritas reversamente e as regiões genômicas 5'UTR e NS5B foram amplificadas pela *nested*-PCR. As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1%, posteriormente corado com brometo de etídio. Os produtos de PCR obtidos apresentaram aproximadamente 253 pares de base (pb) para 5'UTR e 331 pb para NS5B (Figura 7). Adicionaram-se controles negativos durante os procedimentos de amplificação para monitoramento de possíveis contaminações.



**Figura 7. Análise eletroforética dos produtos de PCR** das regiões genômicas 5'UTR (a) e NS5B (b) em gel de agarose 1% impregnado com brometo de etídio. Os poços com o número 1 representam os fragmentos amplificados para as duas regiões genômicas, de acordo com o tamanho esperado para 5'UTR ( $\approx 253$  pb) e NS5B ( $\approx 331$  pb). M1 = marcador DNA ladder 100 pb (*Ludwig Biotecnologia*), M2 = marcador DNA ladder 100 pb (*Invitrogen*) e CN = controle negativo.

Do total de 45 amostras avaliadas para a região 5'UTR, 40 amostras (89%) tiveram o cDNA amplificado pela *nested*-PCR e em 5 amostras (11%) não foi possível estabelecer uma amplificação. A análise da carga viral do HCV revelou que todas as 5 amostras apresentaram valores abaixo do limite de detecção ( $< 615$  UI/ml) nos exames quantitativos realizados no LACEN-DF (Tabela 2).

Do total de 45 amostras avaliadas para a região NS5B obteve-se a amplificação de 33 amostras (73%) e para 12 amostras (27%) não foi possível estabelecer uma amplificação. Por meio da análise dos resultados dos exames de carga viral do HCV realizados no LACEN-DF verificou-se que das 12 amostras PCR negativas testadas, 10 amostras apresentaram carga viral menor que 615 UI/mL e 2 amostras apresentaram carga viral maior que 615 UI/mL (Tabela 2).

**Tabela 2. Relação dos resultados de amplificação** por *nested*-PCR para as regiões genômicas de 5'UTR e de NS5B do HCV com os resultados de carga viral do HCV realizados com as amostras de indivíduos co-infectados com HIV-1 e HCV do Distrito Federal.

Carga viral HCV	5'UTR			NS5B		
	PCR +	PCR -	TOTAL	PCR +	PCR -	TOTAL
$< 615$ UI/ mL	8	5	<b>13</b>	3	10	<b>13</b>
$> 615$ UI/ mL	32	0	<b>32</b>	30	2	<b>32</b>
<b>TOTAL</b>	<b>40</b>	<b>5</b>	<b>45</b>	<b>33</b>	<b>12</b>	<b>45</b>

### 4.3 Genotipagem

#### 4.3.1 Definição dos Genótipos do HCV com base na análise das regiões genômicas 5'UTR e NS5

O seqüenciamento automático foi realizado no sentido senso para as 40 amostras amplificadas para a região de 5'UTR e para as 33 amostras amplificadas para NS5B. Desse total, todas as 40 amostras amplificadas para 5'UTR apresentaram seqüências satisfatórias para realização da genotipagem por seqüenciamento. No entanto, somente 31 das 33 amostras amplificadas para NS5B apresentaram seqüências satisfatórias para a realização da genotipagem e 2 amostras amplificaram, mas não produziram seqüências com qualidade o suficiente para permitir a correta identificação dos genótipos do HCV pelo programa HCV-BLAST (Tabela 3).

**Tabela 3. Número de amostras amplificadas** por *nested*-PCR e seqüenciadas automaticamente para as regiões 5'UTR e NS5B do HCV e número de seqüências usadas na genotipagem pelo programa HCV-BLAST (Kuiken *et al.*, 2005).

Região genômica	Amplificação e Seqüenciamento	Genotipagem
5'UTR	40	40
NS5B	33	31

Os genótipos e subtipos do HCV foram definidos de acordo com a similaridade das seqüências analisadas por meio do programa HCV-BLAST (Karlin, e Altschul, 1990; Karlin, e Altschul, 1993), onde as mesmas são alinhadas com as seqüências do HCV disponíveis no banco genômico do HCV - *HCV Sequence Database* no sítio (<http://hcv.lanl.gov>) (Kuiken *et al.*, 2005).

Trinta e uma amostras foram genotipadas para ambas as regiões genômicas (Tabela 4). Dentre essas amostras o genótipo 1 apresentou prevalência de 81%, seguido pelo genótipo 3 com 10% e genótipo 2 com 6% (Figura 8).

**Tabela 4. Número de amostras e os respectivos genótipos do HCV encontrados** por meio da análise da homologia das seqüências das regiões 5'UTR e NS5B do HCV no programa HCV-BLAST (Kuiken *et al.*, 2005).

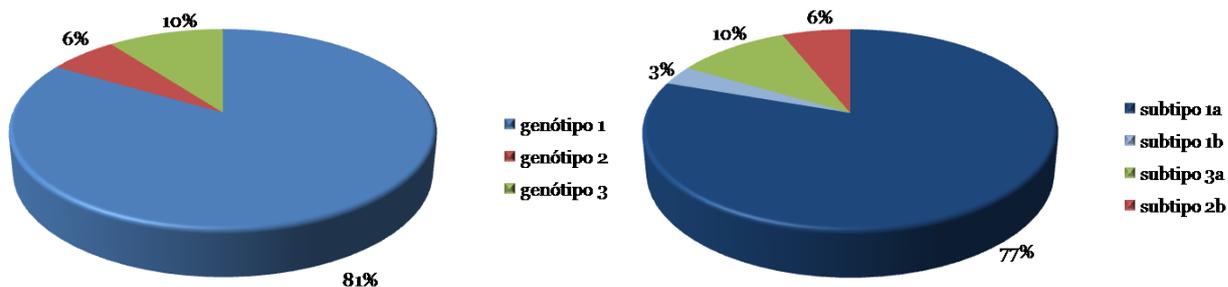
<b>Genótipo HCV</b>	<b>5'UTR</b>	<b>NS5B</b>
<b>1</b>	34	25
<b>2</b>	2	2
<b>3</b>	3	4
<b>4</b>	1	0
<b>TOTAL</b>	<b>40</b>	<b>31</b>

A concordância obtida entre os resultados de genotipagem para as regiões genômicas de 5'UTR e NS5B do HCV foi de 97%, com 30 das 31 amostras apresentando subtipos concordantes para ambas as regiões genômicas (Tabela 5).

**Tabela 5. Número de amostras e os respectivos subtipos do HCV encontrados** para as regiões 5'UTR e NS5B do HCV por meio da análise da homologia das seqüências no programa HCV-BLAST (Kuiken *et al.*, 2005).

<b>Subtipo HCV</b>	<b>5'UTR</b>	<b>NS5B</b>
<b>1a</b>	27	24
<b>1b</b>	2	1
<b>1a/1b</b>	5	0
<b>2b</b>	2	2
<b>3a</b>	3	4
<b>4c/4d</b>	1	0
<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>31</b>

Sendo assim, 77% foram classificadas como subtipo 1a, 3% como subtipo 1b, 10% como subtipo 3a, e 6% como subtipo 2b (Figura 8). Todas as amostras 2b tiveram seus genótipos confirmados por clonagem, purificação e seqüenciamento.



**Figura 8. Gráficos com prevalência de genótipos e subtipos de HCV no DF.** Porcentagem de genótipos e subtipos do HCV obtidos por meio de seqüenciamento das regiões 5'UTR e NS5B do HCV nos indivíduos co-infectados com HIV-1/HCV analisados no presente estudo.

Uma amostra (3%), entre as 31, apresentou divergência de genótipo encontrado na análise das duas regiões genômicas, caracterizando-se subtipo 3a quando foi analisada a seqüência de NS5, e subtipos 1a e 1b quando foi analisada a seqüência de 5'UTR. Sendo assim, a concordância dos resultados de genotipagem realizados para as regiões genômicas 5'UTR e NS5B do HCV foi de 97% entre os genótipos encontrados para o HCV, mas obteve 90% de concordância quando a análise verificou o subtipo da amostra (Tabela 6).

**Tabela 6. Concordância na genotipagem do HCV** por meio de comparação da análise das seqüências das regiões genômicas 5'UTR e NS5B de amostras de indivíduos co-infectados com HIV-1/HCV do presente estudo.

	n=3	Concordância entre resultados de genotipagem com as regiões 5'UTR e NS5B
<b>Genótipo</b>	30	97%
<b>Subtipo</b>	28	90%

Para as 9 amostras que foram amplificadas e genotipadas apenas para a região 5'UTR os resultados de genotipagem encontrados são apresentados na tabela 7 a seguir. Dessas destaca-se uma amostra cuja seqüência apresentou similaridade com os subtipos 4c e 4d do HCV. Esse resultado de genotipagem foi confirmado por meio da análise de hibridização do produto da PCR (INNO-LiPA, *Innogenetics*) no LACEN-DF.

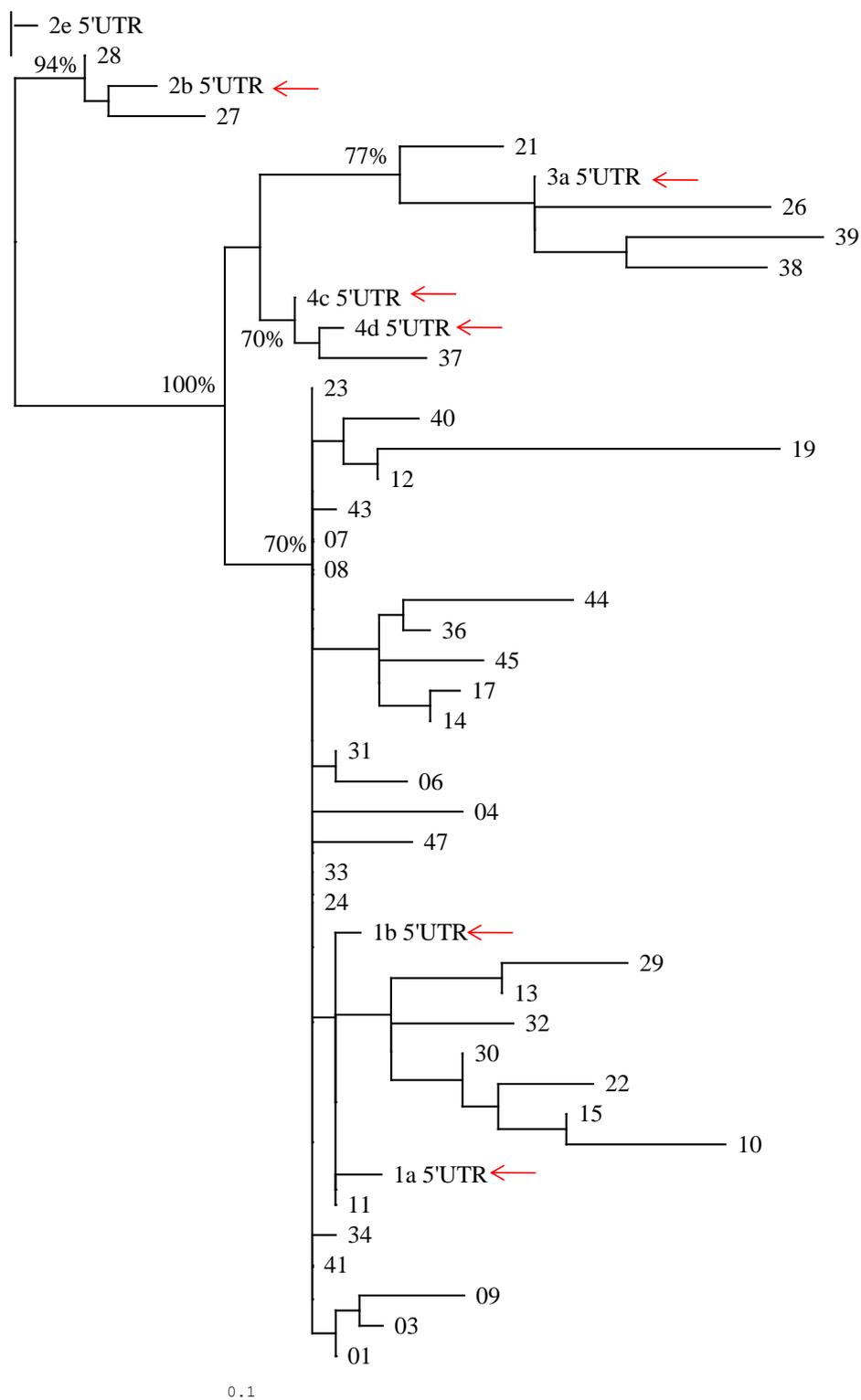
**Tabela 7. Amostras genotipadas somente para a região 5'UTR do HCV** por meio da análise da homologia das seqüências no programa HCV-BLAST (Kuiken *et al.*, 2005).

<b>Amostra</b>	<b>Resultado da Genotipagem para 5'UTR</b>
<b>5</b>	1a
<b>10</b>	1a
<b>15</b>	1a
<b>22</b>	1a
<b>23</b>	1a
<b>32</b>	1b
<b>37</b>	4c/4d
<b>43</b>	1a
<b>45</b>	1a/1b

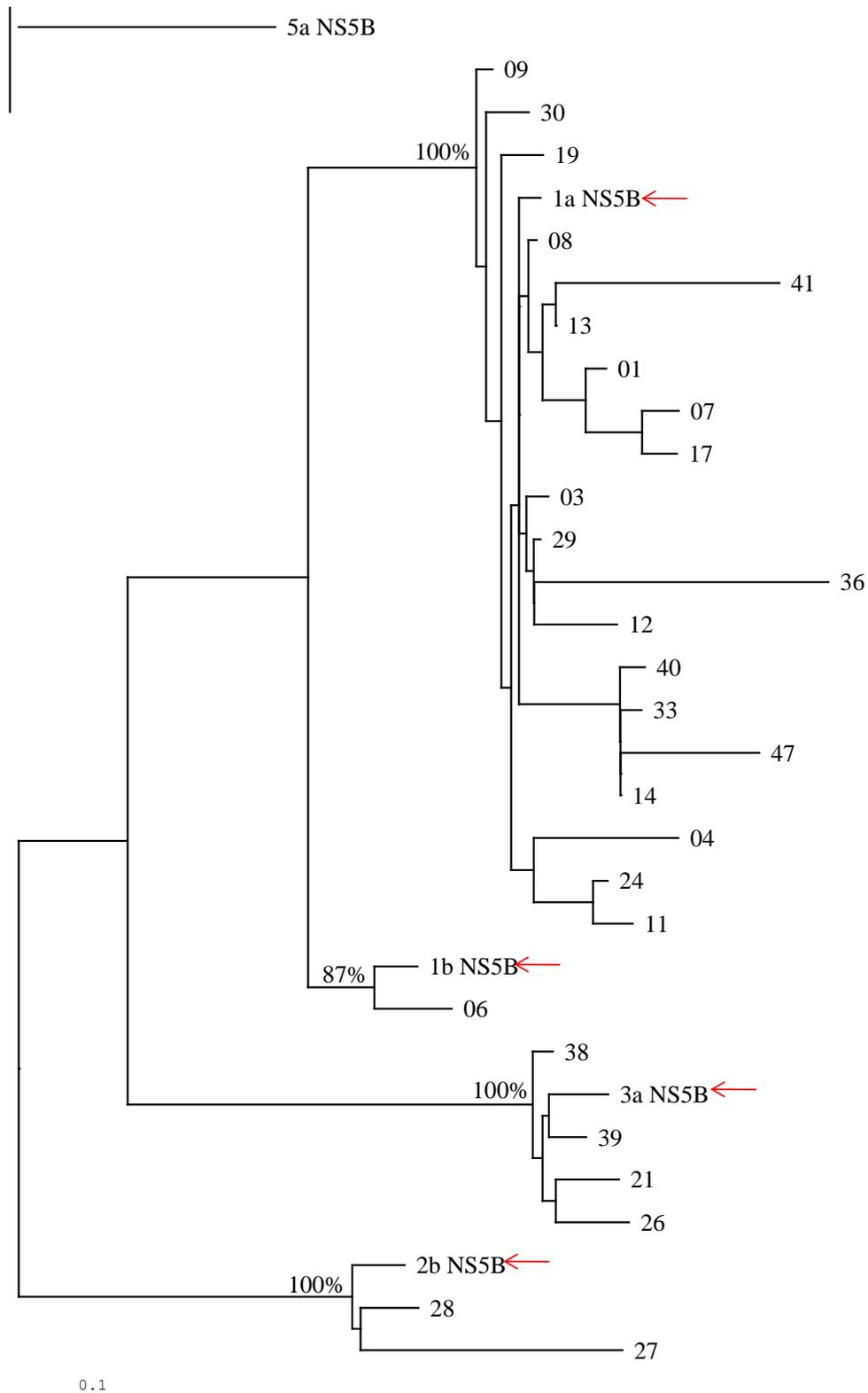
#### 4.3.2 Análise Filogenética

A análise filogenética foi realizada utilizando-se o programa PHYLIP (Felsenstein, 1981), para as seqüências obtidas com o mínimo de 198 nucleotídeos para as regiões de 5'UTR e 208 para NS5B. Desse modo, 38 amostras caracterizadas para 5'UTR foram utilizadas na análise filogenética juntamente com as seqüências referência dos subtipos 1a (>1a.GB.Glasgow.AY885238\_), 1b (>1b.DE.HCV-AD78P1.AJ132997\_), 3a (>3a.\_.CB.AFo46866\_), 2b (>2b.JP.HC-J7.D10077\_) e seqüências provenientes do banco genômico 4c (número de acesso: AY766511) e 4d (AY766523). Como grupo externo, utilizou-se a seqüência referência do genótipo 2e (>2e.ID.JKo20.D49745\_) (Figura 9).

Para a análise filogenética de NS5B foram usadas 27 amostras mais as seqüências referência dos subtipos 1a (>1a.\_.H77.NC\_004102\_), 1b (>1b.CN.HCV-S.AY460204\_), 3a (>3a.DE.HCVCENS1.X76918\_) e 2b (>2b.JP.HC-J8.D10988\_) tendo como grupo externo a seqüência referência do genótipo 5a (>5a.\_.FR741.D50466\_) (Figura 10).



**Figura 9. Análise filogenética da região 5'UTR do HCV em amostras de co-infectados com HIV-1.** Árvore de máxima verossimilhança enraizada com HCV 2e como grupo externo. Os valores nos ramos correspondem aos valores de *bootstrap* calculados pelo método *neighbor joining* com fator de correção de 2 parâmetros de Kimura em 1000 réplicas. São mostrados valores de *bootstrap* acima de 70%. O valor da barra de escala no canto esquerdo inferior de cada figura representa a distância genética em substituições por nucleotídeo do fragmento analisado. As setas vermelhas indicam os subtipos de referência.



**Figura 10. Análise filogenética da região NS5B do HCV em amostras de co-infectados com HIV-1.** Árvore de máxima verossimilhança enraizada com HCV 5a como grupo externo. Os valores nos ramos correspondem aos valores de *bootstrap* calculados pelo método *neighbor joining* com fator de correção de 2 parâmetros de Kimura em 1000 réplicas. São mostrados valores de *bootstrap* acima de 70%. O valor da barra de escala no canto esquerdo inferior de cada figura representa a distância genética em substituições por nucleotídeo do fragmento analisado. As setas vermelhas indicam os subtipos de referência.

Como pode ser observado nas figuras 9 e 10, todas as amostras agruparam com as seqüências de referência dos genótipos correspondentes, com um valor mínimo de *bootstrap* de 70% na árvore de 5'UTR e de 87% na árvore de NS5B. Também pode ser observado que em ambas as árvores as amostras não formaram subgrupos distintos evidenciando uma transmissão que não possui a mesma origem. Além disso, todos os isolados de referência do mesmo genótipo formaram grupos bem caracterizados, com valores de *bootstrap* acima de 70%, evidenciando a confiabilidade da análise.

A confirmação dos genótipos para cada região genômica foi baseada nos agrupamentos observados na análise filogenética com um valor de *bootstrap* igual ou superior a 70%. A análise em conjunto dos genótipos detectados por meio da análise das seqüências pelo programa HCV-BLAST (Kuiken *et al.*, 2005) das regiões genômicas de 5'UTR e NS5B, bem como a análise filogenética, permitiu a classificação em genótipos para todas as 40 amostras e em subtipos para 38 amostras. Assim, as amostras 17, 21 e 47, que apresentaram genótipos ou subtipos divergentes na análise das seqüências pelo programa HCV-BLAST (Kuiken *et al.*, 2005) foram, finalmente, classificadas de acordo com os agrupamentos observados nas árvores. O subtipo não pode ser definido para as amostras 37 e 45, pois as mesmas não tiveram a seqüência de NS5B analisada devido à baixa carga viral e à ausência de conservação dessa região, impossibilitando a amplificação para essa região. Além disso, a análise filogenética de 5'UTR não permitiu a distinção entre os subtipos, pois não houve formação de aglomerado com valor de *bootstrap* significativo separando os subtipos 1a de 1b e 4c de 4d (Figura 9). Os resultados obtidos pela análise de similaridade e confirmados pela análise filogenética estão sumarizados na Tabela 8. Algumas amostras puderam também ter seus genótipos e subtipos determinados pela técnica de hibridização Inno-LiPA HCV II (*Innogenetics*) realizada no LACEN-DF (dados apresentados na Tabela 8) (Stuyver *et al.*, 1996).

**Tabela 8. Genótipo das amostras de co-infectados com HIV-1/HCV de acordo com os resultados obtidos por meio da análise da homologia das seqüências de 5'UTR e NS5B no programa HCV-BLAST (Kuiken *et al.*, 2005) confirmadas pela análise filogenética no programa PHYLIP (Felsenstein, 1981) e pela técnica da Inno-LIPA HCV II (*Innogenetics*) (Stuyver *et al.*, 1996). Em vermelho as amostras discordantes ou com subtipo indefinido pela análise do programa HCV-BLAST (Kuiken *et al.*, 2005).**

Amostra N=40	Genótipo e Subtipo HCV- BLAST 5'UTR	Genótipo Análise Filogenética 5'UTR	Genótipo e Subtipo HCV- BLAST NS5B	Genótipo e Subtipo Análise Filogenética NS5B	Genótipo e Subtipo Consenso dos Resultados	Genótipo e Subtipo InnoLiPA HCV II
1	1a	1	1a	1a	<b>1a</b>	-
3	1a	1	1a	1a	<b>1a</b>	-
4	1a	1	1a	1a	<b>1a</b>	-
5	1a	-	-	-	<b>1a</b>	-
6	1b	1	1b	1b	<b>1b</b>	-
7	1a	1	1a	1a	<b>1a</b>	-
8	1a	1	1a	1a	<b>1a</b>	-
9	1a	1	1a	1a	<b>1a</b>	-
10	1a	1	-	-	<b>1a</b>	-
11	1a	1	1a	1a	<b>1a</b>	-
12	1a	1	1a	1a	<b>1a</b>	-
13	1a	1	1a	1a	<b>1a</b>	-
14	1a	1	1a	1a	<b>1a</b>	-
15	1a	1	-	-	<b>1a</b>	-
17	1a/1b	<b>1</b>	<b>1a</b>	<b>1a</b>	<b>1a</b>	-
19	1a	1	1a	1a	<b>1a</b>	-
21	1a/1b	<b>3a</b>	<b>3a</b>	<b>3a</b>	<b>3a</b>	-
22	1a	1	-	-	<b>1a</b>	-
23	1a	1	-	-	<b>1a</b>	-
24	1a	1	1a	1a	<b>1a</b>	-
26	3a	3a	3a	3a	<b>3a</b>	-
27	2b	2b	2b	2b	<b>2b</b>	-
28	2b	2b	2b	2b	<b>2b</b>	-
29	1a	1	1a	1a	<b>1a</b>	-
30	1a	1	1a	1a	<b>1a</b>	-
31	1a	1	1a	-	<b>1a</b>	1a
32	1b	1	-	-	<b>1b</b>	1b
33	1a	1	1a	1a	<b>1a</b>	1a
34	1a	1	1a	-	<b>1a</b>	1a
36	1a	1	1a	1a	<b>1a</b>	1a
37	4c/4d	<b>4</b>	-	-	<b>4c/4d</b>	4c/4d
38	3a	3a	3a	3a	<b>3a</b>	3a
39	3a	3a	3a	3a	<b>3a</b>	3a
40	1a	1	1a	1a	<b>1a</b>	1a
41	1a	1	1a	1a	<b>1a</b>	-
42	1a	-	1a	-	<b>1a</b>	-
43	1a	1	-	-	<b>1a</b>	-
44	1a	1	1a	-	<b>1a</b>	-
45	1a/1b	<b>1</b>	-	-	<b>1a/1b</b>	-
47	1a/1b	<b>1</b>	<b>1a</b>	<b>1a</b>	<b>1a</b>	-
<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>38</b>	<b>31</b>	<b>27</b>	<b>40</b>	<b>9</b>

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 A prevalência do HCV em HIV-1 soropositivos

A co-infecção HIV-1/HCV atinge mais de um terço dos pacientes infectados com HIV no mundo. Estima-se que nos EUA a prevalência da co-infecção HCV/HIV-1 esteja entre 15% e 30%, enquanto que entre os usuários de drogas injetáveis, estes valores chegam a 90%. No continente europeu a co-infecção HIV-1/HCV apresentou prevalência de 33% entre os indivíduos infectados com HIV-1 (Rockstroh *et al.*, 2005).

No Brasil, a elevada soroprevalência de HCV na população de pacientes HIV-1 soropositivos supera a registrada para populações como a de doadores de sangue ou população em geral (Fainboim *et al.*, 1999). Em muitos países da América, inclusive no Brasil, diferenças na distribuição dos casos de HIV-1 soropositivos, de acordo com a categoria de exposição, foram observadas na década passada quando comparada com os anos 80. Inicialmente, no Brasil, a epidemia afetou principalmente homossexuais ou bissexuais do sexo masculino, hemofílicos e outros que recebiam derivados de sangue. Entretanto, com o passar dos anos, houve um aumento na infecção pelo HIV-1 entre usuários de drogas intravenosas e heterossexuais (Fainboim *et al.*, 1999). O uso de drogas intravenosas é responsável por cerca de 20% dos casos acumulados de AIDS no Brasil (Soto *et al.*, 1997). Treitinger *et al.* (2000) estudaram a soroprevalência do HCV em 93 pacientes HIV-1 soropositivos em Santa Catarina e encontraram 88,2% de prevalência do HCV entre 34 usuários de drogas intravenosas.

Em um estudo realizado com 232 pacientes anti-HIV soropositivos cerca de 54% foram considerados também anti-HCV soropositivos (Pavan *et al.*, 2003). Em um estudo retrospectivo com 2.821 pacientes com AIDS do Brasil, onde 29,5% foram testados para sorologia, a prevalência do anti-HCV foi de 33% (Marins *et al.*, 2005). A prevalência do HCV em pacientes HIV-1 soropositivos tratados nos serviços de saúde em estudo realizado em Belém, região Norte do Brasil, foi de 16% (Monteiro e Nascimento, 2004) e na cidade de Santos, região Sudeste, 36,2% (Segurado *et al.*, 2004). Na cidade de São Paulo (região Sudeste) entre 1.457 pacientes HIV-1 soropositivos analisados, 17,7% eram soropositivos para o HCV (Mendes-Corrêa *et al.*, 2000).

Na cidade de Goiânia (região Centro-Oeste) (n = 592), Pereira *et al.* (2006) encontraram uma prevalência do HCV em 42% dos indivíduos HIV-1 soropositivos. A prevalência da co-infecção HIV-1/HCV no Distrito Federal e Entorno ainda não foi estimada, tornando-se necessário a realização de estudos mais aprofundados. É importante que se amplie o conhecimento epidemiológico da hepatite C em função do tempo, da diversidade genética do HCV, das características da população e da região geográfica afetada, com a identificação dos principais fatores de risco associados à transmissão do HCV para que, no futuro, se ampliem as estratégias de detecção, de prevenção e de controle da infecção.

A prevalência de anticorpos anti-HCV em indivíduos co-infectados com HIV-1/HCV varia de acordo com os fatores de risco da co-infecção e com o teste sorológico utilizado. Entre os hemofílicos HIV-1 soropositivos, a prevalência de anticorpos anti-HCV varia entre 60% a 90% (Navarro *et al.*, 2005). E ainda, a prevalência de anti-HCV pode ser subestimada devido às flutuações de anticorpos anti-HCV em pacientes soropositivos para o HIV-1, conforme foi observado em um estudo no qual 18 de 52 pacientes HIV-1 soropositivos e anti-HCV não reagentes apresentaram RNA-HCV positivo (Mendes-Corrêa *et al.*, 2001). No entanto, os testes para detecção de anticorpos anti-HCV são úteis para diagnosticar a exposição ao vírus, mas não evidenciam a viremia ativa (Majid e Gretch, 2002). Além disso, a presença de anticorpos anti-HCV não determina o estágio da infecção em que o indivíduo se encontra (Carvalho, 1999; Amorim, 2003).

No presente estudo, dentre as amostras de co-infectados analisadas, 5 amostras não tiveram o material genético amplificado para a região 5'UTR e 12 amostras não foram amplificadas para NS5B. A maioria dessas amostras anti-HCV positivas (10/12) apresentou níveis indetectáveis de carga viral nos testes quantitativos do HCV realizados no LACEN-DF. Na situação onde o teste anti-HCV é positivo e o PCR negativo, pode-se considerar algumas possibilidades como infecção crônica com os níveis de RNA flutuantes, eliminação viral espontânea ou supressão da infecção por meio de tratamento (Erensoy, 2001). E ainda, as amostras (2/12) que apresentaram valores elevados de carga viral, possivelmente não tiveram seu material genético amplificado pela PCR devido às limitações da técnica que envolve, por exemplo, a escolha dos iniciadores e a conservação da região genômica utilizada (Zein, 2000).

Corroborando os resultados encontrados neste estudo, a região NS5B não apresenta a mesma conservação encontrada na região 5'UTR (Majid e Gretch, 2002).

## 5.2 Os genótipos do HCV

A determinação do genótipo do HCV é um parâmetro para o prognóstico da resposta ao tratamento antiviral uma vez que o genótipo 1 está associado a uma menor resposta virológica sustentada (40-45%) quando comparado com os genótipos 2 e 3, cuja resposta virológica sustentada é de 70-80% na terapia combinada de interferon com ribavirina. Além disso, a genotipagem é importante epidemiologicamente, pois os seis genótipos apresentam distribuição geográfica distinta. Embora os genótipos 1, 2 e 3 apresentem uma distribuição mundial, sua relativa prevalência varia de uma área geográfica pra outra. O genótipo 4 do HCV, por exemplo, é encontrado no Oriente Médio e Norte da África, e os genótipos 5 e 6 no Sul da África e Ásia, respectivamente (Simmonds *et al.*, 2005).

No Brasil, um país de dimensões continentais, estudos realizados na população de doadores de sangue retratam a diversidade genotípica do HCV. Na região Centro-Oeste do país, em um estudo realizado em Goiânia (n = 42), o subtipo 1a foi o mais prevalente (50%), seguido dos subtipos 3a (30,9%) e 1b (16,7%). Outro estudo, realizado no Mato Grosso (n = 44), entretanto, encontrou que o subtipo 1b (29,5%) foi mais freqüente que o subtipo 3a (25%). No Mato Grosso do Sul (n = 38), subtipos 1a e 1b foram igualmente detectados (36,8%), seguidos pelo subtipo 3a (21,1%). O subtipo 2b raramente foi encontrado nesses estudos, com valores de 2,4%, 4,5% e 5,3%, respectivamente (Martins *et al.*, 2006). No Distrito Federal (n = 41), Amorim (2003) encontrou que o genótipo 1 foi o mais prevalente (60,9%) na população de doadores de sangue, seguido pelo genótipo 3 (39,1%) sendo o subtipo 3a (39%) mais freqüente que os subtipos 1a (34,1%) e 1b (26,8%).

Estudos sobre a prevalência de genótipos do HCV na população de indivíduos co-infectados com HIV-1 e HCV são escassos no Brasil. Em um estudo realizado em indivíduos co-infectados do noroeste de São Paulo e do Mato Grosso do Sul (n = 35) 77% dos HCVs foram caracterizados como genótipo 1 e os demais como genótipo 3 (Aguiar *et al.*, 2005). Em Goiânia (Centro-Oeste) Pereira *et al.* (2006) demonstraram que o subtipo 3a foi encontrado em 86% das amostras, seguido de 14% do subtipo 1a.

No presente estudo sobre a caracterização molecular em indivíduos co-infectados HCV/HIV-1, a prevalência dos genótipos na população de indivíduos co-infectados foi determinada por meio de seqüenciamento das regiões genômicas 5'UTR e NS5B do HCV e confirmada por meio de análise filogenética dessas regiões genômicas. O genótipo do HCV mais prevalente nas amostras de indivíduos com co-infecção HIV-1/HCV foi o genótipo 1 com 81%, seguido dos genótipos 3 (10%), 2 (6%) e 4 (3%). Os genótipos 2 e 4, raros no Brasil (Martins *et al.*, 2006), foram descritos aqui pela primeira vez na população HCV positiva do Distrito Federal mono ou co-infectada com outros vírus.

Trabalhos demonstram que quando diferentes regiões do genoma, como 5'UTR, *core*, NS3 e NS5 são seqüenciadas, os resultados dos genótipos são concordantes (Zein, 2000; Majid e Gretch, 2002). A concordância entre os resultados de genotipagem encontrados neste estudo e feito para as regiões 5'UTR e NS5B foi de 97% para os genótipos e 90% para os subtipos, resultado corroborado por outros trabalhos da literatura (Zein, 2000; Majid e Gretch, 2002). A concordância apresentada para a determinação dos subtipos (90%) foi menor porque a análise de diferentes regiões do genoma pode resultar em diferentes subtipos (Arens, 2001) e, além disso, em 5% a 10% das amostras cujos subtipos são determinados por meio da seqüência da região 5'UTR o método não consegue distinguir os subtipos 1a do 1b (Erensoy, 2001).

O seqüenciamento de 5'UTR fornece uma efetiva discriminação dos principais genótipos, embora apresente limitações na distinção entre alguns subtipos (Germer *et al.*, 1999; Halfon *et al.*, 2001b), sendo indicado o seqüenciamento de outras regiões genômicas para uma melhor exatidão na determinação dos subtipos (Robertson *et al.*, 1998). Outros estudos analisando diferentes regiões genômicas do HCV precisam ser conduzidos para permitir um melhor entendimento da dinâmica da infecção do HCV no Brasil, uma vez que a maioria dos dados disponíveis é proveniente da análise de 5'UTR e, geralmente, não classificam os isolados virais até o nível de subtipo devido às conhecidas limitações do uso de 5'UTR.

No presente estudo, duas amostras (2/31) tiveram seus resultados limitados na determinação do subtipo na análise da região 5'UTR porque em alguns isolados, apenas uma ou duas mudanças nucleotídicas distinguem os subtipos como, por exemplo, a substituição na posição -99 da adenina pela guanina entre os subtipos 1a e

1b. No entanto, tem sido demonstrado que a classificação do HCV em nível de genótipo é suficiente para o prognóstico clínico e terapêutico (Camiotto *et al.*, 2005).

A prevalência dos genótipos e subtipos encontrada neste estudo está de acordo com os resultados de outros estudos de caracterização molecular do HCV circulante na população de doadores de sangue da região do Centro-Oeste (Martins *et al.*, 1998; Amorim, 2003), onde existe maior prevalência do genótipo 1, o que tem importância epidemiológica e clínica, sendo útil no prognóstico e no tratamento da infecção (Zein *et al.*, 2002; Hoofnagle, 2002).

A falta de concordância entre os subtipos encontrados em 10% das amostras sugere que os métodos de genotipagem que visam à obtenção de maior distinção entre os variantes do HCV por meio da amplificação pela *nested-PCR* e seqüenciamento de uma única região genômica não asseguram a definição exata do subtipo, embora os resultados do presente estudo indiquem que, na maioria dos casos, existe uma alta concordância quando seqüências de 5'UTR e NS5B são usadas para definição apenas de genótipos do HCV.

A amostra 7 foi caracterizada como genótipo 1 pela análise de similaridade de seqüências do banco genômico do HCV e análise filogenética para a região 5'UTR e como genótipo 3 para a região NS5B. Uma das possíveis explicações seria a infecção mista por mais de um genótipo, apesar de raros, casos de co-infecção com mais de um genótipo do HCV já foram documentados (Swan e Raymond, 2004). Além disto, como se trata de um paciente com provável comportamento de risco, uma vez que apresenta co-infecção com HIV-1/HCV este paciente pode ter sido exposto a mais de um genótipo de HCV.

### **5.3 A Diversidade Genética do HCV e a Co-infecção com o HIV-1**

O estudo da diversidade viral fornece um melhor entendimento sobre a origem e dinâmica da infecção viral. Pybus *et al.* (2001) encontraram diferença significativa de comportamento entre os diferentes genótipos do HCV ao observarem que os genótipos 1 e 3 se espalharam antes dos métodos de triagem de doação de sangue serem adotados, enquanto que infecções com genótipos 4 e 6 seguiram o padrão das doenças adquiridas por uma ampla variedade de rotas domésticas e sociais não definidas.

Identificar o genótipo do HCV é clinicamente importante porque pode prever a resposta à terapia antiviral, sendo o genótipo 1 associado à maior resistência ao tratamento. Entretanto, não existe consenso se a diferença na gravidade clínica e histológica da doença pode ser explicada pelas diferenças entre os genótipos infectantes. Estudos sugerem que o genótipo 1b esteja associado a uma maior gravidade da doença embora esses resultados apresentem divergência com outros estudos que relataram pouca ou nenhuma influência do genótipo na progressão da doença (Harris *et al.*, 2006).

Estudos que analisam o papel dos genótipos do HCV na eliminação viral espontânea também apresentam resultados controversos. Alguns estudos não encontram associação entre o genótipo do vírus e a eliminação do RNA-HCV, com fatores do hospedeiro, como o sexo do paciente, sendo mais importantes, enquanto que alguns estudos têm sugerido que a infecção com subtipo 1b pode ter menor capacidade de ser eliminada espontaneamente quando comparada com a infecção causada por outros genótipos (Campiotto, 2005; Harris *et al.*, 2006).

Após a introdução da terapia antiretroviral a infecção do HCV tem sido considerada a principal causa de morbidade e mortalidade entre indivíduos co-infectados com HIV-1. Indivíduos co-infectados apresentam uma morbidade mais elevada do que indivíduos mono-infectados com HIV-1, e a infecção pelo HCV é considerada um prognóstico para mortalidade (Rockstroh *et al.*, 2005).

Alguns estudos sugerem que a viremia do HCV é maior em pacientes HIV-1 positivos quando comparado com pacientes não co-infectados com HIV-1 (Hall *et al.*, 2004). Um estudo realizado em São Paulo com 1457 pacientes HIV-1 soropositivos demonstrou que 17,7% eram anti-HCV positivos e, destes, 98% eram positivos também para RNA-HCV (Mendes-Corrêa e Barone, 2000). Ainda com relação à co-infecção HIV-1/HCV, foi observado por alguns autores que a resposta à HAART sofre influência do HCV, com resultados inferiores, sobretudo da contagem de células CD4, quando comparados com o que ocorre nos pacientes sem co-infecção (Swan e Raymond, 2004; Rockstroh *et al.*, 2005).

O tratamento da infecção pelo HCV torna-se importante para alcançar maior sobrevida e melhor qualidade de vida dos indivíduos co-infectados (Zoccratto *et al.*, 2006). A co-infecção com HIV-1/HCV representa um maior risco de progressão para a doença crônica do fígado do que a infecção apenas com HCV (Swan e Raymond,

2004). A elevação da hepatotoxicidade foi relatada em pacientes co-infectados devido ao uso de drogas inibidoras de protease (Mendes-Corrêa e Barone, 2000).

O genótipo do HCV é o principal determinante na resposta ao tratamento da hepatite C crônica. Apesar dos dados relativos às taxas de resposta na infecção com o genótipo 4 do HCV serem limitados e controversos, um grande estudo realizado com amostras da França e do Egito infectadas com genótipo 4 observou que pacientes infectados com o subtipo 4a respondem melhor ao tratamento do que aqueles infectados com subtipo 4d. Observou-se ainda que, assim como ocorre com a infecção do genótipo 1 do HCV, uma baixa carga viral do genótipo 4 antes do tratamento tem significativa associação com melhor resposta ao tratamento. De acordo com o estudo, o subtipo do HCV influencia a resposta ao tratamento em pacientes infectados com HCV 4 (Roulot *et al.*, 2007).

Entre os genótipos do HCV, o genótipo 3 tem sido associado à elevação do nível de transaminases durante a HAART, exercendo um papel mais expressivo do que as drogas na hepatotoxicidade. No estudo de Mendes-Corrêa e Barone (2000), relativo a pacientes infectados com genótipo 3 atendidos na cidade de São Paulo, 89,2% apresentavam níveis de ALT muito elevados, mas ainda não está claro se o HCV genótipo 3 pode representar um fator de risco adicional na elevação das transaminases durante a HAART (Torti *et al.*, 2006).

O efeito da HAART na carga viral do HCV ainda é controverso. Muitos estudos demonstraram nenhuma mudança nos títulos do RNA-HCV com o uso da HAART (Rockstroh *et al.*, 1998; Torre *et al.*, 2001) enquanto que em outros estudos houve um aumento transiente (Rutschman *et al.*, 1998; Puoti *et al.*, 2000) ou sustentado (Ragni *et al.*, 1999) na carga do HCV e, ainda, outros estudos demonstraram uma diminuição nos níveis de RNA-HCV e, em alguns casos, o clareamento do HCV (Swan e Raymond, 2004). O aumento da carga viral do HCV associado ao longo tratamento da HAART pode não ser um fator prognóstico da gravidade da doença causada pelo HCV ou pelo HIV-1, mas pode ser importante para prever a resposta à terapia com interferon (Babik e Holodniy, 2003).

No presente estudo, as análises das seqüências por meio do programa HCV\_BLAST (Kuiken *et al.*, 2005) e análise filogenética definiram os genótipos e os subtipos das amostras de HCV circulantes em indivíduos co-infectados com HIV-1/HCV no Distrito Federal. Como pôde ser observado nas figuras 9 e 10, as amostras

se agruparam junto aos isolados referência dos genótipos 1, 2, 3 e 4 com valores de *bootstrap* superiores a 87% para NS5B e 70% para 5'UTR validando essas informações. Não foi possível a distinção entre os subtipos 1a e 1b pela análise filogenética da região 5'UTR, pois as seqüências desses subtipos apresentam grande similaridade, e assim as amostras de genótipo 1 se agruparam aleatoriamente, sem a formação de aglomerados distintos de subtipos 1a e 1b. A presença de genótipos 1, 2, 3 e 4 do HCV na população de co-infectados com HIV-1-HCV merece ser investigada mais profundamente, pois esses genótipos têm importância na predição da resposta ao tratamento antiviral.

## 6. CONCLUSÕES

- A prevalência do Genótipo 1 (81%) do HCV na população de co-infectados atendidos no DF e Entorno foi significativamente maior do que a dos genótipos 2, 3 e 4 juntos (19%);
- A prevalência do subtipo 1a (77%) do HCV foi significativamente maior do que a dos outros subtipos juntos (23%);
- A concordância entre a genotipagem realizada para as regiões de 5'UTR e NS5B foi de 100% na caracterização dos genótipos e 93% na caracterização dos subtipos;
- A análise filogenética das seqüências se mostrou uma importante ferramenta para genotipagem, uma vez que permitiu confirmar os resultados da genotipagem e definir, com base nos agrupamentos da árvore de NS5B, aqueles subtipos que não puderam ser definidos por meio da genotipagem de 5'UTR;
- Os dados obtidos por este trabalho estão de acordo com aqueles obtidos em estudos realizados com outras populações mono-infectadas com HCV da região Centro-Oeste.

## **7. PERSPECTIVAS**

O presente trabalho é um estudo de série histórica de amostras de indivíduos co-infectados por HIV-1/HCV atendidos pelo sistema de saúde pública do Distrito Federal e Entorno, que teve como principal objetivo caracterizar molecularmente os genótipos e subtipos e suas respectivas prevalências nesta região geográfica do Brasil.

Nesse contexto, deve-se ressaltar a importância de se conhecer por meio de mais estudos a prevalência da população de indivíduos co-infectados por HIV-1/HCV na população de indivíduos HIV-1 soropositivos e na população de HCV soropositivos do Distrito Federal e Entorno, visto a escassez de dados que afeta essa região do país. Com isso, juntamente com os dados gerados por meio dessa avaliação de série histórica será possível obter um melhor perfil epidemiológico da população de co-infectados por HIV-1/HCV.

Mais análises são necessárias para se obter um perfil da infecção do HCV nos indivíduos do Distrito Federal e Entorno co-infectados por HIV-1/HCV que possibilitem gerar dados que contribuirão para as análises da história evolutiva do HCV nessa região e que permitirão comparar com os dados obtidos em outras regiões do país contribuindo, possivelmente, para um melhor entendimento da epidemia de HCV no Brasil.

Em conclusão, a necessidade de uma cuidadosa avaliação epidemiológica no Brasil nos diferentes grupos populacionais é reforçada pelo fato do conhecimento da frequência e distribuição dos genótipos poderem fornecer informações fundamentais para o entendimento da dispersão do HCV bem como fornecer subsídios para direcionamentos do tratamento. E ainda, esses dados podem ajudar profissionais da saúde a tratarem melhor os pacientes infectados com HIV-1 e reforçam a necessidade de programas de prevenção da transmissão do HIV-1.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- AGUIAR, J.I.; UEHARA, S.N.; OLIVEIRA, P.A.; DA COSTA, M.P.; DAHER, R.R.; SILVA, B.S.; VASCONCELLOS, R.L.; SANTOS, V. Avaliação preliminar da associação do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) com as hepatites virais do tipo B e C em dois centros de investigação do Brasil. *Rev. Panam. Infectol.* 7 (2):29-32. 2005.
- ALBERTI, A; BENVIGNÒ, L. Management of hepatitis C. *Journal of Hepatology* 38: S104-S118. 2003.
- ALTER, H.J.; PURCELL, R.H.; SHIH, J.W.; MELPOLDER, J.C.; HOUGHTON, M.; CHOO, Q.L. *et al.* 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: 1494. 1989.
- ALTER, H.J. & HOUGHTON, M. Hepatitis C Virus and eliminating post-transfusion hepatitis. *Nature Medicine* 6(10): 1082-1086. 2000.
- ALTER, M.J.; MARGOLIS, H.S.; KRAWCZYNSKI, K.; JUDSON, F.N.; MARES, A.; ALEXANDER, W.J.; HU, P.Y.; MILLER, J.K.; GERBER, M.A.; SAMPLINER, R.E.; *et al.* The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team *New England Journal of Medicine* 327: 1899 – 1905. 1992.
- AMORIM, R.M.S. Caracterização molecular do vírus da hepatite C em doadores de sangue do Distrito Federal. *Dissertação de Mestrado*. Universidade de Brasília. Instituto de Ciências Biológicas Departamento de Biologia Celular. 2003.
- AMOROSO, P.; RAPICETTA, M.; TOSTI, M.E.; *et al.* Correlation between virus genotype and chronicity rate in acute hepatitis C. *J. Hepatol.* 28(6):939-44. 1998.
- APPEL, N.; SCHALLER, T.; PENIN, F.; BARTENSCHLAGER, R. From Structure to Function: New Insights into Hepatitis C Virus RNA Replication. *J. Biol. Chem.* 281: 9833 – 9836. 2006.
- ARENS, M. Clinically relevant sequence-based genotyping of HBV, HCV, CMV, and HIV-1. *Journal of Clinical Virology* 22(1): 11-29. 2001.
- BABIK, J.M. & HOLODNIY, M. Impact of Highly Active Antiretroviral Therapy and Immunologic Status on Hepatitis C Virus Quasispecies Diversity in Human

- Immunodeficiency Virus/Hepatitis C Virus-Coinfected Patients *Journal of Virology* 77: 1940 – 1950. 2003.
- BANTEL, H. & SCHULZE-OSTHOFF, K. Apoptosis in hepatitis C virus infection. *Cell Death Differ* 10 Suppl 1: S48-58. 2003.
- BARTOSCH, B. & COSSET, F.L. Cell entry of hepatitis C virus. *Virology* 348(1): 1-12. 2006.
- BLATT, L.M.; MUTCHNICK, M.G.; TONG, M.J.; *et al.* Assessment of hepatitis C virus RNA and genotype from 6807 patients with chronic hepatitis C in the United States. *J. Viral Hepat.* 7(3):196-202. 2000.
- BLIGHT, K.J.; KOLYAKHALOV, A.A.; RICE, C.M. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 290: 1972-1974. 2000.
- BOWEN, D.G.; WALKER, C.M. Mutational escape from CD8<sup>+</sup> T cell immunity: HCV evolution, from chimpanzees to man. *J. Exp. Med.* 201: 1709 – 1714. 2005.
- BRAITSTEIN, P.; PALEPU, A.; DIETERICH, D.; BENHAMOU, Y.; MONTANER, J.S. Special considerations in the initiation and management of antiretroviral therapy in individual coinfecting with HIV-1 and hepatitis C. *AIDS* 18: 2221-2234. 2004.
- BUKH, J.; PUCELL, R. H.; MILLER, R. H. At least 12 genotypes of hepatitis C virus predicted by sequence analysis of the putative E1 gene of isolates collected worldwide. *Proceedings Of National Academic Sciences* 90: 8234-8238. 1993.
- BUSEK, S.; OLIVEIRA, G. Molecular epidemiology of the hepatitis C virus in Brazil. *Genetics and Molecular Research* 2 (1): 117-123. 2003.
- CAMPIOTTO, S.; PINHO, J.R.R.; CARRILHO, F.J. *et al.* Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Brazilian Journal of Medical Biological Research* 38(1): 41-49. 2005.
- CARVALHO, E. Hepatitis C em hemofílicos: aspectos epidemiológicos, laboratoriais e clínicos, *Dissertação de Mestrado*. Brasília DF, 165pp. 1999.
- CAUDAI, C.; PIANESE, M.; ZACCHINI, F.; TOTI, M.; ZAZZI, M.; VALENSIN, P.E. Longitudinal study in HIV-1/HCV co-infected HAART-naive patients and role of HCV genotype. *Journal of Clinical Virology* 32(2):151-5. 2005.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Updated U.S. Public Health Service guidelines on the management of occupational exposures to HBV, HCV and HIV-1 and recommendations for post-exposure prophylaxis. *MMWR* 50: 1-67. 2001.

- CHEN, Z.; WECK, K.E. Hepatitis C Virus Genotyping: Interrogation of the 5' Untranslated Region Cannot Accurately Distinguish Genotypes 1a and 1b. *Journal of Clinical Microbiology* 40 (9): 3127-3134. 2002.
- CHISARI, F. V. Unscrambling hepatitis C virus-host interactions. *Nature* 436(7053): 930-932. 2005.
- CHOO, Q.L.; KUO, G.; WEINER, A.J.; OVERBY, L.R.; BRADLEY, D.W.; HOUGHTON, M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244: 359-362. 1989.
- CHOO, Q.L.; RICHMAN, K.H.; HAN, J.H.; BERGER, K.; LEE, C.; DONG, C.; GALLEGOS, C.; COIT, D.; MEDINA-SELBY, A.; BARR, P.J.; WEINER, A.J.; BRADLEY, D.W.; KUO, G.; HOUGHTON, M. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.* 88: 2451-2455. 1991.
- CONSENSO ARGENTINO DE CO-INFECÇÃO HIV-HCV, p.13. 2005
- CORBET, S.; BUKH, J.; HEISEN, A.; FOMSGAARD, A. Hepatitis C virus subtyping by a Core-Envelope 1-Based reverse transcriptase PCR assay with sequencing and its use in determining subtype distribution among Danish patients. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 1091-1100. 2003.
- CRISTINA, J. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus in the Latin American region. *J. Clin. Virol.* 34 Suppl. 2: S1-7. 2005.
- DAVIES, L. HIV-1 Treatment Bulletin. *HCV coinfection - part 1*. Vol. 6, No. 8, MSc for HIV-1 i-Base. 2005.
- de OLIVEIRA, T.; PYBUS, O.G.; RAMBAUT, A.; SALEMI, M.; CASSOL, S.; CICCOCCHI, M.; REZZA, G.; GATTINARA, G.C.; D'ARRIGO, R.; AMICOSANTE, M.; PERRIN, L.; COLIZZI, V.; PERNO, C.F.; & BENGHAZI STUDY GROUP. Molecular epidemiology: HIV-1 and HCV sequences from Libyan outbreak. *Nature* 444 (7121): 836-837. 2006.
- DEUFFIC-BURBAN, S.; POYNARD, T.; SULKOWSKI, M. S. AND WONG, J.B. Estimating the future health burden of chronic hepatitis C and human immunodeficiency virus infections in the United States. *Journal of Viral Hepatology* 14(2): 107 – 115. 2007.

- DOGLIO, A.; LAFFONT, C.; THYSS, S.; LEFEBVRE, J.-C. Rapid genotyping of hepatitis C virus by direct cycle sequencing of PCR-amplified cDNAs and capillary electrophoresis analysis. *Research Virology* 149: 219-227. 1998.
- DOORN, L.J.D.; KLETER, B.; PIKE, I.; QUINT, W. Analysis of hepatitis C virus isolates by serotyping and genotyping. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 1784-1787. 1996.
- DORRUCCI, M.; VALDARCHI, C.; SULIGOI, B.; ZACCARELLI, M.; SINICCO, A.; GIULIANI, M.; VLAHOV, D.; PEZZOTTI, P.; REZZA, G. The effect of hepatitis C on progression to AIDS before and after highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 18 (17):2313-8. 2004.
- DUMOULIN, F.L.; VON DEM BUSSCHE, A.; LI, J.; KHAMZINA, L.; WANDS, J.R.; SAUERBRUCH, T.; SPENGLER, U. Hepatitis C virus NS2 protein inhibits gene expression from different cellular and viral promoters in hepatic and nonhepatic cell lines. *Virology* 305:260-266. 2003.
- ERENSOY, S. Diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection and laboratory monitoring of its therapy. *Journal of Clinical Virology* 21: 271-281. 2001.
- EWING, B. & GREEN, P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities *Genome Research* 8: 186 – 194. 1998.
- FAINBOIM, H.; GONZALEZ, J.; FASSIO, E.; MARTINEZ, A.; ORTEGUI, L.; EPOSTO, M.; CAHN, P.; MARINO, R.; LANDEIRA, G.; SUAYA, G.; GANCEDO, E.; CASTRO, R.; BRAJTERMAN, L.; LAPLUME, H. Prevalence of hepatitis viruses in an anti-human immunodeficiency virus-positive population from Argentina. A multicentre study. *J. Viral Hepatitis* 6: 53-57. 1999.
- FARCI, P.; SHIMODA, A.; COIANA, A.; DIAZ, G.; PEDDIS, G.; MELPOLDER, J.C. The Outcome of Acute Hepatitis C Predicted by the Evolution of the Viral Quasispecies. *Science* 288 (5464): 339-344. 2000.
- FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. *Virus Taxonomy - The VIII ICTV Virus Taxonomy Report*. New York: Academic Press, pp 993-998. 2005.
- FELD, J.J.; HOOFNAGLE, J.H. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* 436: 929-978. 2005.
- FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.*, 17(6), 368 – 376. 1981.

- FOCACCIA, R.; da CONCEIÇÃO, O.J.; SETTE, H.J.; SABINO, C.; BASSIT, L.; NITRINI, D.R.; LOMAR, A.V.; LORENÇO, R.; SOUZA, F.V. de; KIFFER, C.R.V.; SANTOS, B.; GONZALES, M.P.; ALQUEZAR, A.S.; RISCAL, J.R.; FISHER, D. Estimated Prevalence of Viral Hepatitis in the General Population of the Municipality of Sao Paulo, Measured by a Serologic Survey of a Stratified, Randomized and Residence-Based Population. *The Brazilian Journal Of Infectious Diseases* 2 (6): 269-84. 1998.
- FORNS, X.; COSTA, J. HCV virological assessment. *Journal of Hepatology* 44 Suppl 1: S35-S39. 2006.
- FRANCK, N.; LE SEYEC, J.; GUGUEN-GUILLOUZO, C.; ERDTMANN, L. Hepatitis C Virus NS2 Protein Is Phosphorylated by the Protein Kinase CK2 and Targeted for Degradation to the Proteasome. *J. Virol.* 79: 2700 – 2708. 2005.
- FREITAS, J. de. Hepatites víricas. (editor.: José Cotter) cap. 1, Editora NGHD. 2003.
- FRIED, M.W.; SHIFFMAN, M.L.; REDDY, K.R.; SMITH, C.; MARINOS, G.; GONÇALES, F.L.; HÄUSSINGER, D.; DIAGO, M.; CAROSI, G.; DHUMEAUX, D.; CRAXI, A.; LIN, A.; HOFFMAN, J.; YU, J. Peguinterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* 347: 975-982. 2002.
- GARTEN, R.J.; ZHANG, J.; LAI, S.; LIU, W.; CHEN, J.; YU, X.F.. Coinfection with HIV-1 and Hepatitis C Virus among Injection Drug Users in Southern China. *Clinical Infectious Diseases* 41: S18–S24. 2005.
- GERMER, J.J.; RYS, P.N.; THORVILSON, J.N.; PERSING, D.H. Determination of hepatitis C virus genotype by direct sequence analysis of products generated with the Amplicor HCV test. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 2625-2630. 1999.
- GINABREDA, M.G.; YOSHIDA, C.F. AND NIEL, C. Genomic characterization of Brazilian hepatitis C virus genotypes 1a and 1b. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30 (3): 339 – 345. 1997.
- GREUB, G.; LEDERGERBER, B.; BATTEGAY, M.; GROB, P.; PERRIN, L.; FURRER, H.; BURGISSER, P.; ERB, P.; BOGGIAN, K.; PIFFARETTI, J. C.; HIRSCHL, B.; JANIN, P.; FRANCIOLI, P.; FLEPP, M.; TELENTI, A. Clinical progression, survival and immune recovery during anti-retroviral therapy in patients with HIV-1 and HCV: the Swiss HIV-1 Cohort Study. *Lancet* 356: 1800-1805. 2000.

- HALFON, P.; RIFLET, H.; RENOU, C.; QUENTIN, Y.; CACOUB, P. Molecular evidence of male-to-female sexual transmission of hepatitis C virus after vaginal and anal intercourse. *J. Clin. Microbiol.* 39: 1204-1206. 2001a.
- HALFON, P.; TRIMOULET, P.; BOURLIERE, M.; *et al.* Hepatitis C virus genotyping based on 5' noncoding sequence analysis (TRUGENE). *Journal of Clinical Microbiology* 39: 1771-1773. 2001b.
- HALL, C.S.; CHARLEBOIS, E.D.; HAHN, J.A.; MOSS, A.R.; BANGSBERG, D.R. Hepatitis C virus infection in San Francisco's HIV-1-infected urban poor. *Journal of General International Medicine* 19 (4): 357-65. 2004.
- HARRIS, H.E.; RAMSAY, M.E.; ANDREWS, N.J. & HCV NATIONAL REGISTER STEERING GROUP. Survival of a national cohort of hepatitis C virus infected patients, 16 years after exposure. *Epidemiology and Infection* 134(3): 472 – 477. 2006.
- HOFMANN, W.P.; ZEUZEM, S.; SARRAZIN, C. Hepatitis C virus-related resistance mechanisms to interferon  $\alpha$ -based antiviral therapy. *Journal of Clinical Virology* 2 (32): 86-91. 2005.
- HOOFNAGLE, J.H. Course and Outcome of Hepatitis C. *Hepatology* 36: S21-S29. 2002.
- HSU, M.; ZHANG, J.; FLINT, M.; LOGVINOFF, C.; CHENG-MAYER, C.; RICE, C.M. & MCKEATING, J.A. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent fusion and cell entry of pseudotyped retroviral particles. *PNAS* 100: 7271–7276. 2003.
- ICHIMURA, H.; TAMURA, I.; KURIMURA, O.; *et al.* Hepatitis C virus genotypes, reactivity to recombinant immunoblot assay 2 antigens and liver disease. *Journal of Medical Virology* 43: 212-215. 1994.
- KAMILI, S.; KRAWCZYNSKI, K.; MCCAUSTLAND, K.; LI, X.; & ALTER, M.J. Infectivity of hepatitis C virus in plasma after drying and storing at room temperature. *Infection Control Hospital Epidemiology* 28 (5): 519 – 524. 2007.
- KARLIN, S. & ALTSCHUL, S.F. Methods for Assessing the Statistical Significance of Molecular Sequence Features by Using General Scoring Schemes *PNAS* 87: 2264. 1990.
- KARLIN, S. & ALTSCHUL, S.F. Applications and Statistics for Multiple High-Scoring Segments in Molecular Sequences. *PNAS* 90: 5873. 1993.

- KARMOCHKINE, M.; CARRAT, F.; DOS SANTOS, O.; CACOUB, P. & RAGUIN, G. A case-control study of risk factors for hepatitis C infection in patients with unexplained routes of infection. *Journal of Virological Hepathology* 13 (11): 775 - 782. 2006.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16(2): 111 – 120. 1980.
- KORETZ, R.L.; ABBEY, H.; COLEMAN, E.; & GITNICK, G. Non-A, Non-B Post-Transfusion Hepatitis: Looking Back in the Second Decade *Ann. Intern. Med.* 119: 110 – 115. 1993.
- KUIKEN, C.; YUSIM, K.; BOYKIN, L.; & RICHARDSON, R. The Los Alamos hepatitis C sequence database. *Bioinformatics* 21: 379 – 384. 2005.
- KUO, G.; CHOO, Q.L.; ALTER, H.J.; GITNICK, G.L.; REDEKER, A.G.; PURCELL, R.H.; MIYAMURA, T.; DIENSTAG, J.L.; ALTER, M.J.; STEVENS, C.E.; TEGTMEIER, G.E.; BONINO, F.; COLOMBO, M.; LEE, W.S.; KUO, C.; BERGER, K.; SHUSTER, J.R.; OVERBY, L.R.; BRADLEY, D.W.; HOUGHTON, M. An Assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 244: 362-364. 1989.
- LAUER, G.M. & WALKER, B.D. Hepatitis C virus infection. *New England Journal of Medicine* 345 (1): 41-52. 2001.
- LINDENBACH, B.D.; EVANS, M.J.; SYDER, A.J., WOLK, B.; TELLINGHUISEN, T.L.; LIU, C.C.; MARUYAMA, T.; HYNES, R.O.; BURTON, D.R.; MCKEATING, J.A.; RICE, C.M. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309:623-626. 2005.
- LINDENBACH, B.D. & RICE, C.M. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 436 (7053):933-938. 2005.
- LOCARNINI, S.A. Mechanisms of drugs resistance and novel approaches to therapy for chronic hepatitis C. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 17: S351-S359. 2002.
- LOHMANN, V.; KORNER, F.; KOCH, J.; HERIAN, U.; THEILMANN, L.; BARTENCHLGER, R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hematoma cell line. *Science* 285:110-3. 1999.

- MAJID, A.M. & GRETCH, D.R. Current and future hepatitis C virus diagnostic testing: problems and advancements. *Microbes and Infection* 4(12): 1227 – 1236. 2002.
- MARINS, J.R.; BARROS, M.B.; MACHADO, H.; CHEN, S.; JAMAL, L.F.; HEARST, N. Characteristics and survival of AIDS patients with hepatitis C: the Brazilian National Cohort of 1995-1996. *AIDS* 19, Suppl 4:S27-30. 2005.
- MARTINS, R.M.B.; VANDERBORGHT, B.O.M.; YOSHIDA, C.F.T. Hepatitis C virus genotypes among blood donors from different regions of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93(3): 299-300. 1998.
- MARTINS, R.M.B.; TELES S.A.; FREITAS, N.R.; MOTTA-CASTRO, A.R.; SOUTO, F.J.; MUSSI, A.; AMORIM, R.M. & MARTINS, C.R. Distribution of hepatitis C virus genotypes among blood donors from mid-west region of Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 48(1): 53 – 55. 2006.
- MATTHEWS-GREER, J.M.; CALDITO, G.C.; ADLEY, S.D.; WILLIS, R.; MIRE, A.C.; JAMISON, R.M.; MCRAE, K.L.; KING, J.W. & CHANG, W.L. Comparison of HCV viral loads in patients with or without HIV-1. *Clin. Diagn. Immunol.* 8(4): 690-694, 2001.
- MENDES-CORRÊA, M.C.J.; BARONE, A.A.; CAVALHEDO, N. de P.; TENGAN, F. M.; GUASTINI, C. Prevalência das hepatites B e C em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana, em São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 42, no.2, p.81-85. 2000.
- MENDES-CORRÊA, M.C.J. & BARONE, A.A. - Safety and efficacy of interferon-alfa and interferon-alfa plus ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C in HIV infected patients under HAART. *Hepatology* 32: 1582. 2000.
- MENDES-CORRÊA, M.C.J.; BARONE, A.A. & CAVALHEIRO, N. - Avaliação da viremia para o vírus da hepatite C em pacientes co-infectados pelo HIV e pelo vírus da hepatite C. *Braz. J. Infect. Dis.*, 5 (supl. 2): S5. 2001.
- MENDES-CORRÊA, M.C.J. & BARONE, A.A. Hepatitis C in patients co-infected with immunodeficiency virus. A review and experience of brazilian ambulatory. *Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo* 47 (2): 59-64. 2005.
- MERCER, D.F.; SCHILLER, D.E.; ELLIOTT, J.F.; DOUGLAS, D.N.; HAO, C.; RINFRET, A.; ADDISON, W.R.; FISCHER, K.P.; CHURCHILL, T.A.; LAKEY,

- J.R.; TYRRELL, D.L. & KNETEMAN, N.M. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat. Med.* 7(8): 927-933. 2001.
- MONDELLI, M.U. & SILINI, E. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *J. Hepatol.* 31 (Suppl 1): 65-70. 1999.
- MONTEIRO, M.R. & NASCIMENTO, M.M. Hepatite C: prevalência e fatores de risco entre portadores do HIV-1/SIDA em Belém, Pará, na Amazônia Brasileira. *Rev. Soc. Brás. Med. Trop.* 37, Suppl 2: 40-6. 2004.
- MORTON, T.A. & KELEN, G.D. Hepatitis C. *Ann. Emerg. Med.* 31: 381-390. 1998.
- NAVARRO, R.M.; MENDES-CORREA, M.C.; CAVALHEIRO, N.P. & BARONE, A.A. Clinical laboratory assessment of hepatitis C and HIV-1 coinfecting patients according to the antiretroviral therapy received. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 47(1): 13-17. 2005.
- NEUMANN, A.U.; LAM, N.P.; DAHARI, H.; *et al.* Differences in viral dynamics between genotypes 1 and 2 of hepatitis C virus. *J. Infect. Dis.* 182(1):28-35. 2000.
- PAGE, R.D.M. Tree View: An application to display phylogenetic trees on personal computers *Computational Application in Biosciences* 12: 357 – 358. 1996.
- PANG, P.S.; JANKOWSKY, E.; PLANET, P.J.; PYLE, A.M. The hepatitis C viral NS3 protein is a processive DNA helicase with cofactor enhanced RNA unwinding. *EMBO. J.* 21(5): 1168-76. 2002.
- PAVAN, M.H.; AOKI, F.H.; MONTEIRO, D.T.; *et al.* Viral hepatitis in patients infected with human immunodeficiency virus. *Braz. J. Infect. Dis.* 7: 253-261. 2003.
- PENIN, F.; DUBUISSON, J.; REY, F.A.; MORADPOUR, D. & PAWLITSKY, J.M. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 39(1): 5-19. 2004.
- PEREIRA, G.A.; STEFANI, M.M.; MARTELLI, C.M.; TURCHI, M.D.; SIQUEIRA, E.M.; CARNEIRO, M.A. & MARTINS, R.M. Human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus co-infection and viral subtypes at an HIV-1 testing center in Brazil. *Journal of Medical Virology* 78(6): 719 – 723. 2006.
- POYNARD, T.; MARCELLIN, P.; LEE, S.S.; *et al.* Randomised trial of interferon a-2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon a-2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet* 352(9138):1426-32. 1998.

- POZZATO, G.; MORETTI, M.; CROCE, L.; *et al.* Interferon therapy in chronic hepatitis C virus: evidence to different outcome with respect to different viral strains. *Journal of Medical Virology* 45: 445-450. 1995.
- PUOTI, M.; GARGIULO, F.; ROLDAN, E.Q.; *et al.* Liver damage and kinetics of hepatitis C virus and human immunodeficiency virus replication during the early phases of combination antiretroviral treatment. *J. Infect. Dis.* 181: 2033. 2000.
- PYBUS, O.G.; CHARLESTON, M.A.; GUPTA, S.; RAMBAUT, A.; HOLMES, E.C.; & HARVEY, P.H. The Epidemic Behavior of the Hepatitis C Virus. *Science* 292: 2323 – 2325. 2001.
- RAGNI, M.V.; BONTEMPO, F.A. Increase in hepatitis C virus load in hemophiliacs during treatment with highly active antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.* 180: 2027–9. 1999.
- REID, A.E.; KOZIEL, M.J.; AIZA, I.; *et al.* Hepatitis C virus genotypes and viremia and hepatocellular carcinoma in the United States. *Am. J. Gastroenterol.* 94(6):1619-26. 1999.
- ROBERTS, E.A.; YEUNG, L. Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatology* 36 (5 Suppl 1):S106-113. 2002.
- ROBERTSON, B.; MYERS, G.; HOWARD, C.; *et al.* Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. *Archives of Virology* 143: 2493-2503. 1998.
- ROCKSTROH, J.H., THEISEN, A., KAISER, A.; *et al.* Antiretroviral therapy decreases HIV-1 viral load but does not alter hepatitis C virus (HCV) serum levels in HIV-1–HCV co-infected haemophiliacs. *AIDS* 12: 829–30. 1998.
- ROCKSTROH, J.K & SPENGLER, U. HIV-1 and hepatitis C co-infection. *Lancet Infectious Diseases* 4: 437-444. 2004.
- ROCKSTROH, J.K.; MOCROFT, A.; SORIANO, V.; TURAL, C.; LOSSO, M.H.; HORBAN, A.; KIRK, O.; PHILLIPS, A.; LEDERGERBER, B.; LUNDGREN, J.; EUROSIDA STUDY GROUP. Influence of Hepatitis C Virus Infection on HIV-1 Disease Progression and Response to Highly Active Antiretroviral Therapy. *The Journal of Infectious Diseases*, 192: 992–1002. 2005.
- ROULOT, D.; BOURCIER, V.; GRANDO, V.; DENY, P.; BAAZIA, Y.; FONTAINE, H.; BAILLY, F.; CASTERA, L.; LEDINGHEN, V. DE; MARCELLIN, P.; POUPON, R.;

- BOURLIÈRE, M.; ZARSKI, J.P.; ROUDOT-THORAVALL, F. Epidemiological characteristics and response to peginterferon plus ribavirin treatment of hepatitis C virus genotype 4 infection. *J. Viral. Hepat.* 14 (7):460-7. 2007.
- RUTSCHMANN, O.T.; NEGRO, F.; HIRSCHAEL, B.; *et al.* Impact of treatment of human immunodeficiency virus (HIV-1) protease inhibitors on hepatitis C viremia in patients coinfecting with HIV-1. *J. Infect. Dis.* 177:783. 1998.
- SAKAI, A., CLAIRE, M.S.; FAULK, K.; GOVINDARAJAN, S.; EMERSON, S. U.; PURCELL, R. H.; & BUKH, J. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 11646-11651. 2003.
- SEGURADO, A.C.; BRAGA, P.; ETZEL, A.; CARDOSO, M.R. Hepatitis C virus coinfection in a cohort of HIV-1-infected individuals from Santos, Brazil: seroprevalence and associated factors. *AIDS Patient Care STDS* 18 (3): 135-43. 2004
- SHEEHY, P.; MULLAN, B.; MOREAU, I.; KENNY-WALSH, E.; SHANAHAN, F.; SCALLAN, M. & FANNING, L.J. In vitro replication models for the hepatitis C virus. *J. Viral Hepat.* 14(1): 2-10. 2007.
- SHEPARD, C.W.; FINELLI, L.; ALTER, M.J. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infectious Diseases* 5: 558-67. 2005.
- SHERMAN, K.E.; ROUSTER, S.D.; CHUNG, R.T. & RAJICIC, N. Hepatitis C prevalence among patients co-infected with HIV-1: a cross-sectional analysis of the US Adult AIDS Clinical Trials Group. *Clin. Infect. Dis.* 34: 831-837. 2002.
- SHIRE, N.J.; SHERMAN, K.E. Clinical Trials of Treatment for Hepatitis C Virus Infection in HIV-1-Infected Patients: Past, Present, and Future. *Clinical Infectious Diseases*, 41: S63-S68. 2005.
- SIMMONDS, P.; HOLMES, E.C.; CHA, T.-A.; CHAN, S.-W.; McOMISH, F.; IRVINE, B.; BEALL, E.; YAP, P.L.; KOLBERG, J.; URDEA, M.S. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS5 region. *Journal of General Virology* 74: 2391-2399. 1993.
- SIMMONDS, P.; MELLOR, J.; CRAXI, A. *et al.* Epidemiological, clinical and therapeutic associations of hepatitis C types in western European patients. *Journal of Hepatology* 24: 517-524. 1996.

- SIMMONDS, P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on *J. Gen. Virol.* 85: 3173 – 3188. 2004.
- SIMMONDS, P.; BUKH, J.; COMBET, C.; DELEAGE, G.; ENOMOTO, N.; FEINSTONE, S. *et al.* Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42:962-73. 2005.
- SMITH, D.B.; PATHIRANA, S.; DAVIDSON, F.; LAWLOR, E.; POWER, J.; YAP, P.L.; SIMMONDS, P. The origin of hepatitis C virus genotypes. *Journal of General Virology* 78: 321-328. 1997.
- SOTO, B.; SANCHEZ-QUIJANO, A.; RODRIGO, L.; *et al.* Human immunodeficiency virus infection modifies the natural history of chronic parenterally-acquired hepatitis C with an unusually rapid progression to cirrhosis. *Journal of Hepatology* 26(1):1-5. 1997.
- STUYVER, L.; WYSEUR, A.; VAN ARNHEM, W.; HERNANDEZ, F.; & MAERTENS, G. Second-generation line probe assay for hepatitis C virus genotyping. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2259-2266. 1996.
- SWAN, T.; RAYMOND, D. Editado por SHERMAN, K.E.; CURRY, J.; HARRINGTON, M.; HUFF, B. *Hepatitis C Virus (HCV) and HIV-1/HCV Coinfection: A Critical Review of Research and Treatment.* In: *Genotype* Vol. 1, Cap. 2, p.44-46. Treatment Action Group, New York, NY. 2004.
- TAKAHASHI, M.; YAMADA, G.; MIYAMOTO, R.; *et al.* Natural course of hepatitis C. *Am. J. Gastroenterol.* 88(2):240-43. 1993.
- THIERS, V.; JAFFREDO, F.; TUVERI, R.; CHODAN, N.; BRECHOT, C. Development of a simple restriction fragment length polymorphism (RFLP) based assay for genotyping and comparative analysis with genotyping and serotyping tests. *Journal of Virological Methods* 65(1):9-17. 1997.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; & GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids. Res.* 22: 4673 – 4680.1994.
- TORRE, D.; TOMBINI, R.; CADARIO, F.; *et al.* Evolution of coinfection with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus in patients treated with highly active antiretroviral therapy. *Clin. Infect. Dis.* 33: 1579–85. 2001.

- TORRIANI, F.J.; RODRIGUEZ-TORRES, M.; ROCKSTROH, J.K.; LISSEN, E.; GONZALEZ-GARCÍA, J.; LAZZARIN, A.; CAROSI, G.; SASADEUSZ, J.; KATLAMA, C.; MONTANER, J.; JUNIOR, H.S.; PASSE, S.; DE PAMPHILIS, J.; DUFF, F.; SCHRENK, U.M.; DIETERICH, D.T. THE APRICOT STUDY GROUP. Peginterferon Alfa-2a plus Ribavirin for Chronic Hepatitis C Virus Infection in HIV-1-Infected Patients *N. Engl. J. Med.* 351: 438 – 450. 2004.
- TORTI, C.; LAPADULA, G.; PUOTI, M.; CASARI, S.; UCCELLI, M. C.; CRISTINI, G.; BELLA, D.; PASTORE, G.; LADISA, N.; MINOLI, L.; SOTGIU, G.; CAPUTO, S. L.; BONORA, S. & CAROSI, G. Influence of genotype 3 hepatitis C coinfection on liver enzyme elevation in HIV-1-positive patients after commencement of a new highly active antiretroviral regimen: results from the EPOKA-MASTER Cohort. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 41(2): 180 – 185. 2006.
- TREITINGER, A.; SPADA, C.; FERREIRA, L.A.; NETO, M.S.; REIS, M.; VERDI, J.C.; DE MIRANDA, A.F.; DE OLIVEIRA, O.V.; SILVEIRA, M.V.S. & ABDALLA, D.S. Hepatitis B and hepatitis C prevalence among blood donors and HIV-1 infected patients in Florianópolis-Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 4(4): 192 – 196. 2000.
- WEBBER, L.M.; ELS, S.; TAYLOR, M.B.; GRABOW, W.O.K. Assessment of commercial enzyme immunoassay for hepatitis C virus serotype. *Journal of Clinical Pathology* 49: 994-997. 1996.
- WEI, X.; DECKER, J.M.; WANG, S.; HUI, H.; KAPPES, J.C.; WU, X.; SALAZAR, J.F.; SALAZAR, M.G.; KILBY, J.M.; SAAG, M.S.; KOMAROVA, N.L.; NOWAK, M.A.; HAHN, B.H.; KWONG, P.D. & SHAW, G.M. Antibody Neutralization and Escape by HIV-1. *Nature* 422: 307-312. 2003.
- WOLINSKY, S.M.; KORBER, B.T.M.; NEUMANN, A.U.; DANIELS, M.; KUNSTMAN, K.J.; WHETSELL, A.J.; FURTADO, M.R.; CAO, Y.; HO, D.D.; SAFRIT, J.T.; & KOUP, R.A. Adaptive Evolution of Human Immunodeficiency Virus-Type 1 During the Natural Course of Infection. *Science* 272: 537-542. 1996.
- YANO, M.; KUMADA, H.; KAGE, M.; *et al.* The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology* 23(6):1334-40. 1996.
- YOO, T.W.; DONFIELD, S.; LAIL, A.; LYNN, H.S.; DAAR, E.S. & HEMOPHILIA GROWTH AND DEVELOPMENT STUDY. Effect of hepatitis C virus (HCV) genotype on HCV and HIV-1 disease. *J. Infect. Dis.* 191(1): 4-10. 2005.

- YOTSUYANAGI, H.; KOIKE, K.; YASUDA, K.; *et al.* Hepatitis C virus genotypes and development of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 76(8):1352-55. 1995.
- ZEIN, N.N.; RAKELA, J.; KRAWUTT, E.L.; *et al.* Hepatitis C virus genotypes in the United States: epidemiology, pathogenicity and response to interferon therapy. Collaborative study group. *Ann. Intern. Med.* 125(8):634- 39. 1996a.
- ZEIN, N.N.; POTERUCHA, J.J.; GROSS, J.B.JR., *et al.* Increased risk of hepatocellular carcinoma in patients infected with hepatitis C genotype 1b. *Am. J. Gastroenterol.* 91(12):2560-62. 1996b.
- ZEIN, N.N. Clinical Significance of hepatitis C virus genotypes. *Clinical Microbiology Reviews* 13: (2) 223-235. 2000.
- ZHONG, J.; GASTAMINZA, P.; CHENG, G.; KAPADIA, S.; KATO, T.; BURTON, D.R.; WIELAND, S.F.; UPRICHARD, S.L.; WAKITA, T.; CHISARI, F.V. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:9294–9299. 2005.
- ZOCRATTO, K.B.; CAIAFFA, W.T.; PROIETTI, F.A.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.; MINGOTI, S.A.; RIBEIRO, G.J. & PROJETO AJUDE-BRASIL I. HCV and HIV-1 infection and co-infection: injecting drug use and sexual behavior, AjUDE-Brasil I Project. *Cadernos de Saúde Pública* 22(4): 839 – 848. 2006.