Gaspar Lisbôa Neto

**Identificação de polimorfismos e mutações
primárias de resistência aos inibidores de protease
(NS3/NS4A) no vírus da hepatite C em pacientes
com hepatite C crônica monoinfectados e
coinfectados pelo vírus da imunodeficiência
humana**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção de título
de Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cássia Jacintho
Mendes Corrêa

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lisbôa Neto, Gaspar

Identificação de polimorfismo e mutações primárias de resistência aos inibidores de protease (NS3/NS4A) no vírus da hepatite C em pacientes com hepatite C crônica monoinfectados e coinfectados pelo vírus da imunodeficiência humana / Gaspar Lisbôa Neto. -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Maria Cassia Jacintho Mendes Corrêa.

Descritores: 1.Hepatite C crônica/epidemiologia 2.Hepatite C crônica/terapia
3.HIV 4.Inibidores de protease 5.Farmacoresistência viral 6.Estudos transversais

USP/FM/DBD-023/17

*Aos meus pais Edivaldo e Maria Auxiliadora e à minha irmã Samantha,
por toda força e apoio que me deram durante este período da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Cássia Jacintho Mendes Corrêa, pelo imensurável auxílio na realização desta tese, sempre presente nas horas necessárias e disposta a elucidar todas minhas dúvidas e receios. Seus preciosos ensinamentos e sobretudo sua amizade continuam me estimulando na vida profissional e acadêmica.

Às Dras. Fernanda M. Malta, Michele S. Gomes-Gouvêa e à Caroline F. Noble pelo apoio com as análises laboratoriais e pelas orientações técnicas relativas ao processo. Agradeço imensamente todo o suporte e consideração. À Dra. Camila M. Romano pela pronta disponibilidade e esclarecimentos relativos às etapas finais destas análises.

Aos Profs. Dr. João Renato R. Pinho, Dra. Aline G. Vigani e Dr. Jorge Senise, por terem gentilmente participado do exame de qualificação fornecendo preciosas orientações que tanto contribuíram para a realização desta tese. Em especial, ao Prof. Dr. João Renato, por ter se envolvido ativamente neste projeto com todo o suporte do Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical – IMT/FMUSP. Sua orientação foi imprescindível na metodologia laboratorial e na confecção dos artigos científicos relacionados ao tema.

Ao SEAP HIV/AIDS do HCFMUSP, Ambulatório de Hepatites Virais do DMIP – HCFMUSP; à Dra. Mariliza H. da Silva da Clínica de Especialidades de São Bernardo do Campo e do CRT Santa Cruz e à Dra. Andrea G. B. Leite e Dra. Leonora de Z. Piccoli, ambas do Serviço de Infectologia do Centro Especializado em Saúde de Caxias do Sul – RS, por terem contribuído substancialmente com a casuística deste projeto.

À Profa. Dra. Patrícia Emília Braga, pelo auxílio com a análise estatística e ao Prof. Dr. Eliseu Alves Waldman, pelas observações iniciais relativas ao desenho do estudo.

Às secretárias Roseli Antonia Santo e Letícia Claudi de Oliveira, da Pós-graduação do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias, por todo apoio e suporte.

Aos pacientes, principal motivação desta pesquisa.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de tabelas	
Lista de figuras e quadros	
Lista de abreviaturas e siglas	
Resumo	
Abstract	

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O vírus da hepatite C	1
1.1.1	Histórico e epidemiologia	1
1.1.2	Vias de transmissão	4
1.1.3	Virologia	5
1.1.4	Diversidade genética do vírus da hepatite C	9
1.1.5	Infecção crônica pelo vírus da hepatite C	12
1.1.6	Coinfecção pelo vírus da hepatite C e pelo HIV	16
1.2	Tratamento da hepatite C crônica na era das drogas antivirais de ação direta	19
1.2.1	Objetivos do tratamento da hepatite C crônica	19
1.2.2	Histórico do tratamento da hepatite C crônica	20
1.2.3	Terapêutica baseada no uso de drogas antivirais de ação direta	21
1.2.4	Esquemas terapêuticos compostos por inibidor de protease NS3/NS4A / inibidor de NS5A e de polimerase NS5B	24
1.2.5	Polimorfismos / mutações do vírus da hepatite C e impacto na resposta terapêutica baseada em drogas antivirais de ação direta	29
2	JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	40
3	OBJETIVOS	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1	Desenho do estudo:	42
4.2	População de referência:	42
4.3	Amostragem:	44
4.4	Cálculo do tamanho da amostra:	44
4.5	Período do estudo:	46
4.6	Seleção de pacientes:	46
4.7	Instrumento e coleta de dados:	47
4.8	Estadiamento da doença hepática:	50
4.9	Processamento das amostras:	51
4.10	Subtipagem e quantificação do VHC RNA:	52
4.11	Amplificação da região NS3 do VHC:	52
4.12	Identificação e quantificação dos produtos de PCR:	54
4.13	Reação de sequenciamento:	55
4.14	Análise de polimorfismos / mutações na NS3 associadas a resistência	55
4.15	Análise de diversidade das quasiespécies e de pressão seletiva no gene NS3 ..	56
4.16	Análise estatística:	57
4.17	Aspectos éticos:	58
4.18	Revisão bibliográfica:	59

5	RESULTADOS	60
5.1	Caracterização da amostra em estudo:	60
5.2	Descrição de polimorfismos / mutações na NS3 do VHC associadas a resistência aos IPs na amostra estudada:	66
5.3	Comparação entre indivíduos mono infectados pelo VHC e co infectados pelo VHC e HIV quanto a presença de polimorfismos / mutações na NS3 do VHC associadas a resistência aos IPs:.....	68
5.4	Análise de possíveis fatores associados a ocorrência de polimorfismos / mutações na NS3 do VHC associadas a resistência aos IPs:	77
6	DISCUSSÃO	83
7	CONCLUSÕES	109
8	ANEXOS	110
9	REFERÊNCIAS.....	119

Apêndice

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Principais inibidores da protease NS3/NS4A do VHC com aprovação clínica ou em desenvolvimento	25
Tabela 2 -	Frequência de substituições na NS3 do VHC associadas a resistência aos IPs – estudos brasileiros	36
Tabela 3 -	Características sociodemográficas, clínicas e laboratoriais de pacientes com hepatite C crônica	64
Tabela 4 -	Principais comorbidades em pacientes com hepatite C crônica.....	65
Tabela 5 -	Fármacos antirretrovirais utilizados para tratamento do HIV por pacientes coinfectados pelo VHC e HIV	65
Tabela 6 -	Exames laboratoriais hematológicos e bioquímicos de pacientes com hepatite C crônica	66
Tabela 7 -	Polimorfismos de ocorrência natural e mutações associadas a resistência aos IPs na sequência da protease NS3 do VHC	67
Tabela 8 -	Características sociodemográficas, clínicas e virológicas de pacientes com hepatite C crônica de acordo com a coinfeção ou não pelo HIV	71
Tabela 9 -	Exames laboratoriais hematológicos e bioquímicos de pacientes com hepatite C crônica estratificados de acordo com a infecção pelo HIV	73
Tabela 10 –	Polimorfismos de ocorrência natural e mutações associadas a resistência aos IPs na sequência da protease NS3 do VHC de acordo com a coinfeção pelo HIV	74
Tabela 11 -	Distribuição da frequência de substituições na NS3 do VHC de acordo com as características de pacientes com hepatite C crônica	79
Tabela 12 -	Fatores independentemente associados a substituições de aminoácidos na região NS3 do VHC em pacientes com hepatite C crônica.....	82
Tabela 13 -	Análise de diversidade genética e pressão seletiva na região NS3 do VHC em pacientes com fibrose hepática avançada, com histórico de tratamento prévio com (Peg) INF / RBV e no grupo total avaliado.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura genômica e proteínas do VHC.....	6
Figura 2 -	Seleção e representatividade da amostra em estudo de acordo com os critérios adotados.....	61
Figura 3 -	Polimorfismos / mutações na NS3 associadas a resistência aos IPs de acordo com o genótipo do VHC.....	81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Sequência dos primers utilizados para a amplificação da região NS3 do VHC	54
Quadro 2 -	Distribuição da amostra em estudo quanto ao gênero, idade e genótipo do VHC de acordo com o centro de atendimento participante	62
Quadro 3 -	Descrição de pacientes portadores de hepatite C crônica de acordo com a presença de polimorfismos / mutações na região NS3 associadas a resistência	75
Quadro 4 -	Descrição de pacientes portadores de hepatite C crônica coinfectados pelo HIV de acordo com a presença de polimorfismos / mutações na região NS3 associadas a resistência	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

VHC	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
NANBH	Hepatite não-A não-B
DAAs	Drogas antivirais de ação direta
IPs	Inibidores de protease NS3/NS4A
NS	Proteína não estrutural do vírus da hepatite C
LTCD4⁺	Linfócito T CD4 ⁺
LTCD8⁺	Linfócito T CD8 ⁺
INF	Interferon
RBV	Ribavirina
RVS	Resposta virológica sustentada
PCDT	Protocolo Clínico de Diretrizes Terapêuticas de Hepatite C e Coinfecções
PCR	Reação pela Cadeia de Polimerase

RESUMO

Lisbôa Neto G. *Identificação de polimorfismos e mutações primárias de resistência aos inibidores de protease (NS3/NS4A) no vírus da hepatite C em pacientes com hepatite C crônica monoinfectados e coinfectados pelo vírus da imunodeficiência humana* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

INTRODUÇÃO: A hepatite C crônica é uma das principais causas de hepatopatia em todo mundo. A coinfecção pelo vírus C (VHC) e o HIV não é incomum, pois ambos compartilham vias similares de transmissão. Recentemente, a terapêutica da hepatite C crônica foi radicalmente modificada com o advento das drogas antivirais de ação direta (DAAs), elevando as taxas de RVS mesmo na população coinfectada. O VHC é caracterizado pela sua alta taxa replicativa e por grande diversidade populacional. Substituições de ocorrência natural na protease viral associadas a resistência podem comprometer a terapêutica em alguns regimes baseados no uso de inibidores de protease (IPs). **OBJETIVOS:** Estimar a prevalência de polimorfismos e mutações de ocorrência natural associadas a resistência aos IPs em pacientes monoinfectados e coinfectados pelo VHC e HIV e identificar fatores clínicos e virológicos associados a presença de tais substituições. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Dados epidemiológicos e clínicos foram obtidos de 247 pacientes (135 monoinfectados e 112 coinfectados pelo VHC e HIV). VHC RNA foi extraído do plasma dos indivíduos participantes e um fragmento de 765 pares de base da região NS3 foi amplificado e sequenciado por metodologia populacional (técnica de Sanger). O estadiamento da fibrose hepática foi realizado pelo escore não invasivo FIB-4. **RESULTADOS:** 54 indivíduos (21,9%) apresentaram pelo menos uma substituição na região NS3/NS4A do VHC. Somente 14 pacientes (5,7%) apresentaram pelo menos uma mutação de resistência aos IPs (T54S, V55A ou Q80R). A Q80K não foi identificada em nenhuma das amostras. Não houve diferença entre monoinfectados e coinfectados quanto à ocorrência de polimorfismos ou mutações associadas a resistência. As variáveis independentemente associadas com substituições na região da protease foram infecção pelo VHC genótipo 1b, bilirrubinas totais > 1,5 vezes o LSN e níveis de albumina < 3,5 g/dL. Fibrose hepática avançada (FIB-4 > 3.25) não esteve associada a presença de substituições. A análise de diversidade nucleotídica na protease viral revelou maior heterogeneidade do VHC genótipo 1b em relação ao 1a. Contudo, a análise de pressão seletiva não demonstrou maior variabilidade de quasiespécies no grupo de hepatopatia avançada, achado este compatível com uma sequência genômica relativamente conservada. **CONCLUSÕES:** As substituições na região NS3/NS4 do VHC consistiram majoritariamente por polimorfismos naturais sem impacto clínico num eventual tratamento que envolva o uso de IPs. A prevalência de substituições associadas a resistência foi baixa e compatível com os valores informados pela maioria dos estudos nacionais e internacionais. A coinfecção pelo HIV não parece elevar a frequência de substituições na protease do VHC. A região NS3 do genótipo 1b foi altamente variável em relação ao genótipo 1a, reforçando o conceito de possíveis diferenças geográficas em relação ao perfil genético deste vírus.

Descritores: 1.Hepatite C crônica/epidemiologia 2.Hepatite C crônica/terapia 3.HIV 4.Inibidores de proteases 5.Farmacoresistência viral 6.Estudos transversais

ABSTRACT

Lisbôa Neto G. *Characterization of NS3/NS4A polymorphisms and hepatitis C protease inhibitors resistance-associated mutations in hepatitis C virus monoinfected and human immunodeficiency virus coinfecting patients* [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

INTRODUCTION: Chronic hepatitis C is a major cause of liver disease worldwide. Hepatitis C virus (HCV) and HIV coinfection is not uncommon due to similar transmission routes. Recently developed direct-acting antiviral drugs (DAAs) have increased the rate of SVR even in coinfecting patients. HCV has a high replication rate and a lack of proofreading activity, leading to a greatly diverse viral population. Baseline spontaneously occurring resistance substitutions in the protease region may impair the rate of success in some protease inhibitors (PI) based regimens. **OBJECTIVE:** to determine the prevalence of naturally occurring polymorphisms and resistance associated variants to HCV PIs in mono and coinfecting HCV HIV patients and to evaluate potential associations between amino acid substitutions in protease domain and clinical / virological features of those patients. **METHODS:** Clinical and epidemiological data were retrieved from medical records of 247 subjects in Brazil (135 HCV monoinfected and 112 HIV HCV coinfecting patients). HCV-RNA was extracted from plasma and a fragment of 765 base pairs from the NS3 region was amplified and sequenced with Sanger-based technology. Fibrosis staging was assessed by non invasive score (FIB-4). **RESULTS:** Overall, 54 patients (21.9%) had at least one amino acid substitution in the NS3 region; only 14 patients (5.7%) harboured at least one resistance mutation (T54S, V55A, Q80R). Q80K mutation was not found in any sample. There was no difference between monoinfected and coinfecting patients regarding the frequency of natural polymorphisms and resistance mutations. Variables independently associated with amino acid substitution were HCV subtype 1b, total bilirubin level > 1.5 ULN and albumin level < 3.5 g/dL. Advanced liver fibrosis (FIB-4 > 3.25) was not related to NS3 polymorphisms nor resistance associated variants. Examination of HCV protease nucleotide diversity revealed greater heterogeneity in subtype 1b than subtype 1a. Analysis of selective pressure did not reveal a greater quasispecies variability in advanced liver fibrosis group, being such finding consistent with a relatively conserved gene in this setting. **CONCLUSION:** Baseline HCV NS3 amino acid substitutions depicted herein were considered mostly natural polymorphisms with no clinical impact in a PI based therapy. The prevalence of resistance-associated substitutions was low and compatible with values reported by most national and international studies. HIV coinfection was not associated with a greater frequency of such substitutions in the studied sample. The NS3 region of genotype 1b was highly variable in relation to genotype 1a, highlighting geographic differences concerning HCV genetic profile.

Descriptors: 1.Hepatitis C, chronic/epidemiology 2.Hepatitis C, chronic/therapy 3.HIV 4.Protease inhibitors 5.Drug resistance, viral 6.Cross-sectional studies

1 INTRODUÇÃO

1.1 O vírus da hepatite C

1.1.1 Histórico e epidemiologia

O entendimento das hepatites virais remonta ao início da década de 1950 com a identificação da doença hepática transmitida pelo soro e pelas fezes. A partir de 1960, Krugman et al. em Nova Iorque instituiu a classificação das hepatites de acordo com o grau de infectividade, a atividade necroinflamatória enzimática e o período de incubação em hepatite A e hepatite sérica ou hepatite B (1).

Contudo, uma parcela considerável das hepatites transfusionais não era identificada como pertencente ao grupo das hepatites séricas, ou seja, não era promovida pelo vírus B. Estas formas indeterminadas passaram a ser denominadas de hepatite não-A não-B (NANBH). Em 1989, com o aprimoramento das técnicas laboratoriais de biologia molecular, as características estruturais deste novo agente foram elucidadas através de seu sequenciamento, realizado por Michael Houghton, George Kuo e Qui-Lim Choo, pesquisadores da empresa Chiron Corporation (Emeryville, California) e por Dan Bradley do Centros de Controle e Prevenção de Doenças Norte Americano (CDC) (2). Desta forma, comprovou-se que cerca de 70 a 90% das NANBH eram promovidas por tal vírus, que foi, portanto, classificado como vírus da hepatite C (VHC) (3).

Na atualidade, a hepatite C constitui grave problema de saúde pública, sendo responsável pela maioria das hepatopatias crônicas nos países industrializados e em desenvolvimento (4). Análises mais recentes têm demonstrado que a prevalência da infecção pelo VHC parece ser menor do que as cifras previamente relatadas pelos

inquéritos epidemiológicos até então disponíveis. Em 2013, uma revisão sistemática realizada por Mohd Hanafiah et al. concluiu que havia no mundo cerca de 185 milhões de indivíduos com histórico de contato com o VHC (sorologia anti-VHC detectada). Destes, aproximadamente 130 – 150 milhões estariam infectados de maneira persistente (VHC RNA detectável no soro) - prevalência de 2,3%, (IC95% 2,1%-2,5%) (5). Do ponto de vista global, as regiões centrais e leste da Ásia, norte da África e Oriente Médio são consideradas as áreas com maiores prevalências de infecção crônica (> 3,5%). China, Paquistão, Nigéria, Egito, Índia e Rússia constituem países que concentram mais da metade de todos os casos de hepatite C crônica do mundo (5,6).

Em relação a atual prevalência global de hepatite C, uma recente revisão sistemática estimou cerca de 110 milhões de indivíduos com anticorpo anti-VHC detectável, sendo que 80 milhões destes seriam classificados como portadores crônicos (6). Essas estimativas com valores menores seriam explicadas pelo declínio da incidência da doença como um todo e pela melhoria da sensibilidade das técnicas diagnósticas a partir da segunda metade da década de 1990 (7).

Cerca de 4 milhões de indivíduos são infectados anualmente pelo VHC e grande parcela desta população não é consciente de seu estado, devido principalmente à natureza assintomática da fase inicial da doença (8). A ausência do diagnóstico e identificação das pessoas infectadas é um importante fator complicador da doença, uma vez que a hepatite C crônica está associada a grande morbimortalidade. O número de mortes anuais por complicações relacionadas a hepatopatia (hepatocarcinoma, sangramentos e infecções) persiste em ascensão inclusive nos tempos atuais (de 333.000 em 1990 para 704.000 em 2013) (9). Este fato reflete a alta incidência que caracterizou a infecção pelo VHC em meados do século XX, influenciada principalmente pelo aumento da realização de práticas invasivas (transusão de sangue e hemoderivados, procedimentos relacionados a saúde,

medicações de uso parenteral) e pelo uso de drogas tanto inalatórias como injetáveis. A incidência de infecção começa a decair a partir da década de 1990, quando inicia-se a triagem sorológica rotineira em banco de sangue e também pela melhoria dos cuidados relacionados aos controles de infecção (7).

O VHC não é considerado um agente viral autóctone nas Américas. Os dados epidemiológicos provenientes desta região são bastante heterogêneos (10,11). No Brasil, acredita-se que este vírus tenha sido introduzido no início da década de 1960 (12). De uma maneira geral, parte da América Latina compreende áreas de baixa (1,5%) a moderada soroprevalência de anti-VHC (1,5% – 3,5%) (5). As prevalências do anti-VHC variam de 1,2% (IC95%: 1,0 – 4,0) na América Latina Tropical (incluindo Brasil e Paraguai) até 2,1% (IC95: 1,6 – 2,6) nas ilhas Caribenhas (11).

No Brasil, um recente estudo de corte transversal que avaliou 19.503 habitantes de 10 a 69 anos de idade provenientes de todas as macrorregiões estimou uma prevalência sorológica de anticorpos anti-VHC em 1,38%, correspondendo a aproximadamente um total de 2,8 milhões de indivíduos infectados neste país (13). Contudo, Amaku et al. estimaram através de dois métodos matemáticos (baseados na incidência de casos novos reportados ao sistema de notificação SINAN e através do tamanho da lista de espera brasileira para o transplante hepático) valores de prevalência menores do que os obtidos pelos estudos de base populacional – cerca de 1,6 milhões de indivíduos (aproximadamente 0,8% da população) (12).

Desta forma, o Brasil como um todo é considerado um país de baixa prevalência para hepatite C crônica. Aqui a maior proporção de indivíduos infectados encontra-se na faixa etária dos 40 a 59 anos (cerca de 54,4% dos casos). Contudo, a faixa etária com a taxa de detecção mais elevada é aquela que vai dos 50 a 59 anos, sendo mais frequente a infecção em homens do que em mulheres - estima-se que haja cerca de 16 casos de hepatite

para cada 100 mil habitantes entre o sexo masculino e 10 / 100 mil habitantes para o sexo feminino nesta faixa etária (14). Em relação ao gênero, a incidência de infecção aumenta intensamente dos 20 até aproximadamente 45 anos no sexo masculino, fenômeno este que não é observado no sexo feminino, onde a incidência eleva-se discretamente dos 25 aos 55 anos (14). No global, esta dinâmica sugere a ocorrência maior de infecções num passado relativamente recente (em torno de 20 a 30 anos atrás), que coincide com o período pré instituição de testagem sorológica em hemoderivados no país (anterior a 1993) (12,15). Sendo assim, no Brasil, uma parcela considerável de indivíduos com hepatite C crônica acabou infectando-se provavelmente por procedimentos invasivos que envolveram transfusão de sangue e hemoderivados.

1.1.2 Vias de transmissão

O VHC é altamente produtivo do ponto de vista replicativo. Sua transmissão ocorre principalmente através do contato com sangue e/ou material de uso parenteral contaminado (4). Indivíduos que receberam transfusão de sangue / hemoderivados e imunoglobulina anti-D (gestantes) anterior a testagem rotineira de tais produtos (previamente à década de 1990), usuários de droga intravenosa e intranasal, pacientes com tatuagem e *body piercings*, trabalhadores da área de saúde que se acidentaram com material perfuro cortante, pacientes em hemodiálise e pessoas que se envolvem em atividades sexuais desprotegidas e/ou com múltiplos parceiros são considerados indivíduos sob risco de infecção, devendo portanto serem sorotestados (8). Atualmente, devido ao melhor controle dos hemoderivados e ao aprimoramento das práticas de desinfecção relativas aos materiais de uso associado aos cuidados de saúde, houve uma modificação no padrão de indivíduos que se apresentam como novos casos de infecção

(6). Desta forma, uma coorte bastante representativa deste fenômeno inclui determinados agrupamentos de homens que fazem sexo com homens (HSH) e usuários de drogas intravenosas, fenômeno este descrito especialmente em determinadas regiões do globo (EUA, Austrália e em alguns países europeus) (16). No Brasil e no restante do mundo, em cerca de 30-40% dos casos não é possível identificar alguma via aparente de transmissão (4).

De fato, nas últimas décadas, a epidemia de infecção pelo VHC adquirida pela via sexual tem se expandido consideravelmente, influenciando de forma significativa a epidemiologia e a rede de transmissão deste vírus (16). O impacto é notório em certos grupos de indivíduos HSH que se engajam em práticas sexuais consideradas de alto risco, como a escolha de parceiro em função do status sorológico para o HIV e relações sexuais desprotegidas associadas a lesões traumáticas de mucosas (17). O risco de transmissão sexual do VHC é maior nos indivíduos HIV (+), embora este seja também elevado em indivíduos HSH não infectados pelo HIV que apresentam os mesmos comportamentos citados anteriormente (16,17).

1.1.3 Virologia

O VHC é um RNA vírus de fita simples (ssRNA) pertencente a família *Flaviviridae*, que também inclui dois outros agentes agrupados no gênero *Flavivirus* (vírus da Dengue e da Febre Amarela), o vírus GB-vírus B, cuja patogenicidade ainda não é totalmente compreendida e os recentemente identificados hepacivírus de não primatas, de roedores e de morcegos (NPHV20, RHV21 e BHV22). Estes três novos vírus, em conjunto com o VHC, são agrupados no gênero *Hepacivirus* (18).

O genoma do VHC é constituído por 9,6 kb e contém as regiões não codificadoras 5' e 3' (UTR) que delimitam uma fase de leitura aberta (ORF) traduzida no ribossomo via um sítio de entrada interno (IRES). A extremidade 3'-UTR é subdividida em três regiões, sendo a cauda altamente conservada tendo importante papel na interação com proteínas virais e celulares (19). Após a tradução ribossômica, a poliproteína resultante é processada e clivada em proteínas estruturais (Core, E1 e E2) e proteínas não estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B), estas com importantes funções enzimáticas necessárias para o cumprimento do ciclo celular do VHC (Figura 1) (20). Um complexo replicativo associado à membrana do retículo endoplasmático configura-se no citoplasma, formando uma verdadeira teia perinuclear (20,21). A liberação das partículas virais completas (*virion*) segue a etapa da montagem estrutural e ocorre mediante a utilização de vias secretórias que fazem parte da biogênese natural das lipoproteínas (18).

Figura 1 - Estrutura genômica e proteínas do VHC

Fonte: adaptado de Dubuisson 2014 (18)

A proteína do Core constituinte do nucleocapsídeo viral é altamente conservada. Tem função na sinalização intracelular, sendo capaz de alterar tanto a resposta imunomoduladora, o metabolismo de lipoproteínas bem como de interferir no genoma da célula hospedeira, em especial nos genes reguladores do crescimento e morte celular (20).

As glicoproteínas E1 (gp35) e E2 (gp70) estão presentes no envoltório glicolipoproteico do vírus, tendo papel no tropismo e na mediação da união e entrada do VHC no hepatócito, interagindo com receptores de LDL, glicosaminoglicanos da membrana e posteriormente com fatores de entrada SRB1 e tetraspanina CD81, este último exercendo um papel chave na união e fusão do vírus com a célula hospedeira (18,20).

A proteína V7 é uma viroporina que funciona como um canal iônico, prevenindo a acidificação do meio intracelular e consequentemente a inativação viral durante sua liberação através da via secretória (20). As proteínas NS2 e NS3 são moléculas funcionais que tem como função principal a clivagem da poliproteína viral. A NS2 é uma autoprotease que separa em cis as proteínas estruturais das não estruturais (NS3-NS5B das proteínas Core, E1, E2 e p7) (18,20).

A proteína NS3, além de sua função como protease, apresenta atividade de helicase e NTPase. O NS4A é o cofator da NS3, potencializando a clivagem da poliproteína em trans nos sítios não estruturais (19). A NS3 apresenta funções adicionais além de protease. É capaz de ativar células monocíticas e dendríticas e promover a sensibilização de células T através de epítopos específicos CD4⁺ e CD8⁺ (22). A NS3 parece também atuar subvertendo a atividade imune inata nas fases iniciais da infecção aguda, através da clivagem da proteína sinalizadora MAV, resultando na supressão da via sinalizadora que ativa o gene RIG-1 e pelo bloqueio do receptor TRIF indutor de interferon-beta (23,24). Pacientes portadores de hepatite C crônica apresentam uma resposta imune específica

reduzida a esta proteína, que em parte explica a infecção persistente e a progressão do dano hepático (25). A NS3 também atua como ligante da TGF- β , acentuando diretamente o processo de fibrogênese através da ativação deste receptor (26). O complexo NS3/NS4A participa inclusive da montagem da partícula viral. De fato, a ocorrência de mutações no seu domínio helicase parece promover defeitos na conformação da estrutura viral. Além disso, durante tal processo, a interação do NS3 com a proteína do Core é essencial para a composição da estrutura física do vírus (20). O equilíbrio entre a produção de partículas virais e da replicação do VHC RNA também é modulado pela NS3, em conjunto com fatores intracelulares como o YB-1 (27).

A NS4B é um importante organizador do complexo replicativo, uma vez que sua ação facilita a ancoragem deste complexo à membrana do retículo endoplasmático (20). A replicação do RNA do VHC ocorre nas esférulas derivadas da membrana do retículo endoplasmático que são induzidas tanto pela NS4B e pela NS5A, recebendo o nome de teia membranosa (28). A fosfoproteína NS5A é caracterizada por 3 domínios. A estrutura localizada no seu sítio I promove sua união com o material genético sendo, em conjunto com o seu domínio II, essencial para a correta replicação do RNA do VHC. O domínio III participa das fases tardias da montagem da estrutura viral (20).

A NS5B é uma polimerase RNA dependente de RNA, sendo considerada o principal componente do complexo de replicação do VHC (19). Apresenta uma estrutura molecular clássica em forma de mão (em arranjo de palma, dedo e polegar) (29). Após a tradução, as proteínas constituintes da maniquaria replicativa em conjunto com a enzima NS5B replicam a fita de RNA viral de senso (+) através de uma fita intermediária senso (-) (20).

1.1.4 Diversidade genética do vírus da hepatite C

A polimerase NS5B do VHC não possui mecanismo de correção pós-transcricional, o que associado à sua alta taxa de replicação (10^{12} partículas virais ao dia) resulta numa grande frequência de mutações em seu genoma (10^{-5} erros por nucleotídeo por sítio genômico e ano) (30). Esta diversidade genética, por sua vez, é responsável em parte pela persistência da infecção (31). O vírus tem sido rotulado em três níveis hierárquicos quanto a sua heterogenicidade: genótipos, subgenótipos ou subtipos e quasiespécies (32).

O VHC é classificado em 7 genótipos (1 a 7) com aproximadamente 30% de divergência genômica entre eles e em vários subtipos ou subgenótipos – cerca de 67, caracterizados por letras minúsculas (a, b, c...) com aproximadamente 20% de divergência entre as sequências nucleotídicas (33). Há um certo padrão geográfico no que diz respeito a distribuição do VHC conforme os genótipos. Genótipo 1 é considerado o mais frequente no mundo, sendo responsável por aproximadamente metade dos casos de infecção crônica pelo VHC. O genótipo 1 é dominante nas Américas, Japão e Europa. Os genótipos 2 e 3 também estão presentes nestas regiões. O genótipo 3 é responsável por cerca de 30% dos casos do mundo, enquanto os genótipos 2, 4 e 6 respondem por cerca de 20% das infecções crônicas (34). Os genótipos 3 e 6 são comuns na Ásia enquanto os genótipos 4 e 5 são tipicamente africanos, embora sua frequência venha aumentando progressivamente nos países europeus, resultante possivelmente dos fluxos migratórios. O genótipo 7 foi descrito recentemente na África Central, mas aparentemente não possui importância clínica até então descrita (6,20).

O Brasil, por ser um país de dimensões continentais e ter população de origens distintas, apresenta uma grande variação genotípica (35). Análises de 1.688 amostras de

pacientes portadores de infecção pelo VHC, provenientes da maioria dos estados brasileiros, revelou uma prevalência de 64,9% para genótipo 1, 4,6% para genótipo 2, 30,2% para genótipo 3, 0,2% para genótipo 4 e 0,1% para genótipo 5 (36). Em relação aos subtipos, o genótipo 1b parece ser ligeiramente mais comum que o genótipo 1a (1b – 34%, 1a – 31%) (6). O genótipo 1 foi o mais freqüente em todas as regiões, enquanto o genótipo 2 foi mais prevalente na região Centro-Oeste e o tipo 3 mais encontrado no Sul, de forma quase tão freqüente quanto o genótipo 1 (36). Como esta distribuição é muito semelhante àquela descrita em certas regiões da Europa, acredita-se que o VHC tenha sido introduzido no país em parte pelos imigrantes europeus e disseminada posteriormente para a população geral. Além disso, a diversidade do VHC no Brasil parece ter sido influenciada por movimentos migratórios inter-regionais e pela disseminação local do vírus em momentos distintos ao longo dos anos (37).

A população coinfectada pelo HIV apresenta certas particularidades em relação a distribuição genotípica. Mendes-Correa et al. em 2008 avaliaram 100 pacientes coinfectados pelo VHC e HIV com o objetivo de descrever tanto os fatores de risco associados a infecção quanto a distribuição genotípica do VHC no grupo em questão. Observou-se que a distribuição genotípica nos coinfectados foi bastante similar aquela descrita em monoinfectados – 68,7% com genótipo 1, 26,3% com genótipo 3, 4% com genótipo 2 e 1% com genótipo 4. Mais da metade dos pacientes avaliados foi exposta a pelo menos 5 fatores distintos de risco, de modo que a infecção pelo VHC genótipo 3 esteve associado fortemente ao uso de droga injetável (38). A associação entre o genótipo 3 e uso de droga injetável também foi observado pelo estudo de Oliveira et al., que em 2009 avaliou 160 pacientes coinfectados pelo VHC e HIV. Este mesmo estudo identificou diferenças na frequência de infecção pelo genótipo 1a em relação ao 1b, com uma tendência a ascensão do número de infecções pelo subtipo 1a partir da década de 1980

(39). Achado semelhante foi descrito por um estudo venezuelano que avaliou cerca de 500 pacientes coinfectados pelo VHC e HIV (40). No Brasil, Romano et al. em 2010 descreveram a dinâmica da transmissão do VHC de acordo com padrões sociais, sugerindo que o aumento das infecções pelo genótipo 1a e 3 estava associado à infecção pelo HIV e correlacionava-se com o padrão de “alta conectividade” na rede de transmissão, que era caracterizado pela presença de indivíduos com multiplicidade de parceiros sexuais, uso de drogas injetáveis, história de doença sexualmente transmissível e encarceramento (41).

Do ponto de vista de patogenia, a relação entre o genótipo do VHC e a progressão da doença hepática ainda não está totalmente esclarecida. Uma meta análise envolvendo 16 estudos sugeriu que o VHC genótipo 3 estava associado com uma maior taxa de progressão de fibrose, talvez pela relação direta que este subtipo do VHC guarde com esteatose e esteatohepatite (42).

Além da caracterização geográfica da infecção, a determinação do genótipo do VHC é necessária para a definição de quais drogas devem compor eventuais esquemas antivirais a serem utilizados num possível tratamento (fármacos genótipos específicos) e pela sua capacidade preditora do sucesso terapêutico (30). Antes de 2011, o tratamento baseado no uso de interferon peguilado e ribavirina promovia taxas de resposta virológica sustentada (RVS) mais elevadas em pacientes infectados pelo VHC genótipo 2 e 3, enquanto pacientes infectados pelo VHC subtipo 1, 4, 5 e 6 evoluíam com taxas de RVS por volta de 50%. Estes valores eram consideravelmente menores na população coinfectada pelo VHC e HIV (cerca de 30%) (34). Atualmente, com o tratamento baseado em drogas que possuem atividade antiviral direta, o sucesso terapêutico tem sido menor nos pacientes infectados pelo genótipo 3 em relação aos genótipos 1 e 2. A RVS no genótipo 3 também costuma ser reduzida de forma mais intensa nos indivíduos cirróticos e não respondedores a tratamento prévio com interferon (43).

Dada a variabilidade genética do VHC, alguns estudos buscaram correlacionar certos desfechos clínicos com a diversidade nucleotídica de certas estruturas do VHC. Por exemplo, a menor diversidade do envelope viral (região HVR1 da glicoproteína E2) parece estar associada com uma maior taxa de clareamento espontâneo e menor probabilidade de evolução para infecção persistente (44). A diversidade genética também parece estar relacionada com a probabilidade de clareamento viral e progressão ou não para infecção persistente, risco de desenvolvimento de doença hepática terminal (cirrose) e hepatocarcinoma, com a velocidade de evolução do processo fibrogênico e com o sucesso terapêutico (45–49).

1.1.5 Infecção crônica pelo vírus da hepatite C

A primeira etapa da infecção pelo VHC - infecção aguda - promove manifestações clínicas somente em uma pequena parcela dos indivíduos acometidos, sendo portanto infreqüentemente diagnosticada (50). Nesta fase, os pacientes encontram-se em sua maioria assintomáticos ou oligossintomáticos, com sintomas inespecíficos que podem simular inclusive quadros gripais (8).

Apenas uma pequena parcela dos indivíduos acaba por desenvolver algum sinal / sintoma sugestivo de hepatopatia: icterícia, colúria, anorexia, aversão a odores, desconforto abdominal (50). Por convenção, a persistência do VHC RNA no sangue após 6 meses da infecção define infecção crônica pelo VHC (8). A evolução para a forma crônica é comum e ocorre em cerca de 70 a 80% dos indivíduos infectados (51). Nesta etapa da infecção, a doença associa-se a elevação transitória das transaminases e a lesões no parênquima hepático consequentes ao processo de fibrogênese, culminando na sua desestruturação arquitetural e na progressão para a cirrose (52). A doença terminal, que se

define pelo desenvolvimento da cirrose e da hipertensão portal, ocorre em 20-30% dos casos e instala-se por volta da primeira a terceira década após a infecção inicial (50).

O impacto clínico da hepatite C crônica é notório, uma vez que a infecção persistente pelo VHC é responsável pelo desenvolvimento de cerca de 1/3 dos casos de cirrose e de carcinoma hepatocelular em todo mundo, além de ser a principal etiologia de doença terminal com necessidade de transplante de fígado no mundo ocidental (53).

A cirrose pode ser dividida em fase compensada e descompensada, de acordo com as manifestações clínicas do paciente, a capacidade funcional do parênquima e com a patência vascular do sistema portal (54). A hepatopatia descompensada está associada a alta mortalidade, sendo caracterizada por sinais e sintomas de falência, como icterícia, varizes de esôfago, esplenomegalia, ascite e encefalopatia (55). A probabilidade cumulativa para a descompensação nos pacientes cirróticos gira em torno de 22% num período de 5 anos, com uma incidência de 4,4% ao ano (56). A incidência de hepatocarcinoma em pacientes cirróticos é de 1 a 4% ao ano (3).

Do ponto de vista anatomopatológico, a infecção pelo VHC resulta em fenômenos imunomediados que resultam na infiltração de células inflamatórias linfomononucleares nos tratos portais e nos lóbulos hepáticos, podendo ser focal ou portal e na hepatite de interface com perda dos limites da placa limitante (57). Há também formação de pontes de necrose unindo tratos portais e tratos portais com a veia centrolobular, que culminam na modificação dos componentes da matriz extracelular e na desestruturação da arquitetura lobular, repercutindo na resistência da micro e macrovasculatura hepática e portal (54,57).

Como a doença crônica costuma ser assintomática até a ocorrência da descompensação funcional, seu estadiamento precoce é essencial para a prevenção de complicações. Embora a biópsia hepática com a avaliação da amostra tecidual pelo escore

de METAVIR tenha sido tradicionalmente considerada o padrão ouro no estadiamento e graduação necroinflamatória da hepatite C crônica, o uso cada vez mais frequente de métodos não invasivos de estadiamento, sejam eles físicos / de imagem (ex: elastografia transitória) ou baseados na análise de biomarcadores séricos (ex: APRI, Fibrotest) tem restringido o seu uso habitual (58).

A imunopatogênese da infecção crônica pelo VHC caracteriza-se pela disfunção dos interferons do tipo I e III (gama, beta e lambda) influenciada pela própria atividade das proteínas virais que inibem vias de sinalização intracelular necessárias para a ativação e resposta a secreção de citocinas (59). A eficácia da apresentação antigênica pelas células dendríticas às células efetoras T e B determina a intensidade da resposta inflamatória imune, definindo a evolução ou não para a infecção persistente (60). A produção de anticorpos pelos linfócitos B não é capaz de, isoladamente, resolver uma possível infecção aguda ou proteger o hospedeiro de infecções futuras e recorrentes (61). Do ponto de vista histológico, a resposta imune parenquimatosa é caracterizada pelo infiltrado de células T específicas, com predomínio de TCD4⁺ nos espaços portais e TCD8⁺ nas regiões periportais e lobulares (62). Na hepatite crônica, linfócitos TCD4⁺ específicos são funcionalmente inefetivos e não apresentam atividade sustentada, enquanto as células TCD8⁺ apresentam atividade proliferativa reduzida, com menor produção de citocinas antivirais e menor efeito citotóxico direto (como interferon gama) (59,63). Desta forma, a resposta imune desencadeada contra os epítomos virais é compartimentalizada e restrita ao parênquima visceral, sendo ineficiente para a remoção completa das células infectadas e, conseqüentemente, das partículas virais infectantes (31).

A hepatite C crônica pode estar associada a manifestações clínicas extra-hepáticas, que são decorrentes de processos imunomediados consequentes à presença de autoanticorpos e imunocomplexos circulantes. Tais patologias compreendem: síndrome

sicca, liquen plano, linfoma não-Hodgkin de células B, porfiria cutânea tarda, tireoidites e fibrose pulmonar idiopática (64). Cerca de 15-35% dos pacientes com hepatite C crônica apresentam crioglobulinas circulantes. Destes, cerca de 5 a 25% desenvolvem síndromes clínicas associadas a sua presença, como crioglobulinemia mista essencial, vasculite sistêmica, neuropatia periférica, fenômeno de Raynaud e glomerulonefrite membranoproliferativa (8).

O VHC também é capaz de influenciar diversas vias metabólicas de modo direto ou indireto. Assim, pacientes com hepatite C crônica estão sob maior risco de desenvolvimento de resistência insulínica, diabetes mellitus tipo 2, doença cardíaca (insuficiência coronariana) e cerebrovascular (65). Pacientes com sorologia anti-VHC (+) apresentam espessamento de parede arterial com mais frequência, que pode estar associado ou não à placas ateroscleróticas nas carótidas, sendo estes achados preditores independentes de doença cardiovascular (66). Desordens neuropsiquiátricas e disfunção neurocognitiva são bastante comuns em indivíduos com hepatite C crônica. Aproximadamente metade dos pacientes infectados evolui com alguma destas disfunções em maior ou menor grau (67). Tais distúrbios não guardam relação direta com o grau de gravidade da hepatopatia e podem se manifestar como fadiga, distúrbio do sono, depressão, déficit de atenção e memória com redução da qualidade de vida (68).

O curso evolutivo da hepatite C crônica é dinâmico e altamente influenciável por agentes exógenos, endógenos e pelas condições imunológicas do hospedeiro (34). São considerados fatores associados à progressão da hepatopatia crônica: idade de aquisição do vírus, tempo de infecção, sexo masculino, fonte de infecção, raça, perfil genético do hospedeiro, consumo de etanol, tabagismo, defeitos no metabolismo de ferro, síndrome metabólica e coinfeções, em especial com o vírus da hepatite B e com o HIV (8).

1.1.6 Coinfecção pelo vírus da hepatite C e pelo HIV

A presença da infecção pelo VHC conjuntamente com a infecção pelo HIV não é incomum, dado o compartilhamento de vias de transmissão similares por ambos os vírus (69). As estimativas globais da prevalência de coinfecção pelo VHC e HIV são múltiplas e muitas vezes pouco acuradas. Antigamente, estimava-se que cerca de 4 milhões de indivíduos estariam coinfectados pelo VHC e HIV em todo o mundo, representando uma prevalência de infecção pelo VHC em pacientes HIV (+) de 10 a 15% (70).

Revisões mais recente da literatura indicam que a prevalência da coinfecção parece ser menor do que os valores previamente publicados. Uma meta-análise com revisão sistemática de 783 estudos globais publicada por Platt et al. em 2016 demonstrou uma prevalência de coinfecção pelo VHC e HIV de 2,4% (IQR: 0,8-5,8) no total de amostras avaliadas obtidas de pacientes infectados pelo HIV, existindo aproximadamente 2,3 milhões de pessoas coinfectadas em todo o mundo. Este mesmo levantamento estimou que a chance de infecção pelo VHC era cerca de 6 vezes maior em pacientes infectados pelo HIV em relação aos pacientes HIV (-) (OR: 5,8; IC95% 4,5-7,4) (71). Estudos realizados exclusivamente em grupos de origem africana reportaram proporções maiores de coinfecção – cerca de 5,7% (IC95% 4,90-6,56) (72). Entretanto, a prevalência de hepatite C crônica em indivíduos portadores de infecção pelo HIV é extremamente dinâmica, variando de acordo com a região geográfica e com os fatores de risco associados (uso de droga injetável e multiplicidade de parceiros sexuais). As prevalências costumam ser menores nas regiões onde a transmissão principal do HIV não seja essencialmente por uso de drogas injetáveis (7).

No Brasil, Kuehlkamp e Schuelter-Trevisol realizaram em 2013 uma revisão de 40 artigos que tentaram avaliar a prevalência da coinfecção pelo VHC e HIV em diferentes

grupos populacionais brasileiros, estratificados por fatores de risco (uso de droga injetável e população carcerária, por exemplo). A maioria dos pacientes avaliados era jovem (média de idade de 26 anos) e do sexo masculino. A prevalência da coinfeção VHC-HIV nestes estudos variou de 3,3% (em amostras sorológicas) a 82,4% (em usuários de drogas injetáveis) – com uma média de 20,3% (73).

Nos indivíduos co-infectados pelo HIV, em especial naqueles com controle imunológico inadequado, a resposta de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ está comprometida em sua magnitude. A carga viral do VHC costuma ser mais elevada (0,5 a 1 log UI/mL maior), devido a redução absoluta do número e da qualidade de linfócitos T CD4⁺, aliada a resposta inadequada do hospedeiro ao estímulo antigênico (74). Desta forma, o grau de imunossupressão secundário a presença do HIV influi na piora histológica, estando a contagem de linfócito T CD4⁺ < 200 células por mm³ associada a um risco 6 vezes maior de mortalidade por hepatopatia (75,76). Com o advento da terapia antirretroviral de alta potência (TARV) na metade da década de 1990, a doença hepática passou a ser uma das principais causas de hospitalização e morte em indivíduos infectados pelo HIV, situação esta agravada por possíveis complicações adicionais relacionadas à toxicidade medicamentosa secundária ao uso de antirretrovirais, abuso de ingestão alcoólica e ao fígado gorduroso, relativamente frequentes nesta população (74,77).

De fato, a lesão hepática costuma ser mais agressiva e rapidamente progressiva nos coinfectados – em média cerca de 1/3 destes pacientes evoluem para cirrose nos primeiros 20 anos de infecção (78). O risco de desenvolvimento de cirrose e de suas complicações é cerca de 2-3 vezes maior na população coinfectada, em comparação com os monoinfectados pelo VHC (8). Em contrapartida, a incidência de hepatocarcinoma vem aumentando com o extensão do tempo de sobrevida destes pacientes, resultando num incremento de cerca de 10 vezes na mortalidade devido ao seu prognóstico reservado (79).

A questão da coinfecção tornava-se dramática quando avaliada do ponto de vista da abordagem terapêutica. Sabe-se que as taxas de RVS atingidas com a terapia dupla clássica baseada no peginterferon e ribavirina sempre foram significativamente inferiores às aquelas apresentadas pelos monoinfectados – em torno de 30% (74,80). Este fato era agravado pela alta prevalência de cirrose nesta população e pelas dificuldades enfrentadas no encaminhamento dos pacientes portadores de doença terminal para o transplante, consequentes à alta mortalidade pós-cirúrgica e a reinfecção universal do enxerto nos pacientes virêmicos (81). Desta forma, a população coinfectada sempre necessitou de alternativas terapêuticas mais eficazes no combate a infecção crônica pelo VHC.

Nos últimos anos, o tratamento para hepatite C evoluiu de forma notória com o advento dos fármacos capazes de interferir na atividade de proteínas virais não estruturais que possibilitou inclusive a utilização de esquemas medicamentosos sem o emprego do interferon (77,82). Este fato modificou de forma radical o plano terapêutico da população coinfectada, de modo que a infecção pelo HIV passa a não ser mais considerada como um importante fator preditivo negativo de resposta terapêutica (83).

Resultados obtidos de estudos de fase III e de vida real baseados no uso de várias combinações contendo drogas antivirais de ação direta (DAAs) revelaram que a taxa de RVS atingida por estes esquemas em pessoas coinfectadas pelo VHC e HIV é bastante comparável com aquelas obtidas por pacientes monoinfectados pelo VHC (84,85). Assim, a “nova” terapia da hepatite C crônica acabou por simplificar de maneira substancial o manejo desta infecção em indivíduos que vivem com HIV.

A maioria dos estudos que avaliaram a eficácia dos DAAs na população coinfectada pelo VHC e HIV tem demonstrado claramente maior sucesso terapêutico em relação ao tratamento clássico baseado no peginterferon e ribavirina, mesmo nos grupos considerados de difícil manejo, como aqueles compostos por cirróticos e indivíduos com

falha prévia ao uso de interferon e ribavirina (7). Contudo, recentemente Neukam et al. analisaram de forma prospectiva uma grande coorte envolvendo aproximadamente 900 pacientes espanhóis que foram submetidos a tratamento para hepatite C com esquemas contendo DAAs. Neste estudo, a falha terapêutica foi maior nos coinfectados pelo VHC e HIV (menor taxa de RVS na semana 12 e maior taxa de recidiva no pós-tratamento). Assim, os autores sugeriram que a população coinfectada deveria permanecer como um grupo a ser visto com maior cuidado mesmo na era dos DAAs, muito embora neste estudo alguns fatores sabidamente capazes de influenciar negativamente a RVS tenham sido encontrados com maior frequência no grupo de coinfecção (cirrose e infecção pelo VHC genótipo 1a) (86). Estes resultados, portanto, necessitam ser comprovados por protocolos que avaliem populações mais equivalentes no que diz respeito a gravidade da hepatopatia.

Desta forma, a partir dos dados de ensaios clínicos e de vida real disponíveis atualmente na literatura, salvo o pronto reconhecimento e consequente manejo de potenciais interações medicamentosas entre as drogas anti-VHC e antirretrovirais, os principais guias terapêuticos (Europeu e Americano) deixam de especificar terapias distintas quanto a escolha dos fármacos bem como a duração do tratamento entre mono e coinfectados VHC-HIV (87–89).

1.2 Tratamento da hepatite C crônica na era das drogas antivirais de ação direta

1.2.1 Objetivos do tratamento da hepatite C crônica

O VHC, ao contrário do vírus da hepatite B e do HIV, não se integra no genoma do hospedeiro e, portanto, não é capaz de compor reservatórios replicativos (20). Desta

forma, o objetivo principal do tratamento antiviral é a cura virológica, ou seja, a erradicação do RNA viral e não somente a promoção da supressão do processo replicativo.

A eliminação do VHC está associada a redução do processo necroinflamatório parenquimatoso, à reversão parcial da fibrose, ao controle das manifestações extra-hepáticas e ao decréscimo do risco de descompensação da cirrose e de desenvolvimento do hepatocarcinoma. A cura virológica também se associa ao aumento da sobrevida pela redução das taxas de mortalidade tanto por eventos relacionados a doença hepática terminal quanto da mortalidade por todas as causas (90).

1.2.2 Histórico do tratamento da hepatite C crônica

O início da intervenção terapêutica da hepatite C crônica remonta a década de 1990, logo após o descobrimento / sequenciamento do vírus e o melhor entendimento de sua fisiopatogenia. Vários esquemas foram testados e consequentemente utilizados, sendo todos baseados no uso de formulações contendo interferon convencional (monoterapia a partir de 1991) e posteriormente interferon convencional associado a ribavina (em 1998), que resultavam no sucesso terapêutico em uma parcela ínfima dos casos (91).

Por muitos anos e até 2011, o tratamento considerado padrão ouro para a hepatite C crônica era a combinação de interferon alfa (2a ou 2b) na formulação peguilada e ribavirina. Este esquema era utilizado por períodos que variavam de 24 a 72 semanas, a depender do genótipo viral, do histórico terapêutico, da gravidade da hepatopatia (grau de estadiamento) e da presença ou não de coinfeção pelo HIV, produzindo cura virológica (RVS global na semana 24 pós tratamento) em torno de 50% dos indivíduos considerados aderentes (92). Em pacientes infectados pelo VHC genótipo 1 o esquema peginterferon e ribavirina resultava na RVS em aproximadamente 40% dos casos na América do Norte e

50% na Europa Ocidental (87). O sucesso terapêutico era maior nos pacientes infectados pelo genótipo 2, 3, 5 e 6 (taxas de RVS maiores em genótipo 2 – 80% em média, em comparação com os genótipos 3, 5 e 6), enquanto as taxas de RVS eram consideradas intermediárias para o genótipo 4 do VHC (62).

O interferon é considerado um fármaco com características imunoduladoras, cuja atividade culmina na potencialização de ações antivirais inerentes da maquinaria celular, incluindo o favorecimento da atividade antiviral Th1, indução da transcrição de genes específicos (ISGs), depleção de GTP, inibição direta da polimerase do VHC e indução de mutagênese no RNA sintetizado (função esta exercida também pela ribavirina) (93). Todavia, por ser uma medicação de ação sistêmica e possuir atividade inespecífica, seu uso frequentemente era acompanhado por eventos adversos que muitas vezes levavam a má aderência e descontinuação por intolerância. Tais efeitos incluíam sintomas gripais, distúrbios neuropsiquiátricos, doenças autoimunes e distúrbios hematológicos (supressão medular com pancitopenia e anemia hemolítica) (89).

1.2.3 Terapêutica baseada no uso de drogas antivirais de ação direta

Nos últimos anos, a terapêutica da infecção pelo VHC foi radicalmente modificada pelo emprego de drogas antivirais dirigidas às proteínas não estruturais do VHC capazes de bloquear seu ciclo celular em diferentes sítios, sendo denominados agentes antivirais de ação direta (DAAs) (94). Muito deste avanço ocorreu como produto direto da melhor compreensão e do acúmulo de conhecimento sobre a biologia do VHC, consequentes ao desenvolvimento de sistemas laboratoriais de replicação e de cultura celular mais específicos para este vírus (95). Os chamados inibidores da NS3/NS4A (inibidores da protease do VHC - IPs) foram representantes precursores destes fármacos e começaram a

ser desenvolvidos no início da década de 2000. Os IPs são moléculas que interagem por competição no sítio de ação da protease prevenindo a clivagem da poliproteína viral (20,96). O sítio catalítico localizado na protease NS3 é constituído pela tríade de aminoácidos serina-histidina-aspartato, distribuídos de maneira espacial em uma conformação “rasa” na estrutura molecular (24).

O BILN2061 (Ciluprevir, Boehringer Ingelheim Pharma, Canadá) foi o primeiro inibidor de protease a ser investigado em ensaios clínicos (97). Contudo, seu desenvolvimento foi descontinuado na fase Ib, por toxicidade relatada em modelos animais (97,98). Desta forma, os primeiros IPs disponíveis para o uso clínico em terapia combinada com interferon peguilado e ribavirina foram o Telaprevir e o Boceprevir, disponibilizados a partir do ano de 2011. Estas drogas são genótipo 1 específicas tendo suas estruturas constituídas por moléculas lineares caracterizadas por baixa barreira genética frente ao desenvolvimento de mutações virais associadas a resistência (99).

Em pacientes monoinfectados pelo VHC genótipo 1, o uso do Telaprevir ou Boceprevir elevou consideravelmente as taxas de RVS para valores próximos a 70%. (100). Todavia, estas medicações trouxeram consigo uma gama de eventos adversos e interações medicamentosas (sua metabolização ocorre no sistema do citocromo CYP3A), que atuaram como um forte complicador nesta abordagem em especial (101). Este fato tornava-se extremamente relevante em relação aos pacientes coinfectados pelo HIV em uso de TARV, uma vez que estes fármacos promoviam interações medicamentosas com vários antirretrovirais, como certos inibidores de protease e inibidores da transcriptase reversa não análogos nucleosídicos do HIV (83).

Dados obtidos de ensaios clínicos fase II e III envolvendo pacientes coinfectados VHC - HIV tratados com peginterferon, ribavirina, Boceprevir ou Telaprevir reafirmaram a necessidade do uso cuidadoso destes fármacos nesta população (102). Por outro lado,

estes estudos demonstraram elevadas taxas de RVS, ao menos quando comparados aos reduzidos valores obtidos anteriormente com a terapia clássica padrão – taxas de RVS de cerca de 60,5% para o Boceprevir e 74% para o Telaprevir (103–107).

O desenvolvimento de novos compostos agregados à classe dos inibidores de NS3/NS4A (segunda onda e segunda geração) resultou em moléculas macrocíclicas e posteriormente nos tratamentos sem a utilização do interferon, caracterizados por esquemas que combinavam IPs com inibidores da polimerase NS5B e com inibidores da NS5A, associados ou não a ribavirina. Os ensaios clínicos que avaliaram o uso combinado de DAAs demonstraram taxas de RVS mais robustas, com valores superiores a 90% (108). Com isso, o uso de IPs de primeira onda na prática clínica acabou por ser gradativamente reduzido, consequente essencialmente às questões de eficácia e tolerância, de modo que tais drogas (Boceprevir e Telaprevir) não são atualmente mais recomendadas no tratamento da hepatite C crônica pelos principais consensos em vigência (87–89).

Os primeiros representantes dos inibidores da NS5B e da NS5A – Sofosbuvir e Daclatasvir – além do IP de primeira geração e segunda onda Simeprevir - começaram a ser utilizados na União Europeia logo após sua aprovação, em meados de 2014 (109). O Sofosbuvir é um inibidor pangenotípico de alta potência análogo nucleotídico da polimerase do VHC, enquanto o Daclatasvir é droga inibidora pangenotípica da NS5A (87). Cada uma destas drogas foi testada em conjunto com o peginterferon e ribavirina, produzindo taxas de RVS bastante elevadas (de 60 a 100%) (83). Contudo, a existência de eventos secundários ao interferon e ribavirina continuava a atuar como fator complicador nestes esquemas, de forma que a busca de alternativas terapêuticas mais simplificadas e que não envolvessem o uso deste imunomodulador sempre fosse encorajada.

Assim, com o tempo houve um aumento expressivo do número de protocolos clínicos que se propuseram a avaliar a utilização de DAAs em combinações terapêuticas sem a utilização de interferon, caracterizadas pelo uso simultâneo de representantes das diferentes classes de inibidores, cada um bloqueando etapas distintas do ciclo celular do VHC (110,111). O uso destes esquemas tanto em ensaios clínicos como em programas de acesso expandido, acabou por gerar dados de eficácia e segurança em amostras populacionais clinicamente controladas ou não (ensaios clínicos de fase 2 – 3 e estudos de vida real) (112). De fato, em um curto período de tempo, novos regimes terapêuticos sem a utilização de interferon produziram elevadas taxas de RVS, próximas de 95%, em pacientes infectado pelo VHC genótipo 1, este considerado o mais problemático na era do peginterferon / ribavirina (110). Adicionalmente, tais esquemas permitiram uma melhor tolerância e aderência associada a um menor tempo de tratamento – 12 semanas em média.

1.2.4 Esquemas terapêuticos compostos por inibidor de protease NS3/NS4A / inibidor de NS5A e de polimerase NS5B

Na atualidade, os seguintes IPs podem ser utilizados em esquemas terapêuticos em associação com inibidores da NS5B e/ou NS5A – Simeprevir, Paritaprevir, Asunaprevir e Grazoprevir. Outras moléculas inibidoras da NS3/NS4A encontram-se em desenvolvimento, sendo seu uso na prática clínica previsto para breve (Tabela 1). No Brasil, o Protocolo Clínico de Diretrizes Terapêuticas (PCDT) de 2015 indica o uso de Simeprevir como representante dos IPs, além dos DAAs Sofosbuvir e Daclatasvir como representantes dos inibidores de NS5B e da NS5A, respectivamente (89).

Tabela 1 - Principais inibidores da protease NS3/NS4A do VHC com aprovação clínica ou em desenvolvimento

Inibidor de Protease NS3/NS4A	Cobertura genotípica	Barreira genética	Resistência Cruzada	Componentes
Primeira geração*	Genótipo 1	Baixa	Alta	Telaprevir
	Genótipo 1	Baixa	Alta	Boceprevir
	Genótipos 1 e 4	Baixa	Alta	Simeprevir
	Genótipo 1b	Baixa	Alta	Asunaprevir
	Genótipos 1 e 4	Baixa	Alta	Paritaprevir
Segunda geração	Genótipos 1 e 4	Alta	Baixa	Grazoprevir
	Pangenotípico	Alta	Baixa	Voxilaprevir
	Pangenotípico	Média	Alta	ABT-493

***Primeira onda:** Telaprevir e Boceprevir; **Segunda onda:** Simeprevir, Asunaprevir e Paritaprevir

Fonte: Sarrazin 2016; Pawlotsky 2016 (113,114)

A combinação de Sofosbuvir e Simeprevir com ou sem ribavirina por 12 semanas atingiu taxas de RVS próximas de 90% independente da presença de cirrose em pacientes infectados com VHC genótipo 1 (Estudo COSMOS de fase II) (115). Contudo, no estudo de fase 3 OPTIMIST-2 voltado para pacientes cirróticos virgens ou não de tratamento, as taxas de RVS na semana 12 foram menores (em torno de 80%), sendo as piores respostas descritas nos pacientes cirróticos (112,116). O esquema Sofosbuvir / Simeprevir com ou sem ribavirina também foi avaliado para tratamento de pacientes infectados pelo VHC genótipo 4. Entretanto, os dados de eficácia neste caso são considerados ainda limitados (112).

Outro esquema terapêutico utilizado na Europa e Estados Unidos – mas que ainda não foi contemplado pelo PCDT brasileiro - consiste na combinação do IP Paritaprevir associado ao Ritonavir como droga potencializadora, Ombistavir (inibidor de NS5A) e Dasabuvir (inibidor não nucleosídico da NS5B), que é utilizado para pacientes infectados pelo VHC genótipo 1a (em associação com ribavirina) ou 1b, por 12 a 24 semanas a

depende da presença ou não de cirrose (117). Tal esquema, em estudos clínicos realizados em pacientes virgens ou não de tratamento e com ou sem cirrose, alcançou taxas de RVS próximas de 95% (estudos SAPHIRE I / II e TURQUOISE II) (116). O esquema Paritaprevir / Ritonavir, Ombistavir e ribavirina foi também avaliado em pacientes infectados pelo VHC genótipo 4, tratados por 12 semanas, produzindo RVS em 96-100% destes indivíduos (112,117).

No início de 2016, a combinação de Elbasvir (inibidor de NS5A) e Grazoprevir (inibidor da protease NS3/NS4A) em posologia única diária foi aprovada nos Estados Unidos como droga de primeira linha para o uso em pacientes com VHC genótipo 1. Estudo clínico (c-WORTHY) realizado tanto em mono infectados como co-infectados com HIV demonstraram taxas de RVS superiores a 95% (118). A eficácia e tolerabilidade terapêutica manteve-se elevada inclusive nos pacientes com insuficiência renal dialítica (119). Tal combinação também foi estudada na população infectada pelo VHC genótipo 4, que receberam a terapia por período de 12 semanas (virgens de tratamento) ou 16 semanas (em conjunto com ribavirina, para pacientes com história prévia de tratamento) (112).

Outro combo terapêutico envolvendo DAAs constituintes das 3 classes encontra-se atualmente sob avaliação clínica. Este é composto pelos fármacos: Asunaprevir (inibidor da protease NS3/NS4A), Daclatasvir (inibidor da NS5A) e Beclabuvir (inibidor não nucleosídico da NS5B). Tal combinação apresenta atividade contra os genótipos do VHC 1, 2, 3, 4, e 5 e vem sendo estudada em pacientes com presença ou ausência de cirrose e com ou sem história prévia de tratamento (estudos UNITY-1 e 2) (120). A taxa de RVS revelada por estes estudos foi por volta de 90%, um pouco menor nos pacientes com genótipo 1a e semelhante nos grupos de pacientes com ou sem tratamento prévio.

Nos pacientes com cirrose, a RVS foi maior naqueles que fizeram uso concomitante de ribavirina (121).

Um esquema promissor envolvendo IP é aquele constituído pelos fármacos ABT-493, um inibidor da protease NS3/NS4A pangenotípico e o ABT-530, um inibidor de NS5A. Estudo de fase 2 envolvendo pacientes infectados pelo VHC genótipos 1 e 3 que receberam esta combinação por 12 semanas (16 semanas para pacientes com tratamento prévio sem uso de ribavirina) resultou em altas taxas de RVS (96% em ambos os subtipos). A adição de ribavirina elevou a RVS na semana 12 para 100% (122).

Atualmente encontra-se em estudo de fase 3 um esquema contendo o IP pangenotípico Voxilaprevir a ser utilizado em associação com Sofosbuvir e Velpatasvir (inibidor de NS5B e NS5A, respectivamente). Esta combinação tem demonstrado altas taxas de RVS em pacientes infectados pelo VHC genótipo 1 a 6 mesmo quando utilizado por tempos mais curtos (6 a 8 semanas), configurando uma possível alternativa terapêutica para pacientes que evoluíram com falha prévia a esquemas compostos por DAAs (123–125).

Em paralelo aos esquemas constituídos por IPs, combinações terapêuticas contendo inibidor de polimerase NS5B e inibidores de NS5A tem demonstrado taxas elevadas de RVS em períodos relativamente curtos de utilização (média de 12 semanas), englobando aqui outros genótipos além do 1.

A combinação do inibidor de NS5A Daclatasvir e o Sofosbuvir demonstrou ser altamente eficaz, resultando em RVS acima de 95% nos pacientes não cirróticos infectados pelo VHC genótipo 1 submetidos a terapia por 12 semanas. Quanto aos cirróticos, a adição de ribavirina ou a extensão do tratamento para 24 semanas parece elevar as taxas de RVS (126,127). Tal esquema inclusive foi testado para genótipos 2, 4 e 5 mantendo alta efetividade terapêutica (112). Nos pacientes infectados pelo genótipo 3,

os cirróticos - em especial aqueles com falha terapêutica prévia - evoluem com taxas de RVS relativamente reduzidas, mesmo quando realiza-se a extensão do tratamento para 24 semanas associada à ribavirina (70 a 80%) (128,129). Neste caso, a terapia com peginterferon, ribavirina e Sofosbuvir por 12 semanas parece promover maior sucesso terapêutico (em torno de 91%) (130). Entretanto, este esquema atualmente só é embasado pela diretriz brasileira, uma vez que os guias americano e europeu atualmente não mais recomendam o uso de peginterferon (89). Especificamente no caso da infecção pelo genótipo 3, os consensos internacionais sugerem tratamentos baseados no uso de Sofosbuvir com Velpatasvir ou Daclatasvir (inibidores da NS5A), associados ou não com ribavirina e por 12 ou 24 semanas de acordo com a presença ou não de cirrose hepática (87,88).

O esquema baseado nas drogas Ledispavir (inibidor da NS5A) e Sofosbuvir (inibidor da polimerase NS5B) formulados em pílula única promove taxa de RVS de 93 a 99% entre os pacientes infectados pelo VHC genótipo 1, podendo ser utilizado em conjunto com a ribavirina em pacientes cirróticos por 12 semanas (112). De forma semelhante, elevadas taxas de RVS após uso de Ledispavir / Sofosbuvir foram relatadas em coortes de pacientes infectados pelo VHC genótipo 4, 5 ou 6 (112,131).

O novo esquema composto pelo inibidor de NS5A Velpatasvir associado ao inibidor de polimerase NS5B Sofosbuvir tem sido avaliado em ensaios clínicos de fase II e III (protocolo ASTRAL) (132). Estes estudos no geral têm demonstrado elevadas taxas de RVS, próximos a 100%, em todos os genótipos analisados (1 a 6) (133). Tal combinação também se demonstra altamente eficaz na população coinfectada pelo VHC e HIV. Wyles et al. avaliaram 106 pacientes coinfectados (VHC genótipo 1 a 4) que foram tratados com Sofosbuvir e Velpatasvir por 12 semanas. Os valores de RVS foram no geral

bastante satisfatórios, de 92% a 100%, sendo que o sucesso terapêutico nestes casos não foi influenciado pela presença de cirrose e por falha terapêutica pregressa (134).

O uso de Sofosbuvir com ribavirina para pacientes infectados pelo VHC genótipo 2 por 12 semanas resulta na RVS em 94% dos indivíduos (135). Os indivíduos cirróticos parecem beneficiar-se com a extensão do tratamento para 16-24 semanas (88). Outra opção terapêutica para o genótipo 2 é o uso de Sofosbuvir e Daclatasvir, indicado essencialmente para pacientes que apresentem alguma contraindicação a ribavirina (112).

1.2.5 Polimorfismos / mutações do vírus da hepatite C e impacto na resposta terapêutica baseada em drogas antivirais de ação direta

A grande heterogeneidade genômica do VHC resulta na rápida emergência de variantes virais ao nível de quasiespécies, determinando não somente polimorfismos virais bem como variantes que albergam substituições associadas à resistência e/ou redução de susceptibilidade aos antivirais (136). É notável que modificações de ocorrência “natural” de aminoácidos na região do NS3 capazes de comprometer a eficácia dos IPs já tenham sido descritas em coortes de pacientes que nunca foram expostos a tais drogas (137). Estas mutações, por exemplo, são rapidamente selecionadas quando pacientes são submetidos a monoterapia com os IPs de primeira geração, uma vez que seus representantes (Telaprevir e Boceprevir) apresentavam baixa barreira genética para o surgimento de substituições associadas a resistência, além da discutível eficácia clínica e tolerância (138,139).

Assim, aliado ao alto perfil replicativo do VHC, variantes com grande diversidade em suas sequências nucleotídicas (polimorfismos) podem emergir como formas dominantes na vigência da terapia baseada em DAAs, especialmente nos casos onde a combinação de drogas não foi capaz de suprimir totalmente a replicação viral (136). Em

pacientes sob terapia antiviral, a cinética de clareamento do VHC é tipicamente bifásica (140). Na primeira fase, a queda do VHC RNA é rápida e proeminente, resultante do efeito inibitório direto do DAA sobre o processo replicativo. A eficácia farmacológica nesta fase depende diretamente da potência da droga, do grau de exposição à mesma e da susceptibilidade das variantes virais componentes da quasiespecie. Na segunda fase, a queda do VHC RNA é lenta e resultante da perda progressiva do VHC intracelular secundária a degradação do material genético viral a partir de mecanismos efetores da imunidade adaptativa dependentes da atividade de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺. Esta fase é influenciada pela potencia da droga, pelas características genéticas do hospedeiro e pela gravidade da doença hepática (presença de cirrose), podendo ser acelerada pela adição de ribavirina ao esquema de DAA, provavelmente pela sua atividade mutagênica adicional no VHC (114).

Enquanto que as variantes sensíveis são rapidamente eliminadas no contexto do tratamento antiviral, as variantes com moderada ou marcante redução de susceptibilidade a algum DAA são parcialmente ou não são totalmente inibidas. Sendo assim, cada componente da quasiespécie pode assumir três caminhos distintos: evoluir com redução dos seus níveis de viremia, permanecer no mesmo patamar anterior ao tratamento ou evoluir com aumento de sua representatividade no pool viral do hospedeiro (114). Algumas variantes podem permanecer inclusive detectáveis somente no fígado ao final do tratamento. Após a suspensão dos antivirais, estas variantes podem replicar-se novamente a partir da aquisição de mutações secundárias capazes de otimizar seu *fitness*, configurando desta maneira a recidiva viral (114,136).

A identificação de polimorfismos e de substituições associadas a resistência antiviral nas variantes que compõe o pool de quasiespecies do hospedeiro infectado é realizada através da análise genotípica, que é baseada em tecnologia de sequenciamento

de DNA (113). Nesta avaliação, os métodos de base populacional são considerados os mais simples e atualmente são os mais utilizados pelos protocolos clínicos, devido a facilidade relativa de sua realização, rapidez dos resultados e por questões relativas aos custos. Contudo, este método é o que entre todos possui menor sensibilidade, de modo que variantes virais que incidem numa frequência menor que 20-25% podem não ser identificadas. Assim, somente a variante dominante (a sequência de consenso) pode ser detectada e caracterizada (136). O sequenciamento clonal é capaz de detectar variantes que ocorrem com frequências menores. A sensibilidade do teste depende do número de sequencias clonadas (ex: 80 clones são necessários para detectar variantes que incidem num limite maior ou igual a 5%). Entretanto, trata-se de metodologia de alto custo e que demanda tempo para a produção de resultados (141). Ultimamente, popularizam-se os protocolos de pesquisa que utilizam técnicas de sequenciamento de nova geração com alta sensibilidade (por exemplo, o *ultra-deep sequencing*) que são capazes de detectar variantes virais que incidem em frequências de 0,1 a 1% no pool de quasiespécies. Estes métodos têm como limitação o alto custo e a complexidade na interpretação dos resultados obtidos (136,142).

A resistência do VHC a um determinado DAA depende basicamente de 3 fatores distintos: a) barreira genética do vírus em relação a resistência, que se relaciona com o número e tipo de substituições nucleotídicas necessárias para a emergência de substituições de aminoácidos associadas a redução de susceptibilidade aos DAAs durante o processo de replicação e ao número e tipo de substituições de aminoácidos necessárias para que uma variante viral adquira resistência a droga. A barreira genética varia de acordo com a classe de DAA e com o genótipo e subtipo viral; b) *fitness* da variante viral, que se associa a capacidade replicativa da variante no ambiente do hospedeiro e que não necessariamente relaciona-se com o nível de resistência conferida pelas substituições (de

fato, as variantes com substituições associadas a resistência geralmente apresentam um baixo *fitness* e uma menor probabilidade de persistir como população majoritária); c) nível de exposição a droga comparada com as concentrações inibitórias a 50% e 90% *in vitro* (114). Estes níveis podem ser influenciados por questões relacionadas à farmacocinética / farmacodinâmica da medicação (absorção, concentração, biodisponibilidade e interação medicamentosa) (113,143). Além das características relacionadas ao perfil farmacológico da medicação em uso, outros fatores clínicos podem contribuir facilitando o surgimento de polimorfismos / substituições associadas a resistência na região NS3 do VHC, incluindo aqui a aderência do paciente ao tratamento, o tempo de infecção e a gravidade da doença hepática, representada pela presença de cirrose associada com as alterações da homeostase vascular portal (144). Ainda não é claro se algum grupo de características clínicas e/ou virológicas correlaciona-se ou não com a emergência de tais substituições. A utilização na prática clínica de possíveis preditores de substituições associadas a resistência aos DAAs seria de grande ajuda na condução e na otimização da melhor terapêutica no paciente com hepatite C crônica.

O grau de resistência viral a determinado fármaco de ação direta é mensurado *in vitro*. Em ensaios enzimáticos, a resistência é medida em quantas vezes o aumento da concentração da droga é necessário para reduzir os níveis do VHC RNA em 50% e 90% (IC50% e IC90%, respectivamente). Os sistemas que envolvem cultura celular (*replicons*) permitem que o vírus cumpra seu ciclo infeccioso, de modo que a resistência pode ser medida em termos de concentração efetiva da droga em 50% e 90% (EC50 e EC90) (145). De acordo com o grau de aumento que as substituições promovem na IC/EC50 da droga (*fold change*), elas podem ser classificadas em substituições de baixo grau (elevação de 2-20 vezes a IC50), grau intermediário (21-100 vezes a IC50) e alto grau (>100 vezes a IC50) (113). As substituições podem ter pesos distintos de acordo com o subtipo viral (ex:

a A156T/V é uma mutação que compromete *in vitro* a eficácia de IPs de segunda geração em baixo grau para genótipo 1a e alto grau em genótipo 1b) (113,146). Ainda, a presença de duas ou mais mutações simultâneas pode promover efeito aditivo na elevação da IC₅₀, embora algumas destas substituições sejam consideradas secundárias ou acessórias, atuando especificamente na otimização do *fitness* da variante viral (147).

Não há um consenso de qual seria o menor aumento da IC/EC₅₀ necessário para comprometer a real eficácia de determinado DAA num eventual tratamento *in vivo*. Ainda, os resultados dos ensaios *in vitro* devem também ser interpretados dentro do contexto clínico, uma vez que algumas variantes virais consideradas com baixo grau de resistência *in vitro* podem ter um impacto clínico *in vivo* maior do que variantes consideradas com alto grau de resistência (145,148).

Inúmeras variações em determinados resíduos de aminoácidos traduzidos pelo genoma do VHC podem ocorrer em praticamente todos os sítos de ação das drogas antivirais – na região NS3/NS4A, região NS5A e NS5B. Na região NS5A, mutações que envolvem aminoácidos nas posições M28, Q30, L31, H58 e Y93 são capazes de reduzir a susceptibilidade aos inibidores de NS5A, uma vez que as drogas representantes desta classe apresentam baixa barreira genética para o surgimento destas substituições (96). Uma característica da resistência associada aos inibidores de NS5A é a seletividade de acordo com o subtipo do genótipo 1 (ex: substituição Y93H/N produz elevação considerável na IC₅₀ para todos os inibidores de NS5A no subtipo 1a, mas apenas para o Ledispavir no subtipo 1b), o tempo prolongado de permanência das substituições no pool viral de quasiespécies (> 96 semanas, possivelmente por vários anos) e o impacto clínico que tais mutações tanto no pré como no pós tratamento produzem na terapia baseada no uso de Ledispavir e Elbasvir (149,150). De fato, o tempo de tratamento com Grazoprevir e Elbasvir em pacientes infectados pelo VHC genótipo 1a depende da presença ou não de

substituições associadas a resistência na região NS5A. Pacientes com mutações devem receber tratamento por 16 semanas, em contraste com os pacientes sem substituições de resistência, que podem ser tratados por 12 semanas (112,151). Esta combinação é a primeira na qual oficialmente indica-se a testagem de rotina para a presença ou não de substituições associadas a resistência aos inibidores de NS5A antes do início do tratamento.

Quanto aos inibidores da polimerase, a resistência cruzada entre os inibidores análogos nucleotídicos e não nucleosídicos ainda não foi descrita (96). O Sofosbuvir é o representante dos inibidores de NS5B que apresenta elevada barreira genética, de modo que uma pequena parcela dos pacientes que evoluíram com falha terapêutica a esquemas contendo Sofosbuvir desenvolveu alguma mutação de resistência a esta droga (110). Substituições como a S282T, L159F, V321A podem eventualmente emergir durante o tratamento do VHC e aparentemente não influenciam de forma negativa a taxa de RVS (152,153). Por outro lado, no uso de inibidores não análogos nucleosídicos como o Dasabuvir e Beclabuvir, algumas mutações como a M414T e A421V foram observadas com maior frequência nos pacientes que não atingiram a RVS (117,154).

1.2.6 Polimorfismos / mutações na protease NS3/NS4A do vírus da hepatite C

Em quatorze posições localizadas no genoma do VHC, especificamente na região NS3 do vírus, substituições de aminoácidos podem resultar em variantes capazes de promover resistência aos IPs tanto lineares (posição 36, 54, 55, 109, 158, 170), quanto macrocíclicos (80, 138, 168) ou ambos (41, 43, 54, 155, 156) (136,155–157) (**ANEXO A**). Na classe dos IPs, a combinação de substituições de aminoácidos no gene da NS3 pode conferir resistência cruzada a vários componentes, uma vez que tais drogas atuam

em sítios de ação bastante similares na região da protease (158). A resistência cruzada pode ser parcial, afetando um subgrupo de drogas IPs (ex: os representantes das cetoaminas lineares) ou completa, atingindo todos componentes da classe (95). As mutações da NS3 associadas a redução da susceptibilidade aos IPs de primeira geração (Telaprevir e Boceprevir) acometem as posições V36, T54, R155, A156 e D168. Quantos aos IPs de primeira geração / segunda onda e de segunda geração (Simeprevir, Asunaprevir, Paritaprevir e Grazoprevir), sua atividade antiviral é substancialmente reduzida pela presença das mutações R155K e D168E/V/A/Y, que costumam emergir de forma majoritária durante o tratamento nos indivíduos que não alcançaram a RVS (96).

Varios estudos publicados em literatura vigente se propuseram a identificar a frequência de substituições de ocorrência natural, ou seja, no momento pré instituição da terapia, associadas a resistência aos IPs em pacientes infectados pelo VHC genótipo 1. De maneira global, os valores reportados por tais estudos variam de 0,1% a 3,1%, sendo diretamente influenciados pelo número de indivíduos analisados e pela região geográfica onde foi realizado cada levantamento (137,143,159–167). A exceção se dá em relação a variante Q80K, que tem sido associada a redução de susceptibilidade aos IPs Simeprevir, Asunaprevir e Paritaprevir. Esta variante é descrita quase que exclusivamente no genótipo 1a e por não se associar com a perda do *fitness* replicativo viral é capaz de manter sua transmissibilidade de forma efetiva na comunidade (155). Por isso, a Q80K é detectada em elevada frequência nas regiões onde há uma maior prevalência de infecção pelo VHC genótipo 1a (164,168).

No Brasil, os estudos de corte transversal publicados até então revelaram prevalência de 4,4% a 18,9% de mutações basais de ocorrência espontânea na região NS3 associadas a resistência aos IPs em pacientes infectados pelo VHC (Tabela 2). Frequências mais elevadas foram descritas em estudos com amostras menores e em um

estudo no qual o sequenciamento viral foi realizado por técnica de nova geração com alta sensibilidade (*Ion Torrent Sequencing*) (169–175).

Tabela 2 - Frequência de substituições na NS3 do VHC associadas a resistência aos IPs – estudos brasileiros

Autor, data	Amostra	Frequência de substituições na NS3	Substituições descritas
<i>Peres da Silva et al., 2010</i>	101	5 (5%)	V39L, T54S
<i>Zeminian et al., 2013</i>	37	7 (18,9%)	T54A, T54S, V55A, R155K, A156T, Q80K
<i>Hoffmann et al., 2013</i>	68	3 (4,4%)	V36L, T54S, V55A
<i>de Carvalho et al., 2014</i>	171	10 (5,8%)	V36L, T54S, Q80K, R155K, Q41R, D168S
<i>Nishiya et al., 2014</i>	125	16 (12,8%)	V55A, R155K, R117H, D168G, V36L, T54S, Q80L
<i>Peres da Silva et al., 2015</i>	544	24 (4,4%)	T54S, V55A, R155K, A156T, D168E, Q80K
<i>Gaspareto et al., 2016</i>	100	11 (11%)	T54S, V55A, Q80K, R155K, F43I, Q80H, D168E, M175L

A substituição na posição 80 da NS3 (Q80K) encontra-se presente de maneira bastante variável em amostras do VHC genótipo 1a, em frequências que podem alcançar valores próximos de 40%, de acordo com a região geográfica de estudo (168). Esta mutação confere um aumento de aproximadamente 8 vezes na IC₅₀ do IP Simeprevir, promovendo impacto clínico nos indivíduos tratados, virgens ou não de tratamento, com este IP associado à interferon peguilado / ribavirina (146,164). A presença da Q80K no pré-tratamento resulta na falha terapêutica em aproximadamente 40% dos indivíduos tratados com este esquema (165). É notável ainda que nos indivíduos infectados com variantes do VHC que albergam a Q80K adquirirem, após a falha terapêutica, mutações adicionais de alto impacto observadas essencialmente em estudos *in vitro*, como a R155K no genótipo 1a e, menos frequentemente, a A168 no genótipo 1b (139). Quanto aos esquemas compostos exclusivamente por DAAs (sem uso de interferon), um estudo aberto

de único braço e de fase 3 que avaliou o uso de Simeprevir e Sofosbuvir em paciente cirróticos infectados pelo VHC genótipo 1, virgens ou não de tratamento (OPTIMIST-2), revelou uma taxa de RVS global de 83%, sendo que a substituição Q80K nos pacientes infectados pelo genótipo 1a, embora de forma menos pronunciada que na terapia com o interferon, influenciou negativamente a RVS – 34 pacientes com Q80K (RVS 74%) vs 38 pacientes sem Q80K (RVS 92%) (115). Contudo, a Q80K não impactou de maneira global a RVS na terapia com Simeprevir / Sofosbuvir executada por 12 semanas nos pacientes não cirróticos (OPTIMIST-1), embora tal substituição tenha sim produzido menor taxa de resposta em indivíduos nos quais se tentou a redução do tempo de tratamento para 8 semanas (176).

A despeito do Simeprevir, em esquemas atuais que não utilizam o interferon e que são compostos por IPs de primeira geração / segunda onda e segunda geração (Paritaprevir, Asunaprevir e Grazoprevir) associados a inibidores de NS5A e/ou NS5B, a eficácia clínica da sua utilização em pacientes infectados por variantes do VHC que albergam mutações associadas a resistência permanece não totalmente compreendida (108,115). Por exemplo, o esquema terapêutico contendo Asunaprevir e Daclatasvir, aprovado e utilizado no Japão, é indicado para tratamento de infecção crônica pelo VHC genótipo 1b, promovendo RVS em cerca de 90% dos indivíduos tratados por 24 semanas. Neste caso, a ocorrência de substituições tanto na NS3 (D168) como na NS5 (L31, Y93) é capaz de impactar negativamente as taxas de RVS (92% vs 39% naqueles com tais substituições) (113,177). Contudo, no esquema Asunaprevir e Daclatasvir associado ao inibidor de polimerase Beclabuvir, apesar da falha terapêutica ter sido mais frequentemente observada nos pacientes infectados com VHC que apresentavam substituições associadas a resistência ao inibidor de NS5A, as mesmas mutações não impactaram a taxa de RVS em cirróticos (120,178). Uma possível explicação vem do fato

de que metade dos pacientes cirróticos utilizou concomitantemente a ribavirina, que possivelmente potencializou a ação antiviral do tratamento (113).

No esquema Paritaprevir / ritonavir, Ombitasvir e Dasabuvir, utilizado no tratamento da infecção crônica pelo VHC genótipo 1, a prevalência de mutações associadas a resistência em 700 pacientes analisados num extenso estudo clínico foi de 18% e 0,4% para uma ou duas drogas no subtipo 1a e de 33% e 3% para uma ou duas drogas no subtipo 1b, respectivamente (150). Especificamente, em relação as substituições na protease NS3, a prevalência de mutações no pré-tratamento foi inferior a 1%. A variante Q80K foi identificada como uma das substituições descritas, influenciando aqui a taxa de RVS no grupo que foi submetido a tratamento por tempo reduzido de 8 semanas (74% vs 87%) (113,150).

Na combinação em estudo do IP Voxilaprevir / Sofosbuvir e Velpatasvir, a presença de substituições tanto na região NS3 como na região NS5A no momento basal (pré-tratamento) não pareceu influenciar nas taxas de RVS. Da mesma forma, a falha terapêutica naqueles que não responderam não esteve associada com a emergência de resistência, refletindo aqui a alta barreira genética proporcionada pelo uso simultâneo de drogas pertencentes a 3 classes distintas (125,179).

Deste modo, o impacto clínico das mutações basais de ocorrência natural bem como sua implicação no comprometimento da terapêutica específica e mesmo no fitness viral *in vivo* quanto a sua persistência a médio ou longo prazo no pool viral do indivíduo tratado e sem RVS são questões que necessitam ser melhor esclarecidas (136). Alguns estudos de seguimento longitudinal demonstraram que o tempo médio em meses para a perda da detectabilidade das mutações associadas a resistência aos IPs, por técnica de sequenciamento populacional em pacientes sem RVS tratados com Boceprevir, Telaprevir e Simeprevir foi de 14 e 12,5 / 10,6 e 0,9 / 8,3 e 5,5 para os subtipos 1a e 1b do VHC,

respectivamente. Para o Paritaprevir, 9% apresentavam alguma mutação associada a resistência na semana 48 de seguimento pós tratamento (113).

Além do possível envolvimento de determinadas mutações de ocorrência natural no genoma do VHC e a falha terapêutica, outras questões permanecem sob ampla discussão, como a relevância da permanência ou não de quasiespecies virais com susceptibilidade reduzida aos DAAs no sucesso de um eventual retratamento e a necessidade de testes genotípicos / fenotípicos para a detecção de substituições associadas a resistência no período pré-terapêutico (96).

O tema dos polimorfismos / substituições associadas a resistência aos DAAs do VHC toma uma maior proporção quando debatido no âmbito da coinfeção VHC-HIV, dado os inúmeros mecanismos de interação e inter-relação viral (180). A infecção pelo HIV com seu status imunodepressor, representado pelo comprometimento das fases iniciais da resposta inata (atividade de células NK), depleção qualitativa e quantitativa dos LTCD4⁺ (sérica, hepática e em tecido linfóide) e inversão da resposta Th1/Th2 associa-se a maior replicação do VHC, que é evidenciada pelo aumento de sua carga viral e consequentemente da variabilidade de seu pool de quasiespécies contendo possíveis polimorfismos capazes de comprometer a eficácia dos DAAs em questão (82,180–182).

2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

O desenvolvimento das drogas antivirais de ação direta inaugurou um novo patamar no estudo da virologia do VHC. Os polimorfismos de ocorrência natural até então tinham pouca consideração no que diz respeito ao sucesso da terapia dupla clássica baseada em interferon peguilado e ribavirina. Contudo, sabe-se que variantes virais constituídas por substituições capazes de reduzir a susceptibilidade aos DAAs coexistem naturalmente no pool de quasiespécies do paciente infectado. Este fato tem sido documentado em indivíduos monoinfectados através de estudos epidemiológicos realizados em regiões com prevalências distintas de infecção pelo VHC, inclusive no Brasil. Entretanto, há que se considerar que em indivíduos coinfectados pelo HIV a frequência de tais substituições possa ser diferente do que em monoinfectados, considerando-se o perfil singular da resposta imune e possíveis mecanismos de interação intervirais presentes nesta população em especial.

A real prevalência das substituições na região NS3/NS4A do VHC em indivíduos mono e coinfectados pelo HIV não é totalmente conhecida na população brasileira. Ainda, a caracterização de possíveis fatores preditores da ocorrência de polimorfismos / mutações de resistência possibilitaria a identificação precoce de indivíduos sob maior risco de falha terapêutica.

Estes achados em conjunto podem contribuir para a realização de futuros estudos objetivando avaliar o real impacto da presença destas substituições nas taxas de RVS em esquemas terapêuticos que utilizem IPs, bem como a influência dos mesmos na permanência e na eventual disseminação comunitária de tais variantes do VHC.

3 OBJETIVOS

1. Estimar a prevalência de polimorfismos e mutações basais de resistência pré-existentes aos inibidores da protease NS3/NS4A lineares e macrocíclicos do VHC genótipo 1 em pacientes monoinfectados e coinfectados pelo HIV, virgens de tratamento para tais fármacos.
2. Descrever e comparar os pacientes monoinfectados e coinfectados pelo HIV segundo as características sociodemográficas, clínicas e laboratoriais identificadas.
3. Identificar possíveis fatores clínicos e virológicos associados à ocorrência de polimorfismos e mutações de ocorrência natural de resistência aos inibidores da protease NS3/NS4A do VHC na amostra em estudo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo:

O delineamento do estudo foi do tipo transversal e com grupo comparador (pacientes com hepatite C crônica mono infectados vs pacientes co infectados pelo VHC e HIV).

4.2 População de referência:

O estudo foi composto por pacientes mono infectados pelo VHC e pacientes co infectados pelo VHC-HIV provenientes dos mesmos centros de atendimento e selecionados dentre aqueles matriculados e regularmente atendidos nas seguintes unidades de referência: Clínicas de Especialidades de São Bernardo do Campo, SEAP - Serviço de Extensão ao Atendimento de Pacientes HIV/AIDS do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Centro de Referência e Treinamento DST/AIDS-SP – Unidade Santa Cruz, Ambulatório de Hepatites Virais do DMIP - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Centro Especializado em Saúde do Município de Caxias do Sul - RS. Estes locais apresentam em comum o fato de serem constituintes da rede especializada de atendimento terciário, responsável pela assistência a pacientes com hepatite C crônica mono e co infectados pelo HIV.

Os centros realizam os atendimentos segundo critérios de regionalização: a Clínicas de Especialidades de São Bernardo do Campo acolhe pacientes provenientes na sua grande maioria do município de São Bernardo do Campo e de parte do ABC Paulista.

Este é constituído por equipe multidisciplinar reponsável pela assistência a cerca de 2900 pacientes infectados pelo HIV; o Centro de Referência e Treinamento DST/AIDS-SP Unidade Santa Cruz é ligada a Secretaria de Saúde da Governo do Estado de São Paulo, sendo responsável pela assistência de cerca de 6000 pacientes infectados pelo HIV na região Sul do município de São Paulo; o Centro Especializado em Saúde do Município de Caxias do Sul / Serviço Municipal de Infectologia é unidade de referência ligada a prefeitura municipal no atendimento de pacientes com infecção pelo HIV, pelo VHC e por DSTs em de Caxias do Sul - RS, sendo responsável pelo atendimento de cerca 2500 pacientes infectados pelo HIV, incluindo indivíduos procedentes de 17 municípios vizinhos.

O SEAP - Serviço de Extensão ao Atendimento de Pacientes HIV/AIDS e o Ambulatório de Hepatites Virais da DMIP são serviços ligados ao HCFMUSP, sendo reponsáveis pelo atendimento de indivíduos exclusivamente coinfectados pelo VHC / HIV e de pacientes monoinfectados pelo VHC, respectivamente. Estes serviços apresentam em média 4000 pacientes matriculados cada um, sendo estes na sua grande maioria procedentes das diversas unidades formadoras do Complexo do Hospital das Clínicas. As condutas clínicas tomadas para o seguimento e tratamento em todos estes centros são padronizadas e seguem o PCDT publicado e divulgado pelo Ministério da Saúde brasileiro (89).

4.3 Amostragem:

A amostra avaliada por este estudo foi composta por indivíduos selecionados dos cinco centros de atendimento previamente descritos segundo os critérios pré-estabelecidos. Os indivíduos co-infectados pelo VHC e HIV estudados foram procedentes dos seguintes locais: Clínicas de Especialidades de São Bernardo do Campo, SEAP - Serviço de Extensão ao Atendimento de Pacientes HIV/AIDS do HCFMUSP, Centro de Referência e Treinamento DST/AIDS-SP – Unidade Santa Cruz e Centro Especializado em Saúde do Município de Caxias do Sul - RS.

Os pacientes mono infectados pelo VHC foram procedentes do Ambulatório de Hepatites Virais da DMIP – HCFMUSP. A casuística de mono infectados avaliada por este estudo foi composta por parte da amostra utilizada pelo protocolo de pesquisa CAPPESQ 0850/11: “*Análise de evolução de infecção pelo vírus da hepatite C em doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue / Hemocentro de São Paulo*”, que identificou e analisou pacientes recém diagnosticados com hepatite C crônica entre candidatos à doação de sangue feita à Fundação Pró-Sangue / Hemocentro da cidade de São Paulo.

4.4 Cálculo do tamanho da amostra:

Em relação a prevalência de substituições associadas à diminuição de susceptibilidade aos IPs, os estudos publicados realizados em território brasileiro revelaram valores que variaram de 4,4% a 18,9%, sendo estes resultados obtidos por metodologia laboratorial semelhante a empregada por este protocolo (169,171–173,175,183).

Assim, considerando-se uma prevalência de mutações associadas a resistência aos IPs de 5% com uma margem de erro de 5%, poder estatístico de 80% e nível de significância de 5%, a amostra necessária para a etapa descritiva do estudo seria composta por 204 indivíduos (185 pacientes acrescidos de 10% para eventuais perdas durante o processo de seleção) (184).

Para a etapa analítica do estudo, optou-se pela realização do cálculo amostral considerando-se as prevalências de substituições na região da protease do VHC distribuídas de acordo com a presença ou não de coinfecção pelo HIV. Desta forma, a prevalência global adotada de substituições na região da protease foi de 25% (polimorfismos naturais em conjunto com mutações reconhecidamente associadas a resistência aos IPs), valor este estimado a partir do estudo de Patiño-Galindo et al. (185). Considerando que a prevalência de substituições em indivíduos coinfectados pelo VHC e HIV seja pelo menos 2 vezes maior do que em monoinfectados pelo VHC (uma vez que a prevalência global de substituições em coinfectados pelo VHC e HIV não pôde ser estimada de forma acurada com os dados disponíveis na literatura vigente), o cálculo amostral realizado com nível de significância de 5% e poder estatístico de 80% resultou em uma amostra de 165 indivíduos (132 pacientes acrescidos de 10% para eventuais perdas e de 15% para controle de variáveis de confusão) (184). Sendo assim, o valor calculado de 204 indivíduos foi adotado como a amostra mínima necessária para a realização deste estudo, por apresentar maior grandeza.

4.5 Período do estudo:

Foram considerados para o estudo somente pacientes aderentes às consultas ambulatoriais, sendo o critério definidor a presença de pelo menos uma avaliação médica especializada no último ano, dentro de um período de três anos (2011-2013). A escolha desse período permitiu uma amostragem adequada da população e consequentemente a descrição satisfatória da distribuição das variáveis em estudo, permitindo a validade externa dos resultados obtidos.

4.6 Seleção de pacientes:

A amostra de pacientes avaliada foi composta por portadores de infecção crônica pelo VHC, definidos como indivíduos com viremia detectável (VHC RNA) através de técnica de biologia molecular (reação pela cadeia de polimerase), por um período igual ou maior que seis meses.

Esta amostra total foi subdividida em dois grupos, para efeito de comparação, sendo estes: Grupo de pacientes monoinfectados pelo VHC e Grupo de pacientes coinfectados pelo VHC e pelo HIV. A infecção pelo HIV foi definida como indivíduos com anticorpos anti-HIV detectados através de ensaios de triagem (imunoenzimático) e confirmados através de uma das seguintes técnicas laboratoriais: Imunofluorescência indireta, Imunoblot, Westernblot e detecção do HIV RNA por metodologia de biologia molecular.

I. Critérios de inclusão:

- I.1. Idade acima de 18 anos;
- I.2. Infecção crônica pelo VHC genótipo 1, com e sem coinfecção pelo HIV;
- I.3. Presença de informações epidemiológicas, clínicas e laboratoriais relevantes ao estudo disponíveis em prontuário médico, quanto ao perfil de infecção pelo VHC e HIV;
- I.4. Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Informado.

II. Critérios de exclusão:

- II.1. Uso pregresso de inibidores de protease NS3/NS4A (comerciais ou em protocolos clínicos) para infecção pelo VHC;
- II.2. Presença de outras hepatopatias de etiologia não viral – exceto doença hepática promovida por álcool.

4.7 Instrumento e coleta de dados:

A coleta dos dados relevantes ao estudo foi realizada através da revisão sistemática de prontuários médicos utilizando ficha específica (questionário), na qual foram registradas as seguintes variáveis (**ANEXO B**):

I. Identificação:

- a. Nome próprio;
- b. Registro utilizado para o cadastro do paciente;
- c. Centro de origem.

II. Aquisição da infecção pelo VHC:

- a. Ano da primeira sorologia positiva;
- b. Ano provável da infecção de acordo com os fatores de risco em potencial.

III. Informações demográficas:

- a. Sexo;
- b. Data de nascimento.

IV. Comorbidades / Coinfecções: Presença de diabetes mellitus, hipertensão arterial sistêmica, infecção pelo HTLV (definida por teste imunoenzimático positivo em soro), infecção crônica pelo vírus da hepatite B (definida pela detecção do HBsAg em soro), ingestão de álcool e outras patologias associadas.**V. Fatores de risco em potencial para a aquisição do VHC:**

- a. Transfusão de sangue e/ou hemocomponentes antes de 1993;
- b. Cirurgia ou procedimento invasivo;
- c. Uso de droga inalatória;
- d. Uso de droga injetável;
- e. Tatuagem, “piercing”;

- f. Contato sexual de risco (relação sexual com indivíduo sabidamente infectado pelo HIV ou VHC, com usuário de droga ilícita intravenosa; com mais de três parceiros sexuais / ano ou relação sexual sem uso de preservativo).

VI. Perfil do VHC:

- a. Genótipo;
- b. VHC RNA quantitativo (em UI/mL).

VII. Perfil do HIV:

- a. Uso de terapia antirretroviral de alta potência (TARV) nos últimos 6 meses antes da coleta da amostra;
- b. Ano do início do tratamento e esquema TARV atual;
- c. Contagem de LTCD4⁺ e Carga viral do HIV mais recentes (dentro de 6 meses da coleta da amostra).

VIII. História de doença definidora de AIDS.

IX. Exames laboratoriais mais recentes (dentro de 6 meses da coleta da amostra):

- a. Leucograma;
- b. Plaquetas;
- c. Transaminases (ALT e AST), em U/L a 37 C;
- d. Fosfatase alcalina e gamaglutamiltransferase, em U/L a 37 C;
- e. Bilirrubinas totais e frações (direta e indireta), em mg/dL;
- f. Proteínas totais e albumina, em g/dL;
- g. Tempo de protrombina e INR.

- X. Análise histopatológica hepática pela classificação de METAVIR, quando disponível.**
- XI. Histórico terapêutico para o VHC com interferon +/- ribavirina e tipo de resposta obtido.**

4.8 Estadiamento da doença hepática:

Com o objetivo de se obter informações sobre o estadiamento da doença hepática, aplicou-se o escore indireto não invasivo FIB-4. Este índice tem sido largamente empregado por reunir entre suas características a facilidade de realização, o custo zero e uma acurácia discriminatória satisfatória, sendo inclusive adotado pelo PCDT brasileiro (89). A literatura vigente tem demonstrado que o FIB-4 apresenta acurácia de 0,85 (IC 95% 0,82 - 0,89) para a identificação de pacientes com fibrose avançada (correspondente ao METAVIR F3-F4) e um valor preditivo positivo de 82,1%, com uma especificidade de 98,2%, quando se consideram valores de escore maiores que 3,25 (186).

O FIB-4 é considerado um bom preditor de doença hepática inclusive em pacientes coinfectados pelo VHC e HIV (187). Tal escore foi testado e validado na população coinfectada pelo VHC e HIV, apresentando uma acurácia de 0,76 (na distinção entre fibrose hepática avançada - escore de Ishak de 4 a 6 - e fibrose hepática leve a moderada - escore de Ishak 0 a 3) e um valor preditivo positivo para fibrose avançada de 65% com especificidade de 97% para valores acima de 3,25 (188). Este índice é calculado pela seguinte fórmula matemática: $\text{idade (anos)} \times \text{AST [U/L]} / (\text{plaquetas [10}^9\text{/L]} \times (\text{ALT [UI/L]})^{1/2})$. Valores $> 3,25$ foram considerados sugestivos de fibrose avançada (correspondentes ao METAVIR F3-F4).

4.9 Processamento das amostras:

As unidades de referência onde foram coletadas as amostras (em São Paulo, São Bernardo do Campo e Caxias do Sul), bem como o Laboratório de Técnicas Especiais (LATE) do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE) e o Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical do Instituto de Medicina Tropical (IMT), onde as mesmas foram processadas, cumprem com as exigências de qualidade necessárias à coleta e manejo deste tipo de material. Para o transporte, todas as amostras foram acondicionadas em embalagens apropriadas e identificadas segundo os critérios do estudo.

Para cada paciente foram coletados 3 tubos de 10 ml de soro (tubo seco) e 1 tubo de 4 ml de sangue em tubo com anticoagulante EDTA. O plasma, sangue e soro foram separados e acondicionados em freezer (-80° C) até serem processadas.

Os procedimentos laboratoriais foram executados no Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical, Instituto de Medicina Tropical (IMT), pertencente à Universidade de São Paulo. O descarte de material biológico e químico seguiu todas as normas de Biossegurança habitualmente empregadas no laboratório.

4.10 Subtipagem e quantificação do VHC RNA:

Uma alíquota de cada amostra foi enviada ao LATE (HIAE) para a quantificação do VHC RNA. O VHC RNA foi detectado por técnica de PCR em tempo real utilizando kits comercialmente disponíveis (Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HCV test, version 2.0; Roche Diagnostics, Branchburg, NJ, USA) (189). Os subtipos do VHC das amostras coletadas foram determinados através de análises filogenéticas das sequências da região NS5B. As sequências foram alinhadas com o programa CLUSTALX (190) com sequências de referência disponíveis no GenBank representativas dos diferentes genótipos do VHC. As sequências de nucleotídeos alinhadas foram convertidas em sequência de aminoácido no programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis* versão 6.06) (191).

4.11 Amplificação da região NS3 do VHC:

No laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical, foram realizadas técnicas de biologia molecular com a finalidade de se obter a sequência de nucleotídeos da região NS3 do VHC. A sequência dos primers utilizados para a amplificação da região NS3 do VHC pode se visualizada no Quadro 1.

A extração do VHC RNA foi realizada a partir 140 µL de soro utilizando-se o QIAamp® Ultrasens Virus Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), seguindo as instruções do fabricante. Após a extração, o RNA foi submetido à reação de transcrição reversa (síntese do cDNA – DNA complementar) e 1ºPCR em uma única reação (PCR-*OneStep*) com volume total de 25 µL utilizando-se: 12,5 µL de 2X Reaction Mix e 0,5 µL da enzima *SuperScript III High Fidelity One-Step* – ambos pertencentes ao *RT-PCR kit*

(Invitrogen™, Thermo Fisher Brand, Carlsbad, USA), 5 µL de cada um dos *primers* (Quadro 1), 5 µL de água e por fim, 5 µL de RNA. As condições da reação foram: 50 °C por 30 minutos (min); 94 °C por 2 min, seguidos de 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos (s), 56 °C por 30s e 68 °C por 1 min e 30s, e uma extensão final a 68 °C por 5 min.

O produto obtido na primeira reação de amplificação foi submetido a uma segunda etapa de amplificação (*nested-PCR*). As reações de *nested-PCR* foram realizadas em volume final de 50 µL nas seguintes condições: 5 µL de 10X High fidelity Buffer, 1,5 µL de MgSO₄ e 0.5 µL de Taq Platinum High Fidelity (5U/µL) (Invitrogen™, Thermo Fisher Brand, Carlsbad, USA), 35 µL de água DEPC, 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen™, Thermo Fisher Brand, Carlsbad, USA), 1 µL de cada *primer* (20 µM) e 5 µL do produto da 1ª PCR. As condições da reação foram: 94 °C por 3 min, seguidos de 30 ciclos a 94 °C por 30 segundos (s), 60 °C por 30s e 72 °C por 1min e 30s, e uma extensão final a 72 °C por 5 min. A região da protease do VHC (NS3/4A) foi amplificada totalmente gerando um fragmento de 765 pares de bases.

Quadro 1 - Sequência dos primers utilizados para a amplificação da região NS3 do VHC

Etapas	Primers[#]	Sequência	Genótipo
cDNA + 1ª PCR	P1aF1	5'-CTT YTC CCR RAT GGA GAC CAA-3'	1a
	P1aR1	5'-ACC TTA TAG CCC TGR GCY GC-3'	1a
	P1bF1	5' -GCC CGT CRT CTT CTC TGA CAT GG-3'	1b
	P1bR1	5' -TTG TAC CCT TGG GCT GCA TA-3'	1b
Nested PCR e sequenciamento	P1aF2	5'-CTC ATC ACG TGG GGG GCR GA-3'	1a
	P1aR2	5'-TTG GTG CTC TTR CCG CTG CC-3'	1a
	P1bF2	5'-TCA TCA CCT GGG GGG CAG AC-3'	1b
	P1bR2	5'-GTG CTC TTG CCG CTG CCA GT-3'	1b

[#]descritos por Peres-da-Silva 2010 (172)

F: *forward* (senso); R: *reverse* (anti-senso);

4.12 Identificação e quantificação dos produtos de PCR:

A identificação dos produtos amplificados na PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose 2% com adição do corante *SYBR Safe* (InvitrogenTM Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Para tal foram misturados 4 µL do produto final da PCR com 1 µL do tampão 10X *Bluejuice*TM *Gel Loading Buffer* (InvitrogenTM, Thermo Fisher Brand, Carlsbad, CA, USA), a mistura foi aplicada em gel de agarose 2% preparado com tampão TAE 1X e 4,5 µL do corante *SYBR Safe* para cada 100 mL de gel. A identificação e quantificação da banda específica foi realizada a partir da comparação com o padrão de tamanho (100 pb) e com o padrão de massa (*Low DNA Mass Ladder* InvitrogenTM, Thermo Fisher Brand, Carlsbad, CA, USA), respectivamente, conforme orientação do fabricante.

4.13 Reação de sequenciamento:

Os produtos de PCR foram purificados utilizando a enzima ExoSap-IT PCR (Affimetrix, Cleveland, USA), e em seguida foi empregada a técnica de sequenciamento derivada da metodologia de Sanger et al., utilizando-se didesoxinucleotídeos (ddNTPs) contendo marcadores fluorescentes, conforme o kit ABI PrismR BigDye™ Terminator (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), em Sequenciador Automático ABI 3500 (Applied Biosystems) (192). Foram geradas sequências a partir das duas fitas de DNA para garantir a melhor qualidade nos resultados obtidos. As sequências obtidas foram analisadas inicialmente utilizando os programas Phred-Phrap-Consed (193).

4.14 Análise de polimorfismos / mutações na NS3 associadas a resistência aos IPs:

As sequências de consenso para cada amostra foram obtidas através do alinhamento de ambas as fitas sequenciadas (senso e anti-senso) utilizando o CodonCode Aligner Software (CodonCode Corporation, Dedham, MA, USA). Os contigs montados foram alinhados utilizando o software CLUSTALW integrado com o software BioEdit v. 7.0.8 (Ibis Bioscience, Carlsbad, CA, USA).

Os nucleotídeos foram traduzidos em aminoácidos e analisados quanto à presença das seguintes mutações previamente identificadas capazes de reduzir a susceptibilidade *in vitro* aos IPs do VHC: V36A/M, T54A/S, V55A, Q80K/R, R155K/T, A156S/T/V, D168A/V/E/T e para polimorfismos nos seguintes resíduos de aminoácidos: V36, F43, T54, V55, Q80, R109, S122, I132, S138, R155, A156, V158, D168, V170 e M175 (47,157).

4.15 Análise de diversidade das quasiespécies e de pressão seletiva no gene NS3 do VHC:

Com o intuito de se obter informações adicionais sobre a variabilidade viral, a estrutura genômica da região NS3 do VHC foi explorada quanto a sua diversidade nucleotídica e através da quantificação do grau de pressão natural exercida sobre esta sequência. A análise da pressão seletiva foi realizada comparando-se a taxa de substituições não sinônimas por sítio não sinônimo (dN) pela taxa de substituições sinônimas por sítio sinônimo (dS). Desta forma, a detecção de sítios que eventualmente estiveram sob seleção foi realizada utilizando o método SLAC (*Single-Likelihood Ancestor Counting*) baseado em Máxima Verossimilhança, disponível no sítio (<http://www.datamonkey.org>) que disponibiliza a ferramenta *online* para detecção de sítios sob seleção HyPhy (194). A razão dN/dS (ω) < 1 é indicativa de seleção purificadora (contra substituições não sinônimas consideradas deletérias) e (ω) > 1 é sugestiva de seleção diversificadora.

A diversidade genética (π), que é definida pela proporção de diferenças nucleotídicas por sítio no grupo total de nucleotídeos analisados, foi estimada para o conjunto das sequências do gene NS3, tanto em nível de nucleotídeo como de aminoácido utilizando o software Mega 5 (195). Ainda, valores de dN e de dS foram considerados separadamente na análise, visto que um aumento de substituições não-sinônimas em um dado grupo poderia ser indicativo de seleção, sem que a razão dN/dS fosse significativamente alterada. Em todas as análises de seleção e de diversidade genética, as sequências dos genes foram divididas em subtipos (genótipo 1a e 1b) e agrupadas de acordo com os critérios de classificação de grau de fibrose hepática e histórico prévio de

tratamento com interferon / ribavirina. Sendo assim, os parâmetros foram estimados para os genes de forma comparativa e entre os grupos.

4.16 Análise estatística:

Os dados coletados foram posteriormente codificados e digitados em banco de dados, onde tiveram sua consistência averiguada. As variáveis categóricas foram expressas através de suas frequências absolutas e relativas. As variáveis contínuas foram expressas através da mediana e intervalo interquartilico, como medida de dispersão. Para comparação dos dados demográficos, clínicos, laboratoriais e virológicos entre os pacientes monoinfectados e coinfectados pelo HIV e entre indivíduos com ou sem polimorfismos / mutações na NS3/NS4A associadas a resistência aos IPs foi realizado o teste qui-quadrado de Pearson para a análise de proporções ou teste exato de Fisher quando apropriado. Razões de chance (*Odds ratio* - *OR*) foram calculadas em algumas situações como medidas de associação. As variáveis contínuas foram comparadas entre si através do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Foram calculadas as prevalências de polimorfismos e mutações basais de resistência aos IPs do VHC nesses pacientes como um grupo total, bem como nos pacientes com hepatite C crônica subdivididos em mono e coinfectados pelo HIV, com seus respectivos intervalos com 95% de confiança (IC 95%).

O modelo de Regressão Logística foi utilizado para a identificação das variáveis associadas à ocorrência desses desfechos (presença de polimorfismos / mutações na NS3/NS4A associadas a resistência aos IPs). Na análise bivariada foram calculados os *Odds ratios* (OR) para cada uma das variáveis do estudo com seus respectivos IC 95%. As variáveis que na análise bivariada apresentaram valor de p inferior a 0,20 foram

selecionadas para a análise múltipla. O processo de modelagem foi iniciado com a variável que apresentou o menor valor de p à análise bivariada e, em seguida, foram acrescentadas sucessivamente as demais com valor de p inferior a 0,20. As variáveis que apresentaram valor de $p < 0,05$ na análise múltipla permaneceram no modelo final. Finalmente, foram estimados os *Odds ratios* para cada uma das variáveis do modelo final com seus respectivos IC 95%. Os valores calculados para o “ p ” foram bicaudados, sendo considerado o valor menor que 0,05 estatisticamente significativo.

Os dados foram inseridos no programa MS Excel e analisados no software estatístico STATA versão 13.0 (StataCorp LP, College Station, Texas, USA).

4.17 Aspectos éticos:

Todos os indivíduos candidatos ao estudo foram informados previamente sobre o conteúdo do mesmo, bem como seus objetivos e possíveis eventos adversos relacionados à coleta das amostras sanguíneas. Para sua inclusão no protocolo foi obrigatória assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em duas vias (**ANEXO C**), sendo que uma foi entregue ao paciente e outra arquivada em nosso centro de estudos. As informações clínicas foram coletadas por profissionais da área médica, sob sigilo e com respeito ao anonimato de acordo com a conduta preconizada pelo Código de Ética Médica.

Este projeto de pesquisa foi derivado e desenvolvido como um subprojeto a partir de casuísticas originárias de dois outros protocolos: “*Análise da evolução do vírus da hepatite C em doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue, Hemocentro de São Paulo.*” e “*Identificação de mutações primárias para inibidores de protease e polimerase para o vírus da hepatite C, em pacientes com hepatite C crônica, co-infectados pelo vírus da*

imunodeficiência humana. Estudo de uma serie de casos.”, sendo ambos previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo (CAPPesq), assim como pelos Comitês de Ética de todos os centros participantes, com os seguintes protocolos 0850/11 de 06/11/2013 e 0704/11 de 01/02/2012, respectivamente (**ANEXO D e E**).

4.18 Revisão bibliográfica:

Para pesquisa bibliográfica de periódicos foram utilizadas as principais bases de dados disponíveis eletronicamente. Visando uma maior eficiência na obtenção dos resultados, além do uso de palavras-chave relevantes ao assunto abordado, foram utilizados descritores MESH e DeCS indexados respectivamente pelas bases MEDLINE e LILACS. Também foram revistas algumas publicações citadas por autores em suas referências.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da amostra em estudo:

Após a avaliação inicial dos pacientes candidatos, 300 indivíduos foram inicialmente selecionados para compor a amostra em estudo. Destes 15 pacientes monoinfectados e 38 pacientes coinfectados foram excluídos por má qualidade no processo de amplificação das sequências nucleotídicas da região NS3 (30 amostras) ou por viremia do VHC abaixo do limite inferior de detecção (23 amostras). Assim, foram avaliados 247 pacientes, sendo 135 indivíduos (54,6%) monoinfectados pelo VHC e 112 pacientes (45,4%) coinfectados pelo VHC e pelo HIV (Figura 2).

Em relação à distribuição da amostra de acordo com os centros participantes, os pacientes que compuseram o estudo apresentaram características bastante semelhantes entre si no que diz respeito ao gênero e faixa etária. A amostra procedente de cada um dos cinco centros era composta majoritariamente por pacientes do sexo masculino e por indivíduos acima de 40 anos de idade. A exceção se deu em relação ao perfil genotípico do VHC, havendo uma maior proporção de infecção pelo genótipo 1b em pacientes oriundos do Ambulatório de Hepatites Virais do DMIP - Hospital das Clínicas da FMUSP e maior frequência de infecção pelo genótipo 1a em pacientes procedentes dos outros quatro centros participantes – todos estes compostos por indivíduos coinfectados pelo VHC e HIV (Quadro 2).

As características sociodemográficas, clínicas e laboratoriais do grupo total estão descritas na Tabela 3. Cento e cinquenta e seis pacientes (63%) eram do sexo masculino. A mediana de idade foi de 44 anos (IQR: 37 – 52 anos), de maneira que 162 indivíduos (65,3%) apresentavam idade maior ou igual a 40 anos. Quanto aos possíveis fatores de

risco associados a infecção viral, a maioria dos pacientes relatou exposição a fator de risco parenteral (transusão de hemoderivados antes de 1993, uso de droga injetável, tatuagem / piercing e exposição ocupacional). Em cerca de 23% dos indivíduos não foi possível identificar uma possível via de transmissão. As comorbidades mais frequentemente relatadas foram: hipertensão arterial sistêmica, etilismo, depressão, diabetes mellitus e tireoidopatias. Cinco pacientes (2%) eram coinfectados pelo vírus da hepatite B (Tabela 4).

Figura 2 - Seleção e representatividade da amostra em estudo de acordo com os critérios adotados

Quadro 2 - Distribuição da amostra em estudo quanto ao gênero, idade e genótipo do VHC de acordo com o centro de atendimento participante

Centros de atendimento	Gênero masculino (n, %)	Idade > 40 anos (n, %)	Genótipo 1a (n, %)
Clínicas de Especialidades de São Bernardo do Campo	24 (60%)	33 (82,5%)	32 (80%)
SEAP - Serviço de Extensão ao Atendimento de Pacientes HIV/AIDS	10 (52,6%)	16 (84,2%)	17 (89,5%)
Centro de Referência e Treinamento DST/AIDS	4 (66,7%)	5 (83,3%)	5 (83,3%)
Centro Especializado em Saúde do Município de Caxias do Sul – RS	38 (80,9%)	26 (55,3%)	41 (87,2%)
DMIP – Hospital das Clínicas da FMUSP	80 (59,3%)	74 (54,8%)	46 (34,1%)

Quanto às características do VHC, a maioria das infecções (57%) ocorreu pelo genótipo 1a. A mediana da carga viral também foi considerada elevada: 1.418.645 UI/mL (IQR: 600.308 – 3.714.275 UI/mL). Cento e quatro pacientes (42,1%) foram submetidos a tratamento prévio com peginterferon e ribavirina, sendo a maioria classificada como não respondedor (Tabela 3).

Em relação ao estadiamento da hepatopatia, somente 87 indivíduos (35,2%) tinham sido submetidos a realização de biópsia para análise histológica de fragmento hepático. Destes, 21 indivíduos (24%) eram portadores de doença avançada (METAVIR F3-F4). Na avaliação do grau de fibrose por metodologia indireta (FIB-4), a mediana dos valores obtidos foi de 1,30 (IQR: 0,90 – 2,03). Vinte e oito pacientes (11,3%) foram classificados como portadores de doença avançada (FIB-4 > 3,25) (Tabela 3).

Quanto às características do HIV no grupo de coinfectados, embora cerca de 40% dos indivíduos analisados tenha sido acometido por doença oportunista em algum momento da vida, a maioria dos indivíduos apresentava um bom controle imune e

viroológico no momento do estudo (Tabela 3). Cento e seis pacientes (94,7%) estavam em uso de terapia antirretroviral de alta potência (TARV). Os esquemas medicamentosos componentes da TARV utilizados, separados de acordo com cada classe podem ser visualizados na Tabela 5. Cerca de 14% dos pacientes apresentava carga viral do HIV detectável. A mediana da contagem de linfócitos T CD4⁺ foi de 570,5 cels / mm³ (IQR: 388 – 746 cels / mm³) (Tabela 3).

A análise descritiva dos exames laboratoriais de grupo total em estudo revelou valores de enzimas hepáticas (AST, ALT), canaliculares (fosfatase alcalina, gamaglutamiltransferase), bilirrubinas totais e direta, bem como níveis de albumina, INR, contagem de leucócitos e de plaquetas dentro ou bem próximos dos valores de normalidade. Isso denota de forma indireta que a amostra em estudo era composta em sua maioria por indivíduos com provas laboratoriais compatíveis com hepatopatia estável (Tabela 6). De fato, uma pequena parcela dos indivíduos avaliados apresentava marcadores bioquímicos compatíveis com doença avançada. Somente 10 (4,5%), 15 (6,6%) e 46 (18,9%) evoluíram com hipoalbuminemia (< 3,5 g / dL), INR > 1,20 e plaquetopenia (< 150.000 / mm³), respectivamente.

Tabela 3 - Características sociodemográficas, clínicas e laboratoriais de pacientes com hepatite C crônica

Características	Amostra (n=247)
Perfil epidemiológico	
Gênero masculino (n, %)	156 (63,1%)
Idade em anos (mediana, IQR)	44 (37 – 52)
Fatores de risco (n, %)	
Transusão de sangue / hemoderivados antes de 1993	48 (19,4%)
Uso de droga intravenosa	84 (34%)
Uso de droga inalatória	66 (26,7%)
Comportamento sexual de risco*	77 (31,2%)
Tatuagem / piercing	48 (17,1%)
Exposição ocupacional	14 (5,6%)
Contato intradomiciliar com portador de VHC	14 (5,6%)
Não identificado	57 (23,1%)
Perfil do VHC	
Genótipo 1a (vs 1b) (n, %)	141 (57%)
VHC RNA UI/mL (mediana, IQR)	1.418.645 (600.308 – 3.714.275)
Tratamento prévio com (Peg) IFN ribavirina (n, %)	
104 (42,1%)	
Não respondedor (n, %)	79 (75,9%)
Recidivante (n, %)	9 (8,6%)
Resposta desconhecida (n, %)	16 (14,4%)
Estadiamento da doença hepática	
Biópsia hepática (n, %)	
87 (35,2%)	
Fibrose leve ou moderada (METAVIR F0-F2) (n, %)	66 (76%)
Fibrose acentuada (METAVIR F3 e F4) (n, %)	21 (24%)
Método não invasivo (n, %)	
247 (100%)	
FIB-4 (mediana, IQR)	1,30 (0,90 – 2,03)
FIB-4 > 3,25 (n, %)	28 (11,3%)
Infecção pelo HIV (n, %)	
112 (45,4%)	
Contagem de L TCD4 ⁺ (cel/mm ³) (mediana, IQR)	570,5 (388 – 746)
Carga viral do HIV detectável (n, %)	16 / 112 (14%)
Doença definidora de AIDS (n, %)	46 / 112 (40%)
Pacientes em terapia antirretroviral (n, %)	106 / 112 (94,7%)

*Relação sexual com indivíduo sabidamente infectado pelo HIV ou VHC, com usuário de droga ilícita intravenosa; com mais de três parceiros sexuais / ano ou relação sexual sem uso de preservativo).

Tabela 4 - Principais comorbidades em pacientes com hepatite C crônica

Comorbidades (n, %)	Amostra (n=247)
Hipertensão arterial sistêmica	41 (16,1%)
Etilismo	64 (14,2%)
Depressão	16 (6,4%)
Diabetes mellitus	16 (6,4%)
Tireoidopatia	11 (4,4%)
Doença do trato gastrointestinal	10 (4%)
Hepatite B	5 (2%)
Outros	36 (14,5%)

Outros: Doença do trato urinário, neoplasia, pneumopatia, doença osteomuscular

Tabela 5 - Fármacos antirretrovirais utilizados para tratamento do HIV por pacientes coinfectados pelo VHC e HIV

Antiretroviral	Amostra (n=112)
ITR análogos nucleos(t)ídicos (n, %)	
Abacavir	0 (0)
Zidovudina	40 (35,7)
Lamivudina	106 (94,6)
Didanosina	1 (0,8)
Estavudina	3 (2,6)
Tenofovir	70 (62,5)
ITR não análogos nucleosídicos (n, %)	
Efavirenz	54 (48,2)
Nevirapina	1 (0,8)
Inibidores da protease (n, %)	
Lopinavir / Ritonavir	32 (28,6)
Atazanavir	2 (1,8)
Atazanavir / Ritonavir	16 (14,3)
Fosamprenavir / Ritonavir	2 (1,8)
Darunavir / Ritonavir	2 (1,8)
Inibidor de integrase (n, %)	
Raltegravir	2 (1,8)
Sem TARV (n, %)	6 (5,3)

ITR: inibidores da transcriptase reversa, TARV: terapia antirretroviral de alta potência

Tabela 6 - Exames laboratoriais hematológicos e bioquímicos de pacientes com hepatite C crônica

Exames laboratoriais	Mediana	IQR	Valor mínimo	Valor máximo
AST (UI/mL) (n=247)	40	29 - 62	15	303
ALT (UI/mL) (n=247)	49,5	31 - 73	13	268
Fosfatase alcalina (U/L) (n=219)	78	64 - 120	16	403
Gamagt (U/L) (n=233)	74	37 - 131	11	670
Bilirrubinas totais (mg/dL) (n=235)	0,6	0,40 - 0,92	0,15	2,86
Bilirrubina direta (mg/dL) (n=235)	0,24	0,16 - 0,34	0,01	2,4
Albumina (g/dL) (n=223)	4,5	4,1 - 4,8	1,9	5,3
INR (n=229)	1	0,98 - 1,07	0,35	1,73
Leucograma (cels/mm ³) (n=247)	5.735	4.320 - 6.787	1.740	14.510
Plaquetas x 10 ³ (/mm ³) (n=247)	200	156 - 253	35	398

5.2 Descrição de polimorfismos / mutações na NS3 do VHC associadas a resistência aos IPs na amostra estudada:

Dentre os 247 pacientes avaliados pelo estudo, 54 apresentavam algum tipo de substituição na região NS3 do VHC (Prevalência: 21,9% [IC 95%: 15,0 – 53,9]). Em relação a presença de substituições em resíduos de aminoácidos na NS3 associadas a resistência aos IPs, foram observadas apenas 14 ocorrências entre as 247 amostras avaliadas (Prevalência: 5,7% [IC 95%: 3,1 – 9,3]). Assim, cerca de 26% das substituições totais encontradas constituíam mutações com algum grau de impacto *in vitro* na efetividade dos IPs. A descrição da frequência de cada um dos polimorfismos bem como das mutações associadas a resistência encontradas na amostra em estudo pode ser visualizada na Tabela 7. As substituições na posição 122 ocorreram com maior frequência (34 / 54 – 62,9%), sendo todas elas consideradas polimorfismos, sem impacto clínico ou laboratorial na eficácia dos IPs desenvolvidos até então. Quanto as mutações associadas à resistência dos IPs, a substituição V55A foi identificada em 7 amostras (7 / 54 – 13%) e a

T54S em 6 indivíduos (6 / 54 – 11,1%). No total, seis pacientes apresentaram mais de 1 substituição simultânea na sequência genômica da NS3 do VHC, sendo aqui identificadas combinações duplas (T54S+V55I; V55A+Q80R; T54S+S122G; V55A+S122G) e triplas (T54S+V55I+Q80L).

Tabela 7 - Polimorfismos de ocorrência natural e mutações associadas a resistência aos IPs na sequência da protease NS3 do VHC

Características	Amostra (n=247)	Polimorfismos / mutações associadas a resistência de IPs (n)
Pacientes infectados pelo VHC com alguma substituição de aa na NS3 (n, %)	54 (21,9%)	M175 L (3), Q80 L (4), S122 G/N/T (34), V55I (4), V36L (1), T54 S (6), V55 A (7) e Q80 R (2)
Pacientes infectados pelo VHC com polimorfismos naturais na NS3 (n, %)	40 (16,2%)	M175 L (3), Q80 L (4), S122 G/N/T (34), V55I (4) e V36L (1)
Pacientes infectados pelo VHC com pelo menos uma mutação de resistência ao IP (n, %)	14 (5,7%)	T54 S (6), V55 A (7) e Q80 R (2)
T54 S (n, %)	6 (2,4%)	-
V55 A (n, %)	6 (2,4%)	-
Q80 R (n, %)	1 (0,4%)	-
V55 A + Q80 R (n, %)	1 (0,4%)	-

aa: aminoácido, IP: inibidor de protease NS3

5.3 Comparação entre indivíduos monoinfectados pelo VHC e coinfectados pelo VHC e HIV quanto a presença de polimorfismos / mutações na NS3 do VHC associadas a resistência aos IPs:

Algumas características sociodemográficas e clínicas mostraram-se diferentes entre os pacientes com hepatite C crônica mono e coinfectados pelo HIV (Tabela 8). Não houve distinção em relação a distribuição de gênero dos pacientes. No grupo de coinfeção, a mediana de idade foi semelhante à dos monoinfectados. Contudo, na análise de proporção, a maioria dos indivíduos coinfectados era maior de 40 anos ($p<0,001$). Quanto aos possíveis fatores de risco, o grupo de coinfectados foi constituído por uma proporção maior de indivíduos que relataram uso prévio de drogas intravenosas ($p<0,001$) e que se engajaram em práticas sexuais de risco ($p<0,001$). Por outro lado, o histórico de transfusão de sangue e hemoderivados nos pacientes monoinfectados foi mais frequente ($p=0,001$), bem como o número de relatos de indivíduos que habitavam o mesmo domicílio de portadores de infecção pelo VHC ($p<0,001$). Não foi possível identificar a possível forma de transmissão em cerca de 34% dos monoinfectados e em 10% dos coinfectados pelo VHC e HIV ($p<0,001$).

A frequência de infecção pelo VHC genótipo 1a foi maior nos pacientes coinfectados do que nos pacientes monoinfectados ($p<0,001$). Não houve diferença em relação a quantificação da carga viral do VHC entre estes dois grupos ($p=0,186$), bem como em relação ao histórico prévio de tratamento com peginterferon / ribavirina. Contudo, dentre os pacientes que foram submetidos a tal tratamento, houve uma tendência, embora não estatisticamente significativa, de maior frequência de não respondedores no grupo dos coinfectados VHC e HIV ($p=0,051$).

A proporção de indivíduos submetidos a biópsia hepática foi maior nos coinfectados em relação ao monoinfectados ($p < 0,001$). No entanto, de maneira geral, menos da metade dos pacientes avaliados apresentava exame histológico para avaliação. Quando estes indivíduos, na sua totalidade, foram avaliados do ponto de vista do estadiamento por metodologia indireta (escore FIB-4), notou-se que a mediana dos valores obtidos foi maior no grupo de coinfecção VHC e HIV ($p < 0,001$). Contudo, não houve diferença estatisticamente significativa em relação a frequência de indivíduos classificados como portadores de fibrose avançada entre os dois grupos ($\text{FIB-4} \geq 3,24$) ($p = 0,183$).

Em relação às comorbidades relatadas, a proporção de indivíduos com histórico de etilismo foi maior no grupo de monoinfecção (37% vs 12,5%, $p < 0,001$), enquanto que a frequência de pacientes que relataram sintomas depressivos foi maior no grupo de coinfecção ($p = 0,003$). Todos os cinco casos descritos de infecção pelo vírus da hepatite B ocorreram nos pacientes coinfectados VHC e HIV.

A análise laboratorial revelou discrepância entre os resultados de exames hematológicos e bioquímicos hepáticos no grupo de monoinfectados pelo VHC e coinfectados pelo VHC e HIV (Tabela 9). Deste ponto de vista, o grupo de coinfecção VHC e HIV apresentou exames mais compatíveis com doença avançada, em comparação com o grupo de monoinfecção. A mediana das transaminases (AST e ALT) foi maior nos coinfectados, bem como a das enzimas canaliculares. A mediana dos níveis de albumina foi menor no grupo de coinfectados ($p < 0,001$). De fato, a proporção de pacientes que apresentou dosagem de albumina $< 3,5$ g/ dL foi estatisticamente maior neste grupo em relação aos monoinfectados - 8 (9%) vs 2 (1,5%) em monoinfectados [OR: 6,51 (IC 95%: 1,35 – 31,45), $p = 0,008$]. Os pacientes coinfectados apresentaram contagens menores de leucócitos e plaquetas em relação aos monoinfectados pelo VHC na análise quantitativa.

Da mesma forma, a proporção de indivíduos com plaquetopenia (plaquetas $< 150.000 / \text{mm}^3$) e leucopenia (leucócitos $< 5.000 / \text{mm}^3$) também foi maior em coinfectados [plaquetas $< 150.000 / \text{mm}^3$: 27 (24,8%) nos coinfectados e 19 (14,2%) nos monoinfectados, OR: 1,99 (IC 95%: 1,03 – 3,80); $p=0,036$] e [leucócitos $< 5.000 / \text{mm}^3$: 55 (50%) nos coinfectados e 31 (23,1%) nos monoinfectados, OR: 3,32 (IC 95%: 1,92 – 5,75); $p<0,001$]. Não houve diferença estatisticamente significativa em relação a dosagem de bilirrubinas e o INR entre os dois grupos avaliados.

Tabela 8 - Características sociodemográficas, clínicas e virológicas de pacientes com hepatite C crônica de acordo com a coinfeção ou não pelo HIV

Características	Monoinfecção pelo VHC (n=135)	Coinfecção VHC e HIV (n=112)	OR (IC 95%)	p-valor*
Perfil epidemiológico				
Gênero masculino (n, %)	80 (59,2%)	76 (67,8%)	1,45 (0,85 - 2,45)	0,163
Idade em anos (mediana, IQR)	43 (34 - 55)	44 (40 - 48)		0,419
Idade > 40 anos	76 (59%)	86 (76,8%)	0,39 (0,22 - 0,67)	<0,001
Fatores de risco (n, %)				
Transusão de sangue / hemoderivados antes de 1993	40 (29,6%)	8 (7,1%)	0,18 (0,08-0,41)	<0,001
Uso de droga intravenosa	11 (8,1%)	73 (65,1%)	21,10 (10,17-43,73)	<0,001
Uso de droga inalatória	31 (22,9%)	35 (31,2%)	1,52 (0,86-2,68)	0,143
Comportamento sexual de risco [§]	27 (20%)	50 (44,6%)	3,22 (1,83-5,66)	<0,001
Tatuagem / piercing	31 (22,9%)	17 (15,2%)	0,60 (0,31-1,15)	0,124
Exposição ocupacional	10 (7,4%)	4 (3,6%)	0,46 (0,14-1,51)	0,194
Contato intradomiciliar com portador de VHC	14 (10,4%)	0 (0)	1,92 (1,70-2,17)	<0,001
Não identificado	46 (34,1%)	11 (9,8%)	4,74 (2,31 - 9,72)	<0,001
Perfil do VHC				
Genótipo 1a (vs 1b) (n, %)	46 (34,1%)	95 (84,8%)	10,81 (5,77 - 20,23)	<0,001
VHC RNA UI/mL (mediana, IQR)	1.375.998 (510.002 - 3.141.221)	1.664.315 (737.667 - 4.716.104)		0,186
Tratamento prévio com (Peg) IFN / RBV (n, %)				
Não respondedor (n, %)	53 (39,3%)	51 (45,5%)	0,77 (0,46 - 1,28)	0,321
Recidivante (n, %)	36 (67,9%)	43 (84,3%)	2,53 (0,98 - 6,56)	0,051
Desconhecida (n, %)	4 (7,5%)	5 (9,8%)	1,33 (0,33 - 5,26)	0,682
	13 (24,5%)	3 (5,8%)	0,19 (0,05 - 0,72)	0,014

Dados categóricos expressos em frequência absoluta e relativa

Dados contínuos expressos em mediana e intervalo interquartilico

*Teste qui-quadrado de Pearson ou Fisher para dados categóricos

Teste de Mann-Whitney para dados contínuos

[§] Relação sexual com indivíduo sabidamente infectado pelo HIV ou VHC, com usuário de droga ilícita intravenosa, com mais de três parceiros sexuais / ano ou relação sexual sem uso de preservativo.

Tabela 8 – Características sociodemográficas, clínicas e virológicas de pacientes com hepatite C crônica de acordo com a coinfeção ou não pelo HIV (continuação)

Características	Monoinfecção pelo VHC (n=135)	Coinfecção VHC e HIV (n=112)	OR (IC 95%)	p-valor*
Estadiamento da doença hepática				
<i>Biópsia hepática (n, %)</i>	26 (19,2%)	61 (54,4%)	-	<0,001
METAVIR F0-F2 (n, %)	21 (80,8%)	45 (85,7%)	-	0,485
METAVIR F3-F4 (n, %)	5 (19,2%)	16 (14,3%)		
Método não invasivo (n, %)				
	135 (100%)	112 (100%)		
FIB-4 (mediana, IQR)	1,16 (0,72 - 1,81)	1,53 (1,04 - 2,45)	-	<0,001
FIB-4 > 3,25 (n, %)	12 (8,9%)	16 (14,3%)	0,58 (0,26 - 1,30)	0,183
Comorbidades (n, %)				
Hipertensão arterial	25 (18,5%)	16 (14,3%)	0,73 (0,37-1,45)	0,373
Etilismo	50 (37,0%)	14 (12,5%)	0,24 (0,12-0,47)	<0,001
Depressão	3 (2,2%)	13 (11,6%)	5,77 (1,60-20,82)	0,003
Diabetes mellitus	6 (4,4%)	10 (9,0%)	2,10 (0,74-5,99)	0,154
Tireoidopatia	6 (4,4%)	5 (4,4%)	1,00 (0,29-3,38)	0,994
Doença do trato gastrointestinal	5 (3,7%)	5 (4,4%)	1,21 (0,34-4,30)	0,763
Hepatite B	0 (0)	5 (4,4%)	2,26 (1,96-2,60)	0,013

Dados categóricos expressos em frequência absoluta e relativa

Dados contínuos expressos em mediana e intervalo interquartil

*Teste qui-quadrado de Pearson ou Fisher para dados categóricos

Teste de Mann-Whitney para dados contínuos

Tabela 9 - Exames laboratoriais hematológicos e bioquímicos de pacientes com hepatite C crônica estratificados de acordo com a infecção pelo HIV

Exames laboratoriais	Monoinfecção pelo VHC	Coinfecção pelo VHC e HIV	p-valor*
AST (UI/mL) (n=244)	35 (26 - 50)	48,5 (35 - 70,5)	<0,001
ALT (UI/mL) (n=244)	45 (29 - 67)	53,5 (36 - 79,25)	0,017
Fosfatase alcalina (U/L) (n=219)	71,5 (60,7 - 88)	120 (71,5 - 166)	<0,001
Gamagt (U/L) (n=233)	61 (33,5 - 123,5)	82 (46 - 150)	0,036
Bilirrubinas totais (mg/dL) (n=235)	0,59 (0,46 - 0,81)	0,60 (0,40 - 1,00)	0,801
Bilirrubina direta (mg/dL) (n=235)	0,23 (0,17 - 0,31)	0,24 (0,10 - 0,40)	0,854
Albumina (g/dL) (n=223)	4,7 (4,4 - 4,9)	4,1 (3,8 - 4,5)	<0,001
INR (n=229)	1,01 (0,97 - 1,07)	1,00 (1,00 - 1,07)	0,464
Leucograma (cels/mm ³) (n=244)	6150 (5000 - 7287)	5000 (3785 - 6310)	<0,001
Plaquetas x 10 ³ (/mm ³) (n=244)	210 (160 - 256)	189 (149 - 226)	0,048

Dados contínuos expressos em mediana e intervalo interquartilico

*Teste de Mann-Whitney

A avaliação comparativa da ocorrência de substituições de aminoácidos na região da protease do VHC não demonstrou grandes diferenças em relação a frequência dos mesmos entre indivíduos monoinfectados e coinfectados pelo VHC e HIV ($p=0.646$). Embora a proporção de mutações associadas a resistência aos IPs tenha sido maior nos pacientes coinfectados do que nos monoinfectados, a diferença entre estes dois grupos não atingiu significância estatística com a amostra analisada ($p=0,143$). A frequência de substituições na região da protease do VHC distribuída de acordo com a presença ou não da coinfecção pelo HIV pode ser visualizada na Tabela 10.

Na análise individual de cada substituição, embora o número de posições na região NS3 acometidas por substituições de aminoácidos nos sítios analisados tenha sido maior nos pacientes coinfectados (6 posições vs 5 posições em monoinfectados pelo VHC), somente o polimorfismo S122G/N/T ocorreu com maior frequência nos pacientes monoinfectados (25 monoinfectados vs 9 coinfectados; $p=0,004$). Das 6 amostras de pacientes que evoluíram com mais de 1 substituição simultânea na NS3, 4 eram de coinfectados pelo VHC e HIV e 2 de monoinfectados. A descrição individual de cada um

dos 54 pacientes com algum tipo de substituição na NS3, estratificados de acordo com o gênero, idade, genótipo do VHC e o histórico pregresso de tratamento com peginterferon / ribavirina pode ser visualizada nos Quadros 2 e 3 (monoinfectados e coinfectados pelo HIV / VHC, respectivamente).

Tabela 10 – Polimorfismos de ocorrência natural e mutações associadas a resistência aos IPs na sequência da protease NS3 do VHC de acordo com a coinfeção pelo HIV

Características	Monoinfecção pelo VHC (n=135)	Coinfecção pelo VHC e HIV (n=112)	p-valor*
Amostras com alguma substituição de aa na NS3 (n, %)	31 (22,9%)	23 (20,5%)	0,646
Amostras com polimorfismos naturais na NS3 (n, %)	26 (19,2%)	14 (12,5%)	0,151
Posições afetadas na NS3 (n)	M175 L (2), S122 G/N/T (25), V55I (1)	M175 L (1), Q80 L (4), S122 G/N/T (9), V55I (3), V36L (1)	
Amostras com pelo menos uma mutação de resistência ao IP (n, %)	5 (3,7%)	9 (8%)	0,143
T54 S (n, %)	2 (1,5%)	4 (3,6%)	0,415
V55 A (n, %)	3 (2,2%)	3 (2,7%)	1,000
Q80 R (n, %)	0 (0)	1 (0,9%)	0,453
V55 A + Q80 R (n, %)	0 (0)	1 (0,9%)	0,453

aa: aminoácido, IP: inibidor de protease NS3

*Teste qui-quadrado de Pearson ou Fisher para dados categóricos

Quadro 3 - Descrição de pacientes portadores de hepatite C crônica de acordo com a presença de polimorfismos / mutações na região NS3 associadas a resistência

Sexo	Idade	Terapia pregressa com interferon	Tipo de resposta	Genótipo	Substituição NS3
Masculino	33	Não		1b	M175L
Masculino	37	Sim	NR	1b	M175L
Masculino	32	Não		1b	S122G
Masculino	34	Não		1b	S122G
Masculino	44	Sim		1b	S122G
Masculino	29	Não		1b	S122G
Feminino	63	Sim	NR	1b	S122G
Masculino	62	Não		1b	S122G
Feminino	32	Não		1b	S122G
Masculino	55	Não		1b	S122G
Feminino	52	Sim	NR	1b	S122G
Masculino	32	Não		1b	S122G
Masculino	37	Não		1b	S122G
Feminino	35	Sim	NR	1b	S122G
Masculino	34	Não		1b	S122G
Masculino	59	Sim	NR	1b	S122G
Feminino	37	Não		1b	S122G
Masculino	53	Sim	NR	1b	S122G
Feminino	62	Sim	NR	1b	S122G
Feminino	42	Não		1b	S122G
Masculino	53	Sim	NR	1b	S122G
Masculino	54	Sim	REC	1b	S122N
Masculino	38	Não		1b	S122N
Masculino	54	Sim	NR	1b	S122T
Masculino	47	Sim		1b	S122T
Masculino	33	Não		1a	T54S
Feminino	55	Não		1b	T54S + S122G
Feminino	31	Não		1b	V55A
Masculino	47	Sim	NR	1a	V55A
Masculino	61	Sim	NR	1b	V55A + S122G
Masculino	58	Sim	NR	1a	V55I

NR: não respondedor; IND: indefinido; REC: recidivante

Quadro 4 - Descrição de pacientes portadores de hepatite C crônica coinfectados pelo HIV de acordo com a presença de polimorfismos / mutações na região NS3 associadas a resistência

Sexo	Idade	Terapia pregressa com interferon	Tipo de resposta	Genótipo	Substituição NS3
Masculino	39	Não		1b	M175L
Feminino	40	Não		1a	Q80L
Masculino	40	Sim	NR	1a	Q80L
Masculino	46	Sim	NR	1a	Q80L
Masculino	54	Não		1a	Q80R
Feminino	36	Não		1b	S122G
Masculino	52	Não		1a	S122G
Feminino	42	Sim	NR	1b	S122G
Feminino	67	Sim	NR	1b	S122G
Feminino	63	Não		1b	S122G
Masculino	49	Sim	NR	1b	S122G
Feminino	48	Não		1b	S122G
Masculino	47	Sim	NR	1b	S122N
Masculino	49	Não		1b	S122T
Feminino	46	Sim	NR	1a	T54S
Masculino	45	Não		1a	T54S + V55I
Masculino	42	Sim	NR	1a	T54S + V55I
Masculino	56	Não		1a	T54S + V55I + Q80L
Masculino	58	Não		1b	V36L
Masculino	40	Não		1a	V55A
Feminino	48	Não		1a	V55A
Masculino	38	Sim	NR	1a	V55A
Feminino	45	Sim	IND	1a	V55A + Q80R

NR: não respondedor; IND: indefinido

5.4 Análise de possíveis fatores associados a ocorrência de polimorfismos / mutações na NS3 do VHC associadas a resistência aos IPs:

A distribuição das variáveis sociodemográficas, epidemiológicas, clínicas e laboratoriais em estudo foi avaliada de acordo com a ocorrência ou não de substituições em resíduos da NS3 do VHC, sendo esta relatada em forma de tabela de frequência (Tabela 11). Não houve diferença da presença ou não de polimorfismos e mutações associadas a resistência em relação ao gênero, idade estratificada em maiores ou menores de 40 anos, bem como quanto aos fatores de risco mais comumente relatados.

A coinfeção pelo HIV não se associou de forma estatisticamente significativa com a presença de variantes virais na região NS3 ($p=0,646$). Em relação as características do VHC, polimorfismos e mutações associadas a resistência de IPs foram detectadas em ambos os genótipos 1a e 1b. A frequência de polimorfismos foi maior nos pacientes infectados pelo VHC genótipo 1b, embora a análise estatística não tenha revelado diferença na proporção de mutações associadas a resistência de IPs entre os dois genótipos (Figura 3). A substituição que foi detectada de maneira mais comum no genótipo 1b foi aquela ocorrida no resíduo S122 – 33 amostras de um total de 38 (86,9%).

Os fatores que se associaram de maneira independente a substituições de aminoácidos na NS3 (polimorfismos em conjunto com mutações de resistência aos IPs) foram o VHC genótipo 1b, a hiperbilirrubinemia total $> 1,5$ LSN (limite superior da normalidade) e níveis de albumina $< 3,5$ g / dL (Tabela 12). Na amostra estudada, a hipoalbuminemia e a elevação de bilirrubinas totais $> 1,5$ LSN associaram-se à doença avançada pelo escore de FIB-4 [OR: 0,09 (IC95%: 0,02-0,35), $p=0,001$ / OR: 4,35 (IC95% 1,21-15,60), $p=0,036$, respectivamente].

Todavia, quando a doença hepática foi analisada pelo escore não invasivo, não se encontrou associação entre hepatopatia avançada (FIB-4 > 3,25) e a presença de substituições de aminoácidos na NS3 ($p=0,670$). Este achado foi corroborado através da análise de diversidade genômica da NS3, que não revelou uma maior frequência de substituições nos nucleotídeos nem uma seleção positiva no gene NS3 do VHC dos indivíduos avaliados tanto de maneira global, como nos subgrupos de pacientes com fibrose avançada e tratamento prévio com interferon / ribavirina. A diversidade nucleotídica só foi discrepante entre os subtipos virais, onde o genótipo 1b apresentou maior diversidade em relação ao genótipo 1a (0.110 vs 0.063, respectivamente) (Tabela 13).

A quantificação da pressão seletiva exercida sobre esta região revelou que as substituições nucleotídicas ditas silenciosas (sinônimas) predominaram sobre as substituições não sinônimas no grupo de amostras provenientes de pacientes com doença avançada, sendo este achado compatível com uma região NS3 do VHC relativamente conservada. A exposição prévia ao peginterferon e ribavirina parece também não ter influenciado a diversidade das quasiespécies virais e nem atuado promovendo qualquer tipo de seleção de nucleotídeos ou aminoácidos nas amostras avaliadas (Tabela 13).

Tabela 11 - Distribuição da frequência de substituições na NS3 do VHC de acordo com as características de pacientes com hepatite C crônica

Características	n	(%)	Substituições de aa na NS3 (n, %)	OR	IC 95%	p-valor*
Gênero						
Feminino	91	36,8	18 (19,8)	1		0,546
Masculino	156	63,2	36 (23,1)	1,22	0,64 - 2,30	
Idade (anos)						
≤ 40	93	37,7	20 (21,5)	1		0,916
> 40	154	62,3	34 (22,1)	1,03	0,55 - 1,93	
Fatores de risco						
Transusão de sangue / hemoderivados antes de 1993	48	19,4	10 (20,8)	0,92	0,42 - 2,00	0,848
Uso de droga intravenosa	84	34	21 (25,0)	1,31	0,70 - 2,45	0,392
Comportamento sexual de risco ^{\$}	77	31,2	14 (18,1)	0,74	0,37 - 1,45	0,383
Tratamento prévio com (Peg) IFN / RBV						
Não	143	57,9	29 (20,3)	1		0,480
Sim	104	42,1	25 (24,0)	1,24	0,68 - 2,28	
Coinfecção pelo HIV						
Não	135	54,7	31 (23,0)	1		0,646
Sim	112	45,3	23 (20,5)	0,87	0,47 - 1,59	
Perfil do VHC						
Genótipo do VHC						
1a	141	57,1	16 (11,4)	1		<0,001
1b	106	42,9	38 (35,9)	4,37	2,27 - 8,40	
Carga viral do VHC (UI/mL)						
≤ 400.000	48	19,4	11 (22,9)	1		0,844
> 400.000	199	80,6	43 (21,6)	0,93	0,44 - 1,97	

*Obtido por Método de Regressão Logística simples / aa: aminoácidos

^{\$}Relação sexual com indivíduo sabidamente infectado pelo HIV ou VHC, com usuário de droga ilícita intravenosa, com mais de três parceiros sexuais / ano ou relação sexual sem uso de preservativo.

Tabela 11 - Distribuição da frequência de substituições na NS3 do VHC de acordo com as características de pacientes com hepatite C crônica (continuação)

Características	n	(%)	Substituições de aa na NS3 (n, %)	OR	IC 95%	p-valor*
Estadiamento da doença hepática						
Método não invasivo FIB-4						
≤ 3,25	219	88,7	47 (21,5)	1		0,670
> 3,25	28	11,3	7 (25)	0,82	0,33 - 2,04	
Perfil laboratorial						
AST (UI/L)						
≤ 1,5 LSN	180	73,8	37 (20,6)	1		0,320
> 1,5 LSN	64	26,2	17 (26,6)	0,71	0,37 - 1,39	
ALT (UI/L)						
≤ 1,5 LSN	163	66,8	37 (22,7)	1		0,762
> 1,5 LSN	81	33,2	17 (21,0)	0,90	0,47 - 1,73	
Fosfatase alcalina (U/L)						
≤ 1,5 LSN	202	91,4	41 (20,3)	1		0,538
> 1,5 LSN	19	8,6	5 (26,3)	1,40	0,48 - 4,12	
Gamagt (U/L)						
≤ 1,5 LSN	114	49,4	23 (20,2)	1		0,823
> 1,5 LSN	117	50,6	25 (21,4)	1,08	0,57 - 2,03	
Bilirrubinas totais (mg/dL)						
≤ 1,5 LSN	223	94,9	47 (21,1)	1		0,028
> 1,5 LSN	12	5,1	6 (50,0)	3,74	1,15 - 12,14	
Bilirrubina direta (mg/dL)						
≤ 1,5 LSN	209	88,9	43 (20,6)	1		0,044
> 1,5 LSN	26	11,1	10 (38,5)	2,41	1,02 - 5,69	
Albumina (g/dL)						
≥ 3,5	210	95,5	43 (20,5)	1		0,038
< 3,5	10	4,5	5 (50,0)	3,88	1,08 - 14,03	
INR						
≤ 1,2	211	95,9	46 (21,8)	1		0,127
> 1,2	9	4,1	4 (44,4)	2,87	0,74 - 11,12	
Leucograma (cels/mm³)						
≥ 5.000	158	64,8	36 (22,8)	1		0,739
< 5.000	86	35,2	18 (20,9)	0,90	0,47 - 1,70	
Plaquetas (/mm³)						
≥ 150.000	206	85,5	46 (22,3)	1		0,945
< 150.000	35	14,5	8 (22,9)	1,03	0,44 - 2,42	

*Obtido por Método de Regressão Logística simples / aa: aminoácidos; LSN: limite superior normal.

Figura 3 - Polimorfismos / mutações na NS3 associadas à resistência aos IPs de acordo com o genótipo do VHC

1: T54S, V55A e Q80R

2: M175L, Q80L, S122 G/N/T, V55I e V36L

Tabela 12 - Fatores independentemente associados a substituições de aminoácidos na região NS3 do VHC em pacientes com hepatite C crônica – Modelo final

Características	OR bruto	OR ajustado	IC 95%	p-valor*
Genótipo do VHC				
1a	1			<0,001
1b	4,37	5,68	2,61 - 12,35	
Bilirrubina total (mg/dL)				
≤ 1.5 ULN	1			0,033
> 1.5 ULN	3,74	5,25	1,19 - 23,16	
Albumina (g/dL)				
≥ 3.5	1			0,033
< 3.5	3,88	5,25	1,19 - 23,16	

*Obtido por Método de Regressão Logística múltipla

OR: Odds ratio

Tabela 13 - Análise de diversidade genética e pressão seletiva na região NS3 do VHC em pacientes com fibrose hepática avançada, com histórico de tratamento prévio com (Peg) INF / RBV e no grupo total avaliado

	FIB-4 > 3.25 (n=28)				
	<i>dS</i>	<i>dN</i>	ω	+	π
NS3 - VHC genótipo 1a	1.23	0.04	0.047		0.065
NS3 - VHC genótipo 1b	1.49	0.60	0.039		0.110

	Tratamento com (Peg) INF / RBV (n=104)				
	<i>dS</i>	<i>dN</i>	ω	+	π
NS3 - VHC genótipo 1a	2.98	0.11	0.045		0.063
NS3 - VHC genótipo 1b	2.74	0.13	0.049	7	0.110

	Total (n=247)		
	ω	+	π
NS3 - VHC genótipo 1a	0.045	40	0.063
NS3 - VHC genótipo 1b	0.050	18	0.110

dS: taxa de substituições sinônimas por sítio sinônimo*dN*: taxa de substituições não sinônimas por sítio não sinônimo ω = relação *dN/dS*

(+) = códons sob seleção diversificadora

 π = Diversidade nucleotídica na região NS3

6 DISCUSSÃO

Dentre as 247 amostras obtidas de pacientes infectados cronicamente com VHC genótipo 1, 21,9% apresentavam pelo menos uma substituição de aminoácido na região NS3, sendo que 5,6% destas variações foram classificadas como mutações associadas a resistência aos IPs (T54S, V55A e Q80R). A análise de ocorrência tanto de polimorfismos como de substituições associadas a resistência no grupo de mono infectados e de co infectados pelo HIV não revelou diferenças estatisticamente significativas entre estes dois grupos. Na amostra analisada, somente o VHC genótipo 1b, a elevação de bilirrubina total e a hipoalbuminemia estiveram associadas a detecção de substituições na NS3 do VHC, muito embora a avaliação mais acurada da presença de hepatopatia avançada feita pelo cálculo do escore FIB-4 não tenha se associado com a detecção de qualquer variação na região da protease. De fato, numa exploração mais aprofundada, a estrutura genômica da NS3 manteve-se conservada tanto na amostra total como no grupo de pacientes com doença hepática avançada.

O grupo de pacientes avaliado era composto majoritariamente por indivíduos do sexo masculino e de meia idade, achados estes compatíveis com o perfil epidemiológico do VHC nas regiões de realização do estudo (196). Quanto as possíveis formas de aquisição do vírus, a frequência de indivíduos com histórico de transfusão de sangue ou hemoderivados e uso de drogas ilícitas (venosa e inalatória) foi bastante elevada. No Brasil, a maioria das infecções pelo VHC decorreu em um passado relativamente recente, acometendo principalmente indivíduos que foram submetidos a procedimentos transfusionais ou invasivos, como consequência direta da quebra de barreiras de esterilização (uso de seringas reutilizáveis, por exemplo) (41). Em cerca de 20% dos pacientes não foi possível identificar uma possível fonte de infecção, fato este compatível

com a literatura vigente, uma vez que até 40% das pessoas infectadas não relatam qualquer fator de risco relacionado a aquisição do vírus (197).

Os indivíduos avaliados foram infectados na sua maioria pelo genótipo 1a. Sabe-se que no Brasil há predominância de infecção pelo VHC genótipo 1, provavelmente por ser este um vírus de circulação mais antiga no país (36). O VHC genótipo 1a foi introduzido de maneira um pouco mais precoce no território nacional, a partir da década de 1980, mantendo uma distribuição geográfica e etária bastante peculiar (41). Na casuística avaliada, a maior frequência de infecção pelo VHC genótipo 1a deve-se provavelmente ao acaso, reflexo possivelmente da composição e da origem heterogênea da amostra em estudo, composta inclusive por pacientes coinfectados pelo HIV.

Quanto ao histórico pregresso de tratamento, dentre aqueles que foram submetidos ao uso de peginterferon e ribavirina, a maioria (79%) foi classificada como não respondedor. O tipo de resposta previa ao interferon é considerado um fator preditor de resposta a tratamento subsequente com DAAs (198). Pacientes que foram não respondedores a terapia anterior evoluem com uma chance menor de RVS em esquemas terapêuticos compostos por estas drogas, devendo em algumas situações serem submetidos a tratamento conjunto com ribavirina e por tempo estendido de 24 semanas (87,88). Por outro lado, menos de ¼ dos pacientes avaliados era portador de doença avançada pelo método não invasivo FIB-4 e indivíduos com hepatopatia leve e moderada apresentam maiores taxas de sucesso terapêutico em comparação com pacientes cirróticos ou com doença terminal (114,199).

Em relação aos pacientes coinfectados pelo VHC e pelo HIV, quase todos estavam em uso de terapia antirretroviral de alta potência e apenas uma minoria apresentava carga viral do HIV detectável. Cerca de 48% dos pacientes utilizavam algum inibidor de protease do HIV. Alguns estudos chegaram a levantar a possibilidade de ocorrer atividade

cruzada entre IPs voltados contra o HIV e IPs do VHC. Contudo, esta hipótese foi prontamente refutada, uma vez que a aspartil protease do HIV é composta por uma estrutura molecular distinta da serino protease do VHC (159,180,200).

A infecção pelo HIV é um reconhecido fator complicador da infecção crônica pelo VHC. O grau de fibrogênese é diretamente proporcional ao deficit imunológico celular do paciente, expresso essencialmente através da contagem de LTCD4⁺ (77). Possivelmente por isso, a proporção de pacientes coinfectados com doença hepática avançada não tenha sido grande, uma vez que a amostra analisada por este estudo foi composta em sua maioria por pacientes com um bom controle imune e virológico em relação a infecção / doença pelo HIV - mediana de LTCD4⁺ de 570 cel/mm³ e carga viral do HIV detectável em somente 14% dos pacientes avaliados.

Atualmente, existem várias ferramentas laboratoriais com as quais é possível caracterizar o perfil de resistência do VHC em um indivíduo infectado. A utilização de metodologias de última geração para a avaliação de substituições de ocorrência natural do VHC associadas a resistência a DAAs no pré tratamento tem sido alvo de bastante discussão. Sabe-se que estes métodos apesar de terem elevada sensibilidade (como o sequenciamento clonal e o de nova geração) não são isentos de erros de interpretação, pois acabam por gerar uma quantidade muito grande e complexa de dados (201). Por outro lado, cepas virais que apresentam mutações são caracterizadas em sua grande maioria por um baixo *fitness*, ou seja, são variantes que perdem a capacidade efetiva de sobreviver e de se replicar no hospedeiro (136). Estas variantes, portanto, não costumam ser dominantes, podendo ser detectadas em níveis residuais somente por sequenciamento de alta sensibilidade. Por este ponto de vista, a utilização da técnica de base populacional bastaria para identificar cepas virais que eventualmente contenham as mutações de interesse, pois estas seriam aquelas com capacidade de se tornarem dominantes e de se

propagar no hospedeiro, preenchendo o espaço utilizado pelas cepas selvagens do VHC com maior chance de produzir algum impacto clínico num eventual tratamento futuro (24,145).

Desta forma, a acurácia em prever a RVS baseada na proporção de determinadas variantes virais depende do ponto de corte adotado para a análise. Variantes de resistência que incidem em baixas frequências (1% a 15%) no período pré-tratamento não parecem influenciar a resposta terapêutica de maneira significativa. Um *cutoff* de 15% alcançado habitualmente pelas técnicas de sequenciamento direto é capaz de prever de maneira acurada o risco de falha que pode ocorrer consequente a seleção de variantes virais de resistência. Existe um consenso de que este valor de corte deva ser utilizado pelos ensaios clínicos e por estudos de vida real para reportar a presença destas variantes, permitindo inclusive a comparação de resultados produzidos por ensaios laboratoriais distintos, sejam eles de nova geração ou de sequenciamento populacional (114).

Devido a sua grande diversidade, a classificação do VHC em genótipos e subtipos é algo complexo, necessitando ser constantemente revisado – vide a incorporação recente do genótipo 7 e a categorização “provisória” de alguns subtipos em níveis taxonômicos adicionais (33). Nota-se que a variabilidade viral ocorre inclusive em nível de subtipos, especialmente naquelas linhagens do VHC altamente adaptadas e que se disseminaram globalmente ao longo do século 20 (genótipo 1a, 1b e 3a) (33,37).

No mundo, o genótipo 1b pode ser encontrado de maneira dispersa compondo várias linhagens filogenéticas que se entrelaçam com sequências genéticas comuns a vários países. A natureza heterogênea de sua distribuição parece refletir na variabilidade genética deste subtipo viral (37). Um estudo italiano realizado por Paolucci et al. envolvendo 156 indivíduos revelou uma maior diversidade genética da região NS3 no

genótipo 1b do que no 1a, de modo que o número de substituições em aminoácidos para cada sítio polimórfico natural foi de 186 no genótipo 1b e 104 no genótipo 1a (137).

A análise das amostras de VHC genótipo 1b no nosso estudo de fato demonstrou uma grande variabilidade da região NS3/NS4A – tanto na avaliação pontual das 15 posições da protease onde se esperava ocorrer algum tipo de substituição bem como na análise de diversidade nucleotídica. No Brasil, a composição das variantes do VHC parece ter sido influenciada pelo tempo de circulação e pela distribuição geográfica dos genótipos virais (36,168,170). Lampe et al. avaliaram a diversidade genética do VHC brasileiro através da análise por tipagem e subtipagem através do sequenciamento da região NS5B (genótipo 1a: 321 amostras e genótipo 1b: 179 amostras) e identificaram que as sequências brasileiras do VHC subtipo 1b estavam distribuídas em múltiplas linhagens distintas, agrupadas em 7 categorias ou *clades* (BR1b_I a BR1b_VII). Diferenças regionais também foram observadas, de forma que 55% das sequências procedentes do estado de São Paulo e 64% das procedentes do Rio Grande do Sul (estados dos quais foram obtidas as amostras do nosso estudo) foram classificadas como pertencentes as *clades* BR1b_II e BR1b_VI / VII, respectivamente (37). Estes achados sugerem uma complexa disseminação do VHC no território brasileiro, tendo o genótipo 1b uma grande diversidade possivelmente consequente ao seu maior tempo de circulação no país, resultante de múltiplas e pequenas introduções em diferentes regiões geográficas ao longo dos anos. Assim, o subtipo 1b parece ter sido exposto a maior pressão seletiva em relação aos outros genótipos de circulação brasileira, resultando numa diversidade genética cumulativa e substancial (37,41).

Entretanto, quando a diversidade viral é avaliada especificamente do ponto de vista de mutações associadas a resistência aos IPs, os resultados publicados em literatura têm revelado uma maior frequência destas substituições no genótipo 1a (148). O próprio

estudo realizado por Paolucci et al. verificou que o número de sequências do VHC com alguma mutação na região NS3/NS4A capaz de promover resistência a IPs foi cerca de 2 vezes maior no VHC genótipo 1a em relação ao genótipo 1b ($p=0,07$) (137). O genótipo 1a também tem sido associado a menor resposta terapêutica baseada no uso de DAAs, em especial nos esquemas compostos por IPs de primeira geração (primeira e segunda onda). Uma possível explicação está na sua menor barreira genética ao surgimento de mutações e consequentemente maior probabilidade deste genótipo em selecionar substituições de resistência na NS3 (como a V36M, R155K e Q80K) (136). Por exemplo, a mutação R155K, que confere resistência aos IPs de primeira geração, necessita apenas de uma modificação nucleotídica para emergir neste genótipo, ao contrário do genótipo 1b, onde há necessidade da substituição de dois nucleotídeos para a ocorrência da mesma mutação (202).

A substituição mais frequentemente encontrada nas sequências do VHC genótipo 1b foi o polimorfismo de ocorrência natural S122G. Estudos *in vitro* não demonstraram qualquer influência desta substituição na atividade dos IPs (114,139,157). De fato, a posição 122 do VHC parece ser mais variável no genótipo 1b do que no genótipo 1a, porém em proporções menores do que as descritas aqui. De acordo com o estudo de Patiño-Galindo et al. que avaliou aproximadamente 3000 sequências nucleotídicas de VHC obtidas de 3 bases de dados (*European HCV database*, *Los Alamos HCV database* e *The Virus Pathogen Database and Analysis Resource – VIPRBRC*) esta substituição esteve presente em 7,2% das amostras no genótipo 1a e em 13% no genótipo 1b (185). Este achado sugere que variantes virais com este polimorfismo tenham se adaptado de forma efetiva na rede de transmissão brasileira, possivelmente compondo uma assinatura genômica do VHC genótipo 1b neste país. Contudo, a maior frequência da S122G encontrada aqui pode ter sofrido influência do processo de amostragem, devendo a real

prevalência desta substituição ser comprovada por estudos adicionais que envolvam amostras mais representativas de pacientes infectados pelo genótipo 1b.

A incorporação dos DAAs na terapia atual do VHC elevou o estudo da sua virologia a um novo patamar. Até então, os polimorfismos de ocorrência natural do VHC não impactavam a taxa de sucesso terapêutico nos esquemas baseados em peginterferon e ribavirina (203). Contudo, na era dos DAAs, algumas variantes virais constituintes do pool de quasiespecieis infectantes do hospedeiro podem já albergar algum tipo de mutação capaz de reduzir ou mesmo comprometer as taxas de RVS (99). Neste estudo, aproximadamente 1/5 das amostras de VHC obtidas de pacientes cronicamente infectados revelaram ao menos uma substituição em algum resíduo da proteína NS3. A prevalência de mutações associadas a resistência aos IPs foi baixa, sendo constituída por variantes que com baixo poder de impacto na eficácia antiviral *in vitro* dos IPs (157).

No mundo todo, alguns estudos se propuseram a identificar mutações primárias de ocorrência natural na NS3 do VHC capazes de promover resistência de moderado a alto grau a IPs, baseado na elevação da IC50 da droga em estudos *in vitro*. A ocorrência exclusiva deste tipo de substituição tem sido descrita em cerca de 3% das amostras avaliadas por estes levantamentos (160). A frequência de mutações de resistência na amostra estudada foi de 5,6%, sendo compatível com as prevalências descritas atualmente tanto por estudos nacionais como internacionais.

O impacto clínico destas mutações no sucesso terapêutico de esquemas compostos por fármacos representantes da classe dos IPs ainda não é totalmente compreendido. De fato, alguns estudos de séries de casos incluindo mais de 2000 pacientes que foram tratados com IP de primeira geração (Telaprevir, Boceprevir) mais peginterferon e ribavirina revelaram que mutações de surgimento natural na NS3 (de ocorrência

espontânea no período pré-tratamento) não comprometeram a taxa global de RVS após a utilização da droga (160,167).

Por outro lado, como descrito anteriormente, a substituição Q80K foi capaz de comprometer a RVS de pacientes que utilizaram terapia baseada em Simeprevir, em especial naqueles com preditores negativos de RVS (cirróticos e não respondedores prévios) (146). O impacto desta substituição no sucesso terapêutico de esquemas baseados em outros IPs de segunda onda (Asunaprevir e Paritaprevir) é menos claro. Para o Asunaprevir, pacientes infectados com VHC genótipo 1a tratados com esta droga em conjunto com o Daclatasvir apresentaram altas taxas de falha terapêutica relacionadas a emergência de variantes associadas a resistência com substituições tanto na região da protease (incluindo aqui a Q80K) como na região da NS5A. Desta forma, este esquema acabou por ser aprovado somente para uso em pacientes infectados pelo VHC genótipo 1b (204). Quanto ao Paritaprevir utilizado no esquema 3D, a presença da substituição Q80K só foi capaz de impactar negativamente a taxa de RVS em pacientes infectados pelo genótipo 1a que receberam tratamento encurtado por 8 semanas (113).

A identificação da Q80K guarda relação direta com a prevalência regional da infecção pelo VHC genótipo 1a e com a distribuição geográfica de ocorrência destas infecções. Esta mutação é descrita de maneira frequente na América do Norte, em alguns países da Europa e na Austrália (205). De fato, a Q80K apresenta frequência elevada em pacientes infectados pelo VHC nos Estados Unidos. De acordo com Lenz et al., a prevalência estimada desta substituição em indivíduos norte-americanos infectados pelo genótipo 1a é de 48,1% (165). O continente europeu apresenta valores de prevalência extremamente variáveis de acordo com o país analisado – de 0% na Bulgária a 18,2% no Reino Unido (164). Todavia, um recente estudo publicado em 2016 que avaliou cerca de 3000 indivíduos constituintes de uma base de dados responsável pela monitorização de

substituições associadas a resistência do VHC estimou uma prevalência mais elevada de substituições na posição 80 da protease em indivíduos europeus infectados pelo genótipo 1a (34% em pacientes sem histórico de uso de DAAs) (206).

Os estudos de sequenciamento do VHC que avaliaram posições na região NS3 relacionadas com resistência a IPs são incomuns na América do Sul. No geral, estes tem revelado uma baixa frequência da substituição Q80K (207). A exceção contempla um estudo uruguaio envolvendo 20 pacientes que encontrou uma prevalência de substituições na NS3 associada a resistência em 25% dos pacientes avaliados, sendo que 15% das mesmas eram do tipo Q80K (208). No Brasil, os dados publicados até então têm demonstrado uma baixa frequência desta substituição nas amostras avaliadas. Os estudos que empregaram técnicas de sequenciamento direto estimaram prevalências bastante reduzidas de Q80K, partindo de 0% a 2,7% (171,173,175). A identificação desta substituição foi incomum mesmo no estudo brasileiro realizado por Gaspareto et al. que utilizou técnica de sequenciamento de nova geração com alta sensibilidade (prevalência de 4%) (174). Em concordância, a Q80K não foi identificada em nenhum dos 247 indivíduos que compuseram a amostra aqui avaliada.

O genótipo 1a do VHC tem sido classificado filogeneticamente em duas *clades* distintas (I e II), sendo a substituição Q80K mais frequentemente descrita nas infecções pelo genótipo 1a *clade* I (209,210). A infecção pela *clade* I ocorre em aproximadamente 75% dos casos provenientes da América do Norte e em mais de 95% dos casos no Brasil (37). Recentemente, Santos et al. avaliaram a sequência NS3 de cerca de 2000 amostras de VHC genótipo 1a obtidas de banco de dados públicos provenientes da Oceania, Europa e Americas. Estes autores observaram que a *clade* I estava estruturada em 3 *subclades*: IA, IB e IC, com diferenças regionais marcantes. A *clade* IA foi bastante prevalente nos Estados Unidos (65%) enquanto a *clade* IC foi encontrada em quase todas as amostras

brasileiras (96%). A *clade* IB foi descrita somente em amostras americanas. A classificação do VHC genótipo 1a em *subclades* correlacionou-se fortemente com a presença da substituição Q80K. Esta substituição foi encontrada em 64% das amostras de VHC *clade* IA, 0% na IB, 3% na IC e em menos de 1% no genótipo 1a *clade* II. Desta forma, a Q80K parece ter se fixado de forma efetiva na *clade* IA, o que explicaria a sua grande prevalência nas amostras provenientes dos Estados Unidos e sua baixa frequência nas amostras brasileiras, que são compostas praticamente pelo VHC genótipo 1a *clade* IC (211).

É importante enfatizar que mutações da NS3 associadas a resistência de alto grau aos IPs não foram identificadas em nenhuma das amostras avaliadas. Somente 3 variantes associadas a resistência foram descritas após o processo de sequenciamento da região da protease: Q80R, V55A e T54S. Estudos *in vitro* demonstraram que tais mutações são capazes de promover resistência de baixo a moderado grau aos IPs (aumento de baixo a moderado na IC₅₀ - em torno de 5 a 20 vezes o valor) (136,157). A mutação V55A pode diminuir a susceptibilidade ao Boceprevir, principalmente no VHC genótipo 1b, enquanto que a T54S pode promover resistência a ambos os IPs de primeira geração (Telaprevir e Boceprevir). A Q80R tem sido descrita como uma mutação capaz de elevar em até 5 vezes a IC₅₀ do Simeprevir (139,146,157).

Na prática clínica, estes achados são capazes de influenciar no manejo de pacientes com hepatite C crônica no Brasil. É notório que os ensaios clínicos de eficácia e tolerância dos DAAs foram realizados essencialmente com amostras europeias e norte-americanas, exprimindo essencialmente o perfil destas populações (87,88). Vem daí a recomendação oficial que determina a triagem de mutações associadas a resistência em certos cenários terapêuticos. No caso do Simeprevir, a mutação Q80K necessita ser pesquisada no período pré-tratamento em pacientes infectados pelo VHC genótipo 1a

candidatos a esquema que associe seu uso ao peginterferon e ribavirina (muito embora este combo terapêutico não seja mais indicado pelas principais diretrizes atualmente disponíveis), sendo também esta análise recomendada em pacientes cirróticos infectados pelo genótipo 1a a serem tratados com Simeprevir e Sofosbuvir (212).

Dentre os guias terapêuticos internacionais, a diretriz norte-americana da Associação Americana para o Estudo de Doenças do Fígado (AASLD) e o guia da Organização Mundial da Saúde recomendam o uso de Simeprevir e Sofosbuvir como uma das alternativas de tratamento em pacientes infectados pelo VHC genótipo 1 (7,88). Por outro lado, a diretriz europeia de 2016 indica o uso de Simeprevir somente como uma das modalidades terapêuticas restritas ao genótipo 4 (87). No PCDT brasileiro publicado em 2015, esta droga ainda é listada como uma das principais opções para o genótipo 1 (89). Sendo assim, os resultados deste estudo em conjunto com os dados de literatura previamente publicados envolvendo indivíduos brasileiros sugerem um melhor perfil de segurança e possivelmente uma menor probabilidade de falha terapêutica em pacientes cirróticos infectados pelo genótipo 1a tratados com Simeprevir e Sofosbuvir em relação aos pacientes europeus e norte-americanos. Frente a isso, a realização de testes genotípicos que avaliem possíveis substituições de resistência na região da protease do VHC no pré-tratamento de pacientes com este perfil parece não ser imprescindível no Brasil, pois a probabilidade de se encontrar a mutação Q80K é bastante pequena.

Na segunda etapa deste estudo, a população coinfectada pelo VHC e HIV foi explorada de maneira mais detalhada. Quando se realizou a comparação entre as características sociodemográficas, epidemiológicas e laboratoriais entre os pacientes com hepatite C crônica com e sem coinfecção pelo HIV, observou-se que quase 70% dos coinfectados eram do gênero masculino e uma grande proporção destes pacientes estava numa faixa etária acima de 40 anos [86 (76,8%) vs 76 (59%) em monoinfectados,

$p<0,001$]. No nosso país, a chance de ocorrência de coinfecção pelo VHC e HIV é maior em homens e a prevalência parece elevar-se com a idade do paciente. Num estudo realizado pelo Ministério da Saúde, baseado em fichas de casos AIDS notificados no período de 1999 a 2010 (370.672 casos de AIDS, sendo 5.932 com coinfecção pelo VHC), cerca de 70% dos coinfectados pertenciam ao gênero masculino e a razão de chances de ser coinfectado entre as faixas etárias de 35 – 45 anos e acima de 45 anos era de 10 a 12 vezes maior do que naqueles abaixo de 25 anos (213,214).

A avaliação dos fatores de risco associados a infecção viral demonstrou uma frequência maior de indivíduos com uso prévio de drogas intravenosas e práticas sexuais de risco no grupo de coinfecção. Da mesma forma, em somente 10% dos casos não foi possível identificar uma via de transmissão (vs 34% nos monoinfectados pelo VHC), uma vez que a caracterização de fatores de risco sabidamente reconhecidos da transmissão viral costuma ser mais facilmente discriminada nos coinfectados. Estes achados estão alinhados com o que se sabe sobre a epidemiologia da coinfecção (38,196,213). Em relação as comorbidades associadas, pacientes com relatos de sintomas depressivos e com tripla infecção (HIV, VHC e VHB) foram mais frequentemente observados no grupo de coinfecção VHC e HIV. A doença mental e a infecção pelo vírus da hepatite B têm sido mais identificadas em indivíduos com infecção pelo HIV, em proporções relativamente distintas e influenciadas pela presença de fatores facilitadores destas condições (ex: uso de droga injetável, práticas sexuais de risco, faixa etária e vulnerabilidade social) (213,215).

Pacientes coinfectados pelo HIV apresentaram uma maior frequência de infecção pelo genótipo 1a em relação aos monoinfectados (84% vs 34% em monoinfectados pelo VHC). Tanto no Brasil como em estudos internacionais, o genótipo 1a, além do genótipo 3, tem sido descrito com maior frequência nos coinfectados – talvez por haver uma

relação deste genótipo com histórico de uso de drogas injetáveis (38,214,216). Por outro lado, a proporção de pacientes mono infectados com VHC genótipo 1b foi maior do que em co infectados (65,9%), uma vez que este subtipo, por ser de circulação mais antiga, possivelmente associa-se a infecção através de transfusão de sangue e hemoderivados, via esta mais relatada nos mono infectados (41,217).

Infelizmente, não foi possível realizar neste estudo a análise comparativa entre os achados histológicos e a presença ou não de substituições de aminoácidos na região NS3, devido a indisponibilidade de exames de biópsia na maioria dos pacientes que compuseram a amostra analisada. Ainda, o desenho retrospectivo deste estudo não permitiu a realização de procedimento invasivo para a obtenção do fragmento hepático com posterior classificação pelo escore de METAVIR.

A análise indireta do estadiamento revelou uma mediana do escore FIB-4 maior nos pacientes co infectados, embora este valor tenha se correlacionado com um escore METAVIR menor que F3. De fato, a proporção de indivíduos com fibrose avançada pela avaliação indireta não demonstrou diferença em relação aos mono infectados. Porém, quando se analisou as provas laboratoriais bioquímicas (incluindo AST e ALT) e hematológicas, observou-se que estes resultados sugeriram uma maior tendência de pacientes com hepatopatia avançada no grupo de co infecção. A elevação das enzimas denota processo inflamatório ativo do parênquima, sendo um importante preditor de progressão da doença. Este fato é corroborado pelo trabalho de Konerman et al., que avaliaram de forma prospectiva 282 pacientes com hepatite C co infectados pelo HIV com biopsias pareadas e observaram que a elevação de transaminases e a síndrome metabólica estavam associados de maneira independente a progressão para fibrose avançada (78).

Apesar de ser um procedimento invasivo não isento de riscos e ter certas limitações (qualidade do fragmento, variação inter e intraobservador), a biópsia ainda é

considerada o padrão ouro para a análise do estadiamento bem como da graduação necroinflamatória hepática, por fornecer informações adicionais pertinentes inclusive ao diagnóstico diferencial com outras patologias (esteatohepatite e toxicidade medicamentosa, por exemplo) (58,218). Todavia, metodologias não invasivas têm sido cada vez mais utilizadas em pacientes com hepatite C crônica, inclusive em coinfectados pelo HIV. O escore FIB-4 apresenta uma acurácia adequada para avaliação de doença avançada, sendo a AUROC maior na diferenciação dos indivíduos cirróticos de não cirróticos e melhor nos indivíduos monoinfectados que nos coinfectados (85% vs 76%) (186,188,218). Desta forma, alguns pacientes coinfectados podem ter sido erroneamente classificados com hepatopatia mais branda, o que em parte explicaria a discrepância entre as provas laboratoriais e escores obtidos.

A avaliação de polimorfismos e mutações na NS3 associadas a resistência aos IPs estratificada pela presença ou não da coinfeção pelo HIV não revelou diferença estatisticamente significativa quanto a proporção descrita de qualquer substituição nos dois grupos – 19,2% em monoinfectados e 12,5% em coinfectados pelo VHC e HIV para polimorfismos globais e 3,7% em monoinfectados e 8% em coinfectados pelo VHC e HIV para mutações associadas a resistência. Em pacientes coinfectados, a interação entre o VHC e HIV é dinâmica e complexa. A replicação do VHC tem relação direta com o grau de imunodepressão do paciente (182). Contagens de LTCD4⁺ menores associam-se a depleção da resposta efetora pelos linfócitos TCD8⁺ resultando em uma resposta imune inespecífica e enfraquecida contra os epítomos do VHC. Com isso, o VHC RNA acabaria não sendo efetivamente erradicado, o que resultaria na elevação da carga viral deste vírus (219). Como o VHC caracteriza-se pela sua grande diversidade, a imunodepressão em teoria estaria associada a produção contínua de variantes virais contendo substituições associadas a resistência. Desta forma, a probabilidade da identificação de cepas virais

com polimorfismos genéticos associados ou não a resistência seria maior nos coinfectados (220). Todavia, o grupo avaliado era composto por indivíduos que estavam em sua grande maioria sob tratamento antirretroviral e, portanto, com um bom controle imunológico. De forma semelhante, os níveis das cargas virais do VHC não se diferenciaram quando se realizou a comparação entre mono e coinfectados. Assim, estas características podem ter influenciado o fato de que a proporção de variantes genéticas da NS3 tenha sido semelhante entre os dois grupos.

Estudos publicados na literatura vigente que tiveram como objetivo avaliar a prevalência de mutações na NS3 do VHC relacionadas a resistência aos IPs em pacientes coinfectados pelo VHC e HIV demonstraram resultados bastante distintos. Os desfechos são influenciados principalmente pelo tamanho da amostra avaliada, pela região geográfica de realização do estudo, pela metodologia de sequenciamento empregada e pela proporção da mutação Q80K, altamente prevalente na América do Norte. Nos Estados Unidos, Winters et al. analisaram por metodologia de sequenciamento clonal 14 pacientes coinfectados pelo VHC e pelo HIV quanto a presença de mutações associadas a resistência de IPs, demonstrando a substituição D168E em apenas 1 paciente infectado pelo VHC 1a (221). Trimoulet et al. estudaram uma amostra de coinfectados pelo VHC e HIV composta por 120 indivíduos franceses, revelando a presença das mutações V36L, V36M, T54S e R155K em 6 amostras (7,9%) (222). Vicenti et al. avaliaram, em um estudo italiano, 64 amostras de pacientes coinfectados VHC e HIV virgens de tratamento com IPs e demonstraram que em 11 destes (17,1%) havia pelo menos uma mutação de resistência (223). Em um estudo espanhol, Treviño et al. avaliaram 55 indivíduos coinfectados sendo que 36 destes (cerca de 20%) apresentaram alguma mutação de resistência, sendo na maioria a Q80K (224). Morsica et al., também na Itália, avaliaram uma pequena amostra de coinfectados (37 pacientes) e encontraram as mutações R155K,

A156T e V170F em 6 das amostras sequenciadas (16%) (225). Em Portugal, Silva et al. avaliaram 26 amostras de VHC provenientes de indivíduos usuários de droga injetável com hepatite C crônica e infecção pelo HIV, sendo que 12 destas com VHC genótipo 1a e 1 com genótipo 1b. Quatro amostras das 12 com VHC genótipo 1 revelaram alguma mutação associada a resistência ao IP (cerca de 30%) (226). Na China, Zhou et al. avaliaram 193 pacientes coinfectados pelo VHC genótipo 1 e pelo HIV, demonstrando que 3,6% das amostras obtidas apresentavam pelo menos uma substituição associada a resistência (227). Bartolini et al., em um estudo italiano, avaliaram 28 amostras de VHC provenientes de pacientes infectados (18 destas de coinfectados VHC e HIV) por metodologia de sequenciamento de nova geração (*ultra-deep sequencing*) e revelaram que em 85,7% destas amostras havia pelo menos uma mutação de resistência aos IPs do VHC. Sete coinfectados (38%) apresentavam múltiplas mutações (pelo menos duas) simultaneamente na mesma sequência analisada (228). Nevot et al. avaliaram por metodologia de sequenciamento clonal 23 amostras de pacientes originários da Alemanha e Espanha com hepatite C aguda (18 coinfectados e 5 monoinfectados pelo VHC) e identificaram que em 17 delas (74%) havia pelo menos uma substituição associada a resistência a NS3. A maioria das amostras continha a Q80K – 10 de 17 (229). Leggewie et al. avaliaram da mesma maneira 38 pacientes infectados recentemente pelo VHC (infecção aguda) por metodologia de nova geração (*ultra-deep sequencing*), demonstrando uma prevalência de mutações associadas a IPs em 10 das amostras obtidas (26%) (230).

Existem poucos estudos publicados que se propuseram a realizar uma análise comparativa entre a prevalência de substituições no gene da protease do VHC entre monoinfectados e coinfectados pelo HIV. A maioria deles, como neste estudo, não conseguiu demonstrar através de provas estatísticas diferenças entre a frequência de

ocorrência de mutações na NS3 associadas a resistência entre estes dois grupos. Halfon et al. em 2008 realizaram um estudo no qual foram comparados 33 pacientes monoinfectados pelo VHC (16 do genótipo 1a e 17 do genótipo 1b) com 17 pacientes coinfectados pelo VHC e HIV (12 do genótipo 1a e 5 do genótipo 1b) quanto a frequência de mutações na NS3 do VHC, não havendo diferença entre as proporções encontradas nos dois grupos (19% em monoinfectados e 18% em coinfectados (231). A amostra de coinfectados pelo VHC e HIV estudada por Trimoulet et al. (76 indivíduos) foi comparada com 476 sequências da NS3 obtidas do *GenBank*, também não havendo diferença quanto a prevalência de mutações na protease (7,9% em coinfectados vs 6,5% em monoinfectados, $p=0,600$) (222). Gaudieri et al. analisaram 259 pacientes infectados pelo VHC genótipo 1 (205 do genótipo 1a – 78 destes coinfectados e 54 do genótipo 1b – 28 coinfectados), sendo que a frequência de amostras com mutações no VHC genótipo 1a foi de 26 (aproximadamente 8% em monoinfectados e 19,8% em coinfectados) e no genótipo 1b foi de 5 (aproximadamente 15,3% em monoinfectados e 5,3% em coinfectados). Embora as proporções tenham sido distintas entre os grupos de acordo com o genótipo do VHC (mais frequente em coinfectados do genótipo 1a e mais frequente em monoinfectados do genótipo 1b), os autores não realizaram provas estatísticas para comparação das mesmas (162). Vicenti et al. avaliaram 109 pacientes com hepatite C, sendo que destes 64 eram coinfectados e 45 monoinfectados. Cerca de 20% da amostra global apresentou alguma mutação associada a resistência, não havendo diferença entre a proporção de substituições entre mono e coinfectados (17% nos coinfectados e 22% nos monoinfectados, $p>0,05$) (223). As prevalências das substituições da NS3 sofrem influência direta da tecnologia de sequenciamento utilizada. No estudo australiano realizado por Applegate et al., 50 pacientes com hepatite C aguda (26 monoinfectados e 24 coinfectados pelo VHC e HIV) tiveram amostras do VHC analisadas por metodologia

populacional e de nova geração com alta sensibilidade (*ultra-deep sequencing*). A primeira modalidade de sequenciamento revelou uma frequência de 8% de substituições associadas a resistência aos IPs. Quando se avaliou substituições que ocorriam em sequências com níveis maiores que 1%, a frequência de amostras com substituições aumentou para 11 (22%). A técnica de sequenciamento de nova geração (detecção de variantes entre 0,1 e 1% dos componentes da quasiespecie viral) detectou substituições em praticamente todas as posições analisadas na NS3, exceto na posição S138T. De acordo com os autores, não houve diferença estatística entre a frequência de mutações na NS3 entre monoinfectados e coinfectados pelo VHC (232).

Dentre todos estes estudos comparativos relacionados a presença ou não de mutações na NS3 de acordo com a infecção pelo HIV, a exceção se deu pelos levantamentos realizados por Morsica et al. na Itália e Cao et al. na China, que descreveram uma maior frequência de mutações nos coinfectados. Morsica et al. compararam 37 indivíduos coinfectados pelo VHC e HIV com 250 sequências obtidas do *GenBank*. Neste estudo, a proporção de mutações foi maior em pacientes coinfectados do que nos monoinfectados - 6 / 37 coinfectados (16,2%) e 2 / 250 monoinfectados (0,8%) ($p < 0,05$) (225). Cao et al. avaliaram 84 pacientes monoinfectados pelo VHC e 68 coinfectado pelo VHC e HIV. A prevalência de substituições associadas a resistência a IPs foi de 8,3% nos monoinfectados e de 30,8% nos coinfectados, havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,001$). Neste estudo, os autores conseguiram estabelecer uma relação direta entre a frequência de substituições e a contagem de $LTCD4^+$, sendo que a ocorrência de mutações foi maior nos pacientes com $LTCD4^+ < 350$ cels/mm³ (220). Desta forma, a literatura vigente embasa com o maior número de evidências a ideia de que a coinfecção pelo HIV não se associa ou não parece influenciar a prevalência de mutações na região NS3 associadas a resistência aos IPs. De

fato, estudos envolvendo monoinfectados e coinfectados pelo VHC e HIV tem demonstrado esse achado não só na região da protease, como também em outras regiões alvo da terapia baseada em DAA (NS5A e polimerase NS5B) (233).

Na terceira fase deste estudo, a possível associação de variáveis sociodemográficas, epidemiológicas, clínicas e laboratoriais com a presença de substituições na região da protease do VHC foi avaliada através de Modelo de Regressão Logística uni e multivariado. Deste modo, a infecção pelo genótipo 1b e alguns achados bioquímicos comumente observados na hepatopatia avançada foram identificados como elementos associados independentemente com a detecção de substituições nesta região. Cerca de 40% das 106 amostras de VHC genótipo 1b apresentaram algum tipo de substituição (polimorfismos ou mutação de resistência) em comparação com 11% das 141 amostras de VHC genótipo 1a ($p < 0,001$). Contudo, o polimorfismo S122G respondeu pela grande maioria das variantes virais. Pode-se dizer que, na amostra de estudo, o VHC genótipo 1b esteve associado sim a uma maior variação nos resíduos avaliados da protease em relação ao genótipo 1a – decorrente principalmente da presença da S122G – embora o subtipo 1b de fato não tenha se associado a presença de qualquer mutação descrita na protease capaz de interferir na IC50 das drogas IPs em estudos *in vitro* ($p = 0,094$).

Nas hepatopatias crônicas, incluindo aquelas cuja etiologia é o VHC, a lesão histológica consequente a progressão da doença é acompanhada por um conjunto de alterações em exames laboratoriais que podem ser utilizadas como marcadores indiretos na prática clínica. A elevação das transaminases, de enzimas canaliculares e das bilirrubinas são decorrentes do processo de fibrogênese, da inflamação e da agressão ao parênquima (34). As citopenias – plaquetopenia e leucopenia – secundárias ao hiperesplenismo e a hipertensão portal, associam-se com a variação das provas laboratoriais de função hepática (coagulopatia definida pelo alargamento do INR e

hipoproteïnemia / hipoalbuminemia) nas fases mais avançadas da doença (cirrose compensada e descompensada) (234).

A frequência de substituições na região NS3 do VHC foi elevada nos indivíduos que apresentavam alguns marcadores bioquímicos de doença avançada (hipoalbuminemia e hiperbilirrubinemia), sugerindo que a adição de variantes virais com substituições de aminoácidos na NS3 no pool de quasiespécies do VHC do hospedeiro infectado tenha ocorrido de forma cumulativa durante o tempo total de infecção. Pacientes com infecção crônica pelo VHC parecem desenvolver uma resposta imune celular específica enfraquecida e não robusta frente aos epítomos pertencentes a inúmeros sítios do vírus (63). Desta forma, a qualidade da resposta imune desencadeada frente ao estímulo antigênico pode, portanto, resultar em maior ou menor diversidade e divergência genômica viral (235).

Os dois marcadores bioquímicos que se associaram com as variações de resíduos na NS3 do VHC não são considerados capazes de prever individualmente a fibrose avançada e cirrose. Sabe-se que além das doenças associadas ao fígado, outras condições clínicas podem interferir nos níveis de albumina e de bilirrubina (ex: desnutrição e algumas drogas antirretrovirais como o Atazanavir). A análise indireta da lesão hepática demanda a utilização de testes não invasivos validados para a população de interesse e que consigam determinar com uma acurácia satisfatória determinado grau de fibrose como o FIB-4, por exemplo. Como discutido anteriormente, escores indiretos não invasivos são menos acurados que a biópsia (186). Neste estudo em especial, o estadiamento do grau de fibrose somente foi possível graças ao emprego do FIB-4, apesar das possíveis falhas que esta metodologia pode resultar. Sendo assim, procedeu-se a comparação entre a presença ou não de doença avançada pelo FIB-4 com identificação

das variações no VHC, revelando aqui de maneira mais acurada uma ausência da associação entre hepatopatia avançada ($\text{FIB-4} > 3,25$) e substituições na região NS3.

É importante ressaltar que, nesta etapa do estudo, todas as substituições na região NS3 (polimorfismos e mutações associadas a resistência) foram analisadas em conjunto. Esta análise idealmente deveria ser realizada considerando-se dois grupos distintos – grupo de polimorfismos e, principalmente, o grupo de mutações associadas a resistência. Entretanto, a amostra de estudo composta por pacientes com hepatite C crônica somente com mutações associadas a resistência foi relativamente pequena (5,6% do grupo total), o que acabaria por comprometer o poder do teste estatístico para a detecção de eventuais diferenças e o controle efetivo de potenciais fatores de confusão na análise multivariada.

Neste estudo, a análise de possíveis variações na região NS3 foi realizada inicialmente em resíduos da proteína associados com substituições que resultariam numa elevação da IC_{50} dos fármacos da classe dos IPs. Trata-se, portanto, de uma análise pontual da região NS3 de posições previamente descritas e relacionadas com resistência aos IPs baseada em dados obtidos da literatura vigente (47,114,157). Entretanto, a avaliação da variabilidade genômica do VHC pode ser realizada de maneira mais profunda, através da análise da diversidade das sequências nucleotídicas e da quantificação de seleção natural pela identificação da proporção de substituições nucleotídicas sinônimas por sítio sinônimo (dS), não sinônimas por sítio não sinônimo (dN) e pelo cálculo da razão dN/dS.

De fato, alguns estudos têm demonstrado uma relação direta entre a variação de sequências nucleotídicas em determinadas regiões do VHC e o tempo de infecção através deste tipo de abordagem laboratorial (45,46,236). Li et al. em um estudo prospectivo envolvendo pacientes provenientes do Alasca sequenciaram o genoma do VHC em praticamente toda sua extensão em 9 pacientes com infecção crônica objetivando analisar

a evolução genética pelo qual o vírus passaria durante o tempo de infecção, revelando que durante a observação houve um aumento global e cumulativo da frequência de substituições sinônimas e não sinônimas por sítio analisado (237). Contudo, neste mesmo estudo, variações nas regiões p7, NS2, NS3 e NS5B do VHC foram relativamente menores nos pacientes que evoluíram para doença avançada, sugerindo a importância da conservação de determinadas estruturas do vírus para a manutenção da sua capacidade replicativa. López-Labrador et al. avaliaram 22 pacientes com hepatite C crônica pelo genótipo 1b por um período de 3 anos após a realização de transplante de fígado e uma coorte de 22 pacientes também com hepatite C crônica não transplantados (grupo controle) para a comparação das sequências nucleotídicas da região do Core, NS3 e NS5B do VHC de acordo com o grau de progressão da fibrose. Estes autores identificaram uma correlação positiva e significativa entre a similaridade genética do VHC somente nas regiões do Core e da NS5B com a taxa de progressão da fibrose nos pacientes não transplantados. Nenhuma substituição ou um padrão em particular das sequências de aminoácidos da região NS3 associou-se com um perfil evolutivo específico (progressores rápidos vs progressores lentos) (238).

A análise de diversidade genética nucleotídica (π) realizada nas amostras deste estudo demonstrou que não houve uma maior diversidade no consenso de sequências da região NS3 em ambos os genótipos do VHC (1a e 1b) obtidas do grupo de pacientes com doença hepática mais grave em relação ao grupo total de indivíduos avaliados. Este achado parece ter sido influenciado pela região do VHC que foi sequenciada e analisada, uma vez que em um estudo prospectivo realizado por Ramachandran et al., a diversidade cumulativa ao longo do tempo de certas regiões do VHC (como a HVR1 e NS5A) foi identificada com maior frequência em pacientes que foram seguidos por períodos de 9 a 18 anos (144).

A quantificação da pressão natural seletiva exercida na região de interesse do estudo (sequência NS3) revelou que a taxa de substituições sinônimas (dS) foi maior que a taxa de substituições não sinônimas (dN). A avaliação da razão dN/dS demonstrou que a seleção negativa ou purificadora predominou através da preponderância de substituições conservativas sobre substituições diversificadoras nas sequências da região NS3 do VHC obtidas de pacientes com hepatopatia avançada (dN/dS=0,047 no genótipo 1a e dN/dS=0,039 no genótipo 1b). Estes achados em conjunto fortaleceram a hipótese da sequência NS3 ser uma região do vírus mais conservada do ponto de vista genômico, uma vez que as eventuais variações nucleotídicas na sua maioria não resultaram em oscilações genéticas capazes de promover substituições frequentes em resíduos de aminoácidos constituintes da protease viral.

A análise de seleção natural nas sequências nucleotídicas da região NS3 do VHC pode sofrer influência do tamanho da amostra e do tipo de delineamento adotado. Uma limitação deste estudo foi a pequena amostra composta por indivíduos com doença hepática avançada (28 pacientes, 14 em cada grupo genotípico – 1a ou 1b), pouco representativa considerando-se doenças pandêmicas e de alta prevalência como a infecção crônica pelo VHC. Portanto, com os resultados obtidos, torna-se prematuro chegar a alguma conclusão substancial com um maior nível de evidência sobre a real relação entre a diversidade nucleotídica da NS3 do VHC e a doença hepática avançada. De fato, Lara et al. conseguiram demonstrar tal associação através de um modelo matemático computacional onde a heterogeneidade genética em determinados sítios nucleotídicos do genoma do VHC, incluindo aqui a região NS3, correlacionava-se com a evolução da doença em 2 perfis evolutivos – pacientes com processo fibrogênico lento e rápido (239). Ainda, a natureza transversal deste estudo não permitiu estudar a relação temporal entre a exposição e o efeito. Neste tipo de delineamento, não é possível avaliar fenômenos

evolucionários como a tendência da ocorrência de diversificação genética da NS3 no hospedeiro durante o tempo total de infecção e sua eventual associação com a progressão da fibrose. O desenho longitudinal permitiria a análise da região NS3 em dois pontos distintos no tempo evolutivo, permitindo a comparação da diversidade, complexidade e divergência das quasiespécies empregando inclusive testes estatísticos mais robustos.

A falha terapêutica observada em esquemas compostos por DAAs quase sempre está associada a emergência de variantes virais que albergam mutações associadas a resistência, principalmente quando se utilizam drogas de baixa barreira genética como no caso de alguns representantes da classe dos IPs e dos inibidores da NS5A (114). A terapia baseada em peginterferon e ribavirina produz clareamento viral de maneira indireta, uma vez que estes fármacos não possuem atividade antiviral (não se ligam a proteínas alvo do VHC como na terapia DAA) (198). Entretanto, o interferon através de sua atividade imunomoduladora é capaz de acentuar a resposta imune dirigida contra determinados epítomos do VHC, aqui incluindo seguimentos da região NS3/NS4A e NS5A, em tese promovendo variabilidade genética através de pressão seletiva com eventual surgimento de variantes associadas a resistência no pool de quasiespécies do hospedeiro (240).

A análise de diversidade e de pressão seletiva realizada nos 104 indivíduos com história prévia de tratamento com interferon e ribavirina não demonstrou uma maior diversidade das sequências nucleotídicas da NS3 em relação ao grupo total de estudo e nem predomínio de seleção diversificadora. Este resultado foi compatível com achados de outros dois estudos, que analisaram inclusive pacientes coinfectados pelo VHC e HIV em suas casuísticas. Chary et al. avaliaram 26 pacientes com hepatite C crônica coinfectados pelo HIV tratados com peginterferon e ribavirina e demonstraram que o uso prévio deste esquema não esteve associado, no período pós tratamento, com uma maior diversidade da região NS3 e nem com surgimento de mutações de resistência aos IPs em

resíduos enzimáticos pré-estabelecidos (241). Sede et al. avaliaram de forma prospectiva por sequenciamento de nova geração (*ultra-deep sequencing*) a região NS3 e NS5B de dezoito pacientes coinfectados pelo VHC genótipo 1a e pelo HIV submetidos a este tipo de tratamento. Mutações associadas a resistência foram identificadas em todas as posições analisadas na totalidade dos indivíduos estudados em ambas as regiões (NS3/NS4A e NS5B), com uma frequência oscilante e, principalmente, sem uma associação ou mesmo um padrão definido pela progressão da terapêutica (207). Assim, estes resultados sugerem que a falha terapêutica com interferon e ribavirina não parece estar associada com o aumento da frequência de polimorfismos / mutações de resistência aos DAAs, mesmo em pacientes coinfectados pelo VHC e HIV.

Em suma, os resultados obtidos por este estudo sugerem que no Brasil há baixa prevalência de substituições de ocorrência natural na região NS3/NS4A do VHC associadas a diminuição de susceptibilidade aos IPs, inclusive em pacientes coinfectados pelo HIV. É importante ressaltar que nenhuma mutação na protease viral sabidamente capaz de influenciar a taxa de RVS em um eventual tratamento foi identificada na amostra avaliada. O VHC é caracterizado por sua grande diversidade, de modo que algumas variantes virais altamente adaptadas podem se encontrar restritas a regiões geograficamente delimitadas, mantendo-se ativas na cadeia de transmissão sem perda de efetividade. O perfil genético do VHC brasileiro parece bastante peculiar, fato este fortalecido pela elevada frequência de substituições na posição 122 da protease no genótipo 1b e pela ausência da mutação Q80K no genótipo 1a, sendo tais eventos incomuns em dados obtidos de publicações internacionais. O entendimento da variabilidade genética regional do VHC permite um maior embasamento na formulação de diretrizes e guias locais, adequando a terapêutica da hepatite C crônica ao perfil brasileiro. Tal reconhecimento tem o potencial de promover o uso seguro e otimizado de

esquemas contendo IPs e de questionar a real necessidade da realização de testes genotípicos para a avaliação de resistência no período pré-tratamento, tendo aqui inclusive impacto econômico. Em vista do exposto, estudos adicionais envolvendo pacientes procedentes das várias regiões brasileiras são necessários para confirmar tais achados.

7 CONCLUSÕES

As substituições de aminoácidos de ocorrência natural na região NS3/NS4A do VHC consistiram majoritariamente por polimorfismos naturais sem impacto clínico na taxa de RVS em um eventual tratamento que envolva o uso de IPs.

A prevalência de substituições associadas a resistência aos IPs foi baixa e compatível com os valores informados pela maioria dos estudos nacionais e internacionais. A presença da substituição Q80K parece ser incomum no Brasil.

A infecção pelo HIV não esteve associada com uma maior frequência de substituições na região da protease do VHC em pacientes coinfectados com um bom controle imunológico.

A região NS3 do genótipo 1b foi altamente variável em relação ao genótipo 1a, reforçando o conceito de possíveis diferenças geográficas em relação ao perfil genético do VHC.

Embora alguns marcadores bioquímicos que se alteram na doença hepática tenham se associado com a presença de substituições na protease do VHC, a caracterização da hepatopatia avançada através de escore indireto FIB-4 não confirmou tal achado.

8 ANEXOS

ANEXO A – Perfil de resistência dos inibidores da protease NS3/NS4A do VHC Fontes: Cento 2012; Sarrazin 2016; Wyles 2013; Lontok 2015 (113,139,155,157)

Inibidores de protease (NS3/NS4A)	Posições dos aminoácidos													
Aminoácido natural	V	Q	F	T	V	Y	Q	S	R	A	V	D	IV	M
	36	41	43	54	55	56	80	122	155	156	158	168	170	175
Boceprevir	ACGIM	R	CSIL	AS	A				GTK	FGSTV	I		ALT	L
Telaprevir	ACGLM		CIS	AS	A				GTIKINSW	FGSTV			AT	
Simeprevir	M	R	IVIS				HKR	R	KT	GTV		ACEGNHTIKVY	AT	
Paritaprevir	ACGLM		L		H	KLR			GTIKINSW	TV		ACEGNHTIKVY		
Asunaprevir	ALIM		S		AI		KR	R	K	FGSTV		ACEGNHTIKVY	AT	
Faldaprevir	M			S		KLR			KQ	TV		AGV		
Danoprevir						K			KQ			AETV		
Sovaprevir									TK			HEGV		
Vaniprevir			S						GKINQST	GSV		AEIGNTVY		
Grazoprevir									KQ	AGSTV		ACEGNHTIKY		

ANEXO B – Ficha de coleta de dados**IDENTIFICAÇÃO:**

NOME: _____
 REGISTRO: _____
 CENTRO DE ORIGEM: _____
 SEXO: ☐ M ☐ F
 DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____
 ANO PRIMEIRA SOROLOGIA PARA VHC: _____
 ANO PROVÁVEL DA INFECÇÃO PELO VHC [SE DISPONÍVEL]: _____

COMORBIDADES: ☐ HAS ☐ DM ☐ HTLV ☐ OUTRO(S): _____

FATORES DE RISCO PARA AQUISIÇÃO VIRAL:

☐ TRANSFUSÃO DE SANGUE ANTES DE 1993: _____
☐ CIRURGIA OU PROCEDIMENTO INVASIVO – ANO: _____
☐ USO DE DROGA INJETÁVEL
☐ USO DE DROGA INALATÓRIA
☐ TATUAGEM / PIERCING
☐ CONTATO SEXUAL DE RISCO
☐ EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL
☐ CONTATO INTRADOMICILIAR PORTADOR DE VHC
☐ IGNORADO

PERFIL VHC:

GENÓTIPO: _____
 PCR VHC QUANTITATIVO MAIS RECENTE: ☐ S ☐ N
 DATA: ____/____/____
 VALOR _____ UNIDADE _____ LOG: _____

PERFIL HIV:

TARV NOS ÚLTIMOS 6 MESES ANTES DA COLETA DA AMOSTRA: ☐ S ☐ N
 ESQUEMA ATUAL: _____
 ANO DO INÍCIO DE PRIMEIRO ESQUEMA TARV: _____

LTCD4 (NADIR): _____ DATA: ____
 /____/_____
 LTCD4 MAIS RECENTE: _____ DATA: ____
 /____/_____
 CARGA VIRAL HIV MAIS RECENTE: _____ DATA: ____
 /____/_____
 /____/_____

HISTÓRIA DOENÇA DEFINIDORA DE AIDS: ☐ S ☐ N**EXAMES LABORATORIAIS RECENTES:**

AST/ALT: ____/____ FA/gamagt: ____/____ BT/D: ____/____ PT/ALB: ____/____ TAP/INR: ____/____
 LEUCOGRAMA: _____ PLAQUETAS: _____

BX HEPÁTICA: MÊS/ANO: ____/____

SBPH: AE: ____ IIP: ____ APP: ____ AP: ____ **METAVIR:** A ____ F ____
 MARC. ETIOL.: ESTEAT. (GRAU): ____ A. LINF.: () A. DUCTAL: () OUTRAS: ____

TRATAMENTO HCV PRÉVIO: ☐ S ☐ N

TEMPO MÍNIMO PRECONIZADO (48 S.): ☐ S ☐ N

TIPO DE RESPOSTA TERAPÊUTICA OBTIDA:

() RESPONDEDOR () NÃO RESPONDEDOR () RECIDIVANTE () INDEFINIDO

ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL****1. NOME DO PACIENTE:**

DOC. DE IDENTIDADE No

SEXO:

DATA NASC:

ENDEREÇO

No.

APTO

BAIRRO

CIDADE:

CEP:

TELEFONE:

2. RESPONSÁVEL LEGAL:

NATUREZA: (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOC. DE IDENTIDADE:

SEXO:

DATA NASC:

ENDEREÇO

No.

APTO

BAIRRO

CIDADE:

CEP:

TELEFONE:

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CLINICA**1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA**

Identificação de mutações primárias para inibidores de protease e polimerase para o vírus da hepatite C em pacientes com hepatite C crônica, co-infectados pelo vírus da imunodeficiência humana. Estudo de uma série de casos.

2. PESQUISADOR: Dra. Maria Cássia Jacintho Mendes Corrêa**CARGO/FUNÇÃO:** Médico Assistente**INSC. CONS. REGIONAL** No **52275****UNIDADE DA FMABC- CEPES-URDIP**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

SEM RISCO: ☐ RISCO MÍNIMO: X RISCO MÉDIO: ☐ RISCO MAIOR: ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: Doze meses para coleta das amostras

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU EU REPRESENTANTE LEGAL

1. Justificativa e Objetivos da pesquisa

Você está sendo convidado a participar desse estudo, pois nós sabemos que você é infectado pelo vírus da hepatite C. O objetivo de nosso estudo é saber se entre as pessoas que têm a infecção pelo vírus da hepatite C, existem pessoas com mutações ou "variações" desse vírus que possam ser naturalmente "resistentes" aos novos medicamentos que estão sendo propostos para o tratamento dessa infecção. Ou seja, queremos saber se entre nós existem pessoas que tenham hepatite C, e que já possam ter resistência aos novos medicamentos que vão começar a ser usados em quem precisa tratar a hepatite C.

2. Procedimentos

Para poder participar deste estudo, você precisa ser um adulto portador de hepatite crônica C e preencher todas as características exigidas pelo protocolo. O seu médico irá avaliar se você tem essas características, e após a explicação de todos os procedimentos, você poderá decidir se quer ou não participar.

Caso você deseje participar do estudo, uma amostra de seu sangue será coletada para que alguns exames relativos à sua infecção pelo vírus da hepatite C sejam realizados. **O convite para sua participação nesse estudo será realizado durante consulta de rotina com seu médico e a coleta de sangue (caso você concorde em participar) será realizada durante a coleta dos exames de rotina que seu médico costuma solicitar, sem que essa coleta adicional represente qualquer trabalho adicional ou gasto extra (relativo a transporte). Após a coleta de sangue, o material ficará estocado em freezer no CRT Santa Cruz, até ser transportado para o laboratório onde os exames serão realizados. Nenhum exame adicional além dos previstos nesse estudo será realizado caso haja qualquer "sobra" do material coletado.**

Esses exames são para se conhecer o tipo de vírus C que você carrega. Ou seja, será realizado exame para se tentar verificar, se o vírus da hepatite C que você

tem, apresenta mutações que determinam resistência aos medicamentos usados para o tratamento da hepatite C.

Esses exames não são realizados de forma rotineira no tratamento de pessoas com seu problema. Os riscos envolvidos na coleta de sangue são: hematoma no local da punção e dor. Sua participação no estudo é voluntária.

Caso você não deseje participar do estudo, não haverá qualquer modificação no seu atendimento médico no Centro Referência Tratamento – CRT Santa Cruz, São Paulo-SP.

3. Benefícios

As informações obtidas através desse estudo são importantes para o seu atendimento médico e também você poderá estar ajudando futuros pacientes pela possibilidade de proporcionar informações importantes para o seguimento e tratamento da hepatite C crônica. **Não está prevista qualquer forma de pagamento para sua participação nesse estudo.**

4. Desconforto e Riscos

Coleta de Sangue: A coleta de sangue será realizada durante a coleta de exames de rotina, solicitados por seu médico. A coleta de sangue é levemente dolorosa e pode causar hematomas e, muito raramente, desmaio, coágulos sangüíneos ou uma infecção no local da injeção. **Caso haja qualquer complicação decorrente da coleta de sangue, você será atendido por médico da equipe responsável pelo estudo e se necessário será encaminhado para complementação de tratamento (inclusive internação, se necessária) no CRT Santa Cruz. A equipe do CRT Santa Cruz será responsável por seu atendimento médico, não havendo nenhuma indenização especial prevista para a eventualidade de qualquer complicação decorrente desse procedimento.**

5. Alternativas

Não há nenhum outro meio de obtermos as informações que desejamos além das medidas que esse estudo propõe.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. Você terá garantia, a qualquer tempo, que receberá as informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecimentos de qualquer dúvida.
2. Sua participação neste estudo é completamente voluntária. Você pode recusar a participar do estudo ou poderá descontinuar sua participação do mesmo, a qualquer momento, sem qualquer penalidade ou perda dos benefícios aos quais de outra forma faria jus. A Dra. Maria Cássia Corrêa irá prontamente aconselhá-lo sobre suas dúvidas. Se você decidir interromper sua participação no estudo, você deverá entrar em contato com o as pessoas responsáveis pelo estudo no telefone (11) 44946900, de forma a permitir que os procedimentos de finalização de sua participação no estudo possam ser iniciados.
3. **Haverá consulta de todos os dados relativos à sua história médica, que constam em seu prontuário, durante a realização desse estudo.** No entanto, sua participação neste estudo será mantida em caráter confidencial e seu nome não será revelado a ninguém que não seja do estudo. Autoridades governamentais nacionais responsáveis pela segurança e conduta ética dos estudos com seres humanos poderão revisar os registros do estudo, e os registros poderão ser submetidos à divulgação decorrente de outras ordens ou requisitos governamentais. Caso os resultados deste estudo sejam publicados na literatura médica, você não será identificado nominalmente, sendo sua confidencialidade garantida em todas as ocasiões. O comitê de ética poderá ter acesso direto ao seu prontuário médico para verificação dos procedimentos de finalização de sua participação no estudo possam ser iniciados.
4. Você compreende que a Dra. Maria Cássia Corrêa tem o direito de interromper sua participação neste estudo, caso você não siga as instruções do mesmo, ou se considerar que esta interrupção seria de maior benefício para você. Caso seja descoberta qualquer nova informação significativa sobre sua doença enquanto este estudo estiver sendo desenvolvido, você será imediatamente informado e poderá decidir continuar ou interromper sua participação.
5. Caso você venha apresentar indicação de internação hospitalar por qualquer motivo relacionado a esse estudo, ela será feita preferencialmente via CRT Santa Cruz, São Paulo – SP.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA.

Você será incentivado a fazer perguntas, em qualquer ocasião durante o estudo. Caso você tenha perguntas sobre o estudo ou sobre seus direitos como paciente, por favor entre em contato com a Dra. Maria Cássia Jacintho M. Corrêa, no telefone (11) 4494-6900.

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

NENHUMA

VII. CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO:

Eu li este Termo de Consentimento Livre e esclarecido e tive a oportunidade de discuti-lo com um dos membros da pesquisa. Todas as minhas perguntas foram respondidas. Eu fui informado sobre os riscos e benefícios e concordo de livre e espontânea vontade em participar deste estudo.

Eu entendo que posso sair do estudo a qualquer momento e que isso não afetará meu tratamento futuro.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do paciente ou seu representante legal

Data ____/____/____

Assinatura do Investigador que obteve o Consentimento, sob carimbo

Data ____/____/____

ANEXO D - Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0850/11

Título: ANÁLISE DA EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO PELO VIRUS DA HEPATITE C EM DOADORES DE SANGUE DA FUNDAÇÃO PRÓ-SANGUE/ HEMOCENTRO DE SÃO PAULO

Pesquisador Responsável: Maria Cassia Jacitinho Mendes Correa

Pesquisador Executante: a mesma

Co-autores: Estér Sabino

Departamento: MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 06/11/2013, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

•Carta datada de 25.09.13 - Solicitação de ampliação da técnica de fenotipagem do VHC e Inclusão dos pesquisadores: Sorala Mafra Machado, Gaspar Lisboa Neto e Karine Vieira Gaspareto + Relatório parcial da pesquisa

CAPPesq, 06 de Novembro de 2013

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Conte Co 7/11/2013

ANEXO E - Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Cópia

Nº Protocolo: 0704/11

Título: IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES PRIMÁRIAS PARA INIBIDORES DE PROTEASE E POLIMERASE PARA O VÍRUS DA HEPATITE C EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA, CO-INFECTADOS PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA. ESTUDO DE UMA SÉRIE DE CASOS.

Pesquisador Responsável: Maria Cassia Jacintho Mendes Correa

Pesquisador Execulante: a mesma

Co-autores: João Renato Rebello Pinho, Mônica Viviana Alvarado Moro, Michele Soares Gomes-Gouvêa, Flair José Carrilho

Departamento: MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 01/02/2012, o protocolo acima.

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) a elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 01 de Fevereiro de 2012

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Conte
2/02/2012
Co

9 REFERÊNCIAS

1. Alter H. Discovery of non-A, non-B hepatitis and identification of its etiology. *Am J Med.* 1999;107(6B):16S–20S.
2. Houghton M. Discovery of the hepatitis C virus. *Liver Int.* 2009;29(S1):82–8.
3. Aguilera Guirao A, Romero Yuste S, Regueiro BJ. Epidemiology and clinical manifestations of viral hepatitis. *Enfermedades Infecc y Microbiol clínica.* 2006;24(4):264–76.
4. Shire NJ, Sherman KE. Epidemiology of Hepatitis C Virus. A Battle on New Frontiers. *Gastroenterol Clin North Am.* 2015;44(4):699–716.
5. Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology.* 2013;57(4):1333–42.
6. Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 2014;61(1):S45–57.
7. World Health Organization (WHO). Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection (update). 2016;1–138.
8. Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol. European Association for the Study of the Liver;* 2014;61(1):S58–68.
9. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age–sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 2015;385(9963):117–71.
10. Alvarado-Mora M V, Pinho JRR. Epidemiological update of hepatitis B, C and

- delta in Latin America. *Antivir Ther.* 2013;18(3 Pt B):429–33.
11. Méndez-Sánchez N, Paraná R, Cheinquer H, Alves de Mattos A, Gadano A, Silva M, et al. Latin American Association for the Study of the Liver recommendations on treatment of hepatitis C. *Ann Hepatol.* 2014;13 Suppl 2(2):s4-66.
 12. Amaku M, Burattini MN, Coutinho FAB, Lopez LF, Mesquita F, Naveira MCM, et al. Estimating the Size of the HCV Infection Prevalence: A Modeling Approach Using the Incidence of Cases Reported to an Official Notification System. *Bull Math Biol.* 2016;78(5):970–90.
 13. Pereira LMMB, Martelli CMT, Moreira RC, Merchan-Hamman E, Stein AT, Cardoso MRA, et al. Prevalence and risk factors of Hepatitis C virus infection in Brazil, 2005 through 2009: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis.* 2013;13:60.
 14. Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico hepatites virais. Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. 2015;1–25.
 15. Wasley A, Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis.* 2000;20(1):1–16.
 16. Chan DPC, Sun H-Y, Wong HTH, Lee S-S, Hung C-C. Sexually acquired hepatitis C virus infection: a review. *Int J Infect Dis. International Society for Infectious Diseases;* 2016;49(March):47–58.
 17. Urbanus AT, Van De Laar TJW, Geskus R, Vanhommerig JW, Van Rooijen MS, Schinkel J, et al. Trends in hepatitis C virus infections among MSM attending a sexually transmitted infection clinic; 1995–2010. *AIDS.* 2014;28(5):781–90.
 18. Dubuisson J, Cosset FL. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle - An update. *J Hepatol.* 2014;61(1):S3–13.
 19. Pavio N, Lai MMC. The hepatitis C virus persistence: how to evade the immune system? *J Biosci.* 2003;28(3):287–304.

-
20. Scheel TKH, Rice CM. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat Med*. 2013;19(7):837–49.
 21. Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(3):215–29.
 22. López-Labrador FX, Berenguer M, Sempere A, Prieto M, Sirera R, González-Molina A, et al. Genetic variability of hepatitis C virus NS3 protein in human leukocyte antigen-A2 liver transplant recipients with recurrent hepatitis C. *Liver Transpl*. 2004;10(2):217–27.
 23. Foy E, Li K, Wang C, Sumpter R, Ikeda M, Lemon SM, et al. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science*. 2003;300(5622):1145–8.
 24. Ahmed A, Felmlee D. Mechanisms of Hepatitis C Viral Resistance to Direct Acting Antivirals. *Viruses*. 2015;7(12):6716–29.
 25. Racanelli V, Manigold T. Presentation of HCV antigens to naive CD8+T cells: why the where, when, what and how are important for virus control and infection outcome. *Clin Immunol*. 2007;124(1):5–12.
 26. Sakata K, Hara M, Terada T, Watanabe N, Takaya D, Yaguchi S, et al. HCV NS3 protease enhances liver fibrosis via binding to and activating TGF- β type I receptor. *Sci Rep*. 2013;3:3243.
 27. Chatel-Chaix L, Melançon P, Racine M-È, Baril M, Lamarre D. Y-box-binding protein 1 interacts with hepatitis C virus NS3/4A and influences the equilibrium between viral RNA replication and infectious particle production. *J Virol*. 2011;85(21):11022–37.
 28. Romero-Brey I, Merz A, Chiramel A, Lee J-Y, Chlanda P, Haselman U, et al. Three-Dimensional Architecture and Biogenesis of Membrane Structures

- Associated with Hepatitis C Virus Replication. *PLoS Pathog.* 2012;8(12):e1003056.
29. Lesburg CA, Cable MB, Ferrari E, Hong Z, Mannarino AF, Weber PC. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat Struct Biol.* 1999;6(10):937–43.
30. Li H-C, Lo S-Y. Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and treatment. *World J Hepatol.* 2015;7(10):1377–89.
31. Heim MH, Thimme R. Innate and adaptive immune responses in HCV infections. *J Hepatol.* 2014;61(1):S14–25.
32. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Delage G, Enomoto N, Feinstone S, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology.* 2005;42(4):962–73.
33. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology.* 2014;59(1):318–27.
34. Lingala S, Ghany MG. Natural History of Hepatitis C. *Gastroenterol Clin North Am.* 2015;44(4):717–34.
35. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology.* 2015;61(1):77–87.
36. Campiotto S, Pinho JRR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJD, Spinelli V, et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Brazilian J Med Biol Res.* 2005;38(1):41–9.
37. Lampe E, Lewis-Ximenez L, Espírito-Santo MP, Delvaux NM, Pereira SA, Peres-

- da-Silva A, et al. Genetic diversity of HCV in Brazil. *Antivir Ther.* 2013;18(3 Pt B):435–44.
38. Mendes-Correa MC, Cavaleiro NP, Mello C, Barone AA, Gianini RJ. Genotypic distribution of hepatitis C among hepatitis C and HIV co-infected patients in Brazil. *Int J STD AIDS.* 2008;19(9):595–9.
39. Oliveira ML a, Yoshida CFT, Telles PR, Hacker M a, Oliveira S a N, Miguel JC, et al. Trends in HCV prevalence, risk factors and distribution of viral genotypes in injecting drug users: findings from two cross-sectional studies. *Epidemiol Infect.* 2009;137(7):970–9.
40. Jaspe RC, Sulbaran YF, Loureiro CL, Martinez N, Devesa M, Rodriguez Y, et al. Genetic diversity of hepatitis B virus and hepatitis C virus in human immunodeficiency virus type 1-co-infected patients from Venezuela. *J Med Microbiol.* 2014;63(Pt_8):1099–104.
41. Romano CM, de Carvalho-Mello IMVG, Jamal LF, de Melo FL, Iamarino A, Motoki M, et al. Social Networks Shape the Transmission Dynamics of Hepatitis C Virus. *PLoS One.* 2010;5(6):e11170.
42. Probst A, Dang T, Bochud M, Egger M, Negro F, Bochud P-Y. Role of Hepatitis C virus genotype 3 in liver fibrosis progression - a systematic review and meta-analysis. *J Viral Hepat.* 2011;18(11):745–59.
43. Cuypers L, Ceccherini-Silberstein F, Van Laethem K, Li G, Vandamme A-M, Rockstroh JK. Impact of HCV genotype on treatment regimens and drug resistance: a snapshot in time. *Rev Med Virol.* 2016;19(1):57–64.
44. Farci P, Shimoda A, Coiana A, Diaz G, Peddis G, Melpolder JC, et al. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science.* 2000;288(5464):339–44.

45. Wang X-H, Netski DM, Astemborski J, Mehta SH, Torbenson MS, Thomas DL, et al. Progression of fibrosis during chronic hepatitis C is associated with rapid virus evolution. *J Virol*. 2007;81(12):6513–22.
46. Qin H. HCV quasispecies evolution: association with progression to end-stage liver disease in hemophiliacs infected with HCV or HCV/HIV. *Blood*. 2005;105(2):533–41.
47. Wyles DL. Hepatitis C Virus Drug Resistance. *Infect Dis Clin North Am*. 2012;26(4):967–78.
48. Astrakhantseva I V, Campo DS, Araujo A, Teo C-G, Khudyakov Y, Kamili S. Differences in variability of hypervariable region 1 of hepatitis C virus (HCV) between acute and chronic stages of HCV infection. *In Silico Biol*. 11(5–6):163–73.
49. Vallet S, Gouriou S, Nkontchou G, Hotta H, Vilerio M, Legrand-Quillien MC, et al. Is hepatitis C virus NS3 protease quasispecies heterogeneity predictive of progression from cirrhosis to hepatocellular carcinoma? *J Viral Hepat*. 2007;14(2):96–106.
50. Afdhal NH. The natural history of hepatitis C. *Semin Liver Dis*. 2004;24 Suppl 2:3–8.
51. Cho Y-K, Kim YN, Song B-C. Predictors of spontaneous viral clearance and outcomes of acute hepatitis C infection. *Clin Mol Hepatol*. 2014;20(4):368.
52. Dhingra S, Ward SC, Thung SN. Liver pathology of hepatitis C, beyond grading and staging of the disease. *World J Gastroenterol*. 2016;22(4):1357–66.
53. Maasoumy B, Wedemeyer H. Natural history of acute and chronic hepatitis C. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2012;26(4):401–12.
54. Trautwein C, Friedman SL, Schuppan D, Pinzani M. Hepatic fibrosis: Concept to

- treatment. *J Hepatol.* 2015;62(S1):S15–24.
55. Wong T. Hepatitis C: a review for primary care physicians. *Can Med Assoc J.* 2006;174(5):649–59.
 56. Delahooke TES. Hepatitis C: What is the nature of the problem? *J Viral Hepat.* 2004;11 Suppl 1:5–11.
 57. Poynard T, Ratziu V, Benmanov Y, Di Martino V, Bedossa P, Opolon P. Fibrosis in patients with chronic hepatitis C: detection and significance. *Semin Liver Dis.* 2000;20(1):47–55.
 58. Castera L. Assessing liver fibrosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* Taylor & Francis; 2008;2(4):541–52.
 59. Kaplan DE. Immunopathogenesis of Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterol Clin North Am.* 2015;44(4):735–60.
 60. Ryan EJ, O’Farrelly C. The affect of chronic hepatitis C infection on dendritic cell function: a summary of the experimental evidence. *J Viral Hepat.* 2011;18(9):601–7.
 61. Féray C, Gigou M, Samuel D, Ducot B, Maisonneuve P, Reynès M, et al. Incidence of hepatitis C in patients receiving different preparations of hepatitis B immunoglobulins after liver transplantation. *Ann Intern Med.* 1998;128(10):810–6.
 62. Pawlotsky J-M. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol.* 2004;12(2):96–102.
 63. Kanto T, Hayashi N. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity. *Intern Med.* 2006;45(4):183–91.
 64. Tang L, Marcell L, Kottlil S, Hahn T, Rice C, Kohli A, et al. Systemic

- manifestations of hepatitis C infection. *Infect Agent Cancer*. BioMed Central; 2016;11(1):29.
65. Negro F. Facts and fictions of HCV and comorbidities: Steatosis, diabetes mellitus, and cardiovascular diseases. *J Hepatol*. European Association for the Study of the Liver; 2014;61(1):S69–78.
66. Ishizaka N, Ishizaka Y, Takahashi E, Tooda E, Hashimoto H, Nagai R, et al. Association between hepatitis C virus seropositivity, carotid-artery plaque, and intima-media thickening. *Lancet*. 2002;359(9301):133–5.
67. Batista-Neves SC, Quarantini LC, de Almeida AG, Bressan RA, Lacerda AL, De-Oliveira IR, et al. High frequency of unrecognized mental disorders in HCV-infected patients. *Gen Hosp Psychiatry*. 2008;30(1):80–2.
68. Monaco S, Mariotto S, Ferrari S, Calabrese M, Zanusso G, Gajofatto A, et al. Hepatitis C virus-associated neurocognitive and neuropsychiatric disorders: Advances in 2015. *World J Gastroenterol*. 2015;21(42):11974–83.
69. Soriano V, Puoti M, Sulkowski M, Cargnel A, Benhamou Y, Peters M, et al. Care of patients coinfecting with HIV and hepatitis C virus: 2007 updated recommendations from the HCV-HIV International Panel. *AIDS*. 2007;21(9):1073–89.
70. Alter M. Epidemiology of viral hepatitis and HIV co-infection. *J Hepatol*. 2006;44(1 Suppl):S6–9.
71. Platt L, Easterbrook P, Gower E, McDonald B, Sabin K, McGowan C, et al. Prevalence and burden of HCV co-infection in people living with HIV: a global systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(7):797–808.
72. Rao VB, Johari N, du Cros P, Messina J, Ford N, Cooke GS. Hepatitis C seroprevalence and HIV co-infection in sub-Saharan Africa: A systematic review

- and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2015;15(7):819–24.
73. Kuehlkamp VM, Schuelter-Trevisol F. Prevalence of human immunodeficiency virus/hepatitis C virus co-infection in Brazil and associated factors: a review. *Brazilian J Infect Dis*. 2013;17(4):455–63.
74. Chen JY, Feeney ER, Chung RT. HCV and HIV co-infection: mechanisms and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11(6):362–71.
75. Weber R, Sabin CA, Friis-Møller N, Reiss P, El-Sadr WM, Kirk O, et al. Liver-related deaths in persons infected with the human immunodeficiency virus: the D:A:D study. *Arch Intern Med*. 2006;166(15):1632–41.
76. Mohsen AH, Easterbrook PJ, Taylor C, Portmann B, Kulasegaram R, Murad S, et al. Impact of human immunodeficiency virus (HIV) infection on the progression of liver fibrosis in hepatitis C virus infected patients. *Gut*. 2003;52(7):1035–40.
77. Soriano V, Vispo E, Fernandez-Montero JV, Labarga P, Barreiro P. Update on HIV/HCV Coinfection. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2013;10(3):226–34.
78. Konerman MA, Yapali S, Lok AS. Systematic review: identifying patients with chronic hepatitis C in need of early treatment and intensive monitoring - predictors and predictive models of disease progression. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;40(8):863–79.
79. Ioannou GN, Bryson CL, Weiss NS, Miller R, Scott JD, Boyko EJ. The prevalence of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in patients with human immunodeficiency virus infection. *Hepatology*. 2013;57(1):249–57.
80. Wegzyn C, Wyles D. Antiviral drug advances in the treatment of human immunodeficiency virus (HIV) and chronic hepatitis C virus (HCV). *Curr Opin Pharmacol*. 2012;12(5):556–61.
81. Tan-Tam CC, Frassetto LA, Stock PG. Liver and kidney transplantation in HIV-

- infected patients. *AIDS Rev.* 11(4):190–204.
82. Barreiro P, Vispo E, Labarga P, Soriano V. Management and treatment of chronic hepatitis C in HIV patients. *Semin Liver Dis.* 2012;32(2):138–46.
83. Boesecke C, Rockstroh JK. Treatment of Chronic HCV Genotype 1 Coinfection. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2015;12(3):326–35.
84. Rockstroh JK, Hardy WD. Current treatment options for hepatitis C patients co-infected with HIV. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016;10(6):689–95.
85. Christensen S, Mauss S, Hueppe D, Schewe K, Lutz T, Rockstroh J, et al. Objective Directly Acting Agents Against HCV -Results From the German Hepatitis C Cohort (GECCO) [Internet]. 2016 [cited 2016 Nov 10]. Available from: <http://www.croiconference.org>
86. Neukam K, Suárez-Santamaría M, Rivero-Juárez A, Romero-Palacios A, Ortega E, de los Santos-Gil I, et al. HIV Coinfection Impairs Response to DAA-Based HCV Therapy. *J Hepatol.* 2016;64(2):S219.
87. European Association for the Study of the Liver. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016. *J Hepatol.* 2016;63(1):199–236.
88. AASLD. Hepatitis C guidance: AASLD-IDS recommendations for testing, managing, and treating adults infected with hepatitis C virus [Internet]. 2016 [cited 2016 Nov 5]. Available from: <http://www.hcvguidelines.org/full-report-view>
89. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. 2015;1–88.
90. Backus LI, Boothroyd DB, Phillips BR, Belperio P, Halloran J, Mole LA. A sustained virologic response reduces risk of all-cause mortality in patients with hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2011;9(6):509–516.e1.

-
91. Strader DB, Seeff LB. A brief history of the treatment of viral hepatitis C. *Clin Liver Dis.* 2012;1(1):6–11.
 92. McHutchison JG, Lawitz EJ, Shiffman ML, Muir AJ, Galler GW, McCone J, et al. Peginterferon alfa-2b or alfa-2a with ribavirin for treatment of hepatitis C infection. *N Engl J Med.* 2009;361(6):580–93.
 93. Feld JJ, Hoofnagle JH. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature.* 2005;436(7053):967–72.
 94. Welsch C, Jesudian A, Zeuzem S, Jacobson I. New direct-acting antiviral agents for the treatment of hepatitis C virus infection and perspectives. *Gut.* 2012;61 Suppl 1(Suppl 1):i36-46.
 95. Fourati S, Pawlotsky JM. Virologic tools for HCV drug resistance testing. *Viruses.* 2015;7(12):6346–59.
 96. Coppola N, Minichini C, Starace M, Sagnelli C, Sagnelli E. Clinical impact of the hepatitis C virus mutations in the era of directly acting antivirals. *J Med Virol.* 2016;88(10):1659–71.
 97. Lamarre D, Anderson PC, Bailey M, Beaulieu P, Bolger G, Bonneau P, et al. An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature.* 2003;426(6963):186–9.
 98. Georgopapadakou N. Discontinued drugs in 2005: anti-infectives. *Expert Opin Investig Drugs.* 2007;16(1):1–10.
 99. Halfon P, Sarrazin C. Future treatment of chronic hepatitis C with direct acting antivirals: is resistance important? *Liver Int.* 2012;32 Suppl 1:79–87.
 100. Jacobson IM, Pawlotsky J-M, Afdhal NH, Dusheiko GM, Forns X, Jensen DM, et al. A practical guide for the use of boceprevir and telaprevir for the treatment of hepatitis C. *J Viral Hepat.* 2012;19:1–26.

101. Sitole M, Silva M, Spooner L, Comee MK, Malloy M. Telaprevir versus boceprevir in chronic hepatitis C: a meta-analysis of data from phase II and III trials. *Clin Ther.* 2013;35(2):190–7.
102. Stahmeyer JT, Rossol S, Bert F, Böker KHW, Bruch H-R, Eisenbach C, et al. Outcomes and Costs of Treating Hepatitis C Patients in the Era of First Generation Protease Inhibitors – Results from the PAN Study. *PLoS One.* 2016;11(7):e0159976.
103. Andreoni M, Giacometti A, Maida I, Meraviglia P, Ripamonti D, Sarmati L. HIV-HCV co-infection: epidemiology, pathogenesis and therapeutic implications. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012;16(11):1473–83.
104. Salmon D, Bani-Sadr F, Gilbert C, Rosenthal E, Valantin MA, Simon A, et al. HCV viral load at baseline and at week 4 of telaprevir/boceprevir based triple therapies are associated with virological outcome in HIV/hepatitis C co-infected patients. *J Clin Virol.* 2015;73:32–5.
105. Sulkowski MS. HCV therapy in HIV-infected patients. *Liver Int.* 2013;33(Table 1):63–7.
106. Nicolini LA, Menzaghi B, Ricci E, Martinelli C, Magni C, Maggi P, et al. Effectiveness of first-generation HCV protease inhibitors: does HIV coinfection still play a role? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2016;28(1):37–41.
107. Montes ML, Nelson M, Girard P-M, Sasadeusz J, Horban A, Grinsztejn B, et al. Telaprevir-based therapy in patients coinfecting with chronic hepatitis C virus infection and HIV: INSIGHT study. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(1):244–50.
108. Gutierrez JA, Lawitz EJ, Poordad F. Interferon-free, direct-acting antiviral therapy for chronic hepatitis C. *J Viral Hepat.* 2015;22(11):861–70.
109. Pawlotsky J-M, Al E. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2014.

- ILC 2014 London. 2014;63:199–236.
110. Kumar S, Jacobson IM. Antiviral therapy with nucleotide polymerase inhibitors for chronic hepatitis C. *J Hepatol. European Association for the Study of the Liver*; 2014;61(1):S91–7.
 111. Welzel TM, Dultz G, Zeuzem S. Interferon-free antiviral combination therapies without nucleosidic polymerase inhibitors. *J Hepatol. European Association for the Study of the Liver*; 2014;61(1):S98–107.
 112. Wang LS, D’Souza LS, Jacobson IM. Hepatitis C- A clinical review. *J Med Virol*. 2016;30(12):4799–804.
 113. Sarrazin C. The importance of resistance to direct antiviral drugs in HCV infection in clinical practice. *J Hepatol*. 2016;64(2):486–504.
 114. Pawlotsky J-M. Hepatitis C Virus Resistance to Direct-Acting Antiviral Drugs in Interferon-Free Regimens. *Gastroenterology*. 2016;151(1):70–86.
 115. Lawitz E, Sulkowski MS, Ghalib R, Rodriguez-Torres M, Younossi ZM, Corregidor A, et al. Simeprevir plus sofosbuvir, with or without ribavirin, to treat chronic infection with hepatitis C virus genotype 1 in non-responders to pegylated interferon and ribavirin and treatment-naïve patients: The COSMOS randomised study. *Lancet*. 2014;384(9956):1756–65.
 116. González-Grande R, Jiménez-Pérez M, González Arjona C, Mostazo Torres J. New approaches in the treatment of hepatitis C. *World J Gastroenterol*. 2016;22(4):1421–32.
 117. Poordad F, Hezode C, Trinh R, Kowdley K V, Zeuzem S, Agarwal K, et al. ABT-450/r-ombitasvir and dasabuvir with ribavirin for hepatitis C with cirrhosis. *N Engl J Med*. 2014;370(21):1973–82.
 118. Lawitz E, Gane E, Pearlman B, Tam E, Ghesquiere W, Guyader D, et al. Efficacy

- and safety of 12 weeks versus 18 weeks of treatment with grazoprevir (MK-5172) and elbasvir (MK-8742) with or without ribavirin for hepatitis C virus genotype 1 infection in previously untreated patients with cirrhosis and patients with previous . *Lancet*. 2014;385(9973):1075–86.
119. Roth D, Nelson DR, Bruchfeld A, Liapakis A, Silva M, Monsour H, et al. Grazoprevir plus elbasvir in treatment-naïve and treatment-experienced patients with hepatitis C virus genotype 1 infection and stage 4-5 chronic kidney disease (the C-SURFER study): A combination phase 3 study. *Lancet*. 2015;386(10003):1537–45.
120. Muir AJ, Poordad F, Lalezari J, Everson G, Dore GJ, Herring R, et al. Daclatasvir in combination with asunaprevir and beclabuvir for hepatitis C virus genotype 1 infection with compensated cirrhosis. *JAMA*. 2015;313(17):1736–44.
121. Everson GT, Sims KD, Thuluvath PJ, Lawitz E, Hassanein T, Rodriguez-Torres M, et al. Daclatasvir + asunaprevir + beclabuvir ± ribavirin for chronic HCV genotype 1-infected treatment-naïve patients. *Liver Int*. 2016;36(2):189–97.
122. Gane E, Poordad F, Wang S, Asatryan A, Kwo PY, Lalezari J, et al. High Efficacy of ABT-493 and ABT-530 Treatment in Patients With HCV Genotype 1 or 3 Infection and Compensated Cirrhosis. *Gastroenterology*. 2016;151(4):651–659.e1.
123. Lawitz E, Reau N, Hineostroza F, Rabinovitz M, Schiff E, Sheikh A, et al. Efficacy of Sofosbuvir, Velpatasvir, and GS-9857 in Patients With Genotype 1 Hepatitis C Virus Infection in an Open-Label, Phase 2 Trial. *Gastroenterology*. 2016;151(5):893–901.e1.
124. Gane EJ, Kowdley K V., Pound D, Stedman CAM, Davis M, Etzkorn K, et al. Efficacy of Sofosbuvir, Velpatasvir, and GS-9857 in Patients With Hepatitis C Virus Genotype 2, 3, 4, or 6 Infections in an Open-Label, Phase 2 Trial.

- Gastroenterology. 2016;151(5):902–9.
125. Gane EJ, Schwabe C, Hyland RH, Yang Y, Svarovskaia E, Stamm LM, et al. Efficacy of the Combination of Sofosbuvir, Velpatasvir, and the NS3/4A Protease Inhibitor GS-9857 in Treatment-Naïve or Previously Treated Patients With Hepatitis C Virus Genotype 1 or 3 Infections. *Gastroenterology*. 2016;151(3):448–456.e1.
 126. Welzel T, Herzer K, Ferenci P, Petersen J, Gschwantler M, Cornberg M, et al. Daclatasvir plus sofosbuvir with or without ribavirin for the treatment of HCV in patients with severe liver disease: Interim results of a compassionate use program. *J Viral Hepat*. 2015;22:4–5.
 127. Poordad F, Schiff ER, Vierling JM, Landis C, Fontana RJ, Yang R, et al. Daclatasvir with sofosbuvir and ribavirin for hepatitis C virus infection with advanced cirrhosis or post-liver transplantation recurrence. *Hepatology*. 2016;63(5):1493–505.
 128. Nelson DR, Cooper JN, Lalezari JP, Lawitz E, Pockros PJ, Gitlin N, et al. All-oral 12-week treatment with daclatasvir plus sofosbuvir in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection: ALLY-3 phase III study. *Hepatology*. 2015;61(4):1127–35.
 129. Hezode C, De Ledinghen V, Fontaine H, Zoulim F, Lebray P, Boyer N, et al. Daclatasvir plus sofosbuvir with or without ribavirin in patients with HCV genotype 3 infection: Interim analysis of a French multicenter compassionate use program. *J Hepatol*. 2015;62:S265–6.
 130. Foster GR, Pianko S, Brown A, Forton D, Nahass RG, George J, et al. Efficacy of Sofosbuvir Plus Ribavirin with or Without Peginterferon-Alfa in Patients with Hepatitis C Virus Genotype 3 Infection and Treatment-Experienced Patients with

- Cirrhosis and Hepatitis C Virus Genotype 2 Infection. *Gastroenterology*. 2015;149(6):1462–70.
131. Abergel A, Loustaud-Ratti V, Metivier S, Jiang D, Kersey K, Knox SJ, et al. 0056 : Ledipasvir/sofosbuvir treatment results in high SVR rates in patients with chronic genotype 4 and 5 HCV infection. *J Hepatol*. 2015;62:S219–20.
132. Bonaventura A, Montecucco F. Sofosbuvir/velpatasvir: A promising combination. *World J Hepatol*. 2016;8(19):785.
133. Feld JJ, Jacobson IM, Hézode C, Asselah T, Ruane PJ, Gruener N, et al. Sofosbuvir and Velpatasvir for HCV Genotype 1, 2, 4, 5, and 6 Infection. *N Engl J Med*. 2015;373(27):2599–607.
134. Wyles D, Brau N, Kottitil S. Sofosbuvir/velpatasvir fixed dose combination for 12 weeks in patients co-infected with HCV and HIV-1: the phase 3 ASTRAL-5 study. *Progr Abstr 51st Annu Meet Eur Assoc Study Liver*. 2016;13–7.
135. Jacobson IM, Gordon SC, Kowdley K V., Yoshida EM, Rodriguez-Torres M, Sulkowski MS, et al. Sofosbuvir for Hepatitis C Genotype 2 or 3 in Patients without Treatment Options. *N Engl J Med*. 2013;368(20):1867–77.
136. Vermehren J, Sarrazin C. The role of resistance in HCV treatment. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2012;26(4):487–503.
137. Paolucci S, Fiorina L, Piralla A, Gulminetti R, Novati S, Barbarini G, et al. Naturally occurring mutations to HCV protease inhibitors in treatment-naïve patients. *Virol J*. 2012;9(1):245.
138. Rong L, Dahari H, Ribeiro RM, Perelson AS. Rapid emergence of protease inhibitor resistance in hepatitis C virus. *Sci Transl Med*. 2010;2(30):30ra32.
139. Wyles DL. Antiviral resistance and the future landscape of hepatitis C virus infection therapy. *J Infect Dis*. 2013;207 Suppl(Suppl 1):S33-9.

-
140. Pawlotsky J-M. New hepatitis C virus (HCV) drugs and the hope for a cure: concepts in anti-HCV drug development. *Semin Liver Dis.* 2014;34(1):22–9.
 141. Kwong AD, Najera I, Bechtel J, Bowden S, Fitzgibbon J, Harrington P, et al. Sequence and phenotypic analysis for resistance monitoring in hepatitis C virus drug development: recommendations from the HCV DRAG. *Gastroenterology.* 2011;140(3):755–60.
 142. Abdelrahman T, Hughes J, Main J, McLauchlan J, Thursz M, Thomson E. Next-generation sequencing sheds light on the natural history of hepatitis C infection in patients who fail treatment. *Hepatology.* 2015;61(1):88–97.
 143. Dietz J, Susser S, Berkowski C, Perner D, Zeuzem S, Sarrazin C. Consideration of Viral Resistance for Optimization of Direct Antiviral Therapy of Hepatitis C Virus Genotype 1-Infected Patients. *PLoS One.* 2015;10(8):e0134395.
 144. Ramachandran S, Campo DS, Dimitrova ZE, Xia G, Purdy M a, Khudyakov YE. Temporal variations in the hepatitis C virus intrahost population during chronic infection. *J Virol.* 2011;85(13):6369–80.
 145. Pawlotsky JM. Treatment failure and resistance with direct-acting antiviral drugs against hepatitis C virus. *Hepatology.* 2011;53(5):1742–51.
 146. Lenz O, Verbinnen T, Lin T-I, Vijgen L, Cummings MD, Lindberg J, et al. In vitro resistance profile of the hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor TMC435. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(5):1878–87.
 147. Sarrazin C, Kieffer TL, Bartels D, Hanzelka B, Müh U, Welker M, et al. Dynamic hepatitis C virus genotypic and phenotypic changes in patients treated with the protease inhibitor telaprevir. *Gastroenterology.* 2007;132(5):1767–77.
 148. Halfon P, Locarnini S. Hepatitis C virus resistance to protease inhibitors. *J Hepatol.* 2011;55(1):192–206.

149. Dvory-Sobol H, Wyles D, Ouyang W, Chodavarapu K, McNally J, Cheng W, et al. Long-term persistence of HCV NS5A variants after treatment with NS5A inhibitor ledipasvir. *J Hepatol.* 2015;62:S221.
150. Krishnan P, Beyer J, Mistry N, Koev G, Reisch T, DeGoey D, et al. In Vitro and In Vivo Antiviral Activity and Resistance Profile of Ombitasvir, an Inhibitor of Hepatitis C Virus NS5A. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(2):979–87.
151. Zeuzem S, Ghalib R, Reddy KR, Pockros PJ, Ari Z Ben, Zhao Y, et al. Grazoprevir-Elbasvir combination therapy for treatment-naïve cirrhotic and noncirrhotic patients with chronic hepatitis C virus genotype 1, 4, or 6 infection: A randomized trial. *Ann Intern Med.* 2015;163(1):1–13.
152. Gane EJ, Stedman CA, Hyland RH, Ding X, Svarovskaia E, Symonds WT, et al. Nucleotide polymerase inhibitor sofosbuvir plus ribavirin for hepatitis C. *N Engl J Med.* 2013;368(1):34–44.
153. Donaldson EF, Harrington PR, O’Rear JJ, Naeger LK. Clinical evidence and bioinformatics characterization of potential hepatitis C virus resistance pathways for sofosbuvir. *Hepatology.* 2015;61(1):56–65.
154. Sims KD, Lemm J, Eley T, Liu M, Berglind A, Sherman D, et al. Randomized, Placebo-Controlled, Single-Ascending-Dose Study of BMS-791325, a Hepatitis C Virus (HCV) NS5B Polymerase Inhibitor, in HCV Genotype 1 Infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(6):3496–503.
155. Cento V, Mirabelli C, Salpini R, Dimonte S, Artese A, Costa G, et al. HCV genotypes are differently prone to the development of resistance to linear and macrocyclic protease inhibitors. *PLoS One.* 2012;7(7):e39652.
156. Kieffer TL, George S. Resistance to hepatitis C virus protease inhibitors. *Curr Opin Virol.* 2014;8:16–21.

-
157. Lontok E, Harrington P, Howe A, Kieffer T, Lennerstrand J, Lenz O, et al. Hepatitis C virus drug resistance-associated substitutions: State of the art summary. *Hepatology*. 2015;62(5):1623–32.
 158. Serre SBN, Jensen SB, Ghanem L, Humes DG, Ramirez S, Li YP, et al. Hepatitis C Virus Genotype 1 to 6 Protease Inhibitor Escape Variants: In Vitro Selection, Fitness, and Resistance Patterns in the Context of the Infectious Viral Life Cycle. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(6):3563–78.
 159. Kuntzen T, Timm J, Berical A, Lennon N, Berlin AM, Young SK, et al. Naturally occurring dominant resistance mutations to hepatitis C virus protease and polymerase inhibitors in treatment-naïve patients. *Hepatology*. 2008;48(6):1769–78.
 160. Bartels DJ, Sullivan JC, Zhang EZ, Tigges AM, Dorrian JL, De Meyer S, et al. Hepatitis C virus variants with decreased sensitivity to direct-acting antivirals (DAAs) were rarely observed in DAA-naïve patients prior to treatment. *J Virol*. 2013;87(3):1544–53.
 161. Howe JA, Long J, Black S, Chase R, McMonagle P, Curry S, et al. Clinical Implications of Detectable Baseline Hepatitis C Virus-Genotype 1 NS3/4A-Protease Variants on the Efficacy of Boceprevir Combined With Peginterferon/Ribavirin. *Open Forum Infect Dis*. 2014;1(2):ofu078-ofu078.
 162. Gaudieri S, Rauch A, Pfafferott K, Barnes E, Cheng W, McCaughan G, et al. Hepatitis C virus drug resistance and immune-driven adaptations: relevance to new antiviral therapy. *Hepatology*. 2009;49(4):1069–82.
 163. Palanisamy N, Danielsson A, Kokkula C, Yin H, Bondeson K, Wesslén L, et al. Implications of baseline polymorphisms for potential resistance to NS3 protease inhibitors in Hepatitis C virus genotypes 1a, 2b and 3a. *Antiviral Res*.

- 2013;99(1):12–7.
164. Sarrazin C, Lathouwers E, Peeters M, Daems B, Buelens A, Witek J, et al. Prevalence of the hepatitis C virus NS3 polymorphism Q80K in genotype 1 patients in the European region. *Antiviral Res.* 2015;116:10–6.
165. Lenz O, Verbinnen T, Fevery B, Tambuyzer L, Vijgen L, Peeters M, et al. Virology analyses of HCV isolates from genotype 1-infected patients treated with simeprevir plus peginterferon/ribavirin in Phase Ib/III studies. *J Hepatol.* 2015;62(5):1008–14.
166. Vallet S, Viron F, Henquell C, Le Guillou-Guillemette H, Lagathu G, Abravanel F, et al. NS3 protease polymorphism and natural resistance to protease inhibitors in French patients infected with HCV genotypes 1–5. *Antivir Ther.* 2011;16(7):1093–102.
167. Barnard RJO, Howe J a, Ogert R a, Zeuzem S, Poordad F, Gordon SC, et al. Analysis of boceprevir resistance associated amino acid variants (RAVs) in two phase 3 boceprevir clinical studies. *Virology.* 2013;444(1–2):329–36.
168. McCloskey RM, Liang RH, Joy JB, Krajden M, Montaner JSG, Harrigan PR, et al. Global Origin and Transmission of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 3 Q80K Polymorphism. *J Infect Dis.* 2014;(July):1–8.
169. de Carvalho IMVG, Alves R, de Souza PAVM, da Silva EF, Mazo D, Carrilho FJ, et al. Protease inhibitor resistance mutations in untreated Brazilian patients infected with HCV: novel insights about targeted genotyping approaches. *J Med Virol.* 2014;86(10):1714–21.
170. Hoffmann L, Ramos JA, Souza EV de, Araújo Ramos AL de, Villela-Nogueira CA, Urményi TP, et al. Dynamics of resistance mutations to NS3 protease inhibitors in a cohort of Brazilian patients chronically infected with hepatitis C

- virus (genotype 1) treated with pegylated interferon and ribavirin: a prospective longitudinal study. *Virol J.* 2013;10(1):57.
171. Nishiya AS, De Almeida-Neto C, Ferreira SC, Alencar CS, Di-Lorenzo-Oliveira C, Levi JE, et al. HCV genotypes, characterization of mutations conferring drug resistance to protease inhibitors, and risk factors among blood donors in Sao Paulo, Brazil. *PLoS One.* 2014;9(1):e86413.
172. Peres-da-Silva A, de Almeida AJ, Lampe E. Mutations in hepatitis C virus NS3 protease domain associated with resistance to specific protease inhibitors in antiviral therapy naïve patients. *Arch Virol.* 2010;155(5):807–11.
173. Zeminian LB, Padovani JL, Corvino SM, Silva GF, Pardini MIDMC, Grotto RMT. Variability and resistance mutations in the hepatitis C virus NS3 protease in patients not treated with protease inhibitors. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108(1):13–7.
174. Gaspareto K V, Ribeiro RM, de M Malta F, Gomes-Gouvêa MS, Muto NH, Romano CM, et al. Resistance-associated variants in HCV subtypes 1a and 1b detected by Ion Torrent sequencing platform. *Antivir Ther.* 2016;[Epub ahead of print].
175. Peres-da-Silva A. P112: Hepatitis C virus NS3 polymorphism Q80K in genotype 1 therapy-naïve Brazilian patients. *J Viral Hepat.* 2015;22:77–77.
176. Kwo P, Gitlin N, Nahass R, Bernstein D, Etzkorn K, Rojter S, et al. Simeprevir plus sofosbuvir (12 and 8 weeks) in hepatitis C virus genotype 1-infected patients without cirrhosis: OPTIMIST-1, a phase 3, randomized study. *Hepatology.* 2016;64(2):370–80.
177. Manns M, Pol S, Jacobson IM, Marcellin P, Gordon SC, Peng C-Y, et al. All-oral daclatasvir plus asunaprevir for hepatitis C virus genotype 1b: a multinational,

- phase 3, multicohort study. *Lancet*. 2014;384(9954):1597–605.
178. Poordad F, Sievert W, Mollison L, Bennett M, Tse E, Bräu N, et al. Fixed-dose combination therapy with daclatasvir, asunaprevir, and beclabuvir for noncirrhotic patients with HCV genotype 1 infection. *JAMA*. 2015;313(17):1728–35.
179. Rodriguez-Torres M, Glass S, Hill J, Freilich B, Hassman D, Di Bisceglie AM, et al. GS-9857 in patients with chronic hepatitis C virus genotype 1-4 infection: a randomized, double-blind, dose-ranging phase 1 study. *J Viral Hepat*. 2016;23(8):614–22.
180. Kim AY, Chung RT. Coinfection With HIV-1 and HCV—A One-Two Punch. *Gastroenterology*. 2009;137(3):795–814.
181. Valdez H, Anthony D, Farukhi F, Patki a, Salkowitz J, Heeger P, et al. Immune responses to hepatitis C and non-hepatitis C antigens in hepatitis C virus infected and HIV-1 coinfecting patients. *AIDS*. 2000;14(15):2239–46.
182. Rallón NI, Soriano V, Restrepo C, García-Samaniego J, Labarga P, López M, et al. HCV-specific T-cell responses in HIV/hepatitis C virus-coinfecting patients on highly active antiretroviral therapy are comparable to those observed in hepatitis C virus-monoinfecting individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011;57(1):1–8.
183. Hoffmann L, Ramos JA, de Souza EV, de Araújo Ramos AL, Villela-Nogueira CA, Ürményi TP, et al. Dynamics of resistance mutations to NS3 protease inhibitors in a cohort of Brazilian patients chronically infected with hepatitis C virus (genotype 1) treated with pegylated interferon and ribavirin: a prospective longitudinal study. *Virol J*. 2013;10(1):57.
184. Universidade da Califórnia - Clinical and Translational Science Institute. Sample size calculators for designing clinical research [Internet]. 2010 [cited 2013 May 3].

Available from: <http://www.sample-size.net/sample-size-proportions/>

185. Patiño-Galindo JÁ, Salvatierra K, González-Candelas F, López-Labrador FX. Comprehensive screening for naturally occurring hepatitis c virus resistance to direct-acting antivirals in the NS3, NS5A, and NS5B genes in worldwide isolates of viral genotypes 1 to 6. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(4):2402–16.
186. Vallet-Pichard A, Mallet V, Nalpas B, Verkarre V, Nalpas A, Dhalluin-Venier V, et al. FIB-4: an inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. comparison with liver biopsy and fibrotest. *Hepatology*. 2007;46(1):32–6.
187. Luetkemeyer AF, Wyles DL. CROI 2016 : Viral Hepatitis and Liver Fibrosis. 2016;24(1):47–58.
188. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, Sola R, Correa MC, Montaner J, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology*. 2006;43(6):1317–25.
189. Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Rodriguez C, Soulier A, Poveda J-D, Pawlotsky J-M. The Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HCV Test, Version 2.0, Real-Time PCR Assay Accurately Quantifies Hepatitis C Virus Genotype 4 RNA. *J Clin Microbiol*. 2013;51(4):1078–82.
190. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 1997;25(24):4876–82.
191. Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*. 2001;17(12):1244–5.
192. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5463–7.

193. Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 1998;8(3):186–94.
194. Pond SLK, Frost SDW. Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics.* 2005;21(10):2531–3.
195. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol.* 2011;28(10):2731–9.
196. Castro R, Perazzo H, Grinsztejn B, Veloso VG, Hyde C. Chronic Hepatitis C: An Overview of Evidence on Epidemiology and Management from a Brazilian Perspective. *Int J Hepatol.* 2015;2015:1–10.
197. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis.* 2005;5(9):558–67.
198. Cavalcante LN, Lyra AC. Predictive factors associated with hepatitis C antiviral therapy response. *World J Hepatol.* 2015;7(12):1617–31.
199. Al Marzooqi SH, Feld JJ. Sorting out cirrhosis: Mechanisms of non-response to hepatitis C therapy. *Liver Int.* 2015;35(8):1923–33.
200. Lin M V., Charlton AN, Rouster SD, Zamor PJ, Sherman KE. Hepatitis C virus NS3 mutations in haemophiliacs. *Haemophilia.* 2014;20(5):659–65.
201. Chevaliez S, Rodriguez C, Pawlotsky J-M. New virologic tools for management of chronic hepatitis B and C. *Gastroenterology.* 2012;142(6):1303–1313.e1.
202. Powdrill MH, Tchesnokov EP, Kozak R a., Russell RS, Martin R, Svarovskaia ES, et al. Contribution of a mutational bias in hepatitis C virus replication to the genetic barrier in the development of drug resistance. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108(51):20509–13.

-
203. Wohnsland A, Hofmann WP, Sarrazin C. Viral determinants of resistance to treatment in patients with hepatitis C. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(1):23–38.
 204. Gentile I, Buonomo AR, Zappulo E, Minei G, Morisco F, Borrelli F, et al. Asunaprevir, a protease inhibitor for the treatment of hepatitis C infection. *Ther Clin Risk Manag.* 2014;10(1):493.
 205. Vidal LL, Santos AF, Soares MA. Worldwide distribution of the NS3 gene 80K polymorphism among circulating hepatitis C genotype 1 viruses: implication for simeprevir usage. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(7):2024–7.
 206. Susser S, Dietz J, Vermehren J, Peiffer K-H, Passmann S, Perner D, et al. European Ravs Database: Frequency and Characteristics of Ravs in Treatment-Naïve and DAA-Experienced Patients. *J Hepatol.* 2016;64(2):S139.
 207. Sede MM, Laufer NL, Quarleri J. Previous failure of interferon-based therapy does not alter the frequency of HCV NS3 protease or NS5B polymerase inhibitor resistance-associated variants: longitudinal analysis in HCV/HIV co-infected patients. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;46(2):219–24.
 208. Echeverría N, Betancour G, Gámbaro F, Hernández N, López P, Chiodi D, et al. Naturally occurring NS3 resistance-associated variants in hepatitis C virus genotype 1: Their relevance for developing countries. *Virus Res.* 2016;223:140–6.
 209. Pickett BE, Striker R, Lefkowitz EJ. Evidence for separation of HCV subtype 1a into two distinct clades. *J Viral Hepat.* 2011;18(9):608–18.
 210. Peres-da-Silva A, de Almeida AJ, Lampe E. Genetic diversity of NS3 protease from Brazilian HCV isolates and possible implications for therapy with direct-acting antiviral drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107(2):254–61.
 211. Santos AF, Bello G, Vidal LL, Souza SL, Mir D, Soares MA. In-depth phylogenetic analysis of hepatitis C virus subtype 1a and occurrence of 80K and

- associated polymorphisms in the NS3 protease. *Sci Rep*. 2016;6(August):31780.
212. Simeprevir (Olysio) - Prescribing information [Internet]. University of Washington. 2014 [cited 2015 May 5]. Available from: <http://www.hepatitisc.uw.edu/page/treatment/drugs/simeprevir-drug>
213. Oliveira SB de, Merchán-Hamann E, Amorim LDAF. HIV/AIDS coinfection with the hepatitis B and C viruses in Brazil. *Cad Saude Publica*. 2014;30(2):433–8.
214. Freitas SZ, Teles SA, Lorenzo PC, Puga MAM, Tanaka TSO, Thomaz DY, et al. HIV and HCV coinfection: prevalence, associated factors and genotype characterization in the Midwest Region of Brazil. *Rev do Inst Med Trop São Paulo*. 2014;56(6):517–24.
215. Goodkin K. Assessing the prevalence of HIV, HBV, and HCV infection among people with severe mental illness. *The Lancet Psychiatry*. 2016;3(1):4–6.
216. Vigani AG, Pavan MH, Tozzo R, Gonçalves ESL, Feltrin A, Fais VC, et al. Comparative study of patients with chronic hepatitis C virus infection due to genotypes 1 and 3 referred for treatment in southeast Brazil. *BMC Infect Dis*. 2008;8:164.
217. Pawlotsky JM, Tsakiris L, Roudot-Thoraval F, Pellet C, Stuyver L, Duval J, et al. Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis*. 1995;171(6):1607–10.
218. Tsochatzis EA, Castera L. Assessing liver disease in HIV–HCV coinfecting patients. *Curr Opin HIV AIDS*. 2015;10(5):316–22.
219. Kim AY, Lauer GM, Ouchi K, Addo MM, Lucas M, Schulze Zur Wiesch J, et al. The magnitude and breadth of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells depend on absolute CD4+ T-cell count in individuals coinfecting with HIV-1. *Blood*. 2005;105(3):1170–8.

-
220. Cao Y, Zhang Y, Bao Y, Zhang R, Zhang X, Xia W, et al. Naturally occurring hepatitis C virus protease inhibitors resistance-associated mutations among chronic hepatitis C genotype 1b patients with or without HIV co-infection. *Hepatol Res.* 2015;552–8.
 221. Winters MA, Welles SL, Holodniy M. Hepatitis C Virus Protease Gene Diversity in Patients Coinfected with Human Immunodeficiency Virus. *J Virol.* 2006;80(8):4196–9.
 222. Trimoulet P, Belzunce C, Faure M, Wittkop L, Reigadas S, Dupon M, et al. Hepatitis C virus (HCV) protease variability and anti-HCV protease inhibitor resistance in HIV/HCV-coinfected patients. *HIV Med.* 2011;12(8):506–9.
 223. Vicenti I, Rosi A, Saladini F, Meini G, Pippi F, Rossetti B, et al. Naturally occurring hepatitis C virus (HCV) NS3/4A protease inhibitor resistance-related mutations in HCV genotype 1-infected subjects in Italy. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(4):984–7.
 224. Treviño A, de Mendoza C, Parra P, Rodríguez C, Madejón A, Plaza Z, et al. Natural polymorphisms associated with resistance to new antivirals against HCV in newly diagnosed HIV-HCV-coinfected patients. *Antivir Ther.* 2011;16(3):413–6.
 225. Morsica G, Bagaglio S, Uberti-Foppa C, Galli L, Lazzarin A. Detection of Hepatitis C Mutants With Natural Resistance to NS3/4A Protease Inhibitors in HIV/HCV-Coinfected Individuals Treated With Antiretroviral Therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2009;51(1):106–8.
 226. Silva T, Cortes Martins H, Coutinho R, Leitão E, Silva R, Pádua E. Molecular characterization of hepatitis C virus for determination of subtypes and detection of resistance mutations to protease inhibitors in a group of intravenous drug users co-

- infected with HIV. *J Med Virol*. 2015;87(9):1549–57.
227. Zhou K, Liang Z, Wang C, Hu F, Ning C, Lan Y, et al. Natural Polymorphisms Conferring Resistance to HCV Protease and Polymerase Inhibitors in Treatment-Naïve HIV/HCV Co-Infected Patients in China. *PLoS One*. 2016;11(6):e0157438.
228. Bartolini B, Giombini E, Zaccaro P, Selleri M, Rozera G, Abbate I, et al. Extent of HCV NS3 protease variability and resistance-associated mutations assessed by next generation sequencing in HCV monoinfected and HIV/HCV coinfecting patients. *Virus Res*. 2013;177(2):205–8.
229. Nevot M, Boesecke C, Parera M, Andrés C, Franco S, Revollo B, et al. Hepatitis C virus NS3/4A quasispecies diversity in acute hepatitis C infection in HIV-1 co-infected patients. *J Viral Hepat*. 2014;21(6):e19–28.
230. Leggewie M, Sreenu VB, Abdelrahman T, M. Leitch EC, Wilkie GS, Klymenko T, et al. Natural NS3 resistance polymorphisms occur frequently prior to treatment in HIV-positive patients with acute hepatitis C. *AIDS*. 2013;27(15):2485–8.
231. Halfon P, Bourlière M, Khiri H, Pénaranda G, Martineau A, Oulès V, et al. Mutation rate in hepatitis C virus NS3 protease is not influenced by HIV-1 protease inhibitor therapy. *AIDS*. 2008;22(13):1694–6.
232. Applegate TL, Gaudieri S, Plauzolles A, Chopra A, Grebely J, Lucas M, et al. Naturally occurring dominant drug resistance mutations occur infrequently in the setting of recently acquired hepatitis C. *Antivir Ther*. 2014;20(2):199–208.
233. Paolucci S, Fiorina L, Mariani B, Gulminetti R, Novati S, Barbarini G, et al. Naturally occurring resistance mutations to inhibitors of HCV NS5A region and NS5B polymerase in DAA treatment-naïve patients. *Virol J*. 2013;10(1):355.
234. Bertino G, Privitera G, Purrello F, Demma S, Crisafulli E, Spadaro L, et al. Emerging hepatic syndromes: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Intern*

- Emerg Med. 2016;1–12.
235. Farci P, Wollenberg K, Diaz G, Engle RE, Lai ME, Klennerman P, et al. From the Cover: Profibrogenic chemokines and viral evolution predict rapid progression of hepatitis C to cirrhosis. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109(36):14562–7.
236. Li H, McMahon BJ, McArdle S, Bruden D, Sullivan DG, Shelton D, et al. Hepatitis C virus envelope glycoprotein co-evolutionary dynamics during chronic hepatitis C. *Virology*. 2008;375(2):580–91.
237. Li H, Hughes AL, Bano N, McArdle S, Livingston S, Deubner H, et al. Genetic Diversity of Near Genome-Wide Hepatitis C Virus Sequences during Chronic Infection: Evidence for Protein Structural Conservation Over Time. *PLoS One*. 2011;6(5):e19562.
238. López-Labrador F-X, Bracho M a, Berenguer M, Coscollà M, Rayón JM, Prieto M, et al. Genetic similarity of hepatitis C virus and fibrosis progression in chronic and recurrent infection after liver transplantation. *J Viral Hepat*. 2006;13(2):104–15.
239. Lara J, López-Labrador F, González-Candelas F, Berenguer M, Khudyakov YE. Computational models of liver fibrosis progression for hepatitis C virus chronic infection. *BMC Bioinformatics*. 2014;15(Suppl 8):S5.
240. Sherman KE, Rouster SD, Stanford S, Blackard JT, Shire N, Koziel M, et al. Hepatitis C virus (HCV) quasispecies complexity and selection in HCV/HIV-coinfected subjects treated with interferon-based regimens. *J Infect Dis*. 2010;201(5):712–9.
241. Chary A, Winters MA, Kottlilil S, Murphy AA, Polis MA, Holodniy M. Impact of Interferon Ribavirin Treatment on Hepatitis C Virus (HCV) Protease Quasispecies Diversity in HIV and HCV Coinfected Patients. *J Infect Dis*. 2010;202(6):889–93.

Original article

Resistance mutations are rare among protease inhibitor treatment-naïve hepatitis C genotype-1 patients with or without HIV coinfection

Gaspar Lisboa-Neto¹, Caroline F Noble², João R Rebello Pinho^{2,3*}, Fernanda M Malta², Michele S Gomes-Gouvêa², Mônica V Alvarado-Mora², Mariliza H da Silva^{4,5}, Andrea GB Leite⁶, Leonora Z Piccoli⁶, Flaviane K Rodrigues⁷, Flair J Carrilho², Maria C Mendes-Correa^{1,7}

¹Department of Infectious Diseases, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, SP, Brazil

²Laboratory of Tropical Gastroenterology and Hepatology 'João Alves de Queiroz and Castorina Bittencourt Alves', LIM-07, Institute of Tropical Medicine, Department of Gastroenterology, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, SP, Brazil

³Albert Einstein Medicina Diagnóstica, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brazil

⁴Centro de Referência e Treinamento em DST/AIDS do Estado de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

⁵Clínicas de Especialidades, São Bernardo do Campo, SP, Brazil

⁶Centro Especializado em Saúde, Caxias do Sul, RS, Brazil

⁷Infectious Diseases Research Unit, ABC Foundation Medical School, Santo André, SP, Brazil

*Corresponding author e-mail: jrpinho@usp.br

Background: HCV has a high replication rate and a lack of proofreading activity, leading to a greatly diverse viral population. This diversity may lead to emergence of resistant strains in direct-acting antiviral therapy. The frequency of naturally occurring HCV protease inhibitor (PI) mutations has been addressed in many countries, but there are few data on the prevalence of these mutations in Brazilian patients.

Methods: We evaluated the sequence of HCV NS3 protease gene in 247 patients (135 HCV-monoinfected and 112 HIV-HCV-coinfected patients). HCV RNA was extracted from plasma and a fragment of 765 base pairs from the NS3 region was amplified and sequenced with Sanger-based technology.

Results: HIV-HCV-coinfected patients were more likely to be older than 40 years and have an HCV subtype-1a

infection. Overall, 21.9% of patients had at least one amino acid substitution in the NS3 region; 14 patients (5.7%) harboured at least one resistance mutation (T54S, V55A, Q80R) and the Q80K mutation was not found in our case series. There was no difference between monoinfected and coinfecting patients regarding the frequency of natural polymorphisms and resistance mutations.

Conclusions: Baseline HCV NS3 amino acid substitutions identified herein are considered mostly natural polymorphisms with no clinical impact on PI-based therapy. The identified resistance mutations may be associated with low-level resistance to PIs *in vitro*. Q80K substitution seems to be a rare event in Brazil. HIV coinfection was not associated with a greater frequency of such substitutions in the studied sample.

Introduction

HCV infection is a leading cause of chronic liver disease worldwide [1,2]. There are currently about 160 million infected individuals, corresponding to approximately 3% of the world's population [3]. A cross-sectional study conducted in all Brazilian macro-regions from 2005 to 2009 using a sample of 19,503 inhabitants aged between 10 and 69 years determined an overall weighted prevalence of hepatitis C antibodies in 1.38%, corresponding to about 2.8 million infected individuals in Brazil [4].

Due to shared routes of transmission, chronic hepatitis C infection is a common comorbidity among patients infected with HIV. HIV coinfection modifies the natural history of hepatitis C, promoting a rapidly progressive liver disease in this population [5]. Until recently, the only available treatment for HIV-HCV patients has been pegylated interferon plus ribavirin. However, this therapy provides clearance in fewer than one-third of patients with HCV genotype-1, which is the most

prevalent HCV genotype worldwide [6]. Therefore, more effective therapeutic alternatives are needed to treat this group of patients.

In recent years, treatment of HCV infection has undergone a remarkable evolution with the advent of antiviral drugs targeting non-structural HCV proteins capable of blocking the viral cell cycle at different sites. These drugs are known as direct-acting antivirals (DAAs) [7]. The first class of DAAs available for hepatitis C treatment include telaprevir and boceprevir. These two drugs belong to the HCV NS3 protease inhibitor (PI) group [8].

HCV's high replication rate, together with the low fidelity of HCV polymerase result in the rapid emergence of viral variants, leading to viral nucleotide polymorphisms but also to variants harbouring resistance mutations, which may decrease susceptibility to a future antiviral therapy [9,10]. There are a few studies from different areas of the world describing the prevalence of DAA-naïve patients with viral populations predominantly resistant to DAAs. This prevalence may vary from 0 to 7%, depending on the group of patients included or the sequencing methodology employed [11–14].

In viruses such as HIV, a consistent correlation has been shown between some polymorphisms and antiviral therapy failure. Nevertheless, the clinical impact of baseline mutations and their implication for DAA-based therapy for HCV remains unknown [8].

Previous work carried out with Brazilian populations has reported prevalences of 4.1% to 18.9% of NS3 mutations in HCV-monoinfected patients [15–18]. However, the presence of HCV NS3 PI resistant mutations have yet to be studied in Brazilian HCV patients coinfecting with HIV.

The aim of this study was to describe the frequency of natural polymorphisms and resistance mutations in HCV protease from HCV and HCV–HIV-infected patients in Brazil and to analyse the possible association between amino acid substitutions and clinical and demographic variables.

Methods

Patients

A total of 300 HCV-infected patients were enrolled in this study. This cohort included 150 HCV-monoinfected patients and 150 HCV–HIV-1-coinfected patients. Patients were followed-up in five different infectious disease reference centres in Brazil: Infectious Diseases Research Unit (ABC Foundation Medical School), Clínicas de Especialidades de São Bernardo do Campo, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Centro de Referência e Treinamento DST/AIDS-SP

(all located in the São Paulo Metropolitan area) and the outpatient clinic for HIV patients in Caxias do Sul, Rio Grande do Sul.

All patients diagnosed with chronic hepatitis C who were referred to these reference centres between 2011 and 2013 were invited to participate in the study. Patients were included in the study if they had an HCV genotype-1 infection, had detectable levels of viral RNA in the serum, were naïve to PIs or other investigational anti-HCV drugs and signed an informed consent form to participate in the study. The exclusion criteria consisted of HBV coinfection or the presence of other hepatic diseases.

Ethics statement

This study was approved by the Ethics Committee of the ABC School of Medicine (Faculdade de Medicina do ABC, São Paulo, Brazil) under protocol number 011/2010. Written informed consent was obtained from each participant prior to enrolment in the study.

Analysed variables

Medical records were retrospectively reviewed to ascertain demographic (age and gender) and clinical characteristics as well as laboratory data. HCV-associated variables included liver fibrosis score (based on the METAVIR classification), HCV subtype and information on viral response to prior treatment against HCV (with pegylated interferon and ribavirin). We also recorded type of virus exposure: blood transfusion, intravenous or inhaled drug use, tattooing/piercing, high-risk sexual behaviour, occupational exposure and non-sexual HCV household contact.

For HIV patients, we also evaluated antiretroviral therapy use, HIV viral load and CD4⁺ T-cell count at the time the blood sample was collected and during the previous 12 months.

Determination of HCV viral load and genotyping

HCV RNA was detected by real time PCR using a commercially available kit (Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HCV test, version 2.0; Roche Diagnostics, Branchburg, NJ, USA) [19] and extracted from plasma samples using the QIAamp® Ultrasens Virus kit (Qia-gen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. HCV genotyping was conducted according to the methodology described by Sandres-Sauné *et al.* [20].

Amplification and sequencing of the NS3 protease gene

A fragment of 765 base pairs from the NS3 region of the HCV genome was amplified using primers, as previously described [15]. Initially, the extracted viral RNA was transcribed to cDNA and amplified by PCR using SuperScript® III One-Step RT-PCR System with

Platinum® Taq High Fidelity DNA Polymerase kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Cycling conditions included an initial cDNA synthesis step at 50°C for 30 min followed by a denaturation step at 94°C for 2 min, 35 cycles of PCR amplification (94°C for 30 s, 56°C for 30 s, 68°C for 1 min and 30 s) and a final 5 min extension step at 68°C.

The initial reverse transcription PCR product was subjected to a second round of PCR by using Platinum Taq DNA polymerase (Life Technologies). Cycling conditions for the second round consisted of a denaturation step at 94°C for 3 min, followed by 30 cycles at 94°C for 30 s, 60°C for 30 s, 72°C for 1 min and 30 s, and a final 5 min extension step at 72°C. PCR products from the second amplification were detected by agarose gel (2%).

Amplified PCR products were purified using an ExoSAP-IT PCR Clean-up kit (Affymetrix, Cleveland, OH, USA), then sequenced with a BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Life Technologies, Foster City, CA, USA) and electrophoresed in the ABI3500 DNA sequencer (Life Technologies).

Analysis of mutations associated with resistance to PIs
The consensus sequences of each sample were obtained by aligning both sequenced strands (sense and anti-sense) using CodonCode Aligner software (CodonCode Corporation, Dedham, MA, USA). Assembled contigs were aligned using the CLUSTALW program integrated with the BioEdit v.7.0.8 software (Ibis Bioscience, Carlsbad, CA, USA). Nucleotides were translated into amino acids and analysed for the presence of previously-identified substitutions conferring resistance to NS3 PIs: V36A/M, T54A/S, V55A, Q80K/R, R155K/T, A156S/T/V, D168A/V/E/T and for polymorphisms previously found in these patients in amino acid residues V36, F43, T54, V55, Q80, R109, S122, I132, S138, R155, A156, V158, D168, V170 and M175 [10,21].

Statistical analyses

We first conducted a frequency distribution analysis of the previously-described polymorphisms of the HCV NS3 protease and of the mutations associated with resistance to PIs in Group 1 (HCV–HIV-coinfecting patients) and Group 2 (monoinfected patients). We also conducted a frequency distribution analysis of patient demographic and clinical variables.

To determine whether amino acid substitutions were associated with each collected clinical or demographic variable, we used the Student's *t*-test. For categorical variables, we used the Pearson's χ^2 or Fisher's exact tests if the group was small. Two-tailed *P*-values were calculated and considered statistically significant if $P \leq 0.05$. Analyses were conducted using SPSS software, version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

From the 300 patients initially enrolled in this study, 15 monoinfected and 38 coinfecting patients were excluded due to poor quality NS3 amplification and sequencing (30 samples) or low viraemia level (23 samples). The remaining 247 HCV-infected patients included 135 HCV monoinfected patients and 112 HIV-1-coinfecting patients.

Demographic and clinical characteristics are summarized in Table 1. A total of 63% of patients were male and the mean age was 44.86 years (± 9.66). In the coinfecting group, most patients were older than 40 years old ($P=0.001$). This group was also more frequently infected with HCV subtype-1a ($P=0.0001$) and mostly acquired their viral infection through intravenous drug use or high-risk sexual behaviour ($P=0.0001$). A history of blood transfusion was more frequent among HCV-monoinfected patients ($P=0.0001$). Two patients in the coinfecting group were haemophiliacs.

Mutations associated with resistance to PIs

A total of 54 out of 247 (21.86%) sequences from HCV genotype-1 patients showed at least one NS3 amino acid substitution. The monoinfected and coinfecting groups did not differ significantly in terms of the frequency of viruses with at least one of these substitutions – neither in the frequency of NS3 natural polymorphisms at positions 36, 55, 80, 122 or 175 nor in the known NS3 PI resistance mutations sites, isolated or in combination (Table 2).

Among HCV–HIV-coinfecting patients, the NS3 protease variants detected included: M175L (1/23), Q80L (4/23), Q80R (2/23), S122G (7/23), S122N (1/23), S122T (1/23), T54S (3/23), V55I (3/23), V36L (1/23) and V55A (4/23). In the monoinfected group, NS3 substitutions included: M175L (2/31), S122G (21/31), S122N (2/31), S122T (2/31), T54S (2/31), V55A (3/21) and V55I (1/31). Among patients with at least one amino acid substitution, only 14 were related to a low-level resistance to PIs (T54S/V55A/Q80R). Most patients had amino acid substitutions considered to be natural polymorphisms (M175L, Q80L, S122G/N/T, V55I and V36L). S122G/N/T was the most frequent substitution and was more common among monoinfected patients (25 monoinfected versus 9 coinfecting; $P=0.004$). Q80K was not detected in any patient.

In total, six individuals (four coinfecting and two monoinfected patients) had more than one amino acid substitution in a single sequence, and these included double (T54S+V55I; V55A+Q80R; T54S+S122G; V55A+S122G) or triple (T54S+V55I+Q80L) substitution combinations.

The comparison between patients with any NS3 amino acid substitution (54 patients) and patients without amino acids substitutions (193 patients) did not

Table 1. Demographics, clinical characteristics and risk factors for HCV infection among HCV-infected individuals according to HIV infection

	All patients	HCV-HIV-coinfected patients	HCV-monoinfected patients	OR (95% CI)	P-value
Overall characteristics					
Patients	247 (100)	112 (100)	135 (100)	–	–
Gender, male	156 (63.15)	76 (67.80)	80 (59.25)	1.45 (0.85, 2.45)	0.163
Mean age, years (SD)	44.86 (9.66)	44.7 (7.51)	44.90 (11.3)	–	0.939
Age ≥40 years	162 (65.60)	86 (76.78)	76 (59.30)	2.56 (1.47, 4.47)	0.001
HCV characteristics					
Subtype-1a	141 (57.08)	95 (84.82)	46 (34.07)	10.81 (5.77, 20.23)	0.0001
Mean HCV viral load, IU/ml (SD)	2,959,047 (3,819,330)	3,432,810 (4,096,501)	2,573,018 (3,546,414)	–	0.084
Previous HCV treatment with PEG-IFN/ribavirin	104 (42.10)	51 (46.43)	53 (6.60)	1.29 (0.77, 2.14)	0.320
Non-responders	79 (75.96)	43 (84.31)	36 (67.90)	2.53 (0.98, 6.56)	0.051
Relapsers	9 (8.60)	5 (9.80)	4 (7.54)	1.33 (0.33, 5.26)	0.682
Response to treatment unknown	16 (14.40)	3 (5.80)	13 (24.52)	0.19 (0.05, 0.72)	0.014
HIV characteristics					
Mean CD4 ⁺ T-cells, cells/mm ³ (SD; n=106)	–	567 (288.30)	–	–	–
HIV viral load (detectable; n=96)	–	16 (16.67)	–	–	–
AIDS-defining illness (n=96)	–	46 (47.91)	–	–	–
HIV patients on HAART	–	106 (94.64)	–	–	–
Liver biopsy	87 (35.20)	61 (54.46)	26 (19.25)	–	0.0001
No fibrosis or mild fibrosis (METAVIR F0 and F1)	44 (50.50)	26 (42.62)	18 (69.23)	–	–
Moderate-to-severe fibrosis (METAVIR F2 and F3)	33 (37.90)	26 (42.62)	7 (26.92)	–	–
Liver cirrhosis	10 (11.50)	9 (14.75)	1 (3.84)	–	–
Risk factors					
Blood transfusion before 1993	48 (19.40)	8 (7.10)	40 (29.60)	0.18 (0.08, 0.41)	0.0001
Intravenous drug use	84 (34.00)	73 (65.10)	11 (8.14)	21.10 (10.17, 43.73)	0.0001
High-risk sexual behaviour ^a	77 (31.20)	50 (44.65)	27 (20)	3.22 (1.83, 5.66)	0.0001

Values are *n* (%) unless otherwise indicated. Significant values are in bold. All statistical analyses were carried out with Pearson's χ^2 test or Fisher's exact test except for categorical variables when Student's *t*-test was applied. ^aHigh-risk sexual behaviour (sexual intercourse with HIV-positive or HCV-positive partners or intravenous drug users; sexual intercourse without use of condom or more than three sexual partners per year).

Table 2. Natural polymorphisms and resistance mutations in selected sites along the HCV NS3 protease sequence in both groups of patients

	All patients (n=247)	HCV-HIV-coinfected patients (n=112)	HCV-monoinfected patients (n=135)	P-value
HCV NS3 amino acid substitutions	54 (21.86)	23 (20.53)	31 (22.96)	0.646
HCV NS3 natural polymorphisms ^a	40 (16.19)	14 (12.50)	26 (19.26)	0.151
HCV NS3 PI resistance mutations (T54 S/V55 A/Q80 R)	14 (5.66)	9 (8.03)	5 (3.70)	0.143
T54S	6 (2.42)	4 (3.57)	2 (1.48)	0.415
V55A	6 (2.42)	3 (2.68)	3 (2.22)	1.000
Q80R	1 (0.40)	1 (0.89)	0 (0)	0.453
V55A+Q80R	1 (0.40)	1 (0.89)	0 (0)	0.453

Values are *n* (%) unless otherwise indicated. All statistical analyses were carried out with Pearson's χ^2 test or Fisher's exact test. ^aV36L, V55I, Q80L, S122 G/N/T and M175L. PI, protease inhibitor.

reveal any difference regarding most of the analysed variables (gender, age, HIV coinfection, HCV-HIV transmission risk factor, HCV RNA level, liver fibrosis score and previous treatment for HCV). HCV subtype-1b was the only variable associated with any HCV protease amino acid substitution (38 versus 68; $P=0.0001$).

In the HIV-coinfected group, no statistical difference in CD4⁺ T-cell count was observed when stratified according to the presence or absence of HCV protease variants: 543 cells/mm³ (± 266) versus 586 cells/mm³ (± 295), respectively, $P=0.559$. Furthermore, only nine patients had CD4⁺ T-cell counts below 200 cells/mm³ and none

of them presented NS3 protease polymorphisms in the analysed sites or resistance mutations to DAAs.

Discussion

The aim of the present study was to evaluate the prevalence of natural polymorphisms in the NS3 protease related to resistance to PIs in patients with chronic hepatitis C, with or without HIV coinfection. Overall, 21.86% of patients showed at least one NS3 amino acid substitution in the analysed sites. These substitutions were found in 20.53% of HCV-HIV-coinfecting patients and in 22.96% of HCV-monoinfecting patients. The frequency of natural polymorphisms and mutations associated with resistance to PIs was similar between the coinfecting and monoinfecting groups. This result is in line with several published studies [22–26], but contradicts Morsica *et al.* [27], who reported a higher prevalence of mutations in 31 HIV-HCV-coinfecting patients compared to 250 HCV sequences retrieved from GenBank (16.2% versus 0.8%; $P \leq 0.05$). In the current study, polymorphism S122G was the most common substitution in HCV genotype-1b samples. This finding possibly indicates a greater variability at NS3 position 122 in HCV Brazilian samples. However, *in vitro* studies have not shown any influence of S122G substitution on PI inhibitor activity [21,28].

As a group, coinfecting patients were older (>40 years old) than monoinfecting individuals and the great majority of them harboured genotype-1a (84.82%). This finding may have had some impact on HCV diversity, which could eventually modify some results observed in this study. Older age among HCV-HIV-coinfecting patients was also reported in a large study involving databases from the Brazilian Ministry of Health [29], and other studies described genotype-1a as more prevalent among different sets of coinfecting patients [30,31]. Genotype-1a has been associated with a lower sustained virological response (SVR) and a greater chance of selection of mutants resistant to PIs (that is, V36M, R155K and Q80K) [5]. On the other hand, the proportion of monoinfecting patients harbouring genotype-1b was high (65.9%), a finding which has previously been reported in Brazilian patients [32–34].

Previous studies in different parts of the world (for example, Italy and France) have reported a prevalence of resistance-associated mutations of 7.5% to 26% in coinfecting patients and 0.8% to 19.3% in monoinfecting patients [23–25,27]. Prevalence of NS3 mutations in HCV-monoinfecting subjects reported to date in Brazil range from 4.1% to 18.9% [15–18].

It is important to emphasize that mutations linked to high-level PI resistance were not found among patients included in this cohort. In fact, only three variants

associated with low-to-moderate level resistance were identified: Q80R, V55A and T54S. These mutations lead to a low-to-moderate fold-change in drug median effective concentration (that is, 5–20-folds in EC_{50}). V55A substitution may decrease susceptibility to boceprevir in HCV genotype-1b-infected patients, while T54S may trigger resistance to both first generation PIs (telaprevir and boceprevir) and Q80R may result in almost sixfold resistance to simeprevir [10,35,36].

Worldwide, few case series have identified primary mutations associated with medium or high levels of resistance. Actually, they are generally found in less than 3% of screened samples [13]. The clinical impact of baseline mutations in the NS3 region (associated with high or low levels of resistance) is not yet understood for all PIs. Some case series including more than 2,000 patients undergoing telaprevir- or boceprevir-based therapy showed no impact of primary mutations in SVR after use [13,14]. On the contrary, the natural occurrence of the Q80K mutation has been associated with lower chances of achieving SVR after simeprevir use [35]. We did not find any patient harbouring this mutation among the 247 patients analysed in this series.

When all patients (monoinfecting and coinfecting) were evaluated together, we observed an association between polymorphisms/mutations in the NS3 region and HCV subtype-1b ($P=0.0001$). This finding may reflect the fact that subtype distribution was not homogeneous across groups.

Regarding HIV profile, immunosuppression defined by CD4⁺ T-cell depletion is associated with a diminished CD8⁺ T-cell response specific to HCV, which may prompt an increased pool of viral variants eventually harbouring resistance mutations [37]. There was no difference in the frequency of CD4⁺ T-cell count and HCV polymorphisms/mutations in the studied group, as the great majority of HIV-coinfecting patients received antiretroviral therapy and thus had a good immune profile.

In summary, this study shows that 22.96% of HCV-monoinfecting patients and 20.53% of HIV-coinfecting patients harboured at least one amino acid substitution in the HCV NS3 protease. Overall, these variants were considered natural polymorphisms, being eventually associated with low-level resistance to PIs (that is, T54S/V55A/Q80R). The Q80K mutation was not observed in this series of patients. HIV coinfection was not associated with a greater frequency of polymorphisms or resistance mutations in the HCV NS3 protease region. Understanding HCV genetic variability can influence the clinical decision-making policies for DAA therapy in Brazil and this would allow for a safer use of PIs (first and second wave) in interferon-based or interferon-free therapy regimens. Further local protocols enrolling larger samples are needed to confirm these results.

Acknowledgements

This Project was supported by grant 2011/50633-4 from the São Paulo Research Foundation (FAPESP) and the Alves de Queiroz Family Fund for Research. GL-N is a graduate student in the Department of Infectious Diseases at the University of São Paulo. FMM, MSG-G and MVA-M were graduate students from the Department of Gastroenterology at the University of São Paulo and received fellowships from FAPESP (2010/50081-9, 2009/53306-4 and 2008/50461-6) and from Fundação Faculdade de Medicina de São Paulo. CFN is a graduate student from the Department of Gastroenterology at the University of São Paulo who received a fellowship from CAPES. JRRP and MCM-C received fellowships from CNPq (Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 2).

Disclosure statement

JRRP is an employee at Albert Einstein Medicina Diagnóstica, São Paulo, Brazil. MVA-M is currently employed at Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda., São Paulo, Brazil. All other authors who took part in this study declare that they do not have anything to disclose regarding funding or conflicts of interest with respect to the manuscript.

References

- Guirao AA, Yuste SR, Regueiro BJ. [Epidemiology and clinical manifestations of viral hepatitis]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24:264–276. Spanish.
- Lin L, Verslype C, van Pelt JF, van Ranst M, Fevery J. Viral interaction and clinical implications of coinfection of hepatitis C virus with other hepatitis viruses. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18:1311–1319.
- Maasoumy B, Wedemeyer H. Natural history of acute and chronic hepatitis C. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2012; 26:401–412.
- Pereira LM, Martelli CM, Moreira RC, *et al.* Prevalence and risk factors of hepatitis C virus infection in Brazil, 2005 through 2009: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis* 2013; 13:60.
- Soriano V, Labarga P. Treatment of hepatitis C in patients infected with human immunodeficiency virus in the direct-acting antiviral era. *Infect Dis Clin North Am* 2012; 26:931–948.
- Wegzyn CM, Wyles D. Antiviral drug advances in the treatment of human immunodeficiency virus (HIV) and chronic hepatitis C virus (HCV). *Curr Opin Pharmacol* 2012; 12:556–561.
- Welsch C, Jesudian A, Zeuzem S, Jacobson I. New direct-acting antiviral agents for the treatment of hepatitis C virus infection and perspectives. *Gut* 2012; 61 Suppl 1:i36–i46.
- Sarrazin C, Hézode C, Zeuzem S, Pawlotsky JM. Antiviral strategies in hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2012; 56:S88–S100.
- Vermehren J, Sarrazin C. The role of resistance in HCV treatment. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2012; 26:487–503.
- Wyles DL. Antiviral resistance and the future landscape of hepatitis C virus infection therapy. *J Infect Dis* 2013; 207 Suppl 1:S33–S39.
- Kuntzen T, Timm J, Berical A, *et al.* Naturally occurring dominant resistance mutations to hepatitis C virus protease and polymerase inhibitors in treatment-naïve patients. *Hepatology* 2008; 48:1769–1778.
- Paolucci S, Fiorina L, Piralla A, *et al.* Naturally occurring mutations to HCV protease inhibitors in treatment-naïve patients. *Viol J* 2012; 9:245.
- Bartels DJ, Sullivan JC, Zhang EZ, *et al.* Hepatitis C virus variants with decreased sensitivity to direct-acting antivirals (DAAs) were rarely observed in DAA-naïve patients prior to treatment. *J Virol* 2013; 87:1544–1553.
- Barnard RJ, Howe JA, Ogert RA, *et al.* Analysis of boceprevir resistance associated amino acid variants (RAVs) in two Phase 3 boceprevir clinical studies. *Virology* 2013; 444:329–336.
- Peres-da-Silva A, de Almeida AJ, Lampe E. Mutations in hepatitis C virus NS3 protease domain associated with resistance to specific protease inhibitors in antiviral therapy naïve patients. *Arch Virol* 2010; 155:807–811.
- Hoffmann L, Ramos JA, Souza EV, *et al.* Dynamics of resistance mutations to NS3 protease inhibitors in a cohort of Brazilian patients chronically infected with hepatitis C virus (genotype 1) treated with pegylated interferon and ribavirin: a prospective longitudinal study. *Viol J* 2013; 10:57.
- Zeminian LB, Padovani JL, Corvino SM, Silva GF, Pardini MI, Grotto RM. Variability and resistance mutations in the hepatitis C virus NS3 protease in patients not treated with protease inhibitors. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013; 108:13–17.
- Nishiya AS, de Almeida-Neto C, Ferreira SC, *et al.* HCV genotypes, characterization of mutations conferring drug resistance to protease inhibitors, and risk factors among blood donors in São Paulo, Brazil. *PLoS ONE* 2014; 9:e86413.
- Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Rodriguez C, Soulier A, Poveda JD, Pawlotsky JM. The Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HCV test, version 2.0, real-time PCR assay accurately quantifies hepatitis C virus genotype 4 RNA. *J Clin Microbiol* 2013; 51:1078–1082.
- Sandres-Sauné K, Deny P, Pasquier C, *et al.* Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of the NS5b region. *J Virol Methods* 2003; 109:187–193.
- HCV Phenotype Working Group, HCV Drug Development Advisory Group. Clinically relevant HCV drug resistance mutations figure and tables. *Ann Forum Collab HIV Res* 2012; 14:1–10.
- Halfon P, Bourlière M, Khiri H, *et al.* Mutation rate in hepatitis C virus NS3 protease is not influenced by HIV-1 protease inhibitor therapy. *AIDS* 2008; 22:1694–1696.
- Trimoulet P, Belzunce C, Faure M, *et al.* Hepatitis C virus (HCV) protease variability and anti-HCV protease inhibitor resistance in HIV/HCV-co-infected patients. *HIV Med* 2011; 12:506–509.
- Gaudieri S, Rauch A, Pfafferott K, *et al.* Hepatitis C virus drug resistance and immune-driven adaptations: relevance to new antiviral therapy. *Hepatology* 2009; 49:1069–1082.
- Vicenti I, Rosi A, Saladini F, *et al.* Naturally occurring hepatitis C virus (HCV) NS3/4A protease inhibitor resistance-related mutations in HCV genotype 1-infected subjects in Italy. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67:984–987.
- Treviño A, de Mendoza C, Parra P, *et al.* Natural polymorphisms associated with resistance to new antivirals against hepatitis C virus (HCV) in newly diagnosed HIV/HCV-co-infected patients in Spain. *Antivir Ther* 2011; 16:413–416.
- Morsica G, Bagaglio S, Uberti-Foppa C, Galli L, Lazzarin A. Detection of hepatitis C mutants with natural resistance to NS3/4A protease inhibitors in HIV/HCV-co-infected individuals treated with antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009; 51:106–108.

28. Olysio (simeprevir). *Prescribing information* 2013. Janssen Therapeutics, Titusville, NJ, USA.
29. Oliveira SB, Merchán-Hamann E, Amorim LD. HIV/AIDS coinfection with the hepatitis B and C viruses in Brazil. *Cad Saude Publica* 2014; **30**:433–438.
30. Mendes-Correa MC, Cavaleiro NP, Mello C, Barone AA, Gianini RJ. Genotypic distribution of hepatitis C among hepatitis C and HIV co-infected patients in Brazil. *Int J STD AIDS* 2008; **19**:595–599.
31. Rallón NI, Pineda JA, Soriano V, *et al.* Differences in virological response to peginterferon- α plus ribavirin in HIV-positive patients co-infected with HCV subtypes 1a or 1b. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2012; **60**:117–123.
32. Campiotto S, Pinho JRR, Carrilho FJ, da Silva LC, Bernardini AP. Hepatitis C virus (HCV) genotypes distribution in different Brazilian regions. *XIIth International Congress of Virology (Paris)*. 27 July–1 August 2002, Paris, France. Abstract V-1014.
33. Campiotto S, Pinho JR, Carrilho FJ, *et al.* Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2005; **38**:41–49.
34. Nakano T, Lu L, Liu P, Pybus OG. Viral gene sequences reveal the variable history of hepatitis C virus infection among countries. *J Infect Dis* 2004; **190**:1098–1108.
35. Lenz, O, Verbinnen, T, Lin TI, *et al.* *In vitro* resistance profile of the hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor TMC435. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**:1878–1887.
36. Victrelis (boceprevir). *Prescribing information* 2011. Merck & Co., Whitehouse Station, NJ, USA.
37. Kim AY, Lauer GM, Ouchi K, *et al.* The magnitude and breadth of hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells depend on absolute CD4⁺ T-cell count in individuals coinfecting with HIV-1. *Blood* 2005; **105**:1170–1178.

Accepted 24 August 2014; published online 3 October 2014

CHARACTERIZATION OF CLINICAL PREDICTORS OF NATURALLY OCCURRING NS3/NS4A PROTEASE POLYMORPHISM IN GENOTYPE 1 HEPATITIS C VIRUS MONO AND HIV CO-INFECTED PATIENTS.

*Gaspar Lisboa Neto¹, Fernanda M Malta², Michele S Gomes-Gouvêa²,
Caroline F Noble², Camila Malta Romano⁷, João Renato R Pinho^{2,3},
Mariliza H da Silva^{4,5}, Andrea GB Leite⁶, Leonora Z Piccoli⁶,
Flair J Carrilho², Maria Cássia Mendes-Correa^{1,7}*

¹Department of Infectious Diseases, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, SP, Brazil

²LIM-07 Institute of Tropical Medicine, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, SP, Brazil

³Albert Einstein Medicina Diagnóstica, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brazil

⁴Centro de Referência e Treinamento em DST/AIDS do Estado de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

⁵Clínicas de Especialidades, São Bernardo do Campo, SP, Brazil

⁶Centro Especializado em Saúde, Caxias do Sul, RS, Brazil

⁷Laboratory of Virology- LIM 52 - Institute of Tropical Medicine, São Paulo, SP, Brazil

Summary:

Chronic hepatitis C is a major cause of liver disease worldwide. Spontaneously occurring resistance may impair rate of success in NS3/NS4A protease inhibitors (PI) based regimens. This study aimed to evaluate associations between the frequency of amino acid substitutions in protease domain and demographic / clinical features in HCV infected patients. Clinical and epidemiological data were retrieved from medical records of 247 patients in two Brazilian cities (São Paulo metropolitan area and Caxias do Sul). HCV-RNA was extracted from plasma. A fragment of 765 base pairs from the NS3 region was amplified and sequenced with Sanger-based technology. Variables independently associated with amino acid substitution were HCV subtype 1b, total bilirubin level > 1.5 ULN and albumin level < 3.5 g/dL. HCV subtype 1b sequences were highly variable compared to subtype 1a. Advanced liver fibrosis (FIB-4 > 3.25) was not related to NS3 polymorphisms neither to resistance associated variants. Genetic diversity analysis did not reveal a greater frequency of nucleotide mutations or a NS3 positive selection in the advanced liver fibrosis group. In conclusion, our results revealed that the NS3 region of HCV genotype 1b seemed to bear polymorphisms in greater frequency compared to genotype 1a. Although biological markers of advanced liver disease such as hyperbilirubinemia and hypoalbuminemia were associated with protease polymorphisms, the use of indirect staging index (FIB-4) was not related to NS3 variants in patients with advanced liver fibrosis. The role of infection length and progression to cirrhosis was not accompanied by an increasing diversification of NS3 region.

Key words: Hepatitis C virus; Human immunodeficiency virus; Anti-hepatitis C virus DAA; Protease Inhibitors; Mutation

Introduction:

Chronic hepatitis C is a major cause of liver disease worldwide ¹. There are currently at least 80 million chronically infected subjects - approximately 1% of the world's population ². In Brazil, the prevalence of hepatitis C antibodies is estimated in 0.8%, corresponding to about 1.6 million infected subjects in this country ³.

In recent years, treatment of hepatitis C virus (HCV) infection has undergone a remarkable evolution with the advent of direct antiviral agents (DAA) targeting non-structural HCV proteins ⁴. The first antivirals approved to be used in combination with peginterferon and ribavirin were telaprevir and boceprevir. These drugs belonged to the linear NS3/NS4A serine protease inhibitors group (PIs) and were greatly marked by low genetic barrier, poor efficacy and clinical intolerance ⁵. The development of new compounds within this class resulted in macrocyclic molecules and in interferon-free schemes based on regimens combining novel PIs with HCV NS5A inhibitors, NS5B polymerase (RdRp) inhibitors and ribavirin, leading to high rates of SVR in either clinical trials and real-life cohorts (> 90%) ^{6,7}. Besides first line PIs, new molecules were approved for treatment of HCV infection, including second wave and second generation products: simeprevir, asunaprevir, paritaprevir / ritonavir boosted, vaniprevir and grazoprevir ⁸. Still, there are two new drugs within this class currently in pipeline: voxilaprevir and ABT-493, both in phase 3 of clinical development ⁹.

Hepatitis C virus is characterized by its high replication rate and lack of proofreading activity, leading to a great diversity in viral population (quasispecies) that can also be composed by variants resistant to direct-acting antiviral therapy which may emerge as dominant strains under selective drug pressure ¹⁰. Several features are capable to influence selection of HCV strains with PI associated resistance, such as genetic barrier to resistance (the number and type of base pair mutation[s] needed to result in amino acid substitution[s] that confers resistance), viral fitness and pharmacokinetics / pharmacodynamics issues (absorption, concentration and level of drug exposure) ⁹. Particularly, in NS3/NS4A inhibitors class, combination of amino acids substitutions may confer cross-resistance to several drug components, as they all target similar molecular active sites in the protease region ¹¹. Brazilian cross-sectional studies have reported prevalence of 4.1% to 18.9% of HCV infected patients harboring virus with NS3 mutations in baseline ¹²⁻¹⁷.

It is known that spontaneously occurring resistance may impair the rate of success of some macrocyclic NS3/NS4A protease inhibitors, such as simeprevir / peginterferon / ribavirin and simeprevir / sofosbuvir based regimens, especially in HCV genotype 1a infected cirrhotic patients ¹⁸. Nevertheless, clinical efficacy in patients infected with HCV harboring resistance associated substitutions (RAS) in baseline remains unclear in some settings, especially in subjects who undergo treatment with interferon-free options combining new generation PIs (paritaprevir / ritonavir boosted, asunaprevir and grazoprevir) with NS5A and NS5B inhibitors ^{6,19}.

Other factors also contribute to the emergency of amino acid substitutions in HCV genome, including therapy with some particular DAA and length of infection ²⁰. HCV inherent variability leads to intrahost evolution that has been observed as a mechanism of virus escape from neutralizing adaptive immunoresponse ²¹. Whether the emergence of those amino acids substitutions (including RASs) relates or not to any clinical feature is still in debate. Currently, there are few data on this matter in the literature.

This study aimed to evaluate potential associations between the frequency of nucleotides and amino acid substitutions (natural polymorphisms and RAS) in NS3/NS4A protease of HCV and demographic / clinical features in chronic infected patients.

Patients & methods:

Clinical and epidemiological data were retrieved from medical records of 247 HCV chronically infected patients consecutively evaluated in 5 tertiary centers in Brazil, four from São Paulo state, located in Southern region of the country – [Infectious Diseases Research Unit (ABC Foundation Medical School), Clínicas de Especialidades de São Bernardo do Campo, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), Centro de

Referência e Treinamento DST/AIDS-SP] and one from Rio Grande do Sul state, in the South region of Brazil (outpatient clinic for HCV / HIV patients in Caxias do Sul).

All patients diagnosed with chronic hepatitis C who were referred to these reference centers between 2011 and 2013 were invited to participate in the study. Patients were included in the study if they fit the following criteria: HCV genotype 1 infection, detectable levels of viral RNA in the serum and were naïve to treatment with protease inhibitors or other investigational anti-HCV drugs.

Medical records were retrospectively reviewed to ascertain demographic (age and gender) and clinical characteristics. HCV subtype and information on viral response to prior interferon / ribavirin based treatment, as well as serological evidence on HIV co-infection were retrieved likewise. Type of virus exposure was also recorded: blood transfusion, intravenous drug use and high-risk sexual behavior. Laboratory markers such as AST and ALT levels, albumin, INR, white blood cells and platelets count were also recorded for analysis. For HIV patients, we also evaluated antiretroviral therapy, HIV viral load and CD4 T cell count at the time the blood sample was collected and during the previous 12 months.

Determination of liver fibrosis stage:

Liver staging was assessed using non-invasive method, due to the retrospective nature of the study and the lack of availability of liver biopsies for most enrolled patients. In this way, FIB-4 score was calculated as an estimative of liver fibrosis, with values above 3.25 reflecting advanced disease ²²

Determination of HCV viral load and genotyping:

Viral RNA was extracted from plasma samples using the QIAamp® Ultrasens Virus Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. The HCV genotype was determined by NS5B amplification and sequencing according to the methodology described by Sandres-Sauné et al. ²³.

HCV viral load was measured using a commercially available kit (Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HCV test, version 2.0; Roche Diagnostics, Branchburg, NJ, USA) ²⁴.

Amplification and sequencing of the NS3 protease gene:

A fragment of 765 base pairs from the NS3 region of the HCV genome was amplified using primers and conditions previously described ¹². Extracted viral RNA was transcribed to cDNA and amplified using SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity DNA Polymerase Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA). Cycling conditions included cDNA synthesis step at 50 °C for 30 min followed by a denaturation step at 94 °C for 2 min, 35 cycles of PCR amplification (94 °C for 30 s, 56 °C for 30 s, 68 °C for 1 min and 30 sec.) and a final 5 min extension step at 68 °C.

Initial RT-PCR product underwent a second round of PCR by using Platinum Taq DNA polymerase (Life Technologies, Thermo Scientific, Carlsbad, CA). Cycling conditions for the second round consisted of a denaturation step at 94 °C for 3 min, followed by 30 cycles at 94 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, 72 °C for 1 min and 30 s, and a final 5 min extension step at 72 °C. PCR products from the second amplification were detected by agarose gel electrophoresis (2%).

PCR products were purified using an ExoSAP-IT PCR Clean-up kit (Affymetrix, Cleveland, OH, USA), then sequenced with BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Foster City, CA, USA) and electrophoresed in the ABI3500 DNA sequencer (Life Technologies, Foster City, CA, USA).

Analysis of amino acid substitutions (natural polymorphisms and mutations associated with resistance to protease inhibitors) in NS3 coding region:

The consensus sequences of each sample were obtained by aligning sense and antisense sequenced strands using CodonCode Aligner software (CodonCode Corporation, Dedham, MA, USA). Assembled contigs were aligned using the CLUSTALW and BioEdit v.7.0.8 softwares (Ibis Bioscience, Carlsbad, CA, USA). Nucleotides were translated into amino acids and analyzed for substitutions conferring reduced susceptibility to NS3 PIs: V36A/M, T54A/S, V55A, Q80K/R, R155K/T, A156S/T/V, D168A/V/E/T and for other substitutions (natural polymorphisms) in amino acid residues where mutations resistance have occurred: V36, F43, T54, V55, Q80, R109, S122, I132, S138, R155, A156, V158, D168, V170 and M175^{25,26}.

Genetic diversity and evaluation of selection pressure in HCV NS3 gene:

To obtain additional information on viral variability, genomic structure of the HCV NS3 region was explored for nucleotide diversity and for estimates of natural pressure exerted over it. Selection pressures were evaluated by comparing the rate of nonsynonymous substitutions by nonsynonymous site (dN) with the rate of synonymous substitutions by synonymous site (dS). In this way, detection of sites that were under selection was performed with SLAC method (Single-Likelihood Ancestor Counting) available at the website (<http://www.datamonkey.org/>) using the open-source HyPhy package²⁷. dN / dS ratio (ω) < 1 indicates purifying selection (against deleterious non-synonymous substitutions) and (ω) > 1 suggests diversifying selection. Nucleotide diversity (π), which is defined by the ratio of nucleotide differences per site, was estimated for all NS3 retrieved sequences at both nucleotide and amino acid levels using Mega 5 software²⁸. Also, dN and dS values were considered separately in the analysis, since an increase of non-synonymous substitutions could indicate positive selection, without variation of the dN / dS ratio. Analyzed samples were divided into subtypes (1a and 1b) and grouped conforming degree of liver fibrosis and previous interferon / ribavirin treatment.

Statistical analysis:

Categorical data were described in absolute and relative frequencies. Continuous variables were informed in median and interquartile range. To determine whether amino acid substitutions were associated with each collected clinical or demographic variable we used Pearson's chi-square or Fisher's exact test, as appropriate. Logistic regression analysis was performed to determine factors associated with the occurrence of amino acid substitutions in HCV NS3 protein. Variables with a p value <0.2 were included in a multiple logistic regression model calculated in a forward stepwise method. Two-tailed p values were calculated and considered statistically significant if p < 0.05. Analyses were conducted using SPSS software, version 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

This study was approved by the Ethics Committee of the ABC School of Medicine under protocol number 011/2010. Written informed consent was obtained from each participant prior to enrollment in the study.

Results:

Baseline clinical and virological features of the patients enrolled in the study are depicted in Table 1. Most subjects were male (63.2%). The median age was 44 (IQR: 37-52) years old. The most frequent comorbidities seen were ethanol use (27.1%), hypertension (16.2%), depression (7.3%) and diabetes mellitus (6.9%). The most common risk factors included intravenous drug use and high risk sexual behavior (34% and 30.7%, respectively).

One hundred and twelve patients (45.3%) were co-infected with HIV. In this group, the median CD4 T cell count was 570 (IQR: 388-746) cells/mm³. Only sixteen out of 96 (16.8%) had detectable HIV RNA in serum. One hundred and six HCV / HIV co-infected patients (94.6%)

were on antiretroviral therapy. Five HCV/HIV co-infected subjects (4.4%) were also infected with hepatitis B virus.

Regarding HCV profile, 141 patients (57.1%) had subtype 1a infection. Most subjects (80.6%) had HCV RNA > 400,000 IU/mL. One hundred forty-three patients (57.9%) have undergone previous treatment with interferon and ribavirin.

Overall, 21.9% of analyzed subjects had HCV strains with at least one amino acid substitution in NS3 protein [95% CI:15.0 – 53.9]. Distribution of frequency regarding NS3 substitutions per clinical and laboratory data can be seen in Table 1. Fourteen samples (5.6%) harbored at least one NS3 PI resistance mutation (T54S, V55A or Q80R) [95% CI:3.1 – 9.3]. Polymorphisms were more frequent in HCV subtype 1b, but there was no statistical difference between both groups regarding RAS' frequency (Table 4). In HCV subtype 1b, the most frequent NS3 substitution was detected at the amino acid residue S122 - 33 samples out of 38 (86.9%). On the other hand, there was no statistical difference in either proportion of polymorphisms or RASs between HCV mono and HCV-HIV co-infected patients (Table 4).

Univariate analysis showed HCV that genotype 1b, increased total and direct bilirubin levels and hypoalbuminemia were statistically associated with residue substitution in protease region (Table 1). Variables independently associated with NS3 amino acids substitutions (polymorphisms and RASs) were HCV genotype 1b, total bilirubin level > 1.5 ULN and albumin level < 3.5 g/dL (Table 2). However, the use of liver staging index FIB-4 did not show any association between advanced disease (FIB-4 > 3.25) and amino acid substitutions, as previously seen in the Table 1. This finding was confirmed by analysis of genetic diversity (π) in the protease sequence, which did not reveal a greater variability in the subgroup of patients with advanced fibrosis (FIB-4 > 3.25). Nucleotide diversity was only incongruent among HCV subtypes, with genotype 1b comprising greater variation relative to genotype 1a ($\pi = 0.110$ vs $\pi = 0.063$, respectively). Furthermore, the evaluation of selection pressure over HCV NS3 region revealed that silent nucleotide substitutions predominated over non-synonymous mutations in the advanced liver fibrosis group (dN/dS ratio < 1), being such finding consistent with a relatively conserved protease gene (Table 3).

Discussion:

Among 247 patients included in the study, 21.9% of analyzed subjects had HCV strains with at least one amino acid substitution in NS3 region and 14 samples (5.6%) harbored virus with at least one PI resistance mutation (T54S, V55A or Q80R). Also, variables independently associated with occurrence of amino acid substitution were HCV subtype 1b, total bilirubin level > 1.5 ULN and albumin level < 3.5 g/dL.

HCV subtype 1b - the most prevalent genotype in Brazil - was highly variable in this study, supporting the idea of local divergence in viral genetic profile according to the prevalence and to the geographic distribution of HCV genotypes^{16,29,30}. A greater heterogeneity in subtype 1b was seen in both genotypic analysis of nucleotide diversity and amino acid substitutions in predefined residues of NS3 region. According to our data the most common substitution in HCV genotype 1b samples was the natural polymorphism S122G, suggesting high variability at this position and a possible genomic signature of this genotype in Brazil. This finding was in agreement with other previous studies, as described below.

Patiño-Galindo et al. (2016) analyzed 3000 HCV genotype 1 sequences and found a larger variation at the position 122 in the protease of HCV genotype 1b comparing to genotype 1a (7.2% vs 13% in genotype 1a and 1b, respectively), although the frequency of this substitution was much lower than the values described by us³¹. Genetic variability has also been described elsewhere in HCV genotype 1b strains³². A study made by Paolucci et al. that enrolled 156 subjects also found a greater genetic diversity of NS3 in genotype 1b than in 1a - the number of amino acid changes for each natural polymorphic site was 186 in genotype 1b and 104 in genotype 1a. On the other hand, the number of sequences bearing PI's resistance substitutions was 2 fold higher in subtype 1a compared to subtype 1b ($p=0.07$)³³.

In Brazil, HCV genotype dissemination featured a dynamic and complex pattern. Subtype 1b seems to be the first to entry in this country, resulting from multiple introductions in different

geographic areas over the years³⁴. Subtype 1b lineages comprises a total of seven highly supported clades (BR1b_I to BR1b_VII), endorsing its greater variation compared with other genotypes such as 1a and 3³⁵. Selective pressure over time may have influenced the local evolution of HCV 1b towards diversity, so protease polymorphism in specific residues of Brazilian samples somehow distinguish from that retrieved from other countries. In addition, absence of mutation Q80K that confers reduced susceptibility to some second wave PIs (simeprevir, asunaprevir and paritaprevir) in genotype 1a samples are in line with other Brazilian studies, suggesting low prevalence of this substitution in our country^{13,14,36,37}. As a matter of fact, this finding correlates with the highest proportion of genotype 1a subclade IC circulating in Brazil, once variability at position 80 is strongly associated with genotype subclade IA (North-American clade) and uncommon in subclades IB and IC³⁸.

Increased bilirubin level and hypoalbuminemia were independently associated with NS3 amino acid substitution in our study. Both are considered surrogate markers of advanced liver disease, increasing as the disease progresses³⁹. Unfortunately, comparative analysis between HCV NS3 polymorphism and liver histology in our study was impaired due to unavailability of biopsy samples, since the retrospective nature of the study did not allow retrieving additional liver fragments for analysis. However, the use of a more accurate staging index (FIB-4) did not show any association between advanced disease and any amino acid substitution (Table 1). It is known that indirect staging scores as FIB-4 may produce inaccurate outcomes in comparison to liver biopsy (*gold standard*)^{40,41}. Nevertheless, FIB-4 is a widely used index in both HCV mono and HCV-HIV co-infected cohorts, yielding comparable results even for co-infected patients^{42,43}.

The frequency of patients with HCV strains harboring polymorphism in NS3 region showing laboratory markers of advanced liver disease (hypoalbuminemia and hyperbilirubinemia) was high, suggesting that the addition of viral variants with amino acid substitutions in the HCV quasispecies of the infected host have occurred over time. Chronically infected patients seem to have an impaired immune response featuring weak selective pressure on viral epitopes across HCV domains. Some authors postulate this may conclude in a greater viral genomic diversity and divergence^{44,45}.

However, these two biochemical markers when analyzed separately are not able to accurately predicting advanced liver fibrosis or cirrhosis. In addition to liver disease, some clinical conditions potentially impact albumin and bilirubin levels (i.e., malnutrition, antiretroviral drugs). This type of analysis demands validated noninvasive tests to determine the degree of hepatic fibrosis such as FIB-4, with high predictive positive value for diagnosis of extended fibrosis. As a matter of fact, NS3 polymorphisms were not associated with advanced liver disease when evaluated by FIB-4 score.

Genetic diversity analysis carried out herein revealed no association between advanced liver fibrosis and viral variability, once there was no greater nucleotide diversity of NS3 gene in both HCV genotype 1a and 1b in this subgroup related to overall sample. Evaluation of selection pressure in NS3 gene showed that synonymous substitutions (dS) were more frequent than nonsynonymous substitutions (dN). Negative selection pressure predominated with conservative substitutions over nonsynonymous selection (dN/dS=0.047 in subtype 1a and dN/dS=0.039 in subtype 1b). Therefore, nucleotide substitutions did not result in substantial genetic drift causing amino acid mutations of overall NS3 constraints, even in encoded sites known to impact susceptibility to protease inhibitors. Structural conservation of NS3/NS4A region is likely needed to an effective HCV life cycle. Accordingly, in a work carried out by Li et al. HCV samples retrieved from chronically infected patient were near genome-wide sequenced to understand viral evolution over infection time. Outcomes suggested that both synonymous and non-synonymous substitutions per site increased with the duration of infection. However, amino acid variations in NS3 region were lower in patients with severe liver disease, stressing its importance for maintenance of HCV replication fitness⁴⁶.

Natural selection analysis in nucleotide sequences may be influenced by sample size and study design. A limitation of this study was the small sample of subjects with advanced liver disease (28 subjects, 14 in each HCV genotype group). So, with the depicted results, it is premature to draw some conclusion on NS3 nucleotides diversity culminating in amino acid replacements as liver disease progresses, particularly in cirrhotic patients. Due to the cross-

sectional nature of this study, it is possible that some evolutionary phenomena including trends on genetic diversification of NS3 in association with different stages of liver fibrosis might be missed. Future researches preferably including prospective and longitudinal studies on HCV genomic variation are needed to clarify this question.

The incorporation of DAA in HCV therapy led to a great evolution in therapeutic armamentarium and to a new level in the study of HCV virology. So far, naturally occurring polymorphisms had no impact in classic therapy based on pegylated interferon and ribavirin⁴⁷. However, in DAA's era, viral variants may consist of several resistance associated mutants able to compromise the success of treatment. Amino acid substitutions resulting in decreased susceptibility to DAA might as well arise in any specifically-targeted antiviral domain (NS3/NS4A, NS5A and NS5B)⁴⁸. In the present study, approximately 1/5 of the HCV samples retrieved from treatment-naïve DAA patients showed at least one baseline substitution at some amino acid residue in NS3 region. However, the prevalence of PI resistance associated mutations was low, and these comprised only variants with little or even no impact in PI's effectiveness *in vitro*²⁶.

Also, according to our results HCV / HIV co-infection was not associated with a greater frequency of polymorphisms or resistance mutations in the protease domain. This result is in line with several published studies⁴⁹⁻⁵⁴. In addition, resistance mutations have not been observed more frequently in HCV/HIV co-infected patients than in HCV mono-infected patients in genetic domains other than NS3 (i.e. NS5A and NS5B)⁵⁵. Nevertheless, enrolled HCV / HIV co-infected subjects had a good immune profile, as the great majority of these patients were on antiretroviral therapy. This fact may have been influenced the equality in genomic variation between mono and co-infected patients^{56,57}.

In conclusion, NS3 region of HCV genotype 1b seems to bear polymorphisms in greater frequency compared to genotype 1a. Genomic constitution of HCV differs conforming to geographic distribution so the discrimination of viral population profiles concerning target proteins (i.e. NS3, NS5A and NS5B) reflects an important strategy in the context of DAA treatment. It may also have the potential to promote a safe and optimized use of PI based schemes and to contest the real need of performing resistance tests before first-line therapy in some locations. Although biological markers of advanced liver disease such as hyperbilirubinemia and hypoalbuminemia were associated with protease polymorphisms, the use of an accurate and indirect staging index (FIB-4) was not able to predict NS3 genetic variants in patients with advanced liver fibrosis. Once DAA treatment failure seems to be multifactorial and consequent to the emergence of HCV polymorphisms alongside negative predictors of the host (ie., cirrhosis, previous treatment failure), this fact should be evaluated with caution by further studies since it may influence clinical decision-making strategies presented in hepatitis C treatment guidelines, particularly regarding time of starting DAA therapy and safety to postpone it in mild to moderate liver disease patients.

Disclosure statement:

JRRP is an employee at Albert Einstein Medicina Diagnóstica, São Paulo, Brazil. All other authors who took part in this study declare that they do not have anything to disclose regarding funding or conflicts of interest with respect to the manuscript.

Acknowledgements:

This Project was supported by grant 2011/50633-4 from the São Paulo Research Foundation (FAPESP) and the Alves de Queiroz Family Fund for Research. GLN is a graduate student in the Department of Infectious Diseases at the University of São Paulo. FMM and MSG-G were graduate student from the Department of Gastroenterology at the University of São Paulo and received fellowships from FAPESP (2009/53306-4 and 2010/50081-9) and from Fundação Faculdade de Medicina de São Paulo. CFN was graduate student from the Department of Gastroenterology at the University of São Paulo and received a fellowship from CAPES. JRRP

and MCM-C received fellowships from CNPq (Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 2).

References:

1. Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology* 2013;57:1333-1342.
2. Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J Hepato* 2014;61:S45-S57.
3. Amaku M, Burattini MN, Coutinho FAB, et al. Estimating the Size of the HCV Infection Prevalence: A Modeling Approach Using the Incidence of Cases Reported to an Official Notification System. *Bull Math Biol* 2016;78:970-990.
4. Welsch C, Jesudian A, Zeuzem S, Jacobson I. New direct-acting antiviral agents for the treatment of hepatitis C virus infection and perspectives. *Gut* 2012;61 Suppl 1:i36-46.
5. Sarrazin C. The importance of resistance to direct antiviral drugs in HCV infection in clinical practice. *J Hepatol* 2016;64:486-504.
6. Gutierrez JA, Lawitz EJ, Poordad F. Interferon-free, direct-acting antiviral therapy for chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2015;22:861-870.
7. Christensen S, Mauss S, Hueppe D, et al. Objective Directly Acting Agents Against HCV - Results From the German Hepatitis C Cohort (GECCO). <http://www.croiconference.org>. Published 2016. Accessed November 10, 2016.
8. Pawlotsky J-M. Hepatitis C Treatment: The Data Flood Goes on—An Update From the Liver Meeting 2014. *Gastroenterology* 2015;148:468-479.
9. Pawlotsky J-M. Hepatitis C Virus Resistance to Direct-Acting Antiviral Drugs in Interferon-Free Regimens. *Gastroenterology* 2016;151:70-86.
10. Vermehren J, Sarrazin C. The role of resistance in HCV treatment. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2012;26:487-503.
11. Serre SBN, Jensen SB, Ghanem L, et al. Hepatitis C Virus Genotype 1 to 6 Protease Inhibitor Escape Variants: In Vitro Selection, Fitness, and Resistance Patterns in the Context of the Infectious Viral Life Cycle. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:3563-3578.
12. Peres-da-Silva A, de Almeida AJ, Lampe E. Mutations in hepatitis C virus NS3 protease domain associated with resistance to specific protease inhibitors in antiviral therapy naïve patients. *Arch Virol* 2010;155:807-811.
13. Zeminian LB, Padovani JL, Corvino SM, Silva GF, Pardini MIDMC, Grotto RMT. Variability and resistance mutations in the hepatitis C virus NS3 protease in patients not treated with protease inhibitors. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013;108:13-17.
14. Nishiya AS, De Almeida-Neto C, Ferreira SC, et al. HCV genotypes, characterization of mutations conferring drug resistance to protease inhibitors, and risk factors among blood donors in Sao Paulo, Brazil. *PLoS One* 2014;9:e86413.
15. de Carvalho IMVG, Alves R, de Souza PAVM, et al. Protease inhibitor resistance mutations in untreated Brazilian patients infected with HCV: novel insights about targeted genotyping approaches. *J Med Virol* 2014;86:1714-1721.
16. Hoffmann L, Ramos JA, de Souza EV, et al. Dynamics of resistance mutations to NS3 protease inhibitors in a cohort of Brazilian patients chronically infected with hepatitis C virus (genotype 1) treated with pegylated interferon and ribavirin: a prospective longitudinal study. *Virol J* 2013;10:57.
17. Lisboa-Neto G, Noble CF, Rebello Pinho JR, et al. Resistance mutations are rare among protease inhibitor treatment-naïve hepatitis C genotype-1 patients with or without HIV coinfection. *Antivir Ther* 2015;20:281-287.
18. Cuypers L, Ceccherini-Silberstein F, Van Laethem K, Li G, Vandamme A-M, Rockstroh JK. Impact of HCV genotype on treatment regimens and drug resistance: a snapshot in time. *Rev Med Virol* 2016;19:57-64.

19. Lawitz E, Sulkowski MS, Ghalib R, et al. Simeprevir plus sofosbuvir, with or without ribavirin, to treat chronic infection with hepatitis C virus genotype 1 in non-responders to pegylated interferon and ribavirin and treatment-naïve patients: The COSMOS randomised study. *Lancet* 2014;384:1756-1765.
20. Ramachandran S, Campo DS, Dimitrova ZE, Xia G, Purdy M a, Khudyakov YE. Temporal variations in the hepatitis C virus intrahost population during chronic infection. *J Virol* 2011;85:6369-6380.
21. von Hahn T, Yoon JC, Alter H, et al. Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. *Gastroenterology* 2007;132:667-678.
22. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology* 2006;43:1317-1325.
23. Sandres-Sauné K, Deny P, Pasquier C, Thibaut V, Duverlie G, Izopet J. Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of the NS5b region. *J Virol Methods* 2003;109:187-193.
24. Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Rodriguez C, Soulier A, Poveda J-D, Pawlotsky J-M. The Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HCV Test, Version 2.0, Real-Time PCR Assay Accurately Quantifies Hepatitis C Virus Genotype 4 RNA. *J Clin Microbiol* 2013;51:1078-1082.
25. Wyles DL. Antiviral resistance and the future landscape of hepatitis C virus infection therapy. *J Infect Dis* 2013;207 Suppl:S33-9.
26. Lontok E, Harrington P, Howe A, et al. Hepatitis C virus drug resistance-associated substitutions: State of the art summary. *Hepatology* 2015;62:1623-1632.
27. Pond SLK, Frost SDW. Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics* 2005;21:2531-2533.
28. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 2011;28:2731-2739.
29. Campiotto S, Pinho JRR, Carrilho FJ, et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Brazilian J Med Biol Res* 2005;38:41-49.
30. McCloskey RM, Liang RH, Joy JB, et al. Global Origin and Transmission of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 3 Q80K Polymorphism. *J Infect Dis* 2014;:1-8.
31. Patiño-Galindo JÁ, Salvatierra K, González-Candelas F, López-Labrador FX. Comprehensive screening for naturally occurring hepatitis c virus resistance to direct-acting antivirals in the NS3, NS5A, and NS5B genes in worldwide isolates of viral genotypes 1 to 6. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:2402-2416.
32. Suzuki F, Sezaki H, Akuta N, et al. Prevalence of hepatitis C virus variants resistant to NS3 protease inhibitors or the NS5A inhibitor (BMS-790052) in hepatitis patients with genotype 1b. *J Clin Virol* 2012;54:352-354.
33. Paolucci S, Fiorina L, Piralla A, et al. Naturally occurring mutations to HCV protease inhibitors in treatment-naïve patients. *Virol J* 2012;9:245.
34. Nishiya AS, de Almeida-Neto C, Romano CM, et al. Phylogenetic analysis of the emergence of main hepatitis C virus subtypes in São Paulo, Brazil. *Brazilian J Infect Dis* 2015;19:473-478.
35. Lampe E, Lewis-Ximenez L, Espírito-Santo MP, et al. Genetic diversity of HCV in Brazil. *Antivir Ther* 2013;18:435-444.
36. Peres-da-Silva A, de Almeida AJ, Lampe E. NS5A inhibitor resistance-associated polymorphisms in Brazilian treatment-naïve patients infected with genotype 1 hepatitis C virus. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:726-730.
37. Gaspareto K V, Ribeiro RM, de M Malta F, et al. Resistance-associated variants in HCV subtypes 1a and 1b detected by Ion Torrent sequencing platform. *Antivir Ther* 2016:[Epub ahead of print].
38. Santos AF, Bello G, Vidal LL, Souza SL, Mir D, Soares MA. In-depth phylogenetic analysis of hepatitis C virus subtype 1a and occurrence of 80K and associated

- polymorphisms in the NS3 protease. *Sci Rep* 2016;6:31780.
39. Lingala S, Ghany MG. Natural History of Hepatitis C. *Gastroenterol Clin North Am* 2015;44:717-734.
 40. Vallet-Pichard A, Mallet V, Nalpas B, et al. FIB-4: an inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. comparison with liver biopsy and fibrotest. *Hepatology* 2007;46:32-36.
 41. Stasi C. Non-invasive assessment of liver fibrosis: Between prediction/prevention of outcomes and cost-effectiveness. *World J Gastroenterol* 2016;22:1711-1720.
 42. Ramos Paesa C, Marcilla F, López G, Hueso E, Pascual A, Aguirre JM. Valuation of APRI and Forns models for non-invasive diagnosis of fibrosis in patients with hepatitis C in coinfectd and non-coinfectd with HIV. *An Med Interna* 2007;24:369-374.
 43. Luetkemeyer AF, Wyles DL. CROI 2016 : Viral Hepatitis and Liver Fibrosis. 2016;24:47-58.
 44. Farci P, Wollenberg K, Diaz G, et al. From the Cover: Profibrogenic chemokines and viral evolution predict rapid progression of hepatitis C to cirrhosis. *Proc Natl Acad Sci* 2012;109:14562-14567.
 45. Heim MH, Thimme R. Innate and adaptive immune responses in HCV infections. *J Hepatol* 2014;61:S14-S25.
 46. Li H, Hughes AL, Bano N, et al. Genetic Diversity of Near Genome-Wide Hepatitis C Virus Sequences during Chronic Infection: Evidence for Protein Structural Conservation Over Time. *PLoS One* 2011;6:e19562.
 47. Wohnsland A, Hofmann WP, Sarrazin C. Viral determinants of resistance to treatment in patients with hepatitis C. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:23-38.
 48. Forton DM. How much of a problem is resistance in treating hepatitis C? *Curr Opin Infect Dis* 2016;29:625-631.
 49. Halfon P, Bourlière M, Khiri H, et al. Mutation rate in hepatitis C virus NS3 protease is not influenced by HIV-1 protease inhibitor therapy. *AIDS* 2008;22:1694-1696.
 50. Trimoulet P, Belzunce C, Faure M, et al. Hepatitis C virus (HCV) protease variability and anti-HCV protease inhibitor resistance in HIV/HCV-coinfectd patients. *HIV Med* 2011;12:506-509.
 51. Gaudieri S, Rauch A, Pfafferott K, et al. Hepatitis C virus drug resistance and immune-driven adaptations: relevance to new antiviral therapy. *Hepatology* 2009;49:1069-1082.
 52. Vicenti I, Rosi A, Saladini F, et al. Naturally occurring hepatitis C virus (HCV) NS3/4A protease inhibitor resistance-related mutations in HCV genotype 1 -infected subjects in Italy. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:984-987.
 53. Treviño A, de Mendoza C, Parra P, et al. Natural polymorphisms associated with resistance to new antivirals against HCV in newly diagnosed HIV-HCV-coinfectd patients. *Antivir Ther* 2011;16:413-416.
 54. Applegate TL, Gaudieri S, Plauzolles A, et al. Naturally occurring dominant drug resistance mutations occur infrequently in the setting of recently acquired hepatitis C. *Antivir Ther* 2014;20:199-208.
 55. Paolucci S, Fiorina L, Mariani B, et al. Naturally occurring resistance mutations to inhibitors of HCV NS5A region and NS5B polymerase in DAA treatment-naïve patients. *Virol J* 2013;10:355.
 56. Rehmann B. Science in medicine Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses : a tale of coevolution and coexistence. *Sci Med* 2009;119:1745-1754.
 57. Ruhl M, Knuschke T, Schewior K, et al. CD8+ T-cell response promotes evolution of hepatitis c virus nonstructural proteins. *Gastroenterology* 2011;140:2064-2073.

Table 1 – Distribution of patients infected with HCV genotype 1 strains with amino acid substitution in NS3 protein according to clinical and laboratorial variables

Characteristics		Total (n=247)	(%)	NS3 aa substitution (%)	OR	95% CI	p
Gender							
	Female	91	36,8	18 (19.8)	1		0.546
	Male	156	63,2	36 (23.1)	1.22	0.64 - 2.30	
Age (years)							
	≤ 40	93	37,7	20 (21.5)	1		0.916
	> 40	154	62,3	34 (22.1)	1.03	0.55 - 1.93	
Risk factors							
	Blood transfusion before 1993	48	19,4	10 (20.8)	0.92	0.42 - 2.00	0.848
	Intravenous drug use	84	34	21 (25.0)	1.31	0.70 - 2.45	0.392
	High risk sexual behavior	77	31,2	14 (18.1)	0.74	0.37 - 1.45	0.383
Previous interferon / ribavirin treatment							
	No	143	57,9	29 (20.3)	1		0.480
	Yes	104	42,1	25 (24.0)	1.24	0.68 - 2.28	
HIV coinfection							
	No	135	54,7	31 (23.0)	1		0.646
	Yes	112	45,3	23 (20.5)	0.87	0.47 - 1.59	
HCV genotype							
	1a	141	57,1	16 (11.4)	1		<0.001
	1b	106	42,9	38 (35.9)	4.37	2.27 - 8.40	
HCV viral load (IU/mL)							
	≤ 400.000	48	19,4	11 (22.9)	1		0.844
	> 400.000	199	80,6	43 (21.6)	0.93	0.44 - 1.97	
AST (IU/L)							
	≤ 1.5 ULN	180	73.8	37 (20.6)	1		0.320
	> 1.5 ULN	64	26.2	17 (26.6)	0.71	0.37 - 1.39	
ALT (IU/L)							
	≤ 1.5 ULN	163	66,8	37 (22.7)	1		0.762
	> 1.5 ULN	81	33,2	17 (21.0)	0.9	0.47 - 1.73	
Alkaline phosphatase (IU/L)							
	≤ 1.5 ULN	202	91,4	41 (20.3)	1		0.538
	> 1.5 ULN	19	8,6	5 (26.3)	1.4	0.48 - 4.12	
GGT (IU/L)							
	≤ 1.5 ULN	114	49,4	23 (20.2)	1		0.823
	> 1.5 ULN	117	50,6	25 (21.4)	1.08	0.57 - 2.03	
Total bilirubin (mg/dL)							
	≤ 1.5 ULN	223	94,9	47 (21.1)	1		0.028
	> 1.5 ULN	12	5,1	6 (50.0)	3.74	1.15 - 12.14	
Direct bilirubin (mg/dL)							
	≤ 1.5 ULN	209	88,9	43 (20.6)	1		0.044
	> 1.5 ULN	26	11,1	10 (38.5)	2.41	1.02 - 5.69	
Leukocytes (/mm³)							
	≥ 5.000	158	64.8	36 (22.8)	1	0.47 - 1.70	0.739
	< 5.000	86	35.2	18 (20.9)	0.90		
Platelets (/mm³)							
	≥ 150.000	206	85,5	46 (22.3)	1		0.945
	< 150.000	35	14,5	8 (22.9)	1.03	0.44 - 2.42	
Albumin (g/dL)							
	≥ 3.5	210	95,5	43 (20.5)	1		0.038
	< 3.5	10	4,5	5 (50.0)	3.88	1.08 - 14.03	
INR							
	≤ 1.2	211	95,9	46 (21.8)	1		0.127
	> 1.2	9	4,1	4 (44.4)	2.87	0.74 - 11.12	
FIB4							
	≤ 3.25	219	88.7	47 (21.5)	1	0.33 - 2.04	0.670
	> 3.25	28	11.3	7 (25)	0.82		

Categorical data expressed in absolute and relative frequency

†Pearson's χ^2 test

High-risk sexual behavior (sexual intercourse with HIV or HCV positive partners or intravenous drug users; sexual intercourse without use of condom or more than 3 sexual partners per year); ULN: Upper limit of normality

Table 2 - Variables independently associated with the occurrence of HCV strains with NS3 polymorphism in HCV genotype 1 infected patients

Characteristics	OR _{crud}	OR _{adj}	95% CI	p*
HCV genotype				
1a	1			<0.001
1b	4.37	5.68	2.61 - 12.35	
Total bilirubin (mg/dL)				
≤ 1.5 ULN	1			0.033
> 1.5 ULN	3.74	5.25	1.19 - 23.16	
Albumin (g/dL)				
≥ 3.5	1			0.033
< 3.5	3.88	5.25	1.19 - 23.16	

OR_{crud}: crude odds ratio

OR_{adj}: adjusted odds ratio

*Multivariate binary logistic regression model

Table 3 - Nucleotide diversity and evaluation of selection pressure in HCV NS3 region

	FIB-4 > 3.25 (n=28)					Total (n=247)		
	dS	dN	ω	+	π	ω	+	π
NS3 HCV genotype 1a	1.23	0.04	0.047	-	0.065	0.045	40	0.063
NS3 HCV genotype 1b	1.49	0.60	0.039	-	0.110	0.050	18	0.110

ω = dN/dS ratio

(+) = codons under positive (diversifying) selection

π = Nucleotide diversity in HCV NS3 gene

Table 4 - HCV polymorphisms and resistance-associated substitutions (RASs) in HCV infected patients according to HCV genotype and HIV coinfection

	HCV 1a (n=141)	HCV 1b (n=106)	p-value*	HCV mono-infection (n=135)	HCV/HIV coinfection (n=112)	p-value*
Polymorphisms ^a (n, %)	5 (3.5%)	35 (33%)	<0.001	26 (19.2%)	14 (12.5%)	0.151
RASs ^b (n, %)	11 (7.8%)	3 (2.8%)	0.094	5 (3.7%)	9 (8%)	0.143

a: M175L, Q80L, S122 G/N/T, V55I and V36L

b: T54S, V55A and Q80R

*Pearson's X² test