Isabel Maria Vicente Guedes de Carvalho Mello

**Evidências moleculares da transmissão
horizontal do vírus da hepatite C (VHC) entre
cônjuges**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do título de
Doutor em ciências

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Flair José Carrilho

São Paulo
2006

Dedico este trabalho...

*Às minhas filhas
Alessandra e Thaís*

*Obrigada pelo carinho,
compreensão e por tudo o que
você me ensinaram.*

*" O que vale na vida não é o ponto de
partida e sim a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim terás
o que colher."*

Cora Coralina

*Ao marido, Oswaldo,
Meu irmão Gonçalo e minha cunhada Paula,
Meus avós Leopoldina e Alberto (in memorian)
Meus pais Elizabete e Dinis (in memorian),
E amigo Rogério.*

Obrigada por acreditarem em mim, me incentivarem e me escutarem sempre, independente da distância que nos separa, mesmo quando nada faz sentido.

Agradecimentos

Durante a realização deste trabalho tive a oportunidade de conhecer e conviver com várias pessoas. Pessoas que trabalham em diferentes áreas, pessoas simpáticas, antipáticas, sorridentes, sisudas, bem humoradas, mal humoradas, pessoas que me ensinaram que muitas vezes os conceitos que formamos, sem as conhecermos, podem ser completamente errados, enfim o que posso chamar de todos os tipos de pessoas. Mas, com certeza, com todas elas eu aprendi alguma coisa e todo esse convívio foi influenciando a finalização deste trabalho e na minha formação como pesquisadora. A todos, meus sinceros agradecimentos.

Entretanto, não posso deixar de fazer um agradecimento especial aos que conviveram comigo bem de perto e sempre tiveram uma palavra de carinho para me dizer, ajudando-me nas horas em que precisei.

- Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Flair José Carrilho, que confiou em mim como profissional desde o primeiro momento e acredita que a interação entre a clínica e a pesquisa básica, é de fundamental importância para o desenvolvimento da ciência médica. Obrigada pelas palavras de apoio e incentivo, mesmo em momentos difíceis, durante estes anos de trabalho em conjunto.
- Ao Dr. João Renato Rebello Pinho, chefe, amigo, co-orientador deste trabalho e de todos os projetos nos quais venho trabalhando. Obrigada pela oportunidade, por me incentivar nos estudos de biologia molecular, pela confiança que sempre depositou em mim e pelo apoio nas horas difíceis.

- Ao Fundador do Alves de Queiróz Family Fund for Research, Sr. João Alves de Queiróz Filho, por acreditar na pesquisa realizada pelo grupo de Fígado, da Gastroenterologia Clínica da FMUSP e na pesquisa de nosso País. Exemplo de incentivo, da iniciativa privada, à pesquisa médica e básica.
- Às amigas e colegas Fernanda de Mello Malta e Michele Mesquita Soares Gomes por tudo, pela ajuda, confiança, pelas palavras de carinho em todos os momentos, pelo incentivo sempre que pensei em desistir, pelas conversas nos almoços, cafés e caipirinhas no final do dia, enfim pela grande amizade que formamos ao longo dos anos de convívio e pela oportunidade que tive de crescer profissionalmente ao estar junto de vocês e tentar orientá-las.
- Aos amigos e ex-colegas do grupo Eymard e Cíntia obrigada por confiarem em mim para auxiliá-los nas teses e, principalmente, pela amizade que criamos ao longo dos anos de trabalho. Obrigada também, por me escutarem nas horas chatas. Estou feliz porque a distância geográfica não interferiu na nossa amizade e espero que continuemos discutindo assuntos profissionais para continuarmos crescendo juntos.
- À amiga Débora que me acompanha desde o mestrado, sempre pronta a me ajudar no que for preciso.
- Ao Prof. Dr. Luís Caetano da Silva, um exemplo de professor, médico e principalmente, pesquisador. Obrigada pelas suas orientações, pelas palavras de incentivo e pela confiança que o Senhor sempre demonstrou ter em mim. É uma pena que o cotidiano não nos permita mais tempo para discutir questões científicas. Com certeza esta é uma oportunidade que muitos gostariam de ter, mas poucos têm.

- Ao chefe e amigo Carlos Augusto Pereira que, pela segunda vez, me recebeu em seu laboratório, obrigada por confiar no meu trabalho.
- Aos amigos, do "ex" e "atual" laboratório, Ronaldo, Lúcia, Maria Abel, Dulcinéia, Francisca e aos mais novos Soraia, Marisa, Marco, Alexandra, Mari, Coutinho, Aldo, Elaine, Álvaro e Heloísa, obrigada por terem me recebido tão carinhosamente, pela segunda vez. Obrigada por me escutarem nas reuniões mesmo quando falo demais.
- Aos profissionais da ortopedia do centro de reabilitação do Hospital Israelita Albert Einstein, Rodrigo, Andréa, Ricardo, Caio, Rosana, Luciana, Cristiana, Carol e Ana Rosa, que me ajudaram a superar momentos difíceis e sempre me receberam com sorrisos, mesmo quando meu humor não era dos melhores. Foi bom ter convivido com vocês neste último ano.
- Aos mais novos estagiários Gregório e Gabriela obrigada pela ajuda que sempre tive e obrigada por acreditarem em mim.
- À equipe do Laboratório Avançado de Saúde Pública, da Fundação Osvaldo Cruz, Salvador, Bahia, Flora, Luis, Arthur, Eugênia e todos que indiretamente sempre estiveram prontos a me ajudar. Obrigada pela paciência que tiveram para me ensinar filogenia. Com certeza sem a ajuda de vocês este trabalho não teria sido realizado por mim.
- Ao Túlio de Oliveira, pesquisador do "*Evolutionary Biology Group - University Of Oxford*", pela fundamental participação na minha formação nos estudos de filogenia.

- À equipe do Laboratório Bioinformática da USP, Dr. Paolo Zanotto, Corsini, Motoki e Anderson, obrigada pelo suporte e por estarem sempre prontos a me socorrer a cada grito.
- Às amigas Rejane e Suzete obrigada pela oportunidade de conviver com vocês e pelo respeito que sempre tiveram quanto ao trabalho da nossa equipe.
- A todos os alunos que passaram pelo laboratório e me permitiram crescer como profissional e aprender a conviver com as adversidades.
- À Dulce pela ajuda na correção final deste trabalho.
- Às minhas amigas, Cidinha, Mônica, Rubia, Denise e Silvia que, apesar de muitas vezes não entenderem o porquê de muitas situações, sempre me escutaram, me incentivaram e me animaram nos piores momentos. Espero que agora eu consiga mais tempo para almoçarmos, darmos boas risadas e relaxarmos.
- À Aparecida Maria, por toda a sua dedicação, cuidando da rotina da minha família. Com certeza sem você as coisas ficariam mais difíceis.
- Aos funcionários da secretaria da Gastroenterologia, da Faculdade de Medicina da USP, Claudia, Sônia, Fátima, Junior e à técnica de laboratório Virginia que sempre estiveram dispostos a me ajudar.
- À Kátia e Fátima, secretárias do Instituto de Medicina Tropical, USP, pela ajuda sempre que precisei.
- Ao Instituto Adolfo Lutz pela utilização da estrutura física para a realização deste trabalho.

- À secretaria da pós-graduação da Área de Fisiopatologia Experimental da Faculdade de Medicina da USP pelo suporte.
- Aos órgãos financiadores: FAPESP (projeto Rede de Diversidade Genética Viral - VGDN), Alves de Queiróz Family Fund for Research, Instituto Adolfo Lutz e Instituto Butantan.

Esta Tese está de acordo com:

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de biblioteca e documentação; 2004.

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

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.	2
1.1 O Vírus da Hepatite C.....	3
1.1.1 Estrutura genômica e proteínas virais.....	4
1.2 Diversidade genética.....	11
1.3 Diagnóstico.....	14
1.4 Epidemiologia e transmissão.....	15
1.5 Análise filogenética.....	19
1.6 Justificativa.....	21
2. OBJETIVOS	24
3. MÉTODOS	26
3.1 Fluxogramas metodológicos.....	26
3.1.1 Casuística.....	28
3.1.2 Extração de Ácidos Nucléicos.....	33
3.1.3 Síntese de DNA complementar (cDNA).....	33
3.1.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	33
3.1.4.1 Primeira estratégia de PCR.....	36
3.1.4.2 Segunda estratégia de PCR.....	37
3.1.5 Identificação e Quantificação dos Produtos de PCR.....	39
3.1.6 Seqüenciamento dos Produtos de PCR.....	39
3.1.6.1 Reação de seqüenciamento.....	40
3.1.6.2 Purificação após reação de seqüenciamento.....	41
3.1.6.3 Preparo de amostras para apicação no gel de seqüenciamento.....	41
3.1.6.4 Eletroforese.....	42

3.1.7	Análise de Seqüências.....	42
3.1.7.1	Validação, montagem da seqüência consenso e alinhamento.....	42
3.1.8	Genotipagem.....	43
3.1.9	Análise Filogenética.....	44
3.1.9.1	Análise do sinal filogenético.....	44
3.1.9.2	Construção da topologia das árvores filogenéticas.....	45
3.1.9.3	Análise da variabilidade das seqüências de nucleotídeos...	47
3.1.10	Biossegurança.....	47
3.1.11	Aspectos éticos.....	48
4.	RESULTADOS	50
4.1	Genotipagem pela região NS5B.....	50
4.2	PCR e seqüenciamento das amostras dos casais e controles.....	50
4.3	Análise do sinal filogenético.....	52
4.4	Variabilidade nucleotídica.....	54
4.5	Árvores filogenéticas.....	59
5.	DISCUSSÃO	74
6.	CONCLUSÕES	87
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
	APÊNDICES	

Lista de Abreviaturas, símbolos e siglas

bp	Pares de base
°C	Graus Celsius
CD81	Molécula diferenciadora de grupo
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CRS	Sinal de Retenção Citoplasmático
ddNTPS	Dideoxynucleotídeos trifosfatos
DNA	Ácido deoxirribonucléico
dNTPS	Desoxynucleotídeos trifosfatos
DTT	Dithiothreitol
E1	Glicoproteína 1 do envelope
E2	Glicoproteína 2 do envelope
EDTA	Ácido etilenodiamino-tetracético
eIF-2 α	Subunidade α do fator iniciador da tradução 2
ELISA	Ensaio imunoenzimático
<i>et al.</i>	e colaboradores
gp	Glicoproteína
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HVR1	Região hipervariável 1
HVR2	Região hipervariável 2
ISDR	Região Determinante de Sensibilidade ao Interferon
IFN	Interferon

kb	Quilobase
KCl	Cloreto de potássio
M	Molar
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
ml	Mililitro
ng	Nanograma
NLS	Sinal de Localização Nuclear
nm	Nanometro
nt	Nucleotídeos
ORF	Fase Aberta de Leitura (<i>“open reading frame”</i>)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PePHD	Domínio homólogo ao sítio de fosforilação da PKR
PKR	Proteína Quinase R
pmol	picomol
Primer	Oligonucleotídeo iniciador
q.s.p	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
RT	Transcrição reversa
TA	Temperatura ambiente
TBE	Tris-ácido bórico e EDTA
TEMED	Tetramethylethylenediamine

U.V.	Luz ultra-violeta
V3	Região Variável 3
VHC	Vírus da Hepatite C
VHG	Vírus da Hepatite G
µg	Micrograma
µL	Microlitro

Lista de Figuras

Figura 1 -	Partícula viral do Vírus da Hepatite C.....	3
Figura 2 -	Organização genômica do vírus da Hepatite C.....	4
Figura 3 -	Árvore filogenética de seqüências da região NS5B.....	12
Figura 4 -	Variabilidade genética das diferentes regiões do genoma do VHC.....	14
Figura 5 -	Esquema do sítio de anelamento dos primers utilizados para amplificação parcial da região NS5B (1 ^a e 2 ^a PCR).....	35
Figura 6 -	Esquema do sítio de anelamento dos primers utilizados para amplificação parcial da região NS3 (1 ^a e 2 ^a PCR da primeira estratégia).....	36
Figura 7 -	Esquema do sítio de anelamento dos <i>primers</i> utilizados para amplificação parcial da região NS3 (1 ^a e 2 ^a PCR da segunda estratégia).....	37
Figura 8 -	Esquema representativo do mapeamento de verossimilhança (<i>likelihood mapping</i>).....	45
Figura 9 -	Mapeamento da verossimilhança (<i>Likelihood mapping</i>).....	53
Figura 10 -	Árvore filogenética, não enraizada, de 32 seqüências da região NS5B com 344 nucleotídeos (18 seqüências dos casais deste estudo destacadas em vermelho e 14 do <i>Genbank</i> em cinza) gerada no programa Clustal X utilizando-se o método de distância com o modelo TrNef+I+G e algoritmo de <i>Neighbor-joining</i> para reconstrução de topologias.....	60
Figura 11 -	Árvore filogenética, não enraizada, de 28 seqüências da região NS3 com 619 nucleotídeos (14 seqüências dos casais deste estudo destacadas em vermelho e 14 do <i>Genbank</i> em cinza) gerada no programa Clustal X utilizando-se o método de distância com o modelo TrN+I+G e algoritmo de <i>Neighbor-joining</i> para reconstrução de topologias.....	61

- Figura 12 -** Árvore filogenética, não enraizada, de 28 seqüências da região NS3/NS5B com 960 nucleotídeos (14 seqüências dos casais deste estudo destacadas em vermelho e 14 do *Genbank* em cinza) gerada no programa Clustal X utilizando-se o método de distância com o modelo TrN+I+G e algoritmo de *Neighbor-joining* para reconstrução de topologias..... 62
- Figura 13 -** Árvore filogenética, não enraizada, de 32 seqüências da região NS5B com 344 nucleotídeos (18 seqüências dos casais deste estudo destacadas em vermelho e 14 do *Genbank* em cinza) gerada no programa Clustal X utilizando-se o método de máxima verossimilhança com o modelo TrNef+I+G e algoritmo de rearranjo dos braços (*Branch-swapping*) seccionando a árvore em dois pedaços e ligando em outras partes (*TBR*) para reconstrução de topologias..... 63
- Figura 14 -** Árvore filogenética, não enraizada, de 28 seqüências da região NS3 com 619 nucleotídeos (14 seqüências dos casais deste estudo destacadas em vermelho e 14 do *Genbank* em cinza) gerada no programa Clustal X utilizando-se o método de máxima verossimilhança com o modelo TrN+I+G e algoritmo de rearranjo dos braços (*Branch-swapping*) seccionando a árvore em dois pedaços e ligando em outras partes (*TBR*) para reconstrução de topologias..... 64
- Figura 15 -** Árvore filogenética, não enraizada, de 28 seqüências da região NS3/NS5B com 960 nucleotídeos (14 seqüências dos casais deste estudo destacadas em vermelho e 14 do *Genbank* em cinza) gerada no programa Clustal X utilizando-se o método de máxima verossimilhança com o modelo TrN+I+G e algoritmo de rearranjo dos braços (*Branch-swapping*) seccionando a árvore em dois pedaços e ligando em outras partes (*TBR*) para reconstrução de topologias..... 65
- Figura 16 -** Árvore filogenética, não enraizada, de 74 seqüências da região NS5b com 344 nucleotídeos (18 seqüências dos casais deste estudo destacadas em vermelho, 42 controles do estudo e 14 do *Genbank* em cinza) gerada no programa Clustal X utilizando-se o método de distância com o modelo TrNef+I+G e algoritmo de *Neighbor-joining* para reconstrução de topologias..... 66

- Figura 17 -** Árvore filogenética, não enraizada, de 70 seqüências da região NS3 com 619 nucleotídeos (14 seqüências dos casais deste estudo destacadas em vermelho, 42 controles do estudo e 14 do *Genbank* em cinza) gerada no programa Clustal X utilizando-se o método de distância com o modelo TrN+I+G e algoritmo de *Neighbor-joining* para reconstrução de topologias..... 67
- Figura 18 -** Árvore filogenética, não enraizada, de 70 seqüências da região NS3/NS5B com 960 nucleotídeos (14 seqüências dos casais deste estudo destacadas em vermelho, 42 controles do estudo e 14 do *Genbank* em cinza) gerada no programa Clustal X utilizando-se o método de distância com o modelo TrN+I+G e algoritmo de *Neighbor-joining* para reconstrução de topologias..... 68
- Figura 19 -** Árvore filogenética, não enraizada, de 74 seqüências da região NS5B com 344 nucleotídeos (18 seqüências dos casais deste estudo destacadas em vermelho, 42 controles do estudo e 14 do *Genbank* em cinza) gerada no programa Clustal X utilizando-se o método de máxima verossimilhança com o modelo TrNef+I+G e algoritmo de rearranjo dos braços (*Branch-swapping*) seccionando a árvore em dois pedaços e ligando em outras partes (*TBR*) para reconstrução de topologias..... 69
- Figura 20 -** Árvore filogenética, não enraizada, de 70 seqüências da região NS3 com 619 nucleotídeos (14 seqüências dos casais deste estudo destacadas em vermelho, 42 controles do estudo e 14 do *Genbank* em cinza) gerada no programa Clustal X utilizando-se o método de máxima verossimilhança com o modelo TrN+I+G e algoritmo de rearranjo dos braços (*Branch-swapping*) seccionando a árvore em dois pedaços e ligando em outras partes (*TBR*) para reconstrução de topologias..... 70
- Figura 21 -** Árvore filogenética, não enraizada, de 70 seqüências da região NS3/NS5B com 960 nucleotídeos (14 seqüências dos casais deste estudo destacadas em vermelho, 42 controles do estudo e 14 do *Genbank* em cinza) gerada no programa Clustal X utilizando-se o método de máxima verossimilhança com o modelo TrN+I+G e algoritmo de rearranjo dos braços (*Branch-swapping*) seccionando a árvore em dois pedaços e ligando em outras partes (*TBR*) para reconstrução de topologias..... 71

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Características dos pacientes (casais) selecionados.....	30
Tabela 2 -	Características dos pacientes controle.....	31
Tabela 3 -	Seqüência dos <i>primers</i> utilizados nas reações de amplificação parcial da região NS5B.....	35
Tabela 4 -	Seqüência dos primers utilizados nas reações de amplificação parcial da região NS3, primeira e segunda estratégia.....	38
Tabela 5 -	Relação entre o tamanho do fragmento e a concentração de DNA para cada reação de seqüenciamento.....	40
Tabela 6 -	Número de acesso e genótipo das seqüências do <i>GenBank</i> utilizadas para genotipar e subtipar pela região NS5B.....	44
Tabela 7 -	Número de acesso das seqüências do <i>GenBank</i> utilizadas para todas as análise filogenética.....	46
Tabela 8 -	Genotipagem e subtipagem pela região NS5B.....	51
Tabela 9 -	Grau de similaridade de nucleotídeos entre as seqüências da região NS5B dos casais, controle e <i>GenBank</i>	55
Tabela 10 -	Grau de similaridade de nucleotídeos entre as seqüências da região NS3 dos casais, controle e <i>GenBank</i>	57
Tabela 11 -	Resumo das análises das árvores filogenéticas sem os controles	72
Tabela 12 -	Resumo das análises das árvores filogenéticas com os controles	72

Resumo

Mello,IMVGC. Evidências moleculares da transmissão horizontal do vírus da hepatite C (VHC) entre cônjuges. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 119p.

A transmissão do VHC vem diminuindo após a implementação de diretrizes de triagem de doadores de sangue e adoção de políticas sociais para reduzir o risco de infecção em UDI, entretanto o VHC ainda constitui um grave problema de saúde pública mundial. Em torno de 10% dos pacientes infectados com VHC não referem exposição a nenhum fator de risco conhecido. Alguns estudos demonstraram a presença de RNA em diferentes secreções, sugerindo a existência de outras rotas de transmissão do VHC. Este estudo teve como objetivo analisar as relações filogenéticas de diferentes regiões genômicas do VHC de cônjuges portadores crônicos e correlacioná-las com seqüências de portadores crônicos não relacionados atendidos no mesmo ambulatório. Foram selecionados 18 pacientes (9 casais) com genótipo concordante entre eles e 42 controles (14 de cada genótipo encontrados nos casais). Foram amplificadas e seqüenciadas as regiões NS3 (~620nt) e NS5B (~360nt). As seqüências foram alinhadas usando o programa Clustal X e Bioedit 6.0.7. A presença do sinal filogenético, nas regiões estudadas, foi analisado através do mapeamento da verossimilhança pelo programa *Tree-Puzzle*. Os modelos evolucionários foram estimados pelo teste de razão de verossimilhança com o auxílio do programa Modeltest e utilizados para as análises das seqüências NS3, NS3+NS5B (TrN+I+G) e NS5B (TrNef+I+G). Foram empregados os métodos de distância com algoritmo de agrupamento de vizinhos e máxima verossimilhança com o algoritmo de rearranjo dos braços, seccionando a árvore em dois pedaços e ligando em outras partes, para a construção das árvores, pelo programa PAUP*4b10. Foram calculados os valores de *bootstrap*, com 1000 réplicas, para a verificação da sustentação de ramos nas topologias. Nas análises foram incluídas seqüências referencia do *Genbank* de diferentes genótipos. Todos os casais tiveram a região NS5B amplificada e seqüenciada, entretanto, não foi possível amplificar e seqüenciar a região NS3 de amostras de 2 casais. Considerando-se as três análises o sinal filogenético foi de 90.5% (NS5B – 199 nt), 92.9% (NS5B – 344 nt), 94.8% (NS3 – 619 nt) e 96.1% (NS5B + NS3). Como esperado, o melhor sinal filogenético foi obtido com as seqüências das duas regiões concatenadas NS3+NS5B. As análises filogenéticas sugerem fortemente que os vírus dos casais 3, 4, 6, 7, e 8 têm a mesma origem. Na maioria das análises as seqüências dos vírus destes casais formaram um grupo monofilético com valores de *bootstrap* acima de 70. As seqüências dos outros casais, em algumas situações, apresentaram grupos monofiléticos, contudo os valores de *bootstrap* não foram significativos. A utilização de seqüências de duas regiões genômicas diferentes suportam a hipótese de que os vírus dos casais 3, 4, 6, 7 e 8 têm a mesma origem. A inclusão de seqüências controle, dos mesmos subtipos encontrados nas amostras dos casais, foram fundamentais para a confirmação dos resultados. Estes resultados indicam fortemente a possibilidade de transmissão entre casais.

Descritores: 1.Hepatite C crônica 2.Genótipo 3.Filogenia 4.Heterogeneidade genética 5.Transmissão horizontal de doença 6.Fatores de risco

Summary

Mello, IMVGC. *Molecular evidences for horizontal transmission of HCV inside couples*. [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2006. 119p.

HCV transmission has decreased with the adoption of universal blood donors screening and social policies to reduce risk of infection in IVDU, but HCV is still a worldwide health problem. The epidemiological route of infection cannot be identified in a significant proportion of patients. Some studies demonstrated the presence of viral RNA in different secretions, suggesting the existence of other routes for HCV transmission. The aim of this study was to evaluate the phylogenetical relationships among sequences from different HCV genomic regions from sexual partners of chronic infected patients when analyzed among themselves and when analyzed conjointly with sequences from virus found in non related chronic infected patients attended in the same clinic. Eighteen individuals (9 couples with stable relationship without other risk factors for HCV infection) and forty-two control patients (fourteen from each genotype found in the couples) were selected. NS3 (~620 nts) and NS5B (~360 nts) regions were amplified and sequenced. Sequences were aligned using clustal X 1.81 and Bioedit 6.0.7. Phylogenetic signal/noise ratio in the data set was investigated with a likelihood mapping analysis with the program TREE-PUZZLE. Evolutionary models were chosen by *Hierarchical Likelihood Ratio Test* (hLRTs) using Modeltest 3.06 and used for analyze NS3, NS3+NS5B (TrN+I+G) and NS5B (TrNef+I+G) sequences. Distance and maximum-likelihood (ML) phylogenetical analyses were performed with PAUP*4b10 and the trees were constructed with NJ and heuristic search. *Tree bisection and reconnection* (TBR) algorithm respectively. Robustness of trees was evaluated by analyzing 1000 bootstrap replicates. Genbank reference sequences from different genotypes were included in data analysis. Sequences from NS5B region were obtained for all samples while it was not possible to get NS3 sequences from only 2 couples. Considering the three analysis, phylogenetical signals were 90.5% (NS5B – 199 nt), 92.9% (NS5B – 344 nt), 94.8% (NS3 – 619 nt) and 96.1% (NS5B + NS3). As expected, the best phylogenetical signal was obtained with concatenated NS3+NS5B sequences. Phylogenetical analysis strongly suggested that virus from couples 3, 4, 6, 7 and 8 had a common origin. In the majority of the analysis, sequences inside these couples clustered in the same monophyletical group with bootstrap values higher than 70. For the other couples, monophyletical groups were observed but these results were not supported by the bootstrap analysis. In conclusion, using sequencing from two different viral genomic regions, we have strongly supported a common source of infection for the two members of five couples. Control sequences from the same subtypes than the couples were crucial to confirm the results. These data strongly support HCV transmission inside couples.

Descriptors: 1.Chronic C hepatitis 2.Genotype .Phylogeny 4.Genetic heterogeneity 5.Disease transmission horizontal 6.Risk factors

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A hepatite crônica causada, pelo vírus da hepatite C (VHC), constitui um grave problema de saúde pública mundial. Estima-se que, aproximadamente, 170 milhões de pessoas (cerca de 3% da população mundial) estejam infectadas pelo VHC, fazendo com que seja a causa mais comum de hepatite crônica, cirrose e carcinoma hepatocelular (Alter e Seeff, 2000).

A infecção aguda é, na maioria dos casos, benigna e assintomática, dificultando, assim, o seu diagnóstico. Entretanto, cerca de 70% destes evoluem para a infecção crônica, podendo progredir ao estágio de cirrose, doença hepática terminal e até para carcinoma hepatocelular.

Significativa parcela dos portadores do VHC não sabe que está infectada, uma vez que não apresentou sintomas na fase aguda da doença e, com isso, acaba sendo fonte de transmissão do vírus. Portadores apresentam alto risco de evolução para hepatopatia grave.

A ausência de uma vacina e terapia 100% eficazes faz com que a prevenção seja de extrema importância nesta infecção. A identificação de pessoas infectadas e o conhecimento de fatores de risco, associados à infecção do VHC podem levar ao desenvolvimento de estratégias para reduzir a incidência da infecção pelo VHC resultando no controle da epidemia.

1.1. O Vírus da Hepatite C

O vírus da hepatite C (VHC) foi identificado, em 1989, graças aos avanços da biologia molecular (Choo *et al.*, 1989) e está, atualmente, classificado na família *Flaviviridae*, em gênero isolado dos *Flavivirus* e *Pestivirus* pois, apesar de apresentar uma estrutura viral semelhante, a sua seqüência genômica não se aproxima muito de nenhum deles. Para este novo gênero foi proposto, recentemente, o nome *Hepacivirus* (Shukla *et al.*, 1995).

A partícula viral, medindo de 55 a 65 nm de diâmetro (Kaito *et al.*, 1994), é formada por um envelope lipídico, onde se encontram as glicoproteínas virais E1 e E2, um capsídeo protéico formado pela proteína viral Core e o genoma viral constituído por um ácido ribonucléico (RNA) linear, de fita simples, com polaridade positiva (Figura 1) (Imbert *et al.*, 2004).

Figura 1 - Partícula viral do Vírus da Hepatite C. Fonte: (James, 2001), modificado

1.1.1. Estrutura genômica e proteínas virais

O RNA viral possui cerca de 9400 nucleotídeos com uma única fase de leitura aberta (ORF “open reading frame”), que inclui quase todo o genoma e codifica uma poliproteína com pouco mais de 3000 aminoácidos, que é posteriormente clivada por proteases celulares e virais, dando origem às proteínas do vírus (Figura 2).

Figura 2 - Organização genômica do vírus da Hepatite C. (A) Organização do genoma do VHC. As regiões não traduzidas 5'UTR e 3'UTR; (B) Maturação da poliproteína. As setas indicam os sítios de clivagem. Em azul, sítios de clivagem das proteases celulares, em verde o sítio de clivagem da protease NS2-3, em vermelho os sítios de clivagem da NS3 protease. A função das diferentes proteínas do VHC está destacada. (C) No quadro destaca-se a proteína F codificada por uma fase de leitura alternativa no gene Core. Fonte: (Imbert *et al.*, 2004)

Uma característica importante do genoma do VHC é a presença de regiões não traduzidas (UTR, “untranslated region”) ou não codificantes de proteínas (NCR, “non-coding region”) nas extremidades 5’ e 3’ do genoma viral (Smith *et al.*, 1995; Umlauft *et al.*, 1996).

O genoma viral pode ser esquematicamente subdividido em três regiões (Rosenberg, 2001).

A região 5’UTR é uma região bem conservada e possui um papel fundamental na replicação viral. Esta região contém um sítio de entrada interno para o ribossoma (IRES, “internal ribosomal entry site”) responsável pelo estabelecimento da tradução do RNA viral de forma independente do “CAP” 5’, fundamental para a tradução dos RNAs mensageiros celulares. A eficiência do IRES varia entre os diferentes genótipos virais (Buratti *et al.*, 1997; Kamoshita *et al.*, 1997).

Em seguida encontra-se a fase aberta de leitura que codifica a poliproteína que, após a clivagem pelas proteases celulares e virais, dá origem às proteínas virais; quatro estruturais, localizadas no quarto amino terminal e seis não estruturais, na parte restante do genoma. As proteínas estruturais são: core (C), glicoproteínas de envelope (E1 e E2) e uma pequena proteína P7 (Chambers *et al.*, 1990; Sakai *et al.*, 2003). Estudos recentes relatam a existência de uma proteína adicional designada ARFP (“alternative reading frame protein”) ou F (“frameshift”). Esta proteína é produzida a partir de uma fase de leitura alternativa (-2/+1) encontrada na porção amino terminal da região codificante da proteína do core (Xu *et al.*, 2001). As seis proteínas não estruturais são: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A

e NS5B e estão envolvidas nos processos de clivagem da poliproteína e na replicação viral (Imbert *et al.*, 2004).

A proteína do core ou nucleocapsídeo é a primeira da porção amino terminal da poliproteína. Ela é clivada da poliproteína nascente por proteases celulares formando a p21. Clivagens secundárias originam proteínas menores (p19 e p16). Alguns fenômenos, como a supressão da apoptose, por meio da interação com o receptor da linfotóxina (Matsumoto *et al.*, 1997) e a alteração do metabolismo lipídico celular (Barba *et al.*, 1997) foram associados à proteína do core. Estes fenômenos podem estar associados à persistência da infecção e ao desenvolvimento de esteatose, respectivamente (Barba *et al.*, 1997; Matsumoto *et al.*, 1997).

As glicoproteínas do envelope, E1 (gp35) e E2 (gp70), são liberadas, da poliproteína precursora, por peptidases celulares e são caracterizadas como glicoproteínas transmembrânicas do tipo I (Hijikata *et al.*, 1991);(Deleersnyder *et al.*, 1997). Existem evidências de que as glicoproteínas são essenciais para a entrada da partícula viral na célula hospedeira, pela ligação com o receptor celular CD81, encontrado em membranas de linfócitos e hepatócitos, e indução da fusão com a membrana celular (Pileri *et al.*, 1998; Bartosch *et al.*, 2003).

A glicoproteína E2 pode ser encontrada junto a uma pequena proteína, na sua extremidade carboxila, conhecida como p7 (Lin *et al.*, 1994). A clivagem da p7 não está clara; alguns autores sugerem que a sua origem pode ser derivada de uma clivagem ineficiente da E2 (Lin *et al.*, 1994; Mizushima *et al.*, 1994). A função das diferentes formas E2, E2/p7 e

p7 ainda não está clara. Entretanto acredita-se que estejam envolvidas na infectividade do vírus (Sakai *et al.*, 2003).

A E2 possui, na sua porção amino, uma região de 34 aminoácidos que apresenta a maior variabilidade dentro do genoma do VHC, denominada região hipervariável 1 (HVR1) (Sakai *et al.*, 2003). Esta região parece desempenhar um importante papel na determinação do curso evolutivo da doença. Os casos que se resolvem na fase aguda apresentam menor variabilidade na região HVR1, conforme observado em diferentes partículas virais obtidas de um mesmo paciente, comparado com casos de pacientes que evoluem para hepatite crônica. Este fenômeno, provavelmente, acontece devido à maior pressão imunológica nos casos que se resolvem, não permitindo o aparecimento de variantes virais capazes de escapar de uma pressão imunológica ineficiente, o que levaria a uma infecção crônica (Farci *et al.*, 2000).

Uma outra região hipervariável, denominada HVR2 foi descrita, mas sua importância e existência não foram confirmadas (Kato *et al.*, 1992).

Na E2 existe ainda uma região com capacidade de interagir com a proteína quinase R (PKR), uma das proteínas que medeia os efeitos antivirais induzidos pelo Interferon. Esta região, denominada PePHD (PKR-eIF2 α phosphorylation homology domain) possui uma seqüência com alta homologia, tanto para o sítio de autofosforilação da PKR, como para o sítio de fosforilação de eIFN α , que é alvo para a PKR (Taylor *et al.*, 1999). A seqüência nucleotídica da região PePHD é variável, conforme o padrão de sensibilidade ou de resistência ao interferon, entretanto, a importância dessa

região, na predição da resposta sustentada ao IFN, ainda não está clara (Berg *et al.*, 2000; Chayama *et al.*, 2000; Gerotto *et al.*, 2000; Sarrazin *et al.*, 2000). A proteína NS2 possui, como única função conhecida, a mediação de sua própria clivagem em “cis” da proteína NS3 e parece ser uma metaloprotease, uma vez que é estimulada por zinco e inibida por EDTA (Erdos e Skidgel, 1989). Clivagem em “cis” é aquela que ocorre apenas dentro da mesma molécula da poliproteína que catalisa a reação, enquanto clivagem em “trans” ocorre em outras moléculas da poliproteína.

Após a NS2 vem a NS3, que é uma proteína multifuncional com atividade de serinoprotease na região amino terminal e atividades nucleotidase (NTPase) e helicase, na extremidade carboxila (Hijikata *et al.*, 1991; Suzich *et al.*, 1993). Estudos demonstraram que a serinoprotease é responsável pela proteólise de toda a região, a jusante do genoma viral, exceto a clivagem de NS3 e NS4, que só ocorre dentro de uma mesma molécula de RNA (Hijikata *et al.*, 1991). Todas as clivagens mediadas por NS3, com exceção de NS3/NS4, podem ocorrer tanto em “cis” como em “trans” (Bartenschlager *et al.*, 1993). Para que a clivagem em “trans” seja eficiente é necessária a presença de NS4A como cofator, especialmente no sítio NS4B/NS5A (Bartenschlager *et al.*, 1994), sugerindo que NS3 e NS4A formam um complexo estável (Bartenschlager *et al.*, 1995). A função da helicase ainda não é totalmente conhecida, mas parece estar envolvida na iniciação da replicação do RNA viral (Pang *et al.*, 2002; Frick *et al.*, 2004). A proteína NS3 pode também estar envolvida em outros aspectos da infecção pelo VHC, uma vez que se especula sua interação com a proteína quinase A

(Borowski *et al.*, 1996), que participa da transdução de sinais intracelulares, e deve participar do mecanismo patogênico do VHC, principalmente, no desenvolvimento do carcinoma hepatocelular. A capacidade da proteína NS3 induzir a transformação celular e oncogênese em culturas de células já foi demonstrada (Sakamuro *et al.*, 1995).

A região da NS4 codifica duas proteínas, NS4A e NS4B. A função de NS4A como cofator de NS3 foi descrita anteriormente. Outra função atribuída à NS4A é a participação na hiperfosforilação de NS5A (Kaneko *et al.*, 1994; Tanji *et al.*, 1995). A fosforilação é uma característica conservada entre os isolados de VHC, sugerindo que seja funcionalmente importante (Reed *et al.*, 1998). O papel de NS4B, na replicação viral, ainda não é conhecido.

Assim como a região NS4, a região NS5 codifica duas proteínas diferentes: NS5A e NS5B. A NS5A é uma proteína fosforilada em resíduos de serina, que pode ser hiperfosforilada na presença de NS4A (Kaneko *et al.*, 1994). A sua função na replicação do VHC não é conhecida. Têm sido encontradas mutações adaptativas na região central de NS5A, em sistemas de replicação, sugerindo que NS5A esteja envolvida diretamente e / ou por interação com proteínas celulares no processo de replicação viral (Blight *et al.*, 2000; Bartenschlager, 2002). Esta informação, juntamente com a hiperfosforilação com proteínas não estruturais 3, 4A e 4B, suporta a hipótese de que NS5A seja um componente essencial no complexo de replicação do VHC (Koch e Bartenschlager, 1999; Neddermann *et al.*, 1999).

Alguns estudos sugerem que uma pequena região nesta proteína chamada de “interferon sensitivity determining region” (ISDR), localizada na metade próxima à extremidade carboxila, assim como outras regiões ao longo da proteína, como sítio de ligação com a PKR (PKR-binding), sinal de retenção citoplasmático (CRS), sinal de localização nuclear (NLS) e a região variável 3 (V3), interajam diretamente com a PKR, proteína quinase induzida pelo interferon (IFN), interferindo, assim, com a resposta ao tratamento pelo IFN gama (Enomoto *et al.*, 1996; Pawlotsky, 2000; Katze *et al.*, 2002). A PKR é a principal responsável pelo efeito antiviral do IFN. A proteína NS5A de linhagens de VHC resistentes ao IFN é capaz de romper a formação dos dímeros de PKR, resultando na repressão da função da PKR e inibição da fosforilação da subunidade α do fator 2 de iniciação de tradução (eIF2 α) (Gale *et al.*, 1998). O eIF2 α , quando não fosforilado, permanece ativo e, conseqüentemente, a síntese de proteínas e a replicação viral na célula não são inibidas (Vilcek e Sen, 1996). Outras funções têm sido recentemente atribuídas à NS5A. A capacidade de ativar promotores celulares pode explicar processos que envolvem o VHC, como o processo de persistência da infecção, desenvolvimento de cirrose e carcinogênese (Chung *et al.*, 1997; Tanimoto *et al.*, 1997). Entretanto, o papel da NS5A na patogênese da hepatite C não está completamente esclarecido.

A proteína NS5B é uma RNA-polimerase RNA-dependente responsável pela replicação viral. Esta região possui um “motif” GDD característico de uma RNA replicase, presente em diferentes vírus de RNA (Hijikata *et al.*, 1993).

Por último, a região 3'UTR é formada por uma sequência de nucleotídeos variável, seguida por região poli U e uma sequência de 98 nucleotídeos bem conservada, denominada região X, que se mostrou indispensável na replicação do vírus, *in vivo*, em chimpanzés (Imbert *et al.*, 2004).

1.2. Diversidade genética

O VHC apresenta ampla heterogeneidade genética. Comparação de seqüências nucleotídicas, de diferentes isolados, de diferentes regiões geográficas, têm mostrado a existência de, pelo menos, seis grupos geneticamente diferentes (1-6). A variação de nucleotídeos do genoma completo, dentre os diferentes grupos, está entre 30 e 35%. A freqüência de mutações é variável ao longo do genoma. Nas regiões E1, E2 e V3 da proteína NS5A encontram-se as maiores taxas de mutação, enquanto a região do core e algumas proteínas não estruturais, como a NS3, são mais conservadas (Simmonds, 2004). A região de menor variabilidade entre os diferentes genótipos é 5'UTR. A seqüência nucleotídica e a estrutura secundária desta região são de extrema importância para a replicação viral.

Cada um dos seis grupos possui vários subtipos, com uma variabilidade nucleotídica de 20 a 25%, entre eles. Estes subtipos são denominados por letras minúsculas (a,b,etc) (Figura 3) (Simmonds *et al.*, 1994; Simmonds, 2004).

Figura 3 - Árvore filogenética de seqüências da região NS5B (seqüenciamento de nucleotídeos da posição 7975-8196 numerados a partir do códon de iniciação (AUG) da poliproteína) do VHC. Os ramos maiores representam os genótipos e os ramos menores os subtipos. Fonte: (Mizokami *et al.*, 1996; Simmonds *et al.*, 1996)

Em um indivíduo infectado, a população genômica possui grande similaridade entre si, diferindo apenas em alguns nucleotídeos (5 a 10%). O grupo de seqüências altamente similares, centradas em torno de uma seqüência dominante, é denominado de *quasispecies*. A variabilidade genética do VHC é atribuída, sobretudo, à baixa fidelidade da enzima RNA-polimerase RNA-dependente, que não possui atividade corretiva, permitindo, assim, a geração de variantes virais, que constituem as *quasispecies* (Martell *et al.*, 1992). Outros fatores, como a tentativa de escape da vigilância do sistema imunológico do hospedeiro e a alta taxa de replicação, demonstrada pelos estudos de cinética viral (Zeuzem *et al.*,

1996), podem, também, interferir na elevada diversidade das *quasispecies* encontradas em um indivíduo infectado.

A pressão imunológica do hospedeiro, sobre as variantes virais, não afeta as proteínas do vírus de maneira uniforme (Figura 4) (Weiner *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 1997; Mastromatteo *et al.*, 2001). Este é um dos fatos que influenciam na diferença da variabilidade, ao longo do genoma (Reed e Rice, 2000).

A distribuição mundial dos genótipos é variável, dependendo da área geográfica, considerada como uma das características epidemiológicas particulares da população (Simmonds *et al.*, 1994; Farci e Purcell, 2000). Os genótipos 1a,1b, 2a, 2b e 3a apresentam uma distribuição universal, enquanto o 4, 5 e 6 parecem restritos a determinadas regiões (Mellor *et al.*, 1995; Simmonds, 2004). O genótipo 1 é o que mais prevalece, mundialmente, sendo que a sua freqüência varia de 40 a 80%, dependendo da região (Choo *et al.*, 1991; Takada *et al.*, 1992; Simmonds *et al.*, 1994).

No Brasil, o padrão de distribuição dos genótipos segue o padrão mundial, sendo, o genótipo 1 (65%) o prevalente, seguido do 3 (30%), 2 (4%), outros (1%) (Codes *et al.*, 2003; Campiotto *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2006).

O conhecimento do genótipo infectante, em cada paciente, apresenta significativa relevância clínica, visto que se descreve uma evolução mais agressiva e menor taxa de resposta sustentada (negativação da carga viral mantida por seis meses após o término do tratamento) à terapia, em pacientes infectados com o genótipo 1 (Lau *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1996).

Figura 4 - Variabilidade genética das diferentes regiões do genoma do VHC. Representação esquemática do genoma do VHC (acima) mostrando as posições das proteínas estruturais e não-estruturais. O painel abaixo mostra a diversidade entre as seqüências dos diferentes genótipos do VHC. Esta análise mostra regiões altamente conservadas como a 5'UTR e core e alta diversidade viral nos genes do envelope e NS5A. Fonte: (Simmonds, 2004)

1.3. Diagnóstico

A pesquisa de infecção pelo VHC pode ser dividida em testes sorológicos (pesquisa de anticorpos anti-VHC) ou moleculares (detecção do genoma viral). Os testes sorológicos baseiam-se na pesquisa de anticorpos contra antígenos virais por teste imunoenzimático (ELISA). O ELISA de terceira geração apresenta alta especificidade e sensibilidade, em torno de 97% (Jerome e Gretch, 2004). Portanto, resultados falso-positivos ainda podem ser observados em populações de baixo risco ou com hipergamaglobulinemia. Nestes casos, a detecção de anticorpos contra o VHC por *immunoblot*, utilizando antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos, permite identificar a positividade de cada uma das frações

antigênicas em uma tira de nitrocelulose revestida com o material reagente (Alter *et al.*, 1991), esclarecendo, assim, os casos duvidosos em teste anterior.

A pesquisa de infecção ativa (replicação viral) é feita pela avaliação da carga viral por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), método qualitativo (define em positivo ou negativo) ou quantitativo (avalia o número de cópias virais por mL de sangue), com alta sensibilidade e especificidade. A determinação da carga viral pré-tratamento é recomendada por auxiliar, juntamente a outros fatores, a possibilidade de resposta sustentada ao tratamento antiviral.

1.4. Epidemiologia e transmissão

Com a descoberta do VHC e o desenvolvimento de testes sorológicos específicos para a detecção de anticorpos, por método imunoenzimático (ELISA), sensíveis e de fácil execução, tornou-se viável a triagem adequada do sangue e seus derivados, assim como a identificação de indivíduos infectados.

Após a implementação de diretrizes de triagem de doadores de sangue, a incidência de casos de hepatite pós-transfusional pelo VHC, antes sua principal via de disseminação, diminuiu, progressivamente, até chegar a menos de 1% de casos novos nos dias de hoje (Alter, 1995). Entretanto, quando analisamos como grupo, a prevalência nos pacientes hemotransfundidos ou receptores de hemoderivados ainda continua alta (60 a 90%) (Alter *et al.*, 1999), reflexo da cronificação da doença e de sua lenta

evolução. Este viés pode ser evitado pela análise dos receptores de sangue ou hemoderivados, em grupos ,antes e após a disponibilidade dos testes de detecção contra o VHC (1992).

Com a redução da incidência de casos pós-transfusionais, os usuários de drogas injetáveis (UDI) constituíram-se no principal grupo de risco no mundo, com incidência e prevalência crescentes, assumindo proporções assustadoras de até 90% de positividade por ELISA (McCruden *et al.*, 1996). Associada ao aumento da população de UDI, com práticas inseguras de compartilhar seringas e agulhas contaminadas, a alta prevalência de infecção encontrada em UDI e o difícil acesso às políticas de informação e modificação de práticas de risco transformaram este grupo no responsável por mais de 50% dos casos novos de hepatite C (Herrine e Weinberg, 1999).

A prevalência de sorologia positiva para o VHC aumenta com o tempo de uso e frequência de drogas injetáveis, com uma incidência considerada alta (5 – 20%) nos primeiros seis a doze meses após o início do uso de drogas (Kew *et al.*, 2004); (Oliveira Mde *et al.*, 2006). O hábito de compartilhar seringas e equipamento contaminado demonstrou ser o principal fator de risco para infecção crônica pelo VHC (Baozhang *et al.*, 1997; Herrine e Weinberg, 1999) .

Infecção crônica pelo VHC é também comum em pacientes submetidos à hemodiálise, com prevalência de 10 – 33% (*Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium, 1999*). Embora a infecção pelo VHC neste grupo de pacientes tenha baixado,

significativamente, nos últimos anos, devido à rigorosas medidas de controle de higiene, adotadas pelos centros de diálise, pacientes hemodialisados ainda são de extrema relevância para a infecção por VHC, uma vez que surtos esporádicos podem ocorrer nestes centros. Estudos realizados em três diferentes regiões brasileiras mostraram uma prevalência entre 14,6% e 52% de infecção pelo VHC nos pacientes de centro de hemodiálise. Uma diminuição relevante foi observada entre 1999 e 2002, após a implementação de rigorosas medidas de controle e higiene (Carneiro *et al.*, 2001; Medeiros *et al.*, 2004; Carneiro *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2005).

Embora a transmissão intrafamiliar não seja bem documentada, vários estudos relatam transmissão sexual, vertical e contato próximo como fontes de contaminação (Chiaramonte *et al.*, 1996; Mastromatteo *et al.*, 2001; Keiserman *et al.*, 2003; Cavaleiro NdP, 2004). Alguns autores têm mostrado a presença de RNA do VHC em fluidos biológicos, como saliva; entretanto o seu papel na transmissão não está claro (Hsu *et al.*, 1991; Fried *et al.*, 1992; Mastromatteo *et al.*, 2001). A transmissão sexual também não está bem determinada, pois muitos estudos consideram que este meio de transmissão possui baixa efetividade de infecção (Akahane *et al.*, 1994). O risco estimado para transmissão sexual é de 0 a 0,6% ao ano para os parceiros que possuem relações monogâmicas por longo tempo e de 1% ao ano para aqueles com múltiplos parceiros (Terrault, 2002). Nenhuma mudança na prática sexual é recomendada para pessoas com relações monogâmicas de longo tempo. Contudo para aqueles com múltiplos

parceiros ou parceiros sexuais esporádicos são recomendados métodos de proteção contra doenças sexualmente transmissíveis.

Alguns estudos mostraram altas taxas de soropositividade de anticorpos para VHC entre trabalhadoras do sexo, homens que fazem sexo com homens e homens heterossexuais atendidos em clínicas de doenças sexualmente transmissíveis (Nakashima *et al.*, 1992; Thomas *et al.*, 1995; Ndimbie *et al.*, 1996). Se o caso índice estiver co-infectado com HIV o risco de transmissão sexual é ligeiramente maior (Filippini *et al.*, 2001).

O risco de transmissão perinatal de mães portadoras de VHC é considerado baixo (<6%), porém alguns estudos mostram que este risco aumenta muito caso a mãe esteja co-infectada com HIV (Zein, 1997). A amamentação não é tida como fator de risco, por isso não existe recomendação preventiva a ser indicada neste caso.

Assim como a transmissão sexual e vertical, a exposição ocupacional tem sido documentada, mas é rara. Estudos prospectivos com profissionais da saúde após exposição ocupacional têm documentado transmissão somente após picadas com agulhas contaminadas.

Existem, ainda, outros fatores considerados de risco para a infecção pelo VHC. A utilização de agulhas de acupuntura, tatuagens, colocação de piercing, encarceramento e serviço militar têm sido avaliados em estudos de caso-controle de infecção aguda (Alter *et al.*, 1999; Alter, 2002).

Pelo menos 10% dos pacientes infectados com VHC não referem a exposição a nenhum fator de risco conhecido. Estes casos são denominados de casos esporádicos.

1.5. Análise filogenética

Diferentes métodos de reconstrução filogenética têm sido propostos e vêm sendo utilizados em diferentes contextos biológicos. A sua eficiência e acurácia têm sido estudadas de diferentes formas, incluindo simulações computacionais (Sourdis e Nei, 1988; Saitou e Imanishi, 1989; Hillis *et al.*, 1994), filogenética experimental (Hillis *et al.*, 1992) e histórias evolucionárias reais (Leitner *et al.*, 1996).

A reconstrução filogenética consiste em estimar as relações de ancestralidade para um determinado número de organismos (táxons). Uma árvore filogenética representa a história evolutiva dos organismos presentes nela; graficamente, consiste de pontos (ou nós) ligados por linhas (ou ramos). Os táxons podem ser famílias, gêneros, espécies ou populações, ou seja, qualquer nível taxonômico sobre os quais se deseja inferir a história evolutiva. Com frequência são chamados, também, de unidades taxonômicas operacionais ou simplesmente OTUs (do inglês, *operational taxonomic units*) (Miyaki *et al.*, 2001).

Uma árvore filogenética pode ser representada de maneira não enraizada, ou seja, sem apontar onde está a espécie ancestral de todo o grupo. Nesta situação, a árvore mostra apenas as relações de topologia entre as OTUs, sem indicar onde se encaixa a espécie ancestral. A presença da raiz na árvore faz com que se saiba o sentido da evolução, ou seja, a raiz dá o sentido temporal para a árvore (Miyaki *et al.*, 2001). O padrão de ramificação da árvore é chamado de topologia e existem diferentes métodos para a construção de árvores filogenéticas a partir de dados moleculares.

Estes métodos podem ser classificados em métodos quantitativos e qualitativos. A quantificação das diferenças entre seqüências homólogas de DNA pode ser expressa na forma de valores ou distâncias e utilizada para a inferência de filogenias. Os algoritmos de reconstrução filogenética que utilizam essas medidas são conhecidos como métodos de distância (Russo *et al.*, 2001). O princípio dos métodos qualitativos é o critério usado para a escolha da melhor árvore dentre um conjunto delas. Máxima parcimônia e máxima verossimilhança, tradicionalmente, utilizam algoritmos com base nos métodos qualitativos. Em ambos, os algoritmos de reconstrução farão a busca das árvores de acordo com o método de otimização de caracteres escolhido. O conjunto de árvores poderá conter todas as árvores possíveis (algoritmos exatos) onde, necessariamente, o método encontrará a árvore (ou árvores) que satisfaça(m) o critério de otimização. Entretanto, quando analisamos um grande número de táxons terminais, o tempo computacional requerido pode ser impraticável, devido ao grande número de árvores possíveis. Uma alternativa é procurar uma árvore dentro de um subconjunto de árvores (algoritmos heurísticos), gastando menos tempo computacional para a estimativa de uma árvore. No entanto, quando utilizamos este último método corremos o risco de não ser encontrada a melhor árvore, segundo aquele critério. Por isso, devemos ter em mente que podemos estar lidando com uma árvore subótima para o critério escolhido (Miyaki *et al.*, 2001).

Existem vários modelos evolucionários que podem ser aplicados nos diferentes métodos. A escolha do modelo correto é de extrema importância e

deverá representar uma situação próxima à real, pois a escolha de um modelo errado poderá levar a um resultado errado (Leitner *et al.*, 1997).

Diferentes estudos de epidemiologia molecular utilizam técnicas de análise filogenética com o objetivo de fornecer resultados mais próximos da realidade (Chayama *et al.*, 1995; Leitner e Albert, 2000; Metzker *et al.*, 2002). Alguns países, como os Estados Unidos da América e a Suécia permitem que decisões forenses sejam tomadas com base em resultados de análises filogenéticas, em situações como transmissão de doenças infecciosas graves (ex: HIV) (Leitner e Albert, 2000; Metzker *et al.*, 2002).

1.6. Justificativa

Está bem estabelecido que a principal via de transmissão do VHC é a via parenteral (transusão de sangue, compartilhamento de seringas e agulhas contaminadas entre usuários de drogas injetáveis, acupuntura, tatuagem). Entretanto, um grande número de portadores não possui histórico de contato parenteral nem são ou foram usuários de drogas injetáveis. Estes casos dão suporte à hipótese de existirem outras vias de contaminação.

Diferentes estudos relatam a existência de famílias onde várias pessoas são portadoras do VHC e apenas o caso índice relata ser ou ter sido usuário de drogas injetáveis ou ter se submetido a procedimento onde existiu o risco de contato parenteral. Tais resultados sugerem que o contato familiar próximo e relações sexuais possam ser vias de transmissão.

Estudo detalhados de análise filogenética, a partir de seqüências de ácidos nucléicos virais, em amostras dos diferentes familiares infectados,

poderão inferir se os vírus que circulam numa mesma família possuem a mesma origem, suportando a hipótese de que o contato familiar próximo e relações sexuais sejam realmente importantes vias de transmissão do VHC. Contudo, poucos estudos de análise filogenéticas de seqüências de VHC circulantes numa mesma família têm sido realizados.

O presente estudo tem como objetivo suportar a hipótese de contaminação intrafamiliar do VHC por meio de análises filogenéticas complexas, de seqüências de diferentes regiões genômicas.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

- Analisar as relações filogenéticas de diferentes regiões do genoma do VHC de amostras de casais portadores crônicos.
- Comparar as seqüências genômicas dos casais portadores de VHC com seqüências de portadores crônicos, não relacionados, atendidos no mesmo ambulatório.
- Avaliar o grau de similaridade entre as seqüências genômicas do VHC dos casais e dos portadores não relacionados.

MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1. Fluxogramas metodológicos

(I) Extração e PCR:

(II) Sequenciamento:

(III) Análise Filogenética:

3.1.1. Casuística

Foram selecionados 18 pacientes (9 casais) cronicamente infectados com VHC, atendidos no Ambulatório de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que participaram anteriormente de dois estudos do nosso grupo cujos títulos são: “Análise da cinética do VHC durante o tratamento com IFN e Ribavirina” e “Estudo epidemiológico coorte-transversal de portadores de infecção pelo vírus da hepatite C: análise de 700 casos” (Medeiros-Filho, 2002; Notaroberto, 2004). Na análise de prontuário destes pacientes foram colhidas informações sobre possível forma de aquisição do VHC. Entre elas podemos verificar transfusão de sangue e seus derivados, uso de drogas injetáveis, tatuagem, acupuntura, risco profissional e promiscuidade. Em 6 casais apenas um dos pacientes informou fonte de contaminação de alto risco, transfusão ou uso de drogas injetáveis. Dois casais possuíam risco profissional sendo, um deles somente o marido e o outro os dois pacientes. De um dos casais não conseguimos as informações. A idade destes pacientes estava entre 35 e 64 anos (média de 49,8) (Tabela1).

Além dos casais do estudo foram incluídos 42 pacientes, com idade entre 25 e 76 anos (média de 51,9), não relacionados aos casais, como controles, de cepas virais circulantes na população portadora de VHC atendida no Ambulatório de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, local onde os casais do estudo são atendidos. Destes, 28 eram portadores de VHC genótipo 1 e 14 genótipo 3. A análise de prontuário dos pacientes controle mostrou que

as vias de transmissão, conhecidas, encontradas nos casais, estavam representadas (Tabela 2).

A genotipagem realizada nos estudos anteriores foi pelo seqüenciamento da região 5'UTR (Tabela 1 e 2).

Os pacientes do estudo e controles foram submetidos a critérios de inclusão e exclusão nos estudos anteriores (Apêndice).

Para este estudo não houve a necessidade de realizar nova coleta, foram utilizados os soros colhidos nos estudos anteriores para a realização dos testes necessários.

Tabela 1 - Características dos pacientes (casais) selecionados (dados obtidos de prontuário)

Casal	Sexo	Genótipo	Nascimento	Uso Drogas Inj.	Transfusão /ano	Promiscuidade**	Risco Prof.	Tattoo	Acupuntura
1	F	3	28/8/1963	Sim	Não	Não	Não	Não	Não
	M	3	4/1/1960	Não	Não	Não	Não	Não	Sim
2	F	3	30/7/1971	Não	Não	Não	Não	Não	Não
	M	3	22/11/1952	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não
3	F	1	6/7/1942	Não	Sim/1975	Não	Não	Não	Sim
	M	1	S/Inf*	Não	Não	Não	Não	Não	Sim
4	F	1	15/8/1958	Não	Não	Não	Não	Não	Não
	M	1	4/6/1955	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não
5	F	1	16/6/1954	Não	Não	Não	Não	Não	Não
	M	1	29/5/1945	Não	Não	Não	Sim	Não	Não
6	F	1	19/6/1957	Não	Sim/1984	Não	Não	Não	Sim
	M	1	13/2/1949	Não	Não	Não	Não	Não	Sim
7	F	3	5/8/1962	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não
	M	3	29/12/1963	Não	Não	Não	Sim	Não	Não
8	F	1	S/Inf*	Não	Não	Não	Não	Sim	Não
	M	1	S/Inf*	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não
9	F	1	S/Inf*	S/Inf*	S/Inf*	S/Inf*	S/Inf*	S/Inf*	S/Inf*
	M	1	S/Inf*	S/Inf*	S/Inf*	S/Inf*	S/Inf*	S/Inf*	S/Inf*

S/Inf* = Sem informação

** = mais de 2 parceiros no período de 6 meses

Tabela 2 - Características pacientes controle (dados obtidos de prontuário)

Controle Nº	Sexo	Genótipo	Nascimento	Uso Drogas Inj.	Transfusão /ano	Promiscuidade	Risco Prof.	Tattoo	Acupuntura
6947	M	1	1981	Não	Sim/1981	Não	Não	Sim	Não
6681	F	1	1962	Não	Não	Não	Não	Não	Não
8090	F	1	1944	Não	Não	Não	Não	Não	Não
6625	M	1	1957	Não	Não	Não	Não	Não	Não
7152	M	1	1951	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não
10248	F	1	1963	Não	Sim/1986	Não	Não	Não	Sim
8217	M	1	1966	Não	Sim/várias	Não	Sim	Não	Não
7954	M	1	1961	Não	Não	Não	Não	Não	Não
7017	M	1	1954	Não	Sim/1978	Não	Não	Não	Não
9089	M	1	1967	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Sim
8399	F	1	1963	Não	Sim/1988	Não	Não	Não	Não
10402	F	1	1941	Não	Sim/1975	Sim	Não	Não	Não
8432	F	1	1968	Não	Não	Não	Não	Não	Não
10355	M	1	1956	Não	Não	Sim	Não	Sim	Não
7322	F	1	1952	Não	Não	Não	Não	Não	Não
7879	F	1	1936	Não	Sim/1971	Não	Não	Não	Não
7918	F	1	1940	Não	Não	Não	Sim	Não	Não
7910	M	1	1972	Não	Não	Não	Sim	Não	Não
6887	F	1	1931	Não	Sim/1983	Não	Não	Não	Não
7733	M	1	1952	Não	Sim/1974	Não	Não	Não	Não
10187	M	1	1955	Não	Sim/1976	Sim	Não	Não	Não
6611	M	1	1934	Não	Não	Não	Não	Não	Não
10323	M	1	S/Inf*	Sim	Não	Não	Não	Não	Não
6874	M	1	1956	Não	Sim/1975	Não	Não	Não	Não
5772	M	1	1949	Não	Não	Sim	Não	Não	Não
6602	F	1	1977	Não	Não	Não	Não	Não	Não
10371	M	1	1943	Não	Sim/1966	Não	Sim	Não	Não
7692	M	1	1975	S/Inf*	S/Inf*	S/Inf*	S/Inf*	S/Inf*	S/Inf*

S/Inf* = Sem informação

** = mais de 2 parceiros no período de 6 meses

Tabela 2 - Características pacientes controle (dados obtidos de prontuário) (continuação)

Controle Nº	Sexo	Genótipo	Nascimento	Uso Drogas Inj.	Transfusão /ano	Promiscuidade	Risco Prof.	Tatoo	Acupuntura
10180	M	3	1943	Sim	Sim/1980	Não	Não	Não	Não
7647	M	3	1939	Não	Sim/1978	Sim	Não	Não	Não
7826	F	3	1938	Não	Sim/1992	Não	Não	Não	Não
10654	F	3	1952	Não	Não	Não	Não	Não	Não
10831	F	3	1930	Não	Não	Não	Não	Não	Não
7185	M	3	1958	Não	Sim/1978	Não	Não	Não	Não
8319	M	3	1954	Não	Sim/1963	Não	Não	Não	Não
8487	M	3	1961	Não	Sim/1981	Não	Não	Não	Não
7244	M	3	1964	Não	Sim/1990	Não	Não	Sim	Não
7748	M	3	1968	Não	Não	Não	Não	Não	Não
10709	F	3	1951	Não	Sim/1975	Não	Não	Não	Não
10749	F	3	1939	S/Inf*	S/Inf*	S/Inf*	S/Inf*	S/Inf*	S/Inf*
10698	M	3	S/Inf*	S/Inf*	S/Inf*	S/Inf*	S/Inf*	S/Inf*	S/Inf*
10173	F	3	1960	Não	Não	Não	Não	Sim	Não

S/Inf* = Sem informação

** = mais de 2 parceiros no período de 6 meses

3.1.2. Extração de Ácidos Nucléicos

A extração do VHC-RNA foi realizada a partir de 140 µL de soro utilizando-se QIAamp® Viral RNA Kit (Qiagen, Uniscience do Brasil-SP). Foram seguidas as instruções do fabricante. Imediatamente após a extração do RNA, foi realizada a síntese do DNA complementar (cDNA).

3.1.3. Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese do cDNA foi realizada através da reação de transcrição reversa (RT), utilizando-se a enzima Transcriptase Reversa Moloney Murine Leukemia Vírus (M-MLV) e *Random primers*. O volume final da reação foi de 60 µL nas seguintes condições: 50mM de Tris-HCL (pH=8,3), 75mM de KCL, 3mM de MgCl₂, 10mM de DTT, 0,5mM de cada dNTP (10mM), 450ng de *Random primers*, 30 unidades de enzima inibidora de RNase (Rnase OUT™) e 300 unidades de M-MLV. Todos os reagentes utilizados foram da marca Invitrogen (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA,USA).

As amostras foram submetidas aos seguintes ciclos de variação de temperatura: 70°C por 10 minutos, 25°C por 15 minutos, 37°C por 60 minutos e 95°C por 15 minutos em termociclador (Eppendorf Mastercycler®, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

3.1.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Após a etapa de RT, o cDNA foi amplificado pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se a enzima *Platinum Taq DNA* polimerase (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA,USA). A

amplificação foi realizada em duas etapas, 1ª PCR e 2ª PCR, com o objetivo de aumentar a sensibilidade da reação.

Duas regiões do genoma do VHC foram amplificadas: região NS3 e NS5B (polimerase). Foram utilizados *primers* específicos para a amplificação de cada região (Tabelas 3 e 4). Os *primers* utilizados para a região NS5B e alguns da região NS3 foram retirados de trabalhos já publicados os outros, da região NS3, foram desenhados por nós a partir do alinhamento de seqüências completas do VHC obtidas no *Genbank*, banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA).

As reações foram realizadas com volume final de 50 µL nas seguintes condições: 20mM de Tris-HCl (pH=8,3), 50mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP (10mM), 0,4 pmol/µL de cada *primer* (específico para cada região), 2,5 unidades da enzima *Platinum* Taq DNA polimerase e 5 µL de DNA. As condições das reações foram iguais para a amplificação das duas regiões. Os reagentes utilizados foram da marca Invitrogen (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA,USA).

Região NS5B

A região NS5B foi amplificada parcialmente gerando um fragmento de 380 pares de bases (Figura 5). A seqüência dos *primers* utilizados na 1ª e na 2ª PCR foi obtida em trabalhos já publicados (Tabela 3).

Figura 5 - Esquema do sítio de anelamento dos primers utilizados para amplificação parcial da região NS5B (1ª e 2ª PCR)

Os ciclos de variação de temperatura utilizados na 1ª PCR foram: 95°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 63°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos com uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Para a 2ª PCR foram utilizados os seguintes ciclos de variação de temperatura: 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos com uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Tabela 3 - Seqüência dos *primers* utilizados nas reações de amplificação parcial da região NS5B

Primers	Seqüência (5' → 3')	Posição ^a	Referência
NS5B_243	TGG GGA TCC CGT ATG ATA CCC GCT GCT TTG A	8245-8275	(Enomoto <i>et al.</i> , 1990)
NS5B_242	GGC GGA ATT CCT GGT CAT AGC CTC CGT GAA	8616-8645	(Enomoto <i>et al.</i> , 1990)
NS5B_Pr3	TAT GAY ACC CGC TGY TTT GAC TC	8256-8278	(Sandres-Saune <i>et al.</i> , 2003)
NS5B_Pr5	GCT AGT CAT AGC CTC CGT	8619-8636	(Sandres-Saune <i>et al.</i> , 2003)

Y = C ou T

^a numeração baseada na seqüência completa VHC-1 (número de acesso *GenBank* M62321).

Região NS3

A região NS3 também foi amplificada parcialmente, utilizando-se duas estratégias. A maioria dos *primers* utilizados para esta região foram desenhados a partir de um alinhamento de seqüências completas de VHC, de todos os genótipos, obtidas no *GenBank* (Tabela 4). Foram desenhados *primers* genótipo e subtipo específico devido à grande variabilidade do VHC.

3.1.4.1. Primeira estratégia de PCR

A primeira estratégia foi amplificar na primeira etapa da PCR um fragmento de aproximadamente 1,0 Kb e na segunda etapa dois fragmentos de 500 e 350 bp, utilizando-se *primers* internos ao do fragmento obtido na primeira etapa (Figura 6).

Figura 6 - Esquema do sítio de anelamento dos primers utilizados para amplificação parcial da região NS3 (1ª e 2ª PCR da primeira estratégia).

Os ciclos de variação de temperatura utilizados na 1ª PCR foram: 94°C por 30 segundos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e 10 segundos com uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Para a segunda PCR foram utilizados os seguintes ciclos: 94°C por 30 segundos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos com uma extensão final de 10 minutos.

3.1.4.2. Segunda estratégia de PCR

Para amplificar as amostras que apresentaram resultado negativo, utilizando-se a primeira estratégia, foi aplicada uma segunda estratégia que consistiu na geração de dois fragmentos de 500 e 350 bp na primeira e na segunda etapa da PCR. Foram utilizados os mesmos *primers* na 1ª e na 2ª PCR (Figura 7).

Figura 7 - Esquema do sítio de anelamento dos *primers* utilizados para amplificação parcial da região NS3 (1ª e 2ª PCR da segunda estratégia)

Os ciclos de variação de temperatura utilizados na 1ª e 2ª PCR da segunda estratégia foram: 94°C por 30 segundos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos com uma extensão final de 10 minutos.

Tabela 4 - Sequência dos *primers* utilizados nas reações de amplificação parcial da região NS3, primeira e segunda estratégia

Primers/genótipo	Sequência (5' → 3')	Posição ^a	Referência
NS2 487 1a	G <u>A</u> R C <u>C</u> M <u>G</u> TG GTC TTC TCC	2915 - 2932	Deste estudo
NS3 F2 / 1a	TAC TTG AAA GGC TCC TC	3479 - 3495	Deste estudo
NS3 F3 / 1a	GCT TAC ATG TCC AAG GC	3797 - 3813	Deste estudo
NS3 F2AS / 1a	GGT <u>R</u> GA GTA CGT GAT GGG G	3886 - 3868	Deste estudo
NS3 F3AS / 1a	TGG TGG ACA GAG <u>C</u> RA CCT CCT	4109 - 4089	Deste estudo
NS3 1109A 1a	GAG TGG CAG AAA ATG AGA TG	4188 - 4169	Deste estudo
NS3-F1 1b	ACA CCG CGG CGT GTG GGG ACA T	2967 - 2988	(Ogata et al., 2003)
NS3 F2 / 1b	ACC TTT A <u>Y</u> <u>Y</u> TGG TCA CG	3387 - 3403	Deste estudo
NS3 F3 / 1b	GCG TAT ATG TC <u>Y</u> AAG GC	3797 - 3813	Deste estudo
NS3 F2AS / 1b	GGT GGA GTA CGT GAT <u>R</u> GG	3886 - 3869	Deste estudo
NS3 F3AS / 1b	TGG CAG AAA ATG AGA TGC	4185 - 4168	Deste estudo
NS3 1127A 1b	TCG TCA CA <u>Y</u> TTC TTC TTG G	4216 - 4188	Deste estudo
NS2 587 3a	GAT TAG GCC GTG AGG TGT TG	3015 - 3034	Deste estudo
NS3 F2 / 3a	GAC TTA TAC TTG GTT ACC C	3386 - 3404	Deste estudo
NS3 F3 / 3a	ATG T <u>C</u> <u>K</u> CGT GCC TAT GGG	3803 - 3820	Deste estudo
NS3 F2AS / 3a	TTA CCG TAG GTG GAA TAG G	3894 - 3876	Deste estudo
NS3 F3AS / 3a	ATC TCA CCT TCA GAG CC	4119 - 4103	Deste estudo
NS3 1108A 3a	AAT GGC AAA AGA TAA GG	4187 - 4171	Deste estudo

Y = C ou T K = G ou T

R = A ou G M = A ou C

^a numeração baseada na sequência completa VHC-1 (número de acesso *GenBank* M62321).

3.1.5. Identificação e quantificação dos produtos de PCR

O produto amplificado foi identificado por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo. Para tal, foram misturados 4 μ L do produto final da PCR com 1 μ L do tampão 10X Bluejuice™ Gel Loading Buffer (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA,USA) e a mistura foi aplicada em gel de agarose 1% preparado com tampão TBE 1X (Apêndice) e 0,02% de brometo de etídeo. Foi também aplicado no gel o marcador de tamanho molecular de 100pb para avaliação do tamanho do fragmento obtido, e o padrão de massa Low DNA Mass Ladder (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA,USA), que permitiu avaliar a quantidade de produto obtido na reação de PCR. O gel foi submetido à eletroforese de 110V por 1 hora, e ao final o produto amplificado foi visualizado em um transiluminador de luz Ultra Violeta (U.V.) acoplado a um sistema de captura de imagem (Image Acquisition and Analysis Software, UVP, INC. CA, USA). Após a impressão da imagem do gel os produtos foram quantificados através da comparação da intensidade de suas bandas com as bandas padrão de massa, conforme orientação do fabricante.

3.1.6. Seqüenciamento dos produtos de PCR

Foi utilizada a técnica de seqüenciamento por PCR (*Cycle sequencing*) derivada da metodologia de Sanger e colaboradores, 1977, utilizando-se didesoxinucleotídeos (ddNTPs) contendo marcadores

fluorescentes (kit *Big Dye*® Terminator v3.1 *Cycle Sequencing Ready Reaction* - Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

As duas fitas de DNA dos produtos de PCR foram seqüenciadas para garantir uma melhor qualidade na caracterização dos nucleotídeos.

3.1.6.1. Reação de seqüenciamento

A concentração de DNA utilizada nas reações de seqüenciamento foi determinada de acordo com o tamanho do produto de PCR e seguindo as orientações do kit *Big Dye*® Terminator v3.1 *Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Tabela 5).

Tabela 5 - Relação entre o tamanho do fragmento e a concentração de DNA para cada reação de seqüenciamento

Tamanho do produto de PCR (bp)	Concentração de DNA (ng / reação)
100 - 200 bp	1 - 3 ng
200 - 500 bp	3 - 10 ng
500 - 1000 bp	5 - 20 ng
1000 - 2000 bp	10 - 40 ng
> 2000 bp	20 - 50 ng

As reações foram realizadas com volume final de 20 µL nas seguintes concentrações: 2 µL do reagente Ready Reaction Premix (kit *Big Dye*® Terminator v3.1 *Cycle Sequencing Ready Reaction* - Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 6 µL do Tampão 5X (20 Tris 1M (pH=9), 50mM de MgCl₂), 3,2 pmol de cada primer, DNA e H₂O q.s.p. 20 µL. As condições das reações de seqüenciamento foram as mesmas para todas as reações, com exceção da concentração de DNA.

As amostras foram submetidas a repetidos ciclos de variação de temperatura em termociclador (Eppendorf Mastercycler®, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) com os seguintes parâmetros: 25 ciclos de 96°C por 30 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos.

3.1.6.2. Purificação após reação de seqüenciamento

Após a reação de seqüenciamento, as amostras foram precipitadas com isopropanol para a retirada dos ddNTPs marcados não incorporados. Foram adicionados 80 µL de isopropanol 75% (Merck S.A.) ao produto da reação, com posterior incubação por 15 minutos à temperatura ambiente (TA) e centrifugação a 13.000 rpm por 20 minutos (TA). Após esta etapa, o isopropanol foi removido com cuidado para não aspirar o precipitado. Em seguida foram realizadas duas lavagens por centrifugação com 1000 µL de etanol 70% (Merck S.A.), durante 15 minutos a 13.000 rpm (TA). Após as lavagens, todo o etanol foi retirado, e as amostras colocadas em um termobloco por aproximadamente 2 minutos a 94°C, para evaporação completa do álcool.

3.1.6.3. Preparo de Amostras para Aplicação no Gel de Seqüenciamento

O DNA precipitado, após a reação de seqüenciamento, foi ressuspenso com 4 µL do tampão de amostra contendo 5 partes de formamida deionizada (Sigma®) e 1 parte de *blue dextran* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Posteriormente, as amostras foram

incubadas a 94°C por 4 minutos para denaturação das fitas de DNA, imediatamente após a incubação foram colocadas em banho de gelo até a aplicação no gel.

3.1.6.4. Eletroforese

A eletroforese foi realizada no seqüenciador automático ABI Prism 377 da Applied Biosystems, Foster City, CA, USA. Foram utilizadas placas de 36 cm e pente de 48 espaços. Para o gel foi utilizada uma solução comercial de acrilamida e bisacrilamida (Long Ranger® 50% Gel Solution / Cambrex Bio Science Rockland, Inc.) acrescida de 6M de uréia, tampão TBE 1X, 125 µL de persulfato de amônio e 25 µL de TEMED (Sigma®). Para a polimerização total da membrana o período de incubação foi de 2 horas. Foram aplicados 1,5 µL de amostra a cada espaço do pente.

O tempo de eletroforese variou de acordo com o tamanho dos fragmentos, para fragmentos de até 400 bp a duração foi de 5 horas e para fragmentos >400 bp a duração foi de 7 horas.

3.1.7. Análise de Seqüências

3.1.7.1. Validação, montagem da seqüência consenso e alinhamento

As seqüências obtidas foram analisadas inicialmente utilizando os programas *Phred-Phrap-Consed* (Ewing e Green, 1998; Ewing *et al.*, 1998; Gordon *et al.*, 1998).

O programa *Phred* mensurou a qualidade dos dados, atribuindo um escore de 0 a 50 para cada base do cromatograma. Posteriormente, o programa *Phrap* montou uma seqüência consenso a partir do alinhamento das várias seqüências sobrepostas validadas pelo *Phrep*, sendo consideradas para a construção da seqüência consenso bases que apresentaram um escore igual ou > 20 . A seqüência consenso foi visualizada, analisada e editada no programa *Consed*.

Em seguida, as seqüências consenso de cada paciente foram alinhadas no programa *Clustal X* (Thompson *et al.*, 1997) e editadas no programa *Bioedit*.

3.1.8. Genotipagem

A genotipagem pela região 5'UTR foi realizada nos estudos que precederam esta dissertação, conforme citado no início deste capítulo.

A genotipagem pela região NS5B foi realizada através da análise filogenética das seqüências consenso de cada paciente. Para tal foi montado um banco de dados com as seqüências geradas neste estudo e seqüências disponíveis no *GenBank* dos diferentes genótipos de VHC (Tabela 6).

A análise da região NS5B permite a confirmação da genotipagem pela 5'UTR, bem como a determinação do subtipo viral (Simmonds *et al.*, 1994).

Tabela 6 - Número de acesso e genótipo das seqüências do *GenBank* utilizadas para genotipar e subtipar pela região NS5B

Seqüências dos diversos genótipos do VHC do <i>GenBank</i>			
Genótipo / subtipo	nº de acesso	Genótipo / subtipo	nº de acesso
1a	D10749	3a	D28917
1a	M62321	3a	D17763
1b	AF054248	3b	D49374
1b	D11355	4a	Y11604
2a	D00944	5a	Y13184
2b	D10988	6a	Y12083
2b	AB030907		

3.1.9. Análise Filogenética

3.1.9.1. Análise de sinal filogenético

A presença de sinal filogenético nas regiões estudadas foi analisada através do mapeamento da verossimilhança (*likelihood mapping*) pelo programa Tree-Puzzle (Strimmer e von Haeseler, 1997).

Este método analisa grupos de quatro seqüências escolhidas ao acaso chamadas de quartetos (Strimmer e von Haeseler, 1997). Para um quarteto são possíveis somente três topologias de árvore não enraizada. A verossimilhança (*likelihood*) de cada topologia pode ser estimada com o método de Máxima Verossimilhança (*Maximum-Likelihood* -ML) e as três verossimilhanças (*likelihoods*) podem ser registradas como pontos num triângulo equilátero. Para N seqüências existem ($N/4$) quartetos possíveis e a distribuição dos seus pontos no triângulo dão uma visão global das árvores.

No triângulo eqüilátero são observadas duas áreas principais: as três pontas representam topologias de árvores completamente resolvidas, indicando a presença de sinal filogenético nos dados; o centro e as três regiões entre as pontas representam uma filogenia *star-like* e *net-like* respectivamente indicando a presença de ruído filogenético (Figura 8). A percentagem dos pontos localizados em cada região do triângulo nos dá a idéia da evolução dos dados.

Para cada grupo de seqüências (região NS3 e NS5B, separadamente) foram analisados 10000 quartetos.

Figura 8 - Esquema representativo do mapeamento de verossimilhança (*likelihood mapping*). Fonte: (Strimmer e von Haeseler, 1997)

3.1.9.2. Construção da topologia das árvores filogenéticas

Para as análises das seqüências obtidas dos casais, controles e seqüências referência obtidas do *GenBank* foi montado um banco de dados para cada região estudada NS5B, NS3 e as duas regiões juntas NS3/NS5B. O número de acesso das seqüências do *GenBank* utilizadas como referência nestas análises está descrito na tabela 7.

Tabela 7 - Número de acesso das seqüências do *GenBank* utilizadas para todas as análises filogenéticas

Seqüências do <i>GenBank</i> utilizadas como referência para as análises filogenéticas	
nº de acesso	nº de acesso
D10749	D50409
M62321	D17763
AF054248	D49374
D11355	Y11604
D00944	Y13184
D10988	Y12083
AB030907	D28917

As seqüências foram alinhadas com o programa Clustal X e para a realização da análise filogenética foi utilizado o programa PAUP* (Swofford, 2002). As análises foram realizadas utilizando os métodos de distância e máxima verossimilhança (MV). Para os dois métodos o modelo de substituição foi estimado pelo teste de razão de verossimilhança com o auxílio do programa Modeltest versão 3.06 (Posada e Crandall, 1998).

O modelo estimado para a região NS3 e NS3/NS5B foi o modelo de substituição de Tamura-Nei (1993) com proporção de sítios invariantes (I) e distribuição gama para variação da taxa de substituição entre os sítios (G) (TrN+I+G). Para a região NS5B foi utilizado o mesmo modelo acrescentando a frequência de bases iguais (TrNef+I+G).

No método de distância foi utilizado o algoritmo de agrupamento de vizinhos (*neighbor-joining*, NJ); (Saitou e Nei, 1987) para a reconstrução de topologias.

Para o critério de máxima verossimilhança foi realizada uma busca heurística com o algoritmo de rearranjo dos braços (*Branch-swapping*) seccionando a árvore em dois pedaços e ligando em outras partes (TBR, *tree bisection and reconnection*).

Foram calculados os valores de *bootstrap*, com 1000 réplicas para a verificação da sustentação de ramos nas topologias das árvores obtidas (Felsenstein, 1985; Zharkikh e Li, 1995). Foram considerados valores de *bootstrap* significativos acima de 70 (McCormack e Clewley, 2002).

3.1.9.3. Análise da variabilidade das seqüências de nucleotídeos

Para a análise da variabilidade de nucleotídeos das seqüências dos casais, dos controles e seqüências referência do *GenBank* utilizamos o programa Meg Alig 3.12 do pacote DNASTarTM. As seqüências foram alinhadas e analisadas pelo programa, resultando na obtenção do grau de similaridade entre as seqüências de nucleotídeos, calculado par a par.

3.1.10. Biossegurança

Todos os experimentos foram executados no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Adolfo Lutz (IAL), o qual possui as condições de biossegurança necessárias para a manipulação de todo o material utilizado

neste trabalho. O descarte de material biológico e químico seguiu todas as normas de biossegurança já empregadas no Instituto.

3.1.11. Aspectos éticos

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo: nº 1060/05) (Apêndice). Os projetos anteriores, dos quais foram selecionados todos os pacientes, foram submetidos e aprovados, na ocasião, pela comissão acima (protocolos: nº. 095/99 e 167/04) (Apêndice)

Foram tomados todos os cuidados para a preservação e confidencialidade das informações.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Genotipagem pela região NS5B

A genotipagem por seqüenciamento da região NS5B, foi necessária para a confirmação dos genótipos, previamente determinados, pelo seqüenciamento da região 5'UTR, e dos subtipos do VHC dos casais e controles. Na análise filogenética das seqüências da região NS5B dos casais juntamente com seqüências dos diferentes genótipos e subtipos, publicadas no *GenBank*, observamos que 5 pacientes eram portadores do genótipo 1a, 7 do genótipo 1b e 6 do genótipo 3a (Tabela 8). Com exceção do casal 9 (CF09F 1b e CF09M 1a) todos os casais mostraram concordância entre genótipo e subtipo. Os controles foram escolhidos ao acaso de acordo com os genótipos e subtipos encontrados nos casais. Foram selecionados três grupos de 14 pacientes portadores dos genótipos 1a, 1b e 3a. Foi realizada a genotipagem e subtipagem por esta região em todas as seqüências (Tabela 8).

4.2. PCR e seqüenciamento das amostras dos casais e controles

Foi possível amplificar a região da proteína NS5B dos 9 casais do estudo, o fragmento amplificado foi de aproximadamente 350 nucleotídeos.

Para a região da proteína NS3 utilizamos duas estratégias de amplificação, conforme descrito anteriormente, gerando um produto de aproximadamente 620 nucleotídeos. Entretanto, não foi possível amplificar esta região de dois casais do estudo (CF04 e 09). Estes casais foram incluídos apenas nas análises da região NS5B.

Tabela 8 – Genotipagem e subtipagem pela região NS5B

Casal	Sexo	Genótipo/Subtipo	Controle	Genótipo / Subtipo	Controle	Genótipo / Subtipo	Controle	Genótipo / Subtipo
		NS5B		NS5B		NS5B		NS5B
1	F	3a	6947	1a	7322	1b	7185	3a
	M	3a	6681	1a	7879	1b	7244	3a
2	F	3a	8090	1a	7918	1b	7647	3a
	M	3a	6625	1a	7910	1b	7748	3a
3	F	1b	7152	1a	6887	1b	7826	3a
	M	1b	10248	1a	7733	1b	8319	3a
4	F	1b	8217	1a	10187	1b	8487	3a
	M	1b	7954	1a	6611	1b	10173	3a
5	F	1a	7017	1a	10323	1b	10180	3a
	M	1a	9089	1a	6874	1b	10654	3a
6	F	1b	8399	1a	5772	1b	10698	3a
	M	1b	10402	1a	6602	1b	10709	3a
7	F	3a	8432	1a	10371	1b	10749	3a
	M	3a	10355	1a	7692	1b	10831	3a
8	F	1a						
	M	1a						
9	F	1b						
	M	1a						

4.3. Análise do sinal filogenético

A análise do sinal filogenético foi realizada separadamente para as diferentes regiões NS5B, NS3 e NS3/NS5B no banco de dados com as seqüências dos casais, controles e *GenBank*. Para a região NS5B foram analisados dois bancos de dados, um com os primeiros 199 nucleotídeos da região amplificada e o outro com 344 nucleotídeos, produto total da amplificação desta região. Para a região NS3 foi analisado um banco de dados de 619 nucleotídeos. As duas regiões juntas totalizaram 960 nucleotídeos.

A figura 9 mostra o resultado da análise do mapeamento por verossimilhança das seqüências. A região NS5B quando analisada com 344 nucleotídeos apresentou melhora no sinal filogenético, 92,9% contra 90,5% de quartetos nas regiões 1, 2 e 3. A região NS3 foi a que apresentou o melhor sinal entre as regiões analisadas separadamente (94,8%). Ao analisarmos as duas regiões juntas observamos uma melhora no sinal, chegando a 96,1% (Figura 9).

Figura 9 - Mapeamento da verossimilhança (*Likelihood mapping*) de 10000 quartetos selecionados ao acaso de 77 seqüências com 199 nt da região NS5B **(A)**, 77 seqüências com 344 nt da região NS5B **(B)**, 72 seqüências com 619 nt da região NS3 **(C)** e 72 seqüências das regiões NS3/NS5B juntas com 960 nt **(D)**

4.4. Variabilidade nucleotídica

As tabelas 9 e 10 mostram a matriz de similaridade entre as seqüências de nucleotídeos das regiões NS5B e NS3, respectivamente. Esta matriz foi montada com todas as seqüências utilizadas para as análises (seqüências dos casais, controles e *Genbank*).

A similaridade entre as seqüências de nucleotídeos dos casais estudados variou de 78,2% a 99,1% (média de 95,45%) para a região NS5B e de 94,7% a 99,2% (média de 97,24%) para a região NS3. A menor similaridade encontrada foi na região NS5B entre o casal 9, que após a genotipagem e subtipagem por esta região, verificamos uma discordância no subtipo do casal (CF09F 1a e CF09M 1b). A maior similaridade foi verificada na região NS3 entre as seqüências do casal 2 (99,2%).

Entre as seqüências dos controles locais e sequencias do *Genbank* encontramos similaridades entre 53,9% e 98% (média de 72,9%) para a região NS5B e 61% e 98,2% (média de 74,8%) para a região NS3.

Tabela 9 - Grau de similaridade de nucleotídeos entre as seqüências da região NS5B dos casais, controle e *GenBank*

	10173 NS5B	***																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
--	------------	-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Tabela 9 - Grau de similaridade de nucleotídeos entre as sequências da região NS5B dos casais, controle e *GenBank* (continuação)

	8399 NS5B	8432 NS5B	8487 NS5B	9089 NS5B	AB03907	AF054248	D09444	D10749	D10988	D11355	D17763	D28917	D48374	D50409	M62321	Y11604	Y12083	Y13184	CF01F NS5B	CF01M NS5B	CF02F NS5B	CF02M NS5B	CF03F NS5B	CF03M NS5B	CF04F NS5B	CF04M NS5B	CF05F NS5B	CF05M NS5B	CF06F NS5B	CF06M NS5B	CF07F NS5B	CF07M NS5B	CF08F NS5B	CF08M NS5B	CF09F NS5B	CF09M NS5B
62.2	61.3	95.1	63.1	57.8	63.1	58.1	63.1	59.9	60.8	94.8	88.1	73.5	56.7	62.8	64.0	61.6	61.0	93.6	94.2	92.2	92.7	60.5	60.2	61.6	61.0	64.0	61.6	62.5	63.4	95.1	95.6	62.5	62.8	60.5	62.5	10173 NS5B
61.9	61.0	95.9	62.5	57.6	61.0	58.1	62.8	58.4	58.7	97.1	89.0	74.7	55.8	61.3	62.5	61.0	58.1	94.8	94.2	93.6	94.8	59.0	59.3	59.6	59.0	62.5	60.2	61.0	60.8	95.1	96.2	61.0	61.3	58.7	61.6	10180 NS5B
77.9	77.9	59.6	78.8	61.3	91.9	64.2	78.2	62.5	93.0	60.2	59.0	61.6	63.7	78.8	59.3	61.9	66.6	59.6	60.2	60.8	60.2	94.5	94.2	92.2	93.9	78.8	78.8	91.9	91.9	59.0	58.7	78.2	78.2	91.6	78.5	10187 NS5B
96.2	95.9	62.2	96.2	59.3	76.2	61.0	96.5	60.8	79.4	62.5	62.5	61.3	63.1	95.9	64.5	62.8	64.5	62.2	62.8	62.8	62.8	81.1	79.9	77.6	78.8	97.7	96.8	79.4	79.7	60.8	61.6	96.2	97.1	77.9	96.5	10248 NS5B
80.2	81.4	60.2	81.1	62.5	91.9	65.7	81.1	63.7	93.6	61.0	59.9	59.9	63.7	82.0	61.3	64.2	64.8	59.9	60.5	61.0	61.0	93.9	92.4	91.6	92.7	81.1	80.8	91.9	92.2	60.8	60.6	82.3	82.3	90.7	81.1	10323 NS5B
95.9	96.8	62.2	96.5	60.5	76.7	62.8	96.8	61.9	79.4	63.7	62.8	62.8	62.5	96.2	65.1	63.1	64.5	63.4	62.8	62.2	63.4	81.7	80.5	78.8	79.9	97.4	96.5	79.9	80.2	60.8	61.6	95.9	96.8	78.5	96.2	10355 NS5B
78.5	78.5	59.9	78.8	60.5	92.4	63.7	78.8	60.8	93.6	60.8	59.9	61.9	61.9	79.1	57.8	62.2	64.5	59.0	59.6	61.9	61.3	92.2	92.4	91.9	92.4	78.2	78.1	92.4	91.6	60.8	59.9	79.4	79.4	80.4	79.7	10371 NS5B
96.8	96.5	60.8	95.6	59.9	77.9	62.2	94.8	61.9	79.4	61.6	60.5	65.1	62.8	94.2	61.6	63.4	62.5	61.9	61.3	61.0	61.9	82.8	81.7	78.8	79.9	96.5	95.6	80.5	80.5	59.3	59.6	94.2	94.5	79.1	96.2	10402 NS5B
60.8	59.9	93.6	61.9	58.7	63.4	58.1	62.2	59.9	61.0	95.1	87.2	76.2	56.7	61.9	64.2	59.9	58.1	93.6	93.0	93.9	94.5	59.9	60.2	61.6	61.6	61.6	59.0	61.9	62.8	93.0	93.9	60.8	61.0	60.8	60.5	10654 NS5B
61.6	61.3	93.9	62.5	58.4	62.5	56.1	62.5	59.0	60.8	94.8	89.8	74.7	56.4	61.0	63.4	59.0	57.6	91.9	92.2	92.7	93.0	59.9	60.2	60.5	60.5	63.1	60.2	61.3	61.6	93.0	94.2	61.6	61.9	58.4	62.2	10698 NS5B
61.9	61.0	97.1	62.2	58.4	62.5	57.8	62.2	60.2	60.2	95.6	90.4	77.0	56.1	60.8	64.2	60.8	59.0	95.1	94.5	93.6	94.2	60.5	61.3	60.5	59.9	63.1	60.2	62.2	61.6	95.6	96.8	62.2	62.5	60.8	62.8	10709 NS5B
60.5	59.6	96.2	61.9	59.0	60.5	56.1	61.9	59.6	58.7	95.9	88.7	75.0	57.3	59.9	62.5	59.9	58.4	94.8	94.8	93.6	94.2	59.0	59.3	59.6	59.9	62.8	60.5	61.0	60.8	95.1	95.9	61.3	61.6	58.4	61.9	10749 NS5B
62.5	61.6	95.3	64.0	58.4	61.3	57.3	63.4	59.0	59.6	95.9	89.0	75.9	55.2	61.9	64.0	61.3	57.3	95.3	94.8	93.6	94.8	58.7	59.0	58.7	58.7	63.7	61.3	60.2	59.9	94.5	95.6	61.6	61.9	58.4	62.2	10831 NS5B
80.2	80.2	59.9	79.7	60.8	93.0	63.7	81.1	62.5	93.0	60.8	60.2	60.5	61.6	80.2	59.9	63.1	65.7	59.0	59.6	60.8	60.8	96.2	97.4	92.2	92.7	80.5	80.2	93.6	93.9	60.8	60.5	81.7	81.7	92.2	80.8	9772 NS5B
78.8	79.4	60.8	79.7	61.0	91.9	64.0	79.1	62.8	93.0	61.6	60.8	61.0	62.2	79.4	61.3	63.1	65.7	59.9	60.5	62.2	62.2	92.7	92.4	91.9	92.4	78.5	78.4	91.9	91.6	61.9	61.6	79.7	79.7	88.4	80.5	9602 NS5B
78.2	77.9	61.0	78.2	59.9	92.7	64.2	79.4	60.5	93.0	61.9	62.5	61.9	61.0	78.5	59.0	63.1	66.9	60.2	60.8	61.9	61.3	92.7	93.6	91.3	91.6	78.8	78.1	92.7	93.3	61.9	62.8	79.4	79.4	89.0	79.7	9611 NS5B
96.2	95.9	61.3	96.2	61.0	76.2	63.4	95.9	62.2	79.1	62.8	61.9	63.1	64.0	95.9	64.2	63.4	63.7	62.5	61.9	61.9	63.1	80.5	79.1	77.6	78.5	96.8	96.2	79.4	79.7	59.6	60.8	95.6	96.5	78.5	95.6	9625 NS5B
97.4	96.5	61.0	96.2	59.6	77.9	61.9	96.5	61.0	81.1	61.6	60.8	62.8	62.8	61.9	63.7	63.1	63.7	61.9	61.3	60.8	61.9	82.3	80.5	78.8	79.9	96.5	96.2	80.8	80.8	59.9	60.8	95.6	96.5	78.5	96.5	9681 NS5B
79.9	80.5	59.0	79.1	62.2	92.4	64.2	79.1	62.2	92.7	60.8	60.2	60.5	61.9	79.9	60.2	62.8	64.0	59.6	59.6	61.3	60.8	81.3	92.2	90.1	90.4	80.8	79.4	91.9	91.3	59.9	59.3	79.7	79.7	95.1	79.7	9674 NS5B
79.9	81.7	60.8	80.8	62.2	91.9	64.8	80.2	63.4	93.6	61.6	60.8	59.6	62.8	81.7	61.3	63.4	64.5	59.9	60.5	62.2	62.2	93.9	93.0	91.9	92.4	80.8	80.5	92.4	92.2	61.9	61.6	82.0	82.0	90.7	81.7	9687 NS5B
96.8	96.5	60.2	96.8	59.3	75.9	62.2	97.1	60.8	79.1	61.6	60.5	62.8	62.8	96.5	64.5	64.0	64.0	61.3	60.8	60.8	62.2	80.8	79.7	77.9	79.1	97.7	96.8	79.1	79.4	58.7	60.2	96.2	97.1	78.2	96.5	9947 NS5B
97.7	96.2	60.8	95.3	61.0	79.1	61.9	95.6	62.5	80.5	62.5	60.8	63.4	63.7	96.2	64.2	63.4	63.4	61.9	61.3	60.8	61.9	82.3	80.5	78.8	78.5	95.6	95.3	79.7	80.2	58.7	59.9	94.2	95.1	79.7	95.6	7017 NS5B
97.1	96.8	61.0	95.3	60.2	77.9	63.4	95.9	61.6	81.1	62.8	61.9	64.8	64.0	96.5	63.1	63.4	63.4	63.1	62.5	61.9	61.3	82.3	81.1	78.8	79.9	96.8	94.8	80.2	80.2	61.3	61.6	95.1	95.9	78.8	96.2	7152 NS5B
62.2	61.3	94.2	63.1	58.7	61.9	57.6	63.1	58.7	59.6	96.2	88.7	75.6	57.3	61.6	64.2	60.5	58.7	93.0	93.0	93.9	94.2	60.2	59.9	60.2	60.2	64.0	61.6	62.5	62.2	93.3	95.1	62.5	62.8	59.3	63.1	7185 NS5B
60.1	59.2	92.7	60.9	56.3	60.1	56.6	61.2	58.6	56.7	93.3	85.7	74.9	56.5	59.8	61.5	59.2	57.1	91.3	91.3	91.0	91.5	56.9	57.1	58.6	58.0	61.8	59.5	58.9	58.6	91.5	92.7	60.3	60.6	56.6	61.5	7244 NS5B
79.4	79.4	59.3	80.2	61.9	91.0	64.8	79.4	63.1	91.6	60.5	59.3	61.9	62.5	79.7	59.6	62.8	63.4	59.3	60.5	61.0	61.0	92.2	91.9	91.9	91.9	79.1	79.9	92.7	92.4	60.2	59.9	79.9	79.9	90.1	80.8	7322 NS5B
62.2	61.3	94.8	63.1	58.4	60.5	58.4	63.1	59.3	58.7	95.6	87.8	76.2	56.7	61.6	64.8	61.3	58.1	93.6	93.0	92.2	93.3	59.0	59.3	60.2	59.6	62.8	60.5	60.5	60.2	93.9	95.1	61.3	61.6	58.7	61.9	7647 NS5B
79.9	80.5	60.5	80.2	62.2	93.3	66.3	81.4	64.5	92.7	61.3	60.8	62.2	63.7	80.5	59.3	63.4	64.5	60.2	60.8	60.8	60.8	94.5	94.5	95.1	95.3	79.9	80.5	96.2	96.5	60.8	60.5	81.4	81.4	91.3	80.8	7692 NS5B
78.5	80.2	60.8	78.2	59.9	92.7	63.4	78.8	60.5	95.1	59.9	59.6	60.2	61.0	79.7	58.4	62.8	65.7	58.7	59.3	60.5	60.5	91.9	92.7	91.3	91.9	79.9	78.5	92.4	92.2	60.2	60.2	79.9	79.9	94.2	79.1	7733 NS5B
61.3	61.0	96.5	61.6	59.0	60.5	58.4	62.2	60.2	58.7	97.1	90.7	74.1	57.6	60.8	64.8	60.8	58.1	94.8	94.8	94.2	94.8	59.0	59.3	59.0	59.0	62.5	60.8	60.5	60.2	95.1	96.2	61.6	61.9	58.7	62.2	7748 NS5B
62.4	61.5	94.5	62.4	57.1	62.4	56.0	63.6	57.7	60.1	95.0	89.8	75.5	53.9	61.8	63.3	59.5	58.3	93.3	92.4	92.1	92.4	59.8	59.8	60.6	60.6	64.1	61.2	61.8	61.5	93.3	94.5	62.7	63.0	58.9	63.3	7828 NS5B
79.7	79.7	59.6	79.7	62.5	92.4	65.1	80.5	64.8	93.3	59.9	59.9	62.2	63.7	80.2	59.3	64.5	66.3	58.1	59.3	60.5	59.9	92.2	93.0	92.4	93.6	81.4	80.2	92.2	92.4	59.3	59.0	81.1	81.1	90.4	80.8	7879 NS5B
79.8	79.8	58.1	80.1	58.4	89.9	59.3	80.7	60.6	90.8	58.4	57.8	61.5	60.6	80.1	58.1	62.4	62.4	57.8	58.4	59.6	59.0	92.4	93.9	92.7	92.7	80.1	79.8	92.4	92.7	58.7	58.4	81.3	81.3	90.8	81.0	7910 NS5B
79.4	80.5	59.6	80.2	61.0	93.3	65.7	80.8	63.4	94.8	61.0	60.8	60.5	62.5	81.7	59.3	63.1	64.5	59.3	59.3	60.5	60.5	94.2	93.9	95.3	95.9	81.1	81.1	95.6	96.2	60.5	60.2	82.6	82.6	91.6	79.9	7918 NS5B
96.2	95.9	61.9	96.2	59.9	77.0	62.5	96.5	61.3	79.1	62.8	62.5	62.5	63.4	96.5	63.1	63.7	63.7	61.9	61.6	61.6	62.5	82.0	81.													

Tabela 10 - Grau de similaridade de nucleotídeos entre as seqüências da região NS3 dos casais, controle e *GenBank*

[illegible]

Tabela 10 - Grau de similaridade de nucleotídeos entre as seqüências da região NS3 dos casais, controle e *GenBank* (continuação)

	8090 NS3	8217 NS3	8319 NS3	8399 NS3	8432 NS3	8487 NS3	9089 NS3	AB030907	AF054248	DO0944	D07049	D0988	D11355	D28917	D46374	DS0409	D17763	M22321	Y11604	Y12083	Y13184	CF01F NS3	CF01M NS3	CF02F NS3	CF02M NS3	CF03F NS3	CF03M NS3	CF05F NS3	CF05M NS3	CF06F NS3	CF06M NS3	CF07F NS3	CF07M NS3	CF08F NS3	CF08M NS3	CF09F NS3	CF09M NS3	CF10F NS3	CF10M NS3	CF11F NS3	CF11M NS3	CF12F NS3	CF12M NS3	CF13F NS3	CF13M NS3	CF14F NS3	CF14M NS3	CF15F NS3	CF15M NS3	CF16F NS3	CF16M NS3	CF17F NS3	CF17M NS3	CF18F NS3	CF18M NS3	CF19F NS3	CF19M NS3	CF20F NS3	CF20M NS3	CF21F NS3	CF21M NS3	CF22F NS3	CF22M NS3	CF23F NS3	CF23M NS3	CF24F NS3	CF24M NS3	CF25F NS3	CF25M NS3	CF26F NS3	CF26M NS3	CF27F NS3	CF27M NS3	CF28F NS3	CF28M NS3	CF29F NS3	CF29M NS3	CF30F NS3	CF30M NS3	CF31F NS3	CF31M NS3	CF32F NS3	CF32M NS3	CF33F NS3	CF33M NS3	CF34F NS3	CF34M NS3	CF35F NS3	CF35M NS3	CF36F NS3	CF36M NS3	CF37F NS3	CF37M NS3	CF38F NS3	CF38M NS3	CF39F NS3	CF39M NS3	CF40F NS3	CF40M NS3	CF41F NS3	CF41M NS3	CF42F NS3	CF42M NS3	CF43F NS3	CF43M NS3	CF44F NS3	CF44M NS3	CF45F NS3	CF45M NS3	CF46F NS3	CF46M NS3	CF47F NS3	CF47M NS3	CF48F NS3	CF48M NS3	CF49F NS3	CF49M NS3	CF50F NS3	CF50M NS3	CF51F NS3	CF51M NS3	CF52F NS3	CF52M NS3	CF53F NS3	CF53M NS3	CF54F NS3	CF54M NS3	CF55F NS3	CF55M NS3	CF56F NS3	CF56M NS3	CF57F NS3	CF57M NS3	CF58F NS3	CF58M NS3	CF59F NS3	CF59M NS3	CF60F NS3	CF60M NS3	CF61F NS3	CF61M NS3	CF62F NS3	CF62M NS3	CF63F NS3	CF63M NS3	CF64F NS3	CF64M NS3	CF65F NS3	CF65M NS3	CF66F NS3	CF66M NS3	CF67F NS3	CF67M NS3	CF68F NS3	CF68M NS3	CF69F NS3	CF69M NS3	CF70F NS3	CF70M NS3	CF71F NS3	CF71M NS3	CF72F NS3	CF72M NS3	CF73F NS3	CF73M NS3	CF74F NS3	CF74M NS3	CF75F NS3	CF75M NS3	CF76F NS3	CF76M NS3	CF77F NS3	CF77M NS3	CF78F NS3	CF78M NS3	CF79F NS3	CF79M NS3	CF80F NS3	CF80M NS3	CF81F NS3	CF81M NS3	CF82F NS3	CF82M NS3	CF83F NS3	CF83M NS3	CF84F NS3	CF84M NS3	CF85F NS3	CF85M NS3	CF86F NS3	CF86M NS3	CF87F NS3	CF87M NS3	CF88F NS3	CF88M NS3	CF89F NS3	CF89M NS3	CF90F NS3	CF90M NS3	CF91F NS3	CF91M NS3	CF92F NS3	CF92M NS3	CF93F NS3	CF93M NS3	CF94F NS3	CF94M NS3	CF95F NS3	CF95M NS3	CF96F NS3	CF96M NS3	CF97F NS3	CF97M NS3	CF98F NS3	CF98M NS3	CF99F NS3	CF99M NS3	CF100F NS3	CF100M NS3	CF101F NS3	CF101M NS3	CF102F NS3	CF102M NS3	CF103F NS3	CF103M NS3	CF104F NS3	CF104M NS3	CF105F NS3	CF105M NS3	CF106F NS3	CF106M NS3	CF107F NS3	CF107M NS3	CF108F NS3	CF108M NS3	CF109F NS3	CF109M NS3	CF110F NS3	CF110M NS3	CF111F NS3	CF111M NS3	CF112F NS3	CF112M NS3	CF113F NS3	CF113M NS3	CF114F NS3	CF114M NS3	CF115F NS3	CF115M NS3	CF116F NS3	CF116M NS3	CF117F NS3	CF117M NS3	CF118F NS3	CF118M NS3	CF119F NS3	CF119M NS3	CF120F NS3	CF120M NS3	CF121F NS3	CF121M NS3	CF122F NS3	CF122M NS3	CF123F NS3	CF123M NS3	CF124F NS3	CF124M NS3	CF125F NS3	CF125M NS3	CF126F NS3	CF126M NS3	CF127F NS3	CF127M NS3	CF128F NS3	CF128M NS3	CF129F NS3	CF129M NS3	CF130F NS3	CF130M NS3	CF131F NS3	CF131M NS3	CF132F NS3	CF132M NS3	CF133F NS3	CF133M NS3	CF134F NS3	CF134M NS3	CF135F NS3	CF135M NS3	CF136F NS3	CF136M NS3	CF137F NS3	CF137M NS3	CF138F NS3	CF138M NS3	CF139F NS3	CF139M NS3	CF140F NS3	CF140M NS3	CF141F NS3	CF141M NS3	CF142F NS3	CF142M NS3	CF143F NS3	CF143M NS3	CF144F NS3	CF144M NS3	CF145F NS3	CF145M NS3	CF146F NS3	CF146M NS3	CF147F NS3	CF147M NS3	CF148F NS3	CF148M NS3	CF149F NS3	CF149M NS3	CF150F NS3	CF150M NS3	CF151F NS3	CF151M NS3	CF152F NS3	CF152M NS3	CF153F NS3	CF153M NS3	CF154F NS3	CF154M NS3	CF155F NS3	CF155M NS3	CF156F NS3	CF156M NS3	CF157F NS3	CF157M NS3	CF158F NS3	CF158M NS3	CF159F NS3	CF159M NS3	CF160F NS3	CF160M NS3	CF161F NS3	CF161M NS3	CF162F NS3	CF162M NS3	CF163F NS3	CF163M NS3	CF164F NS3	CF164M NS3	CF165F NS3	CF165M NS3	CF166F NS3	CF166M NS3	CF167F NS3	CF167M NS3	CF168F NS3	CF168M NS3	CF169F NS3	CF169M NS3	CF170F NS3	CF170M NS3	CF171F NS3	CF171M NS3	CF172F NS3	CF172M NS3	CF173F NS3	CF173M NS3	CF174F NS3	CF174M NS3	CF175F NS3	CF175M NS3	CF176F NS3	CF176M NS3	CF177F NS3	CF177M NS3	CF178F NS3	CF178M NS3	CF179F NS3	CF179M NS3	CF180F NS3	CF180M NS3	CF181F NS3	CF181M NS3	CF182F NS3	CF182M NS3	CF183F NS3	CF183M NS3	CF184F NS3	CF184M NS3	CF185F NS3	CF185M NS3	CF186F NS3	CF186M NS3	CF187F NS3	CF187M NS3	CF188F NS3	CF188M NS3	CF189F NS3	CF189M NS3	CF190F NS3	CF190M NS3	CF191F NS3	CF191M NS3	CF192F NS3	CF192M NS3	CF193F NS3	CF193M NS3	CF194F NS3	CF194M NS3	CF195F NS3	CF195M NS3	CF196F NS3	CF196M NS3	CF197F NS3	CF197M NS3	CF198F NS3	CF198M NS3	CF199F NS3	CF199M NS3	CF200F NS3	CF200M NS3	CF201F NS3	CF201M NS3	CF202F NS3	CF202M NS3	CF203F NS3	CF203M NS3	CF204F NS3	CF204M NS3	CF205F NS3	CF205M NS3	CF206F NS3	CF206M NS3	CF207F NS3	CF207M NS3	CF208F NS3	CF208M NS3	CF209F NS3	CF209M NS3	CF210F NS3	CF210M NS3	CF211F NS3	CF211M NS3	CF212F NS3	CF212M NS3	CF213F NS3	CF213M NS3	CF214F NS3	CF214M NS3	CF215F NS3	CF215M NS3	CF216F NS3	CF216M NS3	CF217F NS3	CF217M NS3	CF218F NS3	CF218M NS3	CF219F NS3	CF219M NS3	CF220F NS3	CF220M NS3	CF221F NS3	CF221M NS3	CF222F NS3	CF222M NS3	CF223F NS3	CF223M NS3	CF224F NS3	CF224M NS3	CF225F NS3	CF225M NS3	CF226F NS3	CF226M NS3	CF227F NS3	CF227M NS3	CF228F NS3	CF228M NS3	CF229F NS3	CF229M NS3	CF230F NS3	CF230M NS3	CF231F NS3	CF231M NS3	CF232F NS3	CF232M NS3	CF233F NS3	CF233M NS3	CF234F NS3	CF234M NS3	CF235F NS3	CF235M NS3	CF236F NS3	CF236M NS3	CF237F NS3	CF237M NS3	CF238F NS3	CF238M NS3	CF239F NS3	CF239M NS3	CF240F NS3	CF240M NS3	CF241F NS3	CF241M NS3	CF242F NS3	CF242M NS3	CF243F NS3	CF243M NS3	CF244F NS3	CF244M NS3	CF245F NS3	CF245M NS3	CF246F NS3	CF246M NS3	CF247F NS3	CF247M NS3	CF248F NS3	CF248M NS3	CF249F NS3	CF249M NS3	CF250F NS3	CF250M NS3	CF251F NS3	CF251M NS3	CF252F NS3	CF252M NS3	CF253F NS3	CF253M NS3	CF254F NS3	CF254M NS3	CF255F NS3	CF255M NS3	CF256F NS3	CF256M NS3	CF257F NS3	CF257M NS3	CF258F NS3	CF258M NS3	CF259F NS3	CF259M NS3	CF260F NS3	CF260M NS3	CF261F NS3	CF261M NS3	CF262F NS3	CF262M NS3	CF263F NS3	CF263M NS3	CF264F NS3	CF264M NS3	CF265F NS3	CF265M NS3	CF266F NS3	CF266M NS3	CF267F NS3	CF267M NS3	CF268F NS3	CF268M NS3	CF269F NS3	CF269M NS3	CF270F NS3	CF270M NS3	CF271F NS3	CF271M NS3	CF272F NS3	CF272M NS3	CF273F NS3	CF273M NS3	CF274F NS3	CF274M NS3	CF275F NS3	CF275M NS3	CF276F NS3	CF276M NS3	CF277F NS3	CF277M NS3	CF278F NS3	CF278M NS3	CF279F NS3	CF279M NS3	CF280F NS3	CF280M NS3	CF281F NS3	CF281M NS3	CF282F NS3	CF282M NS3	CF283F NS3	CF283M NS3	CF284F NS3	CF284M NS3	CF285F NS3	CF285M NS3	CF286F NS3	CF286M NS3	CF287F NS3	CF287M NS3	CF288F NS3	CF288M NS3	CF289F NS3	CF289M NS3	CF290F NS3	CF290M NS3	CF291F NS3	CF291M NS3	CF292F NS3	CF292M NS3	CF293F NS3	CF293M NS3	CF294F NS3	CF294M NS3	CF295F NS3	CF295M NS3	CF296F NS3	CF296M NS3	CF297F NS3	CF297M NS3	CF298F NS3	CF298M NS3	CF299F NS3	CF299M NS3	CF300F NS3	CF300M NS3	CF301F NS3	CF301M NS3	CF302F NS3	CF302M NS3	CF303F NS3	CF303M NS3	CF304F NS3	CF304M NS3	CF305F NS3	CF305M NS3	CF306F NS3	CF306M NS3	CF307F NS3	CF307M NS3	CF308F NS3	CF308M NS3	CF309F NS3	CF309M NS3	CF310F NS3	CF310M NS3	CF311F NS3	CF311M NS3	CF312F NS3	CF312M NS3	CF313F NS3	CF313M NS3	CF314F NS3	CF314M NS3	CF315F NS3	CF315M NS3	CF316F NS3	CF316M NS3	CF317F NS3	CF317M NS3	CF318F NS3	CF318M NS3	CF319F NS3	CF319M NS3	CF320F NS3	CF320M NS3	CF321F NS3	CF321M NS3	CF322F NS3	CF322M NS3	CF323F NS3	CF323M NS3	CF324F NS3	CF324M NS3	CF325F NS3	CF325M NS3	CF326F NS3	CF326M NS3	CF327F NS3	CF327M NS3	CF328F NS3	CF328M NS3	CF329F NS3	CF329M NS3	CF330F NS3	CF330M NS3	CF331F NS3	CF331M NS3	CF332F NS3	CF332M NS3	CF333F NS3	CF333M NS3	CF334F NS3	CF334M NS3	CF335F NS3	CF335M NS3	CF336F NS3	CF336M NS3	CF337F NS3	CF337M NS3	CF338F NS3	CF338M NS3	CF339F NS3	CF339M NS3	CF340F NS3	CF340M NS3	CF341F NS3	CF341M NS3	CF342F NS3	CF342M NS3	CF343F NS3	CF343M NS3	CF344F NS3	CF344M NS3	CF345F NS3	CF345M NS3	CF346F NS3	CF346M NS3	CF347F NS3	CF347M NS3	CF348F NS3	CF348M NS3	CF349F NS3	CF349M NS3	CF350F NS3	CF350M NS3	CF351F NS3	CF351M NS3	CF352F NS3	CF352M NS3	CF353F NS3	CF353M NS3	CF354F NS3	CF354M NS3	CF355F NS3	CF355M NS3	CF356F NS3	CF356M NS3	CF357F NS3	CF357M NS3	CF358F NS3	CF358M NS3	CF359F NS3	CF359M NS3	CF360F NS3	CF360M NS3	CF361F NS3	CF361M NS3	CF362F NS3	CF362M NS3	CF363F NS3	CF363M NS3	CF364F NS3	CF364M NS3	CF365F NS3	CF365M NS3	CF366F NS3	CF366M NS3	CF367F NS3	CF367M NS3	CF368F NS3	CF368M NS3	CF369F NS3	CF369M NS3	CF370F NS3	CF370M NS3	CF371F NS3	CF371M NS3	CF372F NS3	CF372M NS3	CF373F NS3	CF373M NS3	CF374F NS3	CF374M NS3	CF375F NS3	CF375M NS3	CF376F NS3	CF376M NS3	CF377F NS3	CF377M NS3	CF378F NS3	CF378M NS3	CF379F NS3	CF379M NS3	CF380F NS3	CF380M NS3	CF381F NS3	CF381M NS3	CF382F NS3	CF382M NS3	CF383F NS3	CF383M NS3	CF384F NS3	CF384M NS3	CF385F NS3	CF385M NS3	CF386F NS3	CF386M NS3	CF387F NS3	CF387M NS3	CF388F NS3	CF388M NS3	CF389F NS3	CF389M NS3	CF390F NS3	CF390M NS3	CF391F NS3	CF391M NS3	CF392F NS3	CF392M NS3	CF393F NS3	CF393M NS3	CF394F NS3	CF394M NS3	CF395F NS3	CF395M NS3	CF396F NS3	CF396M NS3	CF397F NS3	CF397M NS3	CF398F NS3	CF398M NS3	CF399F NS3	CF399M NS3	CF400F NS3	CF400M NS3	CF401F NS3	CF401M NS3	CF402F NS3	CF402M NS3	CF403F NS3	CF403M NS3	CF404F NS3	CF404M NS3	CF405F NS3	CF405M NS3	CF406F NS3	CF406M NS3	CF407F NS3	CF407M NS3	CF408F NS3	CF408M NS3	CF409F NS3	CF409M NS3	CF410F NS3	CF410M NS3	CF411F NS3	CF411M NS3	CF412F NS3	CF412M NS3	CF413F NS3	CF413M NS3	CF414F NS3	CF414M NS3	CF415F NS3	CF415M NS3	CF416F NS3	CF416M NS3	CF417F NS3	CF417M NS3	CF418F NS3	CF418M NS3	CF419F NS3	CF419M NS3	CF420F NS3	CF420M NS3	CF421F NS3	CF421M NS3	CF422F NS3	CF422M NS3	CF423F NS3	CF423M NS3	CF424F NS3	CF424M NS3	CF425F NS3	CF425M NS3	CF426F NS3	CF426M NS3	CF427F NS3	CF427M NS3	CF428F NS3	CF428M NS3	CF429F NS3	CF429M NS3	CF430F NS3	CF430M NS3	CF431F NS3	CF431M NS3	CF432F NS3	CF432M NS3	CF433F NS3	CF433M NS3	CF434F NS3	CF434M NS3	CF435F NS3	CF435M NS3	CF436F NS3	CF436M NS3	CF437F NS3	CF437M NS3	CF438F NS3	CF438M NS3	CF439F NS3	CF439M NS3	CF440F NS3	CF440M NS3	CF441F NS3	CF441M NS3	CF442F NS3	CF442M NS3	CF443F NS3	CF443M NS3	CF444F NS3	CF444M NS3	CF445F NS3	CF445M NS3	CF446F NS3	CF446M NS3	CF447F NS3	CF447M NS3	CF448F NS3	CF448M NS3	CF449F NS3	CF449M NS3	CF450F NS3	CF450M NS3	CF451F NS3	CF451M NS3	CF452F NS3	CF452M NS3	CF453F NS3	CF453M NS3	CF454F NS3	CF454M NS3	CF455F NS3	CF455M NS3	CF456F NS3	CF456M NS3	CF457F NS3	CF457M NS3	CF458F NS3	CF458M NS3	CF459F NS3	CF459M NS3	CF460F NS3	CF460M NS3	CF461F NS3	CF461M NS3	CF462F NS3	CF462M NS3	CF463F NS3	CF463M NS3	CF464F NS3	CF464M NS3	CF465F NS3	CF465M NS3	CF466F NS3	CF466M NS3	CF467F NS3	CF467M NS3	CF468F NS3	CF468M NS3	CF469F NS3	CF469M NS3	CF470F NS3	CF470M NS3	CF471F NS3	CF471M NS3	CF472F NS3	CF472M NS3	CF473F NS3	CF473M NS3	CF474F NS3	CF474M NS3	CF475F NS3	CF475M NS3	CF476F NS3	CF476M NS3	CF477F NS3	CF477M NS3	CF478F NS3	CF478M NS3	CF479F NS3	CF479M NS3	CF480F NS3	CF480M NS3	CF481F NS3	CF481M NS3	CF482F NS3	CF482M NS3	CF483F NS3	CF483M NS3	CF484F NS3	CF484M NS3	CF485F NS3	CF485M NS3	CF486F NS3	CF486M NS3	CF487F NS3	CF487M NS3	CF488F NS3	CF488M NS3	CF489F NS3	CF489M NS3	CF490F NS3	CF490M NS3	CF491F NS3	CF491M NS3	CF492F NS3	CF492M NS3	CF493F NS3	CF493M NS3	CF494F NS3	CF494M NS3	CF495F NS3	CF495M NS3	CF496F NS3	CF496M NS3	CF497F NS3	CF497M NS3	CF498F NS3	CF498M NS3	CF499F NS3	CF499M NS3	CF500F NS3	CF500M NS3	CF501F NS3	CF501M NS3	CF502F NS3	CF502M NS3	CF503F NS3	CF503M NS3	CF504F NS3	CF504M NS3	CF505F NS3	CF505M NS3	CF506F NS3	CF506M NS3	CF507F NS3	CF507M NS3	CF508F NS3	CF508M NS3	CF509F NS3	CF509M NS3	CF510F NS3	CF510M NS3	CF511F NS3	CF511M NS3	CF512F NS3	CF512M NS3	CF513F NS3	CF513M NS3	CF514F NS3	CF514M NS3	CF515F NS3	CF515M NS3	CF516F NS3
--	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	--------	--------	-------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------

4.5. Árvores filogenéticas

As seqüências das regiões NS5B e NS3 dos casais e controles geradas neste trabalho foram alinhadas juntamente com seqüências da mesma região publicadas no *GenBank* para a realização das análises filogenéticas utilizando-se os métodos de distância com algoritmo de *neighbor-joining* (NJ) e máxima verossimilhança com o algoritmo de rearranjo dos braços seccionando a árvore em dois pedaços e ligando em outras partes (TBR). As seqüências dos casais foram primeiramente alinhadas e analisadas somente com as seqüências do *GenBank* (Figuras 10, 11, 12, 13, 14 e 15) e em seguida com os controles locais e as seqüências do *GenBank* (Figuras 16, 17, 18, 19, 20 e 21).

Das doze análises realizadas, com as seqüências das diferentes regiões e diferentes métodos, as seqüências do casal 8 foram as únicas que mostraram a mesma origem em todas as análises. Os casais 3, 7, e 6 tiveram respectivamente 6, 6 e 9 análises com a mesma origem, nas suas seqüências. O casal 4 teve apenas 4 análises realizadas na região NS5B, e nas quatro mostrou que suas seqüências têm a mesma origem. Consideramos seqüências com a mesma origem aquelas que apresentaram um *bootstrap* acima de 70. As seqüências dos casais 5 e 9 não apresentaram a mesma origem em nenhuma das situações.

Figura 10 - Árvore filogenética, não enraizada, de 32 seqüências da região NS5B com 344 nucleotídeos (18 seqüências dos casais deste estudo destacadas em vermelho e 14 do *Genbank* em cinza) gerada no programa Clustal X utilizando-se o método de distância com o modelo TrNef+I+G e algoritmo de *Neighbor-joining* para reconstrução de topologias. Valores de *bootstrap* obtidos com 1000 réplicas. Na figura estão representados os *bootstrap* dos ramos dos casais.

Figura 11 - Árvore filogenética, não enraizada, de 28 seqüências da região NS3 com 619 nucleotídeos (14 seqüências dos casais deste estudo destacadas em vermelho e 14 do *Genbank* em cinza) gerada no programa Clustal X utilizando-se o método de distância com o modelo TrN+I+G e algoritmo de *Neighbor-joining* para reconstrução de topologias. Valores de *bootstrap* obtidos com 1000 réplicas. Na figura estão representados os *bootstrap* dos ramos dos casais.

Figura 12 - Árvore filogenética, não enraizada, de 28 seqüências da região NS3/NS5B com 960 nucleotídeos (14 seqüências dos casais deste estudo destacadas em vermelho e 14 do *Genbank* em cinza) gerada no programa Clustal X utilizando-se o método de distância com o modelo TrN+I+G e algoritmo de *Neighbor-joining* para reconstrução de topologias. Valores de *bootstrap* obtidos com 1000 réplicas. Na figura estão representados os *bootstrap* dos ramos dos casais

Figura 13 - Árvore filogenética, não enraizada, de 32 seqüências da região NS5B com 344 nucleotídeos (18 seqüências dos casais deste estudo destacadas em vermelho e 14 do *Genbank* em cinza) gerada no programa Clustal X utilizando-se o método de máxima verossimilhança com o modelo TrNef+I+G e algoritmo de rearranjo dos braços (*Branch-swapping*) seccionando a árvore em dois pedaços e ligando em outras partes (*TBR*) para reconstrução de topologias. Valores de *bootstrap* obtidos com 1000 réplicas. Na figura estão representados os *bootstrap* dos ramos dos casais

Figura 14 - Árvore filogenética, não enraizada, de 28 seqüências da região NS3 com 619 nucleotídeos (14 seqüências dos casais deste estudo destacadas em vermelho e 14 do *Genbank* em cinza) gerada no programa Clustal X utilizando-se o método de máxima verossimilhança com o modelo TrN+I+G e algoritmo de rearranjo dos braços (*Branch-swapping*) seccionando a árvore em dois pedaços e ligando em outras partes (*TBR*) para reconstrução de topologias. Valores de *bootstrap* obtidos com 1000 réplicas. Na figura estão representado os *bootstrap* dos ramos dos casais

Figura 15 - Árvore filogenética, não enraizada, de 28 seqüências da região NS3/NS5B com 960 nucleotídeos (14 seqüências dos casais deste estudo destacadas em vermelho e 14 do *Genbank* em cinza) gerada no programa Clustal X utilizando-se o método de máxima verossimilhança com o modelo TrN+I+G e algoritmo de rearranjo dos braços (*Branch-swapping*) seccionando a árvore em dois pedaços e ligando em outras partes (*TBR*) para reconstrução de topologias. Valores de *bootstrap* obtidos com 1000 réplicas. Na figura estão representados os *bootstrap* dos ramos dos casais

Figura 16 - Árvore filogenética, não enraizada, de 74 seqüências da região NS5B com 344 nucleotídeos (18 seqüências dos casais deste estudo destacadas em vermelho, 42 controles do estudo e 14 do *Genbank* em cinza) gerada no programa Clustal X utilizando-se o método de distância com o modelo TrNef+I+G e algoritmo de *Neighbor-joining* para reconstrução de topologias. Valores de *bootstrap* obtidos com 1000 réplicas. Na figura estão representados os *bootstraps* dos ramos dos casais com valores acima de 70.

Figura 17 - Árvore filogenética, não enraizada, de 70 seqüências da região NS3 com 619 nucleotídeos (14 seqüências dos casais deste estudo destacadas em vermelho, 42 controles do estudo e 14 do *Genbank* em cinza) gerada no programa Clustal X utilizando-se o método de distância com o modelo TrN+I+G e algoritmo de *Neighbor-joining* para reconstrução de topologias. Valores de *bootstrap* obtidos com 1000 réplicas. Na figura estão representados os *bootstrap* dos ramos dos casais com valores acima de 70.

NS3/ NS5B Dist - NJ

Figura 18 - Árvore filogenética, não enraizada, de 70 seqüências da região NS3/NS5B com 960 nucleotídeos (14 seqüências dos casais deste estudo destacadas em vermelho, 42 controles do estudo e 14 do *Genbank* em cinza) gerada no programa Clustal X utilizando-se o método de distância com o modelo TrN+I+G e algoritmo de *Neighbor-joining* para reconstrução de topologias. Valores de *bootstrap* obtidos com 1000 réplicas. Na figura estão representados os *bootstrap* dos ramos dos casais com valores acima de 70.

Figura 19 - Árvore filogenética, não enraizada, de 74 seqüências da região NS5B com 344 nucleotídeos (18 seqüências dos casais deste estudo destacadas em vermelho, 42 controles do estudo e 14 do *Genbank* em cinza) gerada no programa Clustal X utilizando-se o método de máxima verossimilhança com o modelo TrNef+I+G e algoritmo de rearranjo dos braços (*Branch-swapping*) seccionando a árvore em dois pedaços e ligando em outras partes (*TBR*) para reconstrução de topologias. Valores de *bootstrap* obtidos com 1000 réplicas. Na figura estão representados os *bootstrap* dos ramos dos casais com valores acima de 70.

Figura 20 - Árvore filogenética, não enraizada, de 70 seqüências da região NS3 com 619 nucleotídeos (14 seqüências dos casais deste estudo destacadas em vermelho, 42 controles do estudo e 14 do *Genbank* em cinza) gerada no programa Clustal X utilizando-se o método de máxima verossimilhança com o modelo TrN+I+G e algoritmo de rearranjo dos braços (*Branch-swapping*) seccionando a árvore em dois pedaços e ligando em outras partes (*TBR*) para reconstrução de topologias. Valores de *bootstrap* obtidos com 1000 réplicas. Na figura estão representados os *bootstrap* dos ramos dos casais com valores acima de 70.

Figura 21 - Árvore filogenética, não enraizada, de 70 seqüências da região NS3/NS5B com 960 nucleotídeos (14 seqüências dos casais deste estudo destacadas em vermelho, 42 controles do estudo e 14 do *Genbank* em cinza) gerada no programa Clustal X utilizando-se o método de máxima verossimilhança com o modelo TrN+I+G e algoritmo de rearranjo dos braços (*Branch-swapping*) seccionando a árvore em dois pedaços e ligando em outras partes (*TBR*) para reconstrução de topologias. Valores de *bootstrap* obtidos com 1000 réplicas. Na figura estão representados os *bootstrap* dos ramos dos casais com valores acima de 70.

As tabelas 11 e 12 mostram um resumo de todas as análises juntamente com o percentual de similaridade das seqüências dos casais e valores de *bootstrap*.

Tabela 11 - Resumo das análises das árvores filogenéticas sem os controles

Análises sem controles											
Familiares	NS5b				NS3				NS3/NS5b		
	Similaridade	Bootstrap***	Distância	MV	Similaridade	Bootstrap***	Distância	MV	Bootstrap***	Distância	MV
CF01	97.4%	**	MO	MO	96.4%	**	?	?	**	MO	MO
CF02	97.4%	**	?	MO	99.2%	**	?	?	**	MO	MO
CF03	97.1%	**	?	?	94.7%	**	?	?	99	MO	MO
CF04	97.7%	98	MO	MO	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
CF05	96.8%	**	?	?	96.6%	**	?	?	**	?	MO
CF06	97.7%	72	?	MO	97.4%	100	MO	MO	100	MO	MO
CF07	97.7%	73	MO	MO	97.4%	**	MO	MO	81	MO	MO
CF08	99.1%	92	MO	MO	99.0%	94	MO	MO	100	MO	MO
CF09	78.2%	**	?	?	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

MO = Mesma origem (ramo monofilético) (vermelho com Bootstrap acima de 70)

? = Não apresentam ramo monofilético

** = Sem bootstrap significativo (<70)

MV = Máxima Verossimilhança

NR = Não Realizado

*** = Valores acima de 70

Tabela 12 - Resumo das análises das árvores filogenéticas com os controles

Análises com controles											
Familiares	NS5b				NS3				NS3/NS5b		
	Similaridade	Bootstrap***	Distância	MV	Similaridade	Bootstrap***	Distância	MV	Bootstrap***	Distância	MV
CF01	97.4%	**	MO	MO	96.4%	**	?	MO	**	?	MO
CF02	97.4%	**	?	MO	99.2%	**	?	MO	**	?	MO
CF03	97.1%	**	?	?	94.7%	88	MO	MO	94	MO	MO
CF04	97.7%	85	MO	MO	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
CF05	96.8%	**	?	?	96.6%	**	?	?	**	?	MO
CF06	97.7%	**	?	MO	97.4%	99	MO	MO	99	MO	MO
CF07	97.7%	**	MO	MO	97.4%	**	MO	MO	73	MO	MO
CF08	99.1%	92	MO	MO	99.0%	91	MO	MO	98	MO	MO
CF09	78.2%	**	?	?	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

MO = Mesma origem (ramo monofilético) (vermelho com Bootstrap acima de 70)

? = Não apresentam ramo monofilético

** = Sem bootstrap significativo (<70)

MV = Máxima Verossimilhança

NR = Não Realizado

*** = Valores acima de 70

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Os avanços das técnicas de biologia molecular, como sequenciamento genômico, juntamente com estudos filogenéticos, nos permitem realizar estudos mais detalhados de epidemiologia molecular, os quais nos ajudam a melhor compreender as malhas de transmissão de agentes infecciosos, como os vírus (McCormack e Clewley, 2002).

É sabido que a transmissão parenteral é a via de transmissão mais freqüente do VHC (transfusão de sangue, compartilhamento de agulhas e seringas contaminadas - principalmente entre usuários de drogas injetáveis, acidentes ocupacionais entre profissionais de saúde, tatuagens etc.); entretanto, cerca de 10% dos portadores não relatam nenhum fator de risco conhecido. Apesar de existirem controvérsias, este fato sugere que a presença do VHC em secreções corporais possa ser fonte de transmissão, desde contato próximo, em relações familiares, até mesmo por relações sexuais.

Wang e colaboradores (1991) e Sugimura e colaboradores (1995) identificaram o genoma do VHC em saliva de portadores crônicos de VHC, contudo, Hsu e colaboradores (1991) e Fried e colaboradores (1992) não conseguiram encontra-lo ao analisar a saliva de pacientes soropositivos. Young e colaboradores (1993), verificaram a presença de VHC em células mononucleares periféricas, em pacientes com e sem genoma de VHC detectável na saliva. Mastromatteo e colaboradores (2001) detectaram fita negativa de RNA viral em células mononucleares periféricas, mas não em

saliva destes pacientes, sugerindo a ausência de estágio replicativo do VHC em saliva. Contudo, a presença destas células na saliva poderá atuar como veículo de transmissão de partículas virais.

Vários estudos epidemiológicos levantam a hipótese da existência de transmissão sexual e intrafamiliar do VHC, ainda que em proporções bem menores do que o vírus da hepatite B (VHB) e o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (Eyster *et al.*, 1991; Llibre *et al.*, 1992; Mohamed *et al.*, 2005). Afirmar que a aquisição do VHC foi por relação sexual ou contato com parente próximo, apenas por avaliação epidemiológica, sem utilizarmos ferramentas de biologia molecular, é extremamente difícil, gerando dados controversos publicados. Contudo, informações moleculares podem inferir com maior precisão se a origem do VHC das pessoas infectadas é a mesma. Para que esta análise seja a mais próxima possível da realidade, é importante que as informações moleculares obtidas sejam de qualidade, assim como as ferramentas utilizadas para as análises sejam, cuidadosamente, selecionadas e baseadas em critérios específicos. Entre estas ferramentas destacam-se a seleção da região genômica mais apropriada e a escolha adequada do método de análise e do modelo evolutivo a ser aplicado.

Apesar de existirem vários trabalhos de transmissão intrafamiliar e sexual, do VHC, poucos são os que utilizaram técnicas de epidemiologia molecular (Kao *et al.*, 1992; Chayama *et al.*, 1995; Wejstal, 1999; Ackerman *et al.*, 2000; Tengan *et al.*, 2001; Cavalheiro NP, 2004; Minola *et al.*, 2006).

Durante a realização de dois estudos anteriores (“Análise da cinética do VHC durante o tratamento com IFN e Ribavirina” (Medeiros-Filho, 2002) e “Estudo epidemiológico coorte-transversal de portadores de infecção pelo vírus da hepatite C: análise de 700 casos” (Notaroberto, 2004), verificamos que, em diferentes casais, portadores de VHC de mesmo genótipo, apenas um membro do casal informava fonte de contaminação conhecida, o que nos levou a uma investigação detalhada, de análise molecular, após levantamento de dados de prontuário, seguindo critérios adotados, previamente, em alguns estudos de investigação forense de transmissão de HIV (Leitner e Albert, 2000) e em um estudo de transmissão de VHC e VHGE (Ross *et al.*, 1999).

Os casais selecionados para o estudo possuíam o mesmo genótipo, quando avaliado pelo sequenciamento da região 5’UTR; entretanto, ao realizarmos a subtipagem por, sequenciamento de região genômica diferente, NS5B, verificamos que um dos casais (casal 9) apresentava subtipo diferente (1a e 1b). Neste caso, conseguimos apenas informações de prontuário do esposo (genótipo 1a) e não pudemos avaliar se ambos possuíam fontes conhecidas de transmissão. Mesmo assim, resolvemos prosseguir com as análises deste casal.

A genotipagem e subtipagem pelo sequenciamento da região NS5B nos deram informações mais precisas do que a genotipagem realizada para os estudos anteriores, pelo sequenciamento da região 5’UTR. Simmonds *et al* mostraram que a caracterização de variantes de VHC, sequenciamento da região 5’UTR, pode apresentar uma divergência de subtipo em torno de

10%, pois existem muito poucos sítios informativos nesta região (Simmonds *et al.*, 1996; Simmonds, 2004). Portanto, se seqüências desta região sequer diferenciam, corretamente, os diferentes subtipos virais, a análise de malhas de transmissão é ainda muito mais passível de erros de interpretação, quando baseada apenas em 5'UTR. Desta forma, o sequenciamento de uma região mais informativa se torna necessário para a melhor caracterização da transmissão viral por análises filogenéticas.

Estes resultados confirmam que apenas a informação, quanto ao genótipo viral e a simples avaliação de dados epidemiológicos, é insuficiente para a afirmação da existência de transmissão sexual e intrafamiliar. Isto é, particularmente, válido para o VHC, pois existem subtipos Iprevalentes na população da maior parte do mundo (1a, 1b, 2b, 3a) (Caporaso *et al.*, 1998). Em particular, no Brasil, os genótipos 1 e 3 são os mais prevalentes, o que dificulta a realização de análises de transmissão intrafamiliar apenas pela análise desta região (Campiotto *et al.*, 2005).

Na tentativa de elucidar se a origem dos vírus dos casais infectados era a mesma, avaliamos as relações filogenéticas de diferentes regiões genômicas de ambas as amostras.

A reconstrução de uma árvore filogenética, apenas com seqüências das amostras do estudo, não é informativa, por isso, é importante incluirmos controles que não façam parte da população em estudo, mas que circulem em ambiente próximo. Devem ser incluídos controles com os mesmos genótipos e subtipos da população a ser investigada. Se possível, estes controles devem representar todos os grupos de risco e áreas geográficas.

Além disso, devem também ser incluídos controles representativos, obtidos em bancos de dados como o “*GenBank*” (Leitner e Albert, 2000; McCormack e Clewley, 2002). A escolha de controles de forma incorreta pode levar a diferentes conclusões.

Como controles locais, foram selecionados 42 pacientes, sem qualquer grau de parentesco ou relacionamento com os casais a serem investigados, atendidos no Ambulatório de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo, local onde os pacientes do estudo foram atendidos. Foram, também, incluídas nas análises 14 seqüências obtidas no *GenBank*, que representam todos os genótipos e subtipos. Os controles locais foram divididos em grupos de 14 pacientes, portadores de cada um dos genótipos 1a, 1b e 3a. Assim, como para as amostras do estudo, a genotipagem foi realizada, primeiramente, pela região 5’UTR e a subtipagem, posteriormente, pela região NS5B. Na análise do prontuário destes pacientes pudemos observar que existe representatividade de todos os meios de transmissão, observados na população de estudo. Contudo, não foi possível avaliar a origem geográfica dos casais e dos controles. De qualquer forma, existe uma probabilidade maior de existir mais similaridade entre as cepas do VHC, que circulam entre os controles locais, e as cepas dos casais estudados, do que entre os controles obtidos no *GenBank* e os casais, uma vez que estes são originários de outros países.

Nos últimos anos, alguns países estão utilizando técnicas de biologia molecular juntamente com análise filogenética, para estudos de

epidemiologia molecular, na tentativa de, solucionar casos forenses de transmissão do HIV, por diferentes vias, entre portadores (Leitner e Albert, 2000; Metzker *et al.*, 2002). Entretanto, este tipo de análise ainda não é uma prática comum entre os portadores de VHC. Na literatura, não existem muitos trabalhos de epidemiologia molecular de VHC sobre estudos de transmissão. Por isso, existem poucas informações sobre quais as melhores regiões genômicas e os melhores critérios a serem utilizados nestes casos. Não existe um consenso sobre qual região genômica do VHC deve ser utilizada nestes estudos. Várias regiões, como core, NS5B, envelope e NS3, têm sido utilizadas (Honda *et al.*, 1993; Chayama *et al.*, 1995; Ross *et al.*, 1999; Cavaleiro NP, 2004). É importante salientar que a escolha da região a ser analisada é de fundamental importância. As diferentes regiões do genoma do VHC possuem dinâmicas evolucionárias diferentes e com isso diferentes relações podem ser inferidas entre as seqüências. Existem regiões que codificam proteínas que estão muito expostas ao sistema imune do hospedeiro e sofrem mutações constantes, enquanto outras codificam proteínas funcionais e são menos variáveis. Enfim, a análise das diferentes regiões pode nos levar a conclusões diferentes. O ideal é estudar, pelo menos, duas regiões genômicas, que apresentem dinâmicas evolutivas diferentes, para podermos obter um resultado mais próximo do real (Ross *et al.*, 1999; Leitner e Albert, 2000; McCormack e Clewley, 2002).

Outro aspecto que devemos considerar, ao escolher as regiões a serem analisadas, é a informação genética (sinal filogenético) que podemos obter. Informação genética não está diretamente relacionada ao tamanho do

fragmento, pois nem sempre uma sequência longa possui um bom sinal filogenético (Strimmer e von Haeseler, 1997; Leitner e Albert, 2000; McCormack e Clewley, 2002).

Salemi e Vandamme (2002) analisaram o sinal filogenético dos diferentes genes do VHC e verificaram que a região com o melhor sinal é a NS5B, seguida da região NS3. As regiões core e envelope, sugeridas por diferentes autores, não apresentam o melhor sinal. Os autores sugerem que não havendo a possibilidade de realizar análises com o genoma completo, NS5B e NS3 podem ser utilizadas com segurança.

Baseados nas informações acima utilizamos sequências das regiões NS5B e NS3 para prosseguir com as análises. Uma vez que as informações encontradas se referiam aos genes completos, utilizamos o mapeamento da verossimilhança (*likelihood mapping*) realizado pelo programa Tree-Puzzle para verificar se os fragmentos de NS5B e NS3, que havíamos amplificado, também possuíam um bom sinal filogenético (Strimmer e von Haeseler, 1997). Os valores encontrados para os fragmentos utilizados são próximos dos valores encontrados por Salemi e Vandame (2002). Na análise dos fragmentos de diferentes tamanhos da região NS5B (199nt e 344nt) verificamos que o tamanho do fragmento nesta região interfere no sinal filogenético, sendo que o fragmento maior (344nt) apresentou em torno de 92,9% dos quartetos nas áreas do triângulo, que representam árvores completamente resolvidas, contra 90,5% para o fragmento menor. Para a região NS3 utilizamos apenas um fragmento (619nt). Esta região apresentou 94,8% dos quartetos nas áreas do triângulo, que representam árvores

completamente resolvidas. Ao compararmos os resultados obtidos por Salemi e Vandame (2002) verificamos uma diminuição do sinal filogenético para a região NS5B quando analisamos regiões menores, 90,5% e 92,9% para os fragmentos de 199nt e 344nt, respectivamente, contra 94,9% para o gene completo. Entretanto, encontramos uma situação contrária para a região NS3: 94,8% para o fragmento de 619nt contra 90,4% para o gene completo. As diferenças encontradas entre os dois estudos podem ser explicadas pela existência de diferentes taxas de substituição de nucleotídeos ao longo do genoma de VHC e até mesmo dentro do mesmo gene. Outro fato que não podemos desconsiderar é que a origem das populações examinadas é diferente e podem existir variações entre elas.

Alguns trabalhos de epidemiologia molecular de HIV mostraram resultados melhores nas análises realizadas com duas regiões genômicas juntas (Leitner e Albert, 2000). Na tentativa de obter um melhor sinal filogenético, realizamos análises com as duas regiões juntas. O fragmento de 960nt obtido pela junção das duas regiões apresentou 96,1% dos quartetos nas áreas do triângulo que representam árvores completamente resolvidas. Este resultado está próximo ao percentual obtido quando analisadas seqüências genômicas completas (96,7%) (Salemi e Vandamme, 2002).

Diferentes autores sugerem que o grau de similaridade pode mostrar se os vírus possuem a mesma origem, indicando, em alguns casos, transmissão intrafamiliar ou sexual (Kao *et al.*, 1992; Honda *et al.*, 1993; Chayama *et al.*, 1995; Ross *et al.*, 1999). Contudo, o grau de similaridade,

encontrado entre seqüências, varia de acordo com a região e o tamanho da seqüência a serem analisados. Neste trabalho, a similaridade encontrada, entre as seqüências dos casais do estudo, para a região NS5B, variou entre 78,2% e 99,1% (média de 95,45%). O casal que exibiu apenas 78,2% de similaridade foi o casal que apresentou subtipos diferentes. Se não considerarmos este casal, a similaridade desta região, entre os casais de mesmo genótipo e subtipo, ficou entre 96,8% e 99,1% (média de 97,65%). Para a região NS3, a similaridade encontrada variou entre 94,7% e 99,2% (média de 97,24%). O casal que apresentou subtipos diferentes não foi incluído nesta análise, por não termos tido sucesso ao sequenciar esta região. A similaridade entre as seqüências dos controles locais e as do *GenBank* variou entre 53,9% e 98% (média de 72,9%) para a região NS5B e entre 61% e 98,2% (média de 74,8%) para a região NS3. Estes resultados mostram que podemos encontrar valores de similaridade aproximados entre seqüências de origens completamente diferentes, indicando que inferir a mesma origem entre duas cepas virais, apenas pela análise de similaridade, pode nos levar a conclusões erradas.

Chayama e colaboradores (1995) verificaram similaridade entre 91,4% e 99,8% para um fragmento de 606nt do gene E1 quando analisaram seqüências de oito casais portadores de VHC. Os cinco casais que foram considerados portadores de vírus, com a mesma origem, apresentaram similaridade entre 97,3% e 99,8%. Para os outros três casais, o autor não conseguiu confirmar se a origem das duas cepas era a mesma na árvore filogenética, apesar da similaridade ficar entre 91,4 e 92,4%. Contudo, neste

trabalho, foram incluídos apenas três controles locais, representativos do período utilizado para a seleção dos casais, e destes, não foram realizadas análises de similaridade. Com isso, não é possível avaliar qual a similaridade encontrada entre cepas de portadores não familiares e sem contato com os mesmos. Cavalheiro (2004) encontrou similaridade de 93% a 99,4% entre seqüências da região NS5B ao analisar um fragmento de 180nt, proveniente de amostras obtidas de 22 casais, portadores de VHC do mesmo genótipo e subtipo. Os autores não incluíram controles locais, impossibilitando a comparação das amostras do estudo com controles de cepas que circulam na mesma região.

Após a avaliação do sinal filogenético, das regiões escolhidas, e das análises de similaridade, foram efetuadas as construções das árvores filogenéticas. Com o objetivo de avaliar se diferentes métodos poderiam gerar resultados diferentes, realizamos os métodos de distância e máxima verossimilhança, com as seqüências de cada região em separado e das duas regiões concatenadas, apenas com os controles obtidos do *GenBank* e depois acrescentando os controles locais.

As topologias obtidas com os diferentes métodos foram semelhantes em todos os casos em que encontramos valores de *bootstrap* acima de 70. Algumas seqüências que apresentaram ramos monofiléticos, nas análises sem controle, deixaram de apresentar após a análise com os controles locais, indicando que, nestes casos, os ramos monofiléticos formados nas árvores sem os controles, não se sustentaram ao incluirmos seqüências mais próximas. A maioria dos ramos monofiléticos formados nas análises

sem os controles foi confirmada ao incluirmos os controles locais. Os resultados destas análises sugerem que a origem dos vírus dos casais 3, 4, 6, 7 e 8 seja a mesma. Em todos os casos, a região que apresentou melhor informação genética mostrou que as duas seqüências possuem uma origem comum (grupo monofilético com ancestral comum), com valores de *bootstrap* significativo (acima de 70) (McCormack e Clewley, 2002). Para os outros casais, embora tenhamos observado, em algumas análises, a formação de grupos monofiléticos, estes não tiveram suporte do teste de *bootstrap*.

Apesar da avaliação dos prontuários dos pacientes dos casais 1, 2 e 5 indicar, fortemente, a possibilidade de transmissão intrafamiliar, os resultados obtidos com nossos estudos filogenéticos não suportam esta hipótese.

O casal 9 mostra uma grande probabilidade de fontes de infecção diferentes, uma vez que, em todas as análises, o perfil das seqüências foi de dois subtipos diferentes.

Com base nestes resultados acreditamos que a junção das regiões NS5B e NS3 seja a melhor opção para análises de estudo de transmissão. Em alguns casos esta análise não foi suficiente para elucidar se a origem das diferentes cepas virais é a mesma. Talvez, nestes casos, a análise de outras regiões pudesse ajudar a esclarecer esta questão.

Este estudo sugere que casais podem estar infectados com cepas virais que apresentam relações monofiléticas, indicando uma fonte comum de contaminação; contudo, não temos como avaliar se esta contaminação foi devido a relações sexuais ou outras formas de contato próximo.

A construção de árvores filogenéticas, a partir de seqüências genômicas e análises filogenéticas, nos dá a informação das relações genéticas virais, mas não nos mostra a direção da transmissão.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- A escolha da região genômica e do método de análise filogenética a ser utilizado são importantes para a precisão dos resultados;
- Os dados de prontuário juntamente com as análises moleculares indicam que a origem dos vírus dos casais 8, 7, 6, 3 e 4 seja a mesma, dando suporte à hipótese de transmissão intrafamiliar;
- A inclusão dos controles nas análises mostrou-se relevante para a confirmação dos resultados;
- Dados como similaridade de seqüências não são suficientes para inferir mesma fonte de transmissão.

REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackerman Z, Ackerman E, Paltiel O. Intrafamilial transmission of hepatitis C virus: a systematic review. *J Viral Hepat.*2000;7(2): 93-103.

Akahane Y, Kojima M, Sugai Y, Sakamoto M, Miyazaki Y, Tanaka T, Tsuda F, Mishihiro S, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis C virus infection in spouses of patients with type C chronic liver disease. *Ann Intern Med.*1994;120(9): 748-52.

Alter HJ, Seeff LB. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin Liver Dis.*2000;20(1): 17-35.

Alter HJ, Tegtmeier GE, Jett BW, Quan S, Shih JW, Bayer WL, Polito A. The use of a recombinant immunoblot assay in the interpretation of anti-hepatitis C virus reactivity among prospectively followed patients, implicated donors, and random donors. *Transfusion.*1991;31(8): 771-6.

Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C in the West. *Semin Liver Dis.*1995;15(1): 5-14.

Alter MJ. Prevention of spread of hepatitis C. *Hepatology.*2002;36(5 suppl 1): S93-S8.

Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, McQuillan GM, Gao F, Moyer LA, Kaslow RA, Margolis HS. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med.*1999;341(8): 556-62.

Baozhang T, Kaining Z, Jinxing K, Ruchang X, Ming L, Caixia Z, Li T. Infection with human immunodeficiency virus and hepatitis viruses in Chinese drug addicts. *Epidemiol Infect.*1997;119(3): 343-7.

Barba G, Harper F, Harada T, Kohara M, Goulinet S, Matsuura Y, Eder G, Schaff Z, Chapman MJ, Miyamura T, Brechot C. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A.*1997;94(4): 1200-5.

Bartenschlager R. Hepatitis C virus replicons: potential role for drug development. *Nat Rev Drug Discov.*2002;1(11): 911-6.

Bartenschlager R, Ahlborn-Laake L, Mous J, Jacobsen H. Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. *J Virol.*1993;67(7): 3835-44.

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

Bartenschlager R, Lohmann V, Wilkinson T, Koch JO. Complex formation between the NS3 serine-type proteinase of the hepatitis C virus and NS4A and its importance for polyprotein maturation. *J Virol.*1995;69(12): 7519-28.

Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med.*2003;197(5): 633-42.

Berg T, Mas Marques A, Hohne M, Wiedenmann B, Hopf U, Schreier E. Mutations in the E2-PePHD and NS5A region of hepatitis C virus type 1 and the dynamics of hepatitis C viremia decline during interferon alfa treatment. *Hepatology.*2000;32(6): 1386-95.

Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science.*2000;290(5498): 1972-4.

Borowski P, Heiland M, Oehlmann K, Becker B, Kornetzky L, Feucht H, Laufs R. Non-structural protein 3 of hepatitis C virus inhibits phosphorylation mediated by cAMP-dependent protein kinase. *Eur J Biochem.*1996;237(3): 611-8.

Buratti E, Gerotto M, Pontisso P, Alberti A, Tisminetzky SG, Baralle FE. In vivo translational efficiency of different hepatitis C virus 5'-UTRs. *FEBS Lett.*1997;411(2-3): 275-80.

Campiotto S, Pinho JR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJ, Spinelli V, Pereira LM, Coelho HS, Silva AO, Fonseca JC, Rosa H, Lacet CM, Bernardini AP. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res.*2005;38(1): 41-9.

Caporaso N, Ascione A, Stroffolini T. Spread of hepatitis C virus infection within families. Investigators of an Italian Multicenter Group. *J Viral Hepat.*1998;5(1): 67-72.

Carneiro MA, Martins RM, Teles SA, Silva SA, Lopes CL, Cardoso DD, Vanderborght BO, Yoshida CF. Hepatitis C prevalence and risk factors in hemodialysis patients in Central Brazil: a survey by polymerase chain reaction and serological methods. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*2001;96(6): 765-9.

Carneiro MA, Teles SA, Dias MA, Ferreira RC, Naghettine AV, Silva SA, Lampe E, Yoshida CF, Martins RM. Decline of hepatitis C infection in hemodialysis patients in Central Brazil: a ten years of surveillance. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*2005;100(4): 345-9.

Cavalheiro NP. Hepatitis C: Transmission Between Couples. *Rev. Inst. Med. trp. S. Paulo*.2004;46(2): 86.

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol*.1990;44: 649-88.

Chang KM, Reherrmann B, McHutchison JG, Pasquinelli C, Southwood S, Sette A, Chisari FV. Immunological significance of cytotoxic T lymphocyte epitope variants in patients chronically infected by the hepatitis C virus. *J Clin Invest*.1997;100(9): 2376-85.

Chayama K, Kobayashi M, Tsubota A, Koida I, Arase Y, Saitoh S, Ikeda K, Kumada H. Molecular analysis of intraspousal transmission of hepatitis C virus. *J Hepatol*.1995;22(4): 431-9.

Chayama K, Suzuki F, Tsubota A, Kobayashi M, Arase Y, Saitoh S, Suzuki Y, Murashima N, Ikeda K, Takahashi N, Kinoshita M, Kumada H. Association of amino acid sequence in the PKR-eIF2 phosphorylation homology domain and response to interferon therapy. *Hepatology*.2000;32(5): 1138-44.

Chiaramonte M, Stroffolini T, Lorenzoni U, Minniti F, Conti S, Floreani A, Ntakirutimana E, Vian A, Ngatchu T, Naccarato R. Risk factors in community-acquired chronic hepatitis C virus infection: a case-control study in Italy. *J Hepatol*.1996;24(2): 129-34.

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*.1989;244(4902): 359-62.

Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby R, Barr PJ, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*.1991;88(6): 2451-5.

Chung KM, Song OK, Jang SK. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A contains potential transcriptional activator domains. *Mol Cells*.1997;7(5): 661-7.

Codes L, de Freitas LA, Santos-Jesus R, Vivitski L, Silva LK, Trepo C, Reis MG, Parana R. Comparative study of hepatitis C virus genotypes 1 and 3 in Salvador, Bahia Brazil. *Braz J Infect Dis*.2003;7(6): 409-17.

Deleersnyder V, Pillez A, Wychowski C, Blight K, Xu J, Hahn YS, Rice CM, Dubuisson J. Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J Virol*.1997;71(1): 697-704.

Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Ogura Y, Izumi N, Marumo F, Sato C. Mutations in the nonstructural protein

5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med.*1996;334(2): 77-81.

Enomoto N, Takada A, Nakao T, Date T. There are two major types of hepatitis C virus in Japan. *Biochem Biophys Res Commun.*1990;170(3): 1021-5.

Erdos EG, Skidgel RA. Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones. *Faseb J.*1989;3(2): 145-51.

Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.*1998;8(3): 186-94.

Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.*1998;8(3): 175-85.

Eyster ME, Alter HJ, Aledort LM, Quan S, Hatzakis A, Goedert JJ. Heterosexual co-transmission of hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV). *Ann Intern Med.*1991;115(10): 764-8.

Farci P, Purcell RH. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Semin Liver Dis.*2000;20(1): 103-26.

Farci P, Shimoda A, Coiana A, Diaz G, Peddis G, Melpolder JC, Strazzer A, Chien DY, Munoz SJ, Balestrieri A, Purcell RH, Alter HJ. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science.*2000;288(5464): 339-44.

Felsenstein J. Confidence Limits on Phylogenies: an Approach Using the Bootstrap. *Evolution.*1985;39: 783-91.

Filippini P, Coppola N, Scolastico C, Rossi G, Onofrio M, Sagnelli E, Piccinino F. Does HIV infection favor the sexual transmission of hepatitis C? *Sex Transm Dis.*2001;28(12): 725-9.

Frick DN, Rypma RS, Lam AM, Gu B. The nonstructural protein 3 protease/helicase requires an intact protease domain to unwind duplex RNA efficiently. *J Biol Chem.*2004;279(2): 1269-80.

Fried MW, Shindo M, Fong TL, Fox PC, Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. Absence of hepatitis C viral RNA from saliva and semen of patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology.*1992;102(4 Pt 1): 1306-8.

Gale M, Jr., Blakely CM, Kwieciszewski B, Tan SL, Dossett M, Tang NM, Korth MJ, Polyak SJ, Gretch DR, Katze MG. Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol.*1998;18(9): 5208-18.

Gerotto M, Dal Pero F, Pontisso P, Noventa F, Gatta A, Alberti A. Two PKR inhibitor HCV proteins correlate with early but not sustained response to interferon. *Gastroenterology*.2000;119(6): 1649-55.

Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *J Viral Hepat*.1999;6(1): 35-47.

Gordon D, Abajian C, Green P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res*.1998;8(3): 195-202.

Herrine K, Weinberg DS. Epidemiology of Hepatitis C Viral Infection. *Infect Med*.1999;16(2): 111-17.

Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Shimotohno K. Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*.1991;88(13): 5547-51.

Hijikata M, Mizushima H, Akagi T, Mori S, Kakiuchi N, Kato N, Tanaka T, Kimura K, Shimotohno K. Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol*.1993;67(8): 4665-75.

Hillis DM, Bull JJ, White ME, Badgett MR, Molineux IJ. Experimental phylogenetics: generation of a known phylogeny. *Science*.1992;255(5044): 589-92.

Hillis DM, Huelsenbeck JP, Cunningham CW. Application and accuracy of molecular phylogenies. *Science*.1994;264(5159): 671-7.

Honda M, Kaneko S, Unoura M, Kobayashi K, Murakami S. Risk of hepatitis C virus infections through household contact with chronic carriers: analysis of nucleotide sequences. *Hepatology*.1993;17(6): 971-6.

Hsu HH, Wright TL, Luba D, Martin M, Feinstone SM, Garcia G, Greenberg HB. Failure to detect hepatitis C virus genome in human secretions with the polymerase chain reaction. *Hepatology*.1991;14(5): 763-7.

Imbert I, Dimitrova M, Wolf M, Schuster C. Réplication du virus de l'hépatite C: systèmes d'étude, avantages et limites. *Virologie*.2004;8(4): 281-95.

James A, 2001. Ilustração do vírus da Hepatite C. Disponível em: www.rit.edu/~japfaa/hcv.jpg. acesso: outubro, 2005

Jerome KR, Gretch DR. Laboratory approaches to the diagnosis of hepatitis C virus infection. *Minerva Gastroenterol Dietol*.2004;50(1): 9-20.

Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, Konishi M, Yokoi M, Ishida S, Suzuki S, Kohara M. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol.*1994;75 (Pt 7): 1755-60.

Kamoshita N, Tsukiyama-Kohara K, Kohara M, Nomoto A. Genetic analysis of internal ribosomal entry site on hepatitis C virus RNA: implication for involvement of the highly ordered structure and cell type-specific transacting factors. *Virology.*1997;233(1): 9-18.

Kaneko T, Tanji Y, Satoh S, Hijikata M, Asabe S, Kimura K, Shimotohno K. Production of two phosphoproteins from the NS5A region of the hepatitis C viral genome. *Biochem Biophys Res Commun.*1994;205(1): 320-6.

Kao JH, Chen PJ, Yang PM, Lai MY, Sheu JC, Wang TH, Chen DS. Intrafamilial transmission of hepatitis C virus: the important role of infections between spouses. *J Infect Dis.*1992;166(4): 900-3.

Kato N, Ootsuyama Y, Ohkoshi S, Nakazawa T, Sekiya H, Hijikata M, Shimotohno K. Characterization of hypervariable regions in the putative envelope protein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun.*1992;189(1): 119-27.

Katze MG, He Y, Gale M, Jr. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol.*2002;2(9): 675-87.

Keiserman DR, Both CT, Mattos AA, Remiao J, Alexandre CO, Sherman KE. Intrafamilial transmission of hepatitis C virus in patients with hepatitis C and human immunodeficiency virus coinfection. *Am J Gastroenterol.*2003;98(4): 878-83.

Kew M, Francois G, Lavanchy D, Margolis H, Van Damme P, Grob P, Hallauer J, Shouval D, Leroux-Roels G, Meheus A. Prevention of hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat.*2004;11(3): 198-205.

Koch JO, Bartenschlager R. Modulation of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by nonstructural proteins NS3, NS4A, and NS4B. *J Virol.*1999;73(9): 7138-46.

Lau JY, Davis GL, Prescott LE, Maertens G, Lindsay KL, Qian K, Mizokami M, Simmonds P. Distribution of hepatitis C virus genotypes determined by line probe assay in patients with chronic hepatitis C seen at tertiary referral centers in the United States. Hepatitis Interventional Therapy Group. *Ann Intern Med.*1996;124(10): 868-76.

Leitner T, Albert J. Reconstruction of HIV-1 transmission chains for forensic purposes. *AIDS Rev.*2000;2: 241-51.

Leitner T, Escanilla D, Franzen C, Uhlen M, Albert J. Accurate reconstruction of a known HIV-1 transmission history by phylogenetic tree analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*.1996;93(20): 10864-9.

Leitner T, Kumar S, Albert J. Tempo and mode of nucleotide substitutions in gag and env gene fragments in human immunodeficiency virus type 1 populations with a known transmission history. *J Virol*.1997;71(6): 4761-70.

Lin C, Lindenbach BD, Pragai BM, McCourt DW, Rice CM. Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J Virol*.1994;68(8): 5063-73.

Llibre JM, Tor J, Manterola JM, Carbonell C, Roset J. Risk stratification for dissemination of tuberculosis in HIV-infected patients. *Q J Med*.1992;82(298): 149-57.

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

Martins RM, Teles SA, Freitas NR, Motta-Castro AR, Souto FJ, Mussi A, Amorim RM, Martins CR. Distribution of hepatitis C virus genotypes among blood donors from mid-west region of Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*.2006;48(1): 53-5.

Mastromatteo AM, Rapaccini GL, Pompili M, Ursino S, Romano-Spica V, Gasbarrini G, Vanini G. Hepatitis C virus infection: other biological fluids than blood may be responsible for intrafamilial spread. *Hepatogastroenterology*.2001;48(37): 193-6.

Matsumoto M, Hsieh TY, Zhu N, VanArsdale T, Hwang SB, Jeng KS, Gorbalenya AE, Lo SY, Ou JH, Ware CF, Lai MM. Hepatitis C virus core protein interacts with the cytoplasmic tail of lymphotoxin-beta receptor. *J Virol*.1997;71(2): 1301-9.

McCormack GP, Clewley JP. The application of molecular phylogenetics to the analysis of viral genome diversity and evolution. *Rev Med Virol*.2002;12(4): 221-38.

McCruden EA, Hillan KJ, McKay IC, Cassidy MT, Clark JC. Hepatitis virus infection and liver disease in injecting drug users who died suddenly. *J Clin Pathol*.1996;49(7): 552-5.

Medeiros MT, Lima JM, Lima JW, Campos Hde H, Medeiros MM, Coelho Filho JM. [Prevalence and associated factors to hepatitis C in hemodialysis patients in Brazil]. *Rev Saude Publica*.2004;38(2): 187-93.

Medeiros-Filho JEM. *Análise da cinética do Vírus da hepatite C durante tratamento com interferon e ribavirina*. (Tese doutorado). Departamento Gastroenterologia Clínica, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São paulo, 2002. 162 p.

Mellor J, Holmes EC, Jarvis LM, Yap PL, Simmonds P. Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implications for virus classification. The International HCV Collaborative Study Group. *J Gen Virol*.1995;76 (Pt 10): 2493-507.

Metzker ML, Mindell DP, Liu XM, Ptak RG, Gibbs RA, Hillis DM. Molecular evidence of HIV-1 transmission in a criminal case. *Proc Natl Acad Sci U S A*.2002;99(22): 14292-7.

Minola E, Baldo V, Baldovin T, Trivello R, Floreani A. Intrafamilial transmission of hepatitis C virus infection. *Eur J Epidemiol*.2006;21(4): 293-7.

Miyaki CY, Russo CAM, Pereira SL. *Reconstrução filogenética. Introdução e o método da máxima parcimônia*. In: Mاتيoli S R, (Ed.). *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto, SP: Editoa holos, 2001, p.97-107.

Mizokami M, Gojobori T, Ohba K, Ikeo K, Ge XM, Ohno T, Orito E, Lau JY. Hepatitis C virus types 7, 8 and 9 should be classified as type 6 subtypes. *J Hepatol*.1996;24(5): 622-4.

Mizushima H, Hijikata M, Asabe S, Hirota M, Kimura K, Shimotohno K. Two hepatitis C virus glycoprotein E2 products with different C termini. *J Virol*.1994;68(10): 6215-22.

Mohamed MK, Abdel-Hamid M, Mikhail NN, Abdel-Aziz F, Medhat A, Magder LS, Fix AD, Strickland GT. Intrafamilial transmission of hepatitis C in Egypt. *Hepatology*.2005;42(3): 683-7.

Nakashima K, Kashiwagi S, Hayashi J, Noguchi A, Hirata M, Kajiyama W, Urabe K, Minami K, Maeda Y. Sexual transmission of hepatitis C virus among female prostitutes and patients with sexually transmitted diseases in Fukuoka, Kyushu, Japan. *Am J Epidemiol*.1992;136(9): 1132-7.

Ndimbie OK, Kingsley LA, Nedjar S, Rinaldo CR. Hepatitis C virus infection in a male homosexual cohort: risk factor analysis. *Genitourin Med*.1996;72(3): 213-6.

Neddermann P, Clementi A, De Francesco R. Hyperphosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein requires an active NS3 protease, NS4A, NS4B, and NS5A encoded on the same polyprotein. *J Virol*.1999;73(12): 9984-91.

Notaroberto S. *Estudo Epidemiológico coorte-transversal de portadores de infecção pelo vírus da hepatite C: análise de 700 casos*. (Dissertação de mestrado). Departamento de Gastroenterologia Clínica, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São paulo, 2004. 99 p.

Ogata S, Florese RH, Nagano-Fujii M, Hidajat R, Deng L, Ku Y, Yoon S, Saito T, Kawata S, Hotta H. Identification of hepatitis C virus (HCV) subtype 1b strains that are highly, or only weakly, associated with hepatocellular carcinoma on the basis of the secondary structure of an amino-terminal portion of the HCV NS3 protein. *J Clin Microbiol*.2003;41(7): 2835-41.

Oliveira Mde L, Hacker MA, Oliveira SA, Telles PR, O KM, Yoshida CF, Bastos FI. "The first shot": the context of first injection of illicit drugs, ongoing injecting practices, and hepatitis C infection in Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saude Publica*.2006;22(4): 861-70.

Pang PS, Jankowsky E, Planet PJ, Pyle AM. The hepatitis C viral NS3 protein is a processive DNA helicase with cofactor enhanced RNA unwinding. *Embo J*.2002;21(5): 1168-76.

Pawlotsky JM. Hepatitis C virus resistance to antiviral therapy. *Hepatology*.2000;32(5): 889-96.

Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*.1998;282(5390): 938-41.

Posada D, Crandall KA. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*.1998;14(9): 817-8.

Reed KE, Gorbalenya AE, Rice CM. The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family flaviviridae are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. *J Virol*.1998;72(7): 6199-206.

Reed KE, Rice CM. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr Top Microbiol Immunol*.2000;242: 55-84.

Rosenberg S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. *J Mol Biol*.2001;313(3): 451-64.

Ross RS, Viazov S, Varenholz C, Roggendorf M. Inquiries on intraspousal transmission of hepatitis C virus: benefits and limitations of genome sequencing and phylogenetic analysis. *Forensic Sci Int*.1999;100(1-2): 69-76.

Russo CAM, Miyaki CY, Pereira SL. *Reconstrução filogenética. Métodos geométricos*. In: Mاتيoli S R, (Ed.). *Biologia molecular e Evolução*. Ribeirão Preto, SP: Editora Holos, 2001, p.108-16.

Saitou N, Imanishi T. Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, maximum-parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution, and neighbor-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. *Mol Biol Evol.*1989;6: 514-25.

Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.*1987;4(4): 406-25.

Sakai A, Claire MS, Faulk K, Govindarajan S, Emerson SU, Purcell RH, Bukh J. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.*2003;100(20): 11646-51.

Sakamuro D, Furukawa T, Takegami T. Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. *J Virol.*1995;69(6): 3893-6.

Salemi M, Vandamme AM. Hepatitis C virus evolutionary patterns studied through analysis of full-genome sequences. *J Mol Evol.*2002;54(1): 62-70.

Sandres-Saune 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(2): 187-93.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*1977;74(12): 5463-7.

Sarrazin C, Kornetzky I, Ruster B, Lee JH, Kronenberger B, Bruch K, Roth WK, Zeuzem S. Mutations within the E2 and NS5A protein in patients infected with hepatitis C virus type 3a and correlation with treatment response. *Hepatology.*2000;31(6): 1360-70.

Shukla DD, Hoyne PA, Ward CW. Evaluation of complete genome sequences and sequences of individual gene products for the classification of hepatitis C viruses. *Arch Virol.*1995;140(10): 1747-61.

Silva LK, Silva MB, Lopes GB, Rodart IF, Costa FQ, Santana NP, Parana R, Santana A, Reis MG. Prevalence of hepatitis C virus infection and HCV genotypes among hemophiliacs in the State of Bahia, Northeastern Brazil: analysis of serological and virological parameters. *Rev Soc Bras Med Trop.*2005;38(6): 496-502.

Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *J Gen Virol.*2004;85(Pt 11): 3173-88.

Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C, Brouwer JT, Chan SW, Chayama K, Chen DS, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology.*1994;19(5): 1321-4.

Simmonds P, Mellor J, Sakuldamrongpanich T, Nuchaprayoon C, Tanprasert S, Holmes EC, Smith DB. Evolutionary analysis of variants of hepatitis C virus found in South-East Asia: comparison with classifications based upon sequence similarity. *J Gen Virol.*1996;77 (Pt 12): 3013-24.

Smith DB, Mellor J, Jarvis LM, Davidson F, Kolberg J, Urdea M, Yap PL, Simmonds P. Variation of the hepatitis C virus 5' non-coding region: implications for secondary structure, virus detection and typing. The International HCV Collaborative Study Group. *J Gen Virol.*1995;76 (Pt 7): 1749-61.

Sourdis J, Nei M. Relative efficiencies of the maximum parsimony and distance-matrix methods in obtaining the correct phylogenetic tree. *Mol Biol Evol.*1988;5(3): 298-311.

Strimmer K, von Haeseler A. Likelihood-mapping: a simple method to visualize phylogenetic content of a sequence alignment. *Proc Natl Acad Sci U S A.*1997;94(13): 6815-9.

Sugimura H, Yamamoto H, Watabiki H, Ogawa H, Harada H, Saitoh I, Miyamura T, Inoue M, Tajima K, Kino I. Correlation of detectability of hepatitis C virus genome in saliva of elderly Japanese symptomatic HCV carriers with their hepatic function. *Infection.*1995;23(5): 258-62.

Suzich JA, Tamura JK, Palmer-Hill F, Warrenner P, Grakoui A, Rice CM, Feinstone SM, Collett MS. Hepatitis C virus NS3 protein polynucleotide-stimulated nucleoside triphosphatase and comparison with the related pestivirus and flavivirus enzymes. *J Virol.*1993;67(10): 6152-8.

Swofford DL. PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), Version 4. *Sinauer Associates.* 2002. Sunderland, Massachusetts.

Takada N, Takase S, Takada A, Date T. HCV genotypes in different countries. *Lancet.*1992;339(8796): 808.

Tanimoto A, Ide Y, Arima N, Sasaguri Y, Padmanabhan R. The amino terminal deletion mutants of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A function as transcriptional activators in yeast. *Biochem Biophys Res Commun.*1997;236(2): 360-4.

Tanji Y, Hijikata M, Satoh S, Kaneko T, Shimotohno K. Hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS4A has versatile functions in viral protein processing. *J Virol.*1995;69(3): 1575-81.

Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science.*1999;285(5424): 107-10.

Tengan FM, Eluf-Neto J, Cavaleiro NP, Barone AA. Sexual transmission of hepatitis C virus. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*.2001;43(3): 133-7.

Terrault NA. Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. *Hepatology*.2002;36(5 Suppl 1): S99-105.

Thomas DL, Zenilman JM, Alter HJ, Shih JW, Galai N, Carella AV, Quinn TC. Sexual transmission of hepatitis C virus among patients attending sexually transmitted diseases clinics in Baltimore--an analysis of 309 sex partnerships. *J Infect Dis*.1995;171(4): 768-75.

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.

Umlauf F, Wong DT, Oefner PJ, Underhill PA, Cheung RC, Wright TL, Kolykhalov AA, Gruenewald K, Greenberg HB. Hepatitis C virus detection by single-round PCR specific for the terminal 3' noncoding region. *J Clin Microbiol*.1996;34(10): 2552-8.

Vilcek J, Sen GC. *Interferons and other cytokines*. In: Fields B N,Knipe D M,Howley P M, (Ed.). *Fields Virology*. Philadelphia, USA: Lippincott Raven Publishers, 1996.

Wang JT, Wang TH, Lin JT, Sheu JC, Lin SM, Chen DS, *et. a*. Hepatitis C virus RNA in saliva of patients with pos-transfusion hepatitis C infection. *Lancet*.1991: 337:48.

Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson C, Hall JE, Mason TJ, Saracco G, Bonino F, Crawford K, Marion CD, Crawford KA, *et al*. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*.1992;89(8): 3468-72.

Wejstal R. Sexual transmission of hepatitis C virus. *J Hepatol*.1999;31 Suppl 1: 92-5.

Xu Z, Choi J, Yen TS, Lu W, Strohecker A, Govindarajan S, Chien D, Selby MJ, Ou J. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *Embo J*.2001;20(14): 3840-8.

Young KC, Chang TT, Liou TC, Wu HL. Detection of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells and in saliva. *J Med Virol*.1993;41(1): 55-60.

Zein NN. Vertical Transmission of hepatitis C: to screen or not to screen? *J Pediatr*.1997;130: 859-61.

Zeuzem S, Schmidt JM, Lee JH, Ruster B, Roth WK. Effect of interferon alfa on the dynamics of hepatitis C virus turnover in vivo. *Hepatology*.1996;23(2): 366-71.

Zharkikh A, Li WH. Estimation of confidence in phylogeny: the complete-and-partial bootstrap technique. *Mol Phylogenet Evol*.1995;4(1): 44-63.

Zhou S, Terrault NA, Ferrell L, Hahn JA, Lau JY, Simmonds P, Roberts JP, Lake JR, Ascher NL, Wright TL. Severity of liver disease in liver transplantation recipients with hepatitis C virus infection: relationship to genotype and level of viremia. *Hepatology*.1996;24(5): 1041-6.

APÊNDICES

Critérios de exclusão e inclusão de pacientes nos estudos anteriores

Critérios de exclusão

- Cirrose hepática descompensada ou com história de descompensação anterior;
- Diagnóstico atual ou passado de hepatocarcinoma;
- Doenças graves concomitantes (tireoidopatias, neoplasias, insuficiência renal, cardíaca, coronariana e cerebrovascular);
- Diabetes mellitus descompensado;
- Hemoglobinopatias ou anemias hemolíticas, leucopenia e plaquetopenia;
- Outras hepatopatias (hepatite autoimune, esquistossomose hepato-intestinal ou hepato-esplênica, hepatite por drogas, hemocromatose, cirrose biliar primária, colangite esclerosante primária, doença de Wilson, entre outras).

Critérios de inclusão

- Infecção crônica pelo VHC definida como positividade na pesquisa de anticorpos contra VHC por ELISA e VHC-RNA detectável por PCR, durante pelo menos 6 meses;
- Sorologia anti-HIV negativa por ELISA.

Preparação do Tampão Tris, Ácido bórico e EDTA (TBE) 10 X

Tris (Invitrogen™ Life Technologies).....	108g
Ácido Bórico (Invitrogen™ Life Technologies).....	55g
EDTA (Invitrogen™ Life Technologies).....	8,3g
H ₂ O Milli-Q q.s.p.....	1000 ml

A solução foi preparada dissolvendo-se o Tris, ácido bórico e EDTA em aproximadamente 700 ml de H₂O Milli-Q utilizando-se o agitador magnético. Após total solubilização dos reagentes acrescentou-se H₂O Milli-Q quantidade suficiente para 1000ml com posterior filtração da solução.

Para preparo da solução de TBE 1 X foram adicionados 900 ml de H₂O Milli-Q a 100 ml da solução 10 X. As soluções foram armazenadas a temperatura ambiente.

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 24.11.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1060/05**, intitulado: "Evidências moleculares da transmissão intrafamiliar do vírus da Hepatite C (VHC)" apresentado pela **ÁREA FISIOPATOLOGIA EXPERIMENTAL**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Prof. Dr. Flair José Carrilho**

Pesquisador (a) Executante: **Sra. Isabel Maria Vicente Guedes de Carvalho Mello**

CAPPesq, 24 de Novembro de 2005.

Encaminhe-se à CPG-FMUSP
para as devidas providências.
S.P., 08/12/05

Prof.ª Dra. Elia Garcia Caldini
Vice Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Fisiopatologia Experimental

Prof. Dr. Euclides Ayres de Castilho
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL, 3671
SÃO PAULO - BRASIL

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão nº 60ª de 10/03/1999, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 095/99, intitulado: "Estudo Randomizado controlado por placebo na terapia da hepatite crônica pelo VHC: efeitos da terapia de indução com Interferon X-2 com ou sem RIBAVIRINA", apresentado pelo(a) pesquisador(a) *José Eymard Moraes de Medeiros Filho*, do Departamento Gastroenterologia, bem como o Termo de Consentimento Pós-Informação.

CAPPesq, 11 de março de 1999.

PROF. DR. JORGE KALIL FILHO
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 25.03.04, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 167/04, intitulado: "Aspectos epidemiológicos da infecção Crônica pelo Vírus da Hepatite C (VHC) em pacientes atendidos no ambulatório de fígado da disciplina de gastroenterologia clínica do HCFMUSP - Análise de 1000 casos" apresentado pelo Departamento de **GASTROENTEROLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Pesquisador(a) Responsável: Prof. Dr. Flair José Carrilho

Pesquisador(a) Executante: Dra. Suzete Notaroberto

CAPPesq, 25 de Março de 2004.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")