Fernanda de Mello Malta

**Seqüenciamento da Região NS5A do
Genoma do Vírus da Hepatite C, Genótipo 3,
de Pacientes Brasileiros com Infecção Crônica**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental
Orientador: Dr. João Renato Rebello Pinho

São Paulo

2006

Dedico este trabalho...

Aos meus pais, Zeca e Cris, que sempre investiram na minha formação. Obrigada pelo apoio, incentivo e por todo amor.

À minha sobrinha querida, Maria Luiza,
amiga e companheira. Obrigada pelos
grandes momentos de alegria!

À minha irmã e ao meu
cunhado, Gabriela e Marcelo,
pelo apoio e pelos momentos
de descontração.

À amiga, Isabel M.V.G.C.Mello, pelo
que me ajudou a conquistar, por
tudo que me ensinou e pela
dedicação.

Muito Obrigada!

Ao meu orientador, João Renato, pelo
incentivo, pelas oportunidades e pela
confiança.

Muito Obrigada!

Agradecimentos

- À Michele M. S. Gomes, amiga e companheira nas horas boas e difíceis do laboratório e da vida. Obrigada por tudo!
- À Mônica Yamaguchi e Gabriela P. Lopes pelo apoio e incentivo.
- Ao Prof. Dr. Flair José Carrilho pela confiança em meu trabalho e por valorizar a integração da área de pesquisa básica com a clínica.
- Ao Dr. José Eymard de Medeiros Filho pelo auxílio e pelas idéias fornecidas no início deste trabalho.
- À “*Alves de Queiroz Family Fund For Research*” pelo auxílio fornecido.
- Ao Instituto Adolfo Lutz pela utilização de sua estrutura física para a realização deste trabalho.
- À Fapesp, que por intermédio do projeto *Rede de Diversidade Genética Viral – VGDN*, possibilitou a realização deste trabalho.
- À *Sociedade Israelita Brasileira Hospital Albert Einstein (SBIBHAE)*, pela concessão da bolsa de estudo.
- À secretaria da pós-graduação da Área de Fisiopatologia Experimental pelo suporte oferecido.
- À secretaria da Gastroenterologia Clínica por todo apoio.
- A todos que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

Esta Dissertação 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

Lista de gráficos

Resumo

Summary

1. Introdução	01
1.1. Estrutura e Função do Genoma Viral	05
1.2. Diversidade Genética e Grupos Virais	12
1.3. Diagnóstico	14
1.4. Tratamento	15
2. Objetivos	24
3. Métodos	26
3.1. Casuística	26
3.2. Extração de Ácidos Nucléicos	30
3.3. Síntese do DNA complementar (cDNA)	31
3.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	31
3.5. Identificação e Quantificação dos Produtos de PCR	37
3.6. Seqüenciamento dos Produtos de PCR	38
3.7. Análise das Seqüências	41
3.8. Análise Estatística	43

4. Resultados	45
4.1. PCR	45
4.2. Análise da Seqüência de Aminoácidos	45
4.2.1 E2	45
4.2.2 NS5A	49
4.3. Análise Estatística	57
5. Discussão	65
6. Conclusões	76
7. Referências Bibliográficas	78

Apêndice

Lista de Abreviaturas, símbolos e siglas

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
bp	Pares de base
°C	Graus Celsius
CD81	Molécula diferenciadora de grupo
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CRS	Sinal de Retenção Citoplasmático
ddNTPS	Dideoxynucleotídeos trifosfatos
DNA	Ácido deoxirribonucleico
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
HBV	Vírus da Hepatite B
HCC	Carcinoma Hepatocelular
HCV	Vírus da Hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana

HVR1	Região hipervariável 1
HVR2	Região hipervariável 2
IL-8	Interleucina 8
INF- α	Interferon α
INF-PEG	Interferon Peguilado
IRF-3	Fator 3 regulador do IFN
ISDR	Região Determinante de Sensibilidade ao Interferon
kb	Quilobase
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Quilodalton
M	Molar
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
ml	Mililitro
ng	Nanograma
NK	Células exterminadoras (do inglês <i>Natural Killer</i>)
NLS	Sinal de Localização Nuclear
nm	Nanometro
nt	Nucleotídeos
ORF	Fase Aberta de Leitura
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
RIBA	Ensaio de imunoblotting recombinante
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
RpRd	RNA polimerase RNA dependente
RT	Transcrição reversa
TA	Temperatura ambiente
TBE	Tris-ácido bórico e EDTA
TEMED	Tetramethylethylenediamine
U.V.	Luz ultra-violeta
V3	Região Variável 3
μg	Micrograma
μL	Microlitro

Lista de Figuras

Figura 1	Representação esquemática da história natural da Hepatite C.....	04
Figura 2	Partícula viral do HCV formada pelo envelope viral, glicoproteínas, nucleocapsídeo (proteína core) e RNA fita simples positiva.....	05
Figura 3	Estrutura do genoma do HCV incluindo a poliproteína que codifica proteínas estruturais e não estruturais com a indicação da principal função de cada proteína.....	06
Figura 4	Localização das regiões da proteína NS5A do HCV descritas na literatura.....	11
Figura 5	Transcrição de proteínas com atividades antiproliferativas e imunomoduladoras induzidas pelo IFN em resposta à infecção viral. Ação da proteína quinase (<i>PKR</i>) e sua interação com as proteínas do HCV.....	20
Figura 6	Comparação entre a seqüência do sítio de fosforilação do eIF2- α e da <i>PKR</i> com a seqüência correspondente na proteína E2 dos diferentes isolados do HCV.....	21
Figura 7	Esquema do sítio de anelamento dos primers utilizados para amplificação parcial da região E2 (1 ^a e 2 ^a PCR).....	33
Figura 8	Esquema do sítio de anelamento dos primers utilizados para amplificação da região NS5A (1 ^a e 2 ^a PCR da primeira estratégia).....	35

Figura 9	Esquema do sítio de anelamento dos primers utilizados para amplificação da região NS5A (1ª e 2ª PCR da segunda estratégia).....	36
Figura 10	Alinhamento utilizado para analisar mutações presentes na região da proteína E2, entre os códons 665 e 676, incluindo o PePHD.....	47
Figura 11	Comparação entre as seqüências da região <i>PePHD</i> deste estudo, que diferiram da seqüência padrão genótipo3 (NZL-1), com as seqüências da <i>PKR</i> , do fator eF12 α	48
Figura 12 (a-d)	Alinhamento utilizado para analisar mutações presentes na proteína NS5A, entre os códons 1979 e 2414, incluindo as regiões de interesse destacadas com diferentes cores e linhas.....	50

Lista de Tabelas

Tabela 1	Dados obtidos na análise dos prontuários.....	29
Tabela 2	Características dos pacientes selecionados.....	30
Tabela 3	Seqüência dos <i>primers</i> utilizados nas reações de amplificação da região E2.....	33
Tabela 4	Seqüência dos <i>primers</i> utilizados nas reações de amplificação da região NS5A, primeira e segunda estratégias.....	34
Tabela 5	Relação entre o tamanho do fragmento e a concentração de DNA para cada reação de seqüenciamento.....	38
Tabela 6	Classificação das mutações encontradas na região do <i>PePHD</i> entre os códons 665 e 676 da proteína E2.....	46
Tabela 7	Classificação das mutações encontradas na região <i>NLS</i> entre os códons 2332 e 2340.....	54
Tabela 8	Classificação das mutações encontradas na região NS5A entre os códons 1979 e 2280.....	55
Tabela 9	Classificação das mutações encontradas na região NS5A entre os códons 2332 e 2414.....	56
Tabela 10	Média dos múltiplos do limite superior da normalidade da AST e o desvio padrão de cada grupo.....	58
Tabela 11	Média das substituições conservadoras encontradas na região V3 da NS5A e o desvio padrão de cada grupo	59

Tabela 12	Média dos múltiplos do limite superior da normalidade da AST e o desvio padrão de cada grupo (Cirróticos X Não-Cirróticos).....	60
Tabela 13	Média das substituições de aminoácidos conservadoras encontradas na região <i>NLS</i> da NS5A e o desvio padrão de cada grupo (teste da soma de postos de Wilcoxon, $p=0,026$).....	61
Tabela 14	Média das substituições de aminoácidos conservadoras encontradas na região <i>V3</i> da NS5A de cada grupo e o desvio padrão (teste da soma de postos de Wilcoxon, $p=0,003$).....	62

Lista de Gráficos

Gráfico 1	Possíveis fontes de infecção pelo HCV dos pacientes estudados....	28
Gráfico 2	Média dos múltiplos do limite superior da normalidade da AST e o desvio padrão de cada grupo, $p=0,031$ (teste de Kruskal-Wallis, $p<0,05$).....	58
Gráfico 3	Média das substituições conservadoras encontradas na região V3 da NS5A e o desvio padrão de cada grupo (teste de Kruskal-Wallis).....	59
Gráfico 4	Média dos múltiplos do limite superior da normalidade da AST e o desvio padrão de cada grupo (teste da soma de postos de Wilcoxon, $p=0,011$).....	61
Gráfico 5	Média das substituições de aminoácidos conservadoras encontradas na região NLS da NS5A e o desvio padrão de cada grupo (teste da soma de postos de Wilcoxon, $p=0,026$).....	62
Gráfico 6	Média das substituições de aminoácidos conservadoras encontradas na região V3 da NS5A de cada grupo e o desvio padrão (teste da soma de postos de Wilcoxon, $p=0,003$).....	63

Resumo

Malta FM. *Seqüenciamento da região NS5A do genoma do vírus da hepatite C, genótipo 3, de pacientes brasileiros com infecção crônica* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 98p.

O HCV é a principal causa de doença crônica do fígado. A prevalência mundial de portadores do HCV é de aproximadamente 170 milhões de indivíduos. No tratamento da Hepatite C, a terapia proposta é a combinação Interferon (IFN) e Ribavirina; entretanto, menos da metade dos pacientes tratados apresentam resposta virológica sustentada, definida como RNA viral não detectável pela técnica de PCR entre 6 a 12 meses após a suspensão da terapia. Estudos demonstraram que o HCV genótipo 1 escapa aos efeitos antivirais do IFN através da ligação de uma pequena região da proteína NS5A com a PKR, o que reprime a função desta. Em geral, pacientes infectados com HCV genótipos 2 e 3 respondem melhor à terapia com IFN do que pacientes infectados com o genótipo 1. Embora dados clínicos confirmem esta afirmação, um número significativo de pacientes infectados pelo genótipo 3 não respondem à terapia com IFN. No presente estudo, foram selecionados 33 pacientes infectados com HCV genótipo 3a, tratados com IFN e Ribavirina, incluindo pacientes cirróticos (C) e não-cirróticos (NC), respondedores (R) e não-respondedores (NR). Foi realizado o seqüenciamento das regiões E2 e NS5A do genoma do HCV e as seqüências geradas foram analisadas quanto a presença de mutações na região E2 (PePHD) e na região NS5A (CRS, ISDR, na região de ligação da PKR, NLS e na região V3). As mutações encontradas foram classificadas em conservadoras e não-conservadoras. Na análise estatística as mutações presentes na região E2 não apresentaram diferença estatística significativa. As mutações conservadoras encontradas na região V3 da NS5A apresentaram diferença significativa entre os pacientes NC/R e NC/NR ($p < 0,05$). No NLS da NS5A a diferença foi significativa entre as mutações conservadoras dos grupos cirróticos e não-cirróticos ($p < 0,05$). Estudos funcionais envolvendo a proteína NS5A e um número maior de pacientes são necessários para que possamos avaliar o valor preditivo das mutações conservadoras e não-conservadoras encontradas.

Descritores: 1.Hepatite C crônica 2.Genótipo 3.Interferon alfa 4.Proteínas não estruturais virais 5. IEF-2 kinase 6.Análise mutacional do DNA

Summary

Malta FM. *Sequencing of NS5A region of HCV genotype 3 in brazilian patients with chronic disease*. [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2006. 98p.

Hepatitis C Virus (HCV) is a major cause of liver disease throughout the world. Approximately 170 million individuals or 3 % of the world population, are infected. Interferon (IFN) in combination with ribavirin (RBV) is the only approved therapeutic antiviral agent for chronic HCV infection. NS5A and E2 proteins of HCV genotype 1 were reported to inhibit the double-stranded (ds) RNA-dependent protein kinase (*PKR*), which is involved in the cellular antiviral response induced by IFN. Response to IFN therapy is quite different between genotypes, with response rate among patients infected with types 2 and 3 two to threefold higher than in patients infected with type 1, but a significant percentage of HCV genotype 3 infected patients did not respond to treatment. The aim of this study was to analyse the sequences of fragments of E2 and NS5A regions from 33 outpatients infected with genotype 3, including cirrhotic (C) and non-cirrhotic (NC) patients that have responded (R) or not (NR) to treatment. HCV RNA was extracted and amplified with specific primers for NS5A and E2 regions and PCR products were sequenced. Sequences obtained covered aminoacids 636 –708 in E2 and 1979 – 2414 in NS5A (including regions *CRS*, *ISDR*, *PKR-binding*, *NLS* and *V3*). In the E2 region, we did observe few amino acids changes between patients without statistical significance. In the V3 domain, we found more conservative mutations in responders (0.63 ± 0.62) than in non-responders (0.06 ± 0.25) ($p= 0.003$). The number of conservative mutations in *NLS* region were higher in cirrhotic (0.46 ± 0.52) than non-cirrhotic (0.11 ± 0.32) ($p= 0.026$). In conclusion, our results confirm that the *ISDR* domain is not predictive for treatment success in patients infected with HCV genotype 3. The carboxy-terminal region and especially *V3* domain region showed most of variations. Although some variations were observed, structure-function studies are required to identify precisely how NS5A and IFN interact.

Keywords: 1.Chronic hepatitis C 2.Genotype 3.Interferon-alpha 4.Viral nonstructural proteins 5.eIF-2 kinase 6.DNA mutational analyses

INTRODUÇÃO

1. Introdução

A identificação do Vírus da Hepatite C (HCV) em 1989, por técnicas de biologia molecular, constituiu um marco na história da virologia (Choo *et al.*, 1989). O desenvolvimento de testes sorológicos, baseados na pesquisa de anticorpos contra antígenos do HCV, permitiu demonstrar que este era responsável pela maioria das hepatites não-A não-B, além de estar associado a alguns casos de cirrose criptogênica (Kuo *et al.*, 1989; Alter *et al.*, 1990). Outro estudo demonstrou que o HCV também estava freqüentemente associado ao carcinoma hepatocelular (HCC) (Kiyosawa *et al.*, 1990).

Desde então, o foco das pesquisas das áreas básicas e clínicas tem sido entender melhor a biologia deste patógeno com diferentes objetivos, entre eles o desenvolvimento de testes diagnósticos de grande sensibilidade e especificidade, maior conhecimento dos mecanismos patogênicos, melhor caracterização da história natural da Hepatite C e melhorar a eficiência dos tratamentos (Tellinghuisen *et al.*, 2004).

A infecção pelo HCV é um grave problema de saúde pública mundial, sendo considerada a maior causa de doença hepática crônica. Estima-se que 3% da população global esteja infectada pelo HCV, ou seja, mais de 170 milhões de indivíduos (McHutchison, 2004).

No Brasil, a maioria dos estudos sobre a prevalência da infecção pelo HCV envolve grupos específicos como, usuários de drogas, pacientes hemodialisados e doadores de sangue, o que não representa a população em geral (Focaccia *et al.*, 2004).

Focaccia e colaboradores (1998) realizaram um estudo populacional na cidade de São Paulo que apontou a prevalência de 1,42% de indivíduos infectados pelo HCV, e, quando foram analisados indivíduos com 30 anos ou mais, esta prevalência aumentou para 3,5%.

A hepatite C é transmitida principalmente pelo contato com o sangue infectado e seus derivados. As situações de risco relacionadas à transmissão do HCV são: uso de drogas injetáveis, hemotransfusão, transplante de órgãos sólidos de doadores infectados, práticas médicas inseguras, exposição ocupacional, exposição sexual com parceiro (a) infectado (a), filhos de mães infectadas, sendo esta última a menos freqüente (*NIH*, 2002).

Em muitos casos, a fonte de contaminação é desconhecida, e pode estar associada a hábitos sociais ou familiares como o uso comum de lâminas de barbear e escovas de dente ou a outros hábitos como uso de cocaína intranasal, tatuagem, “*piercing*”, procedimentos dentários e acupuntura realizados sem o uso de materiais descartáveis ou devidamente esterilizados (*Centers for Disease Control-CDC*, 2003; *Armstrong et al.*, 2000).

A história natural da hepatite C é heterogênea, pois a progressão da doença está diretamente relacionada a fatores virais, tais como, genótipo, carga viral, e também a características do indivíduo como o tempo de infecção, idade, sexo, consumo de álcool, co-infecção com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e com o Vírus da Hepatite B (HBV) (*Poynard et al.*, 1997; *Farci & Purcell*, 2000; *Seeff*, 2002).

A hepatite C é raramente diagnosticada na fase aguda, isto porque a grande maioria das infecções agudas são assintomáticas (60% a 70%) ou acompanhadas de sintomas leves (10% a 20%), muitas vezes, inespecíficos podendo confundir-se com um quadro gripal. Em 20 a 30 % dos casos, pode haver icterícia, mal estar e náusea (NIH, 2002).

Estudos mostram que em 20% a 50% dos indivíduos infectados pelo HCV, o sistema imune consegue eliminar o vírus resolvendo a infecção na fase aguda, mas na maioria dos casos (50% a 80%) a infecção evolui para sua forma crônica, que é definida pela persistência do ácido ribonucleico viral (RNA-HCV) no sangue por mais de seis meses (Hoofnagle, 2002; Seeff, 2002). De maneira geral, cerca de 20% dos indivíduos cronicamente infectados pelo HCV desenvolverão cirrose hepática, e, a cada ano, aproximadamente de 3% a 6% dos indivíduos com cirrose terão doença hepática descompensada, e de 1% a 4% dos cirróticos poderão desenvolver carcinoma hepatocelular (Figura 1) (Pawlotsky, 2004).

Figura 1 - Representação esquemática da história natural da Hepatite C.

Fonte: Pawlotsky, 2004, modificado.

1.1. Estrutura e Função do Genoma Viral

O HCV está classificado dentro da família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivirus*. A característica comum entre os membros desta família é a expressão de genes virais a partir de uma única fase aberta de leitura (ORF-Open Reading Frame), que codifica uma poliproteína cujo processamento (co e pós-traducional) é realizado pela combinação de proteases celulares e virais (Kato, 2000).

A partícula viral tem em média 50 nm de diâmetro e é composta por um envelope onde estão inseridas as glicoproteínas E1 e E2, possui genoma constituído por uma molécula de RNA fita simples e linear de polaridade positiva com aproximadamente 9.500 nucleotídeos (Figura 2) (Choo *et al.*, 1989).

Figura 2 - Partícula viral do HCV formada pelo envelope viral, glicoproteínas, nucleocapsídeo (proteína core) e RNA fita simples positiva. Fonte: James A, 2001, modificado.

O genoma do HCV apresenta duas regiões não traduzidas nas extremidades 5' e 3'. Estas regiões apresentam pouca diversidade entre os diferentes isolados virais e são essenciais no processo de tradução da poliproteína e na replicação do genoma viral (Lindenbach *et al.*, 2001).

A poliproteína codificada tem pouco mais de 3.000 aminoácidos, e é clivada em proteínas estruturais e não-estruturais. As proteínas virais estruturais incluem o Core (C) e duas glicoproteínas do envelope (E1 e E2). As proteínas virais não-estruturais são p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B (Figura 3) (Houghton, 1996).

Figura 3 - Estrutura do genoma do HCV incluindo a poliproteína que codifica proteínas estruturais e não estruturais com a indicação da principal função de cada proteína. Fonte: Lindenbach e Rice, 2005a, modificado.

▪ Proteínas Estruturais do HCV

CORE

A proteína Core está localizada na extremidade amino da poliproteína e compõe o nucleocapsídeo viral (Kunkel *et al.*, 2001). Essa proteína pode estar envolvida na modulação da transcrição de genes, na proliferação, sinalização e morte celular. Além disso, pode interferir no metabolismo de lipídios e na supressão da resposta imune do hospedeiro. Entretanto, são necessários estudos mais detalhados sobre a estrutura desta proteína para que essas funções sejam comprovadas (McLauchlan, 2000; Lai *et al.*, 2000).

Estudos recentes demonstraram a existência de uma nova proteína viral expressa em uma fase aberta de leitura alternativa (ORF) no gene core, a proteína F (do inglês *Frame*) ou ARFP (do inglês *Alternative Reading Frame Protein*), porém sua função ainda não foi determinada (Walewski *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2001; Branch *et al.*, 2005).

E1 e E2

As glicoproteínas do envelope viral E1 e E2 participam do processo de ligação ao receptor celular e da fusão do envelope viral com a membrana da célula do hospedeiro (Bartosch *et al.*, 2003).

A proteína E2 possui em sua extremidade amino uma região de 34 aminoácidos conhecida como região hipervariável 1 (HVR1), que apresenta maior variabilidade dentro do genoma do HCV. As mutações

que ocorrem nesta região podem conferir capacidade ao vírus de escapar aos anticorpos neutralizantes (Weiner *et al.*, 1991). Uma outra região hipervariável de 7 aminoácidos foi descrita no HCV genótipo 1, denominada HVR2 (Kato *et al.*, 2001).

Outra característica da proteína E2 é a presença de um sítio de ligação para CD81, que é uma proteína expressa na membrana de diferentes células, além dos linfócitos e hepatócitos (Pileri *et al.*, 1998; Flint *et al.*, 1999). A interação CD81 e E2 pode facilitar a entrada do HCV no hepatócito, além disso, pode inibir a função das células NK (do inglês *Natural Killer*) (Roccasecca *et al.*, 2003; Tseng *et al.*, 2002).

Taylor e colaboradores (1999) verificaram que a proteína E2 do HCV continha uma seqüência similar ao sítio de fosforilação da proteína quinase (*PKR*) e similar à subunidade α do fator iniciador da tradução 2 (eIF-2 α). Esta seqüência foi denominada *PePHD* (do inglês *PKR-eIF2 α phosphorylation homology domain*) e atua como pseudo-substrato da *PKR* inibindo suas funções, bloqueando dessa forma o efeito anti-viral do IFN- α .

▪ Proteínas Não-Estruturais do HCV

P7

A p7 é uma proteína hidrofóbica pequena composta por 63 aminoácidos, e está envolvida na permeabilidade de membrana funcionando como um canal iônico (Pavilovic *et al.*, 2003).

NS2

A proteína NS2 é uma metaloprotease, pois é estimulada por zinco e inibida por EDTA, e tem como única função conhecida mediar sua própria clivagem em “cis” da proteína NS3 (Pieroni *et al.*, 1997; Yamaga *et al.*, 2002).

NS3

A proteína NS3 é uma das mais estudadas do genoma viral e foi a primeira região do HCV a ser identificada (Choo *et al.*, 1989; Kuo *et al.*, 1989).

Essa proteína possui funções de protease, helicase e trinucleotidase (NTPase). Estudos de transcrição e tradução *in vitro* demonstraram que a extremidade amino apresenta atividade serino-protease e quando associada à NS4A (cofator) promove a clivagem dos sítios NS4A/4B, NS4B/5A e NS5A/5B da poliproteína viral (Tomei *et al.*, 1993; De Francesco *et al.*, 2000). A extremidade carboxila apresenta as atividades RNA helicase e NTPase (Suzich *et al.*, 1993).

A NS3 interage diretamente com a NS5B, NS4B e NS5A via NS4A durante o processo da replicação (Lin *et al.*, 1997; Ishido *et al.*, 1998), além disso, a interação entre a NS3 e componentes celulares (a proteína quinase A e C, a p53 e as histonas H2B e H4) têm sido descritas, mas o mecanismo e a importância dessas interações ainda não foram determinadas (Tellinghuisen *et al.*, 2002).

Foy e colaboradores (2003) demonstraram que a associação entre as proteínas NS3 e NS4A bloqueia a fosforilação e a translocação nuclear do fator 3 regulador do IFN (IRF-3). Tal ação resulta na redução significativa da transcrição de genes induzidos pelo IFN- α , indicando que a NS3 também pode ter importância na terapia antiviral com IFN- α .

NS4

Esta região compreende duas proteínas: a NS4A, que atua como cofator de NS3 e participa da hiperfosforilação da proteína NS5A (Tanji *et al.*, 1995), e a NS4B, que tem participação na replicação e possui atividade GTPase que pode estar relacionada com sua habilidade em alterar membranas.

A NS4B organiza o denominado complexo de replicação que promove estabilidade das proteínas do HCV (estruturais e não-estruturais) e do RNA durante a replicação viral (Egger *et al.*, 2002; Einav *et al.*, 2004).

NS5A

A proteína NS5A é uma fosfoproteína que apresenta uma forma basal de 56 kDa e uma forma hiperfosforilada de 58 kDa de peso molecular (Reed *et al.*, 1998).

Essa proteína tem atraído grande interesse devido à sua potencial participação na modulação da resposta ao tratamento com Interferon- α (IFN- α) (Pawlotsky *et al.*, 2000; Katze *et al.*, 2002). A figura 4 mostra

algumas regiões que têm sido estudadas dentro da NS5A, entre elas estão o sinal de retenção citoplasmático (*CRS*), a região determinante de sensibilidade ao IFN (*ISDR*), o sítio de ligação com a *PKR* (*PKR-binding*), o sinal de localização nuclear (*NLS*) e a região variável 3 (*V3*).

Figura 4 – Localização das regiões da proteína NS5A do HCV descritas na literatura.

Outras funções são atribuídas à NS5A, incluindo a ativação da transcrição, regulação da proliferação celular, participação nos mecanismos de sinalização celular e envolvimento direto ou indireto no processo de replicação viral. Entretanto, seu papel na patogênese da hepatite C permanece desconhecido (Tellinghuisen *et al.*, 2002; Pawlotsky *et al.*, 2002; Dimitrova *et al.*, 2003).

NS5B

A proteína NS5B é uma RNA polimerase RNA dependente (RpRd) e é indispensável para a replicação do HCV (Behrens *et al.*, 1996; Lohmann *et al.*, 1997). Esta enzima não apresenta atividade revisora e isto está diretamente relacionado à diversidade genética que o HCV apresenta (genótipos e as *quasispécies*) (Simmonds *et al.*, 1993).

1.2. Diversidade Genética e Grupos Virais

O sistema de classificação mais utilizado para o HCV é o proposto por Simmonds e colaboradores (1994a). Neste sistema, o HCV é agrupado em 6 diferentes genótipos identificados por números arábicos (de 1 a 6) e vários subtipos identificados por letras minúsculas (a, b, c...). Os genótipos diferem entre si de 31% a 34% na sequência de nucleotídeos e os subtipos diferem de 20% a 23%, sendo que essa diferença varia de acordo com a região do genoma (Pawlotsky, 2004). Os subtipos de um mesmo genótipo na região 5'UTR diferem de 1% a 3,3% já na região NS5B diferem de 16,5% a 20,1%, isto demonstra que a região 5'UTR não é adequada para a subtipagem do HCV (Maertens and Stuyver, 1997).

Os genótipos do HCV apresentam uma distribuição geográfica variável nas diferentes regiões do globo, refletindo, provavelmente, a origem epidemiológica do vírus e o modo de transmissão da doença entre os hospedeiros (Simmonds *et al.*, 1994b; Farci e Purcell, 2000).

Os genótipos 1a, 1b, 2a, 2b e 3a apresentam distribuição universal, enquanto o 4, 5 e 6 parecem restritos a determinadas regiões. O tipo 4 é encontrado freqüentemente no Médio Oriente e o 5 predomina na África do Sul. O genótipo 3 é o mais freqüente na Ásia e é também encontrado com freqüência entre os usuários de drogas endovenosas (Silini *et al.*, 1995).

No Brasil, Campiotto e colaboradores (2005) determinaram a frequência dos genótipos do HCV nas diferentes regiões do país: o genótipo 1 foi o mais freqüente (64,9%), seguido do genótipo 3 (30,2%). Os genótipos 2, 4 e 5 foram encontrados com menor frequência: 4,6%, 0,2% e 0,1%, respectivamente.

A determinação dos genótipos é útil não só para estudos epidemiológicos, mas também na prática clínica para a determinação da dose e do tempo de terapêutica antiviral (Pozzato *et al.*, 1994).

O HCV sofre mutações durante a replicação devido a falta de atividade revisora da enzima RNA polimerase RNA dependente (RdRp) e assim, sob pressão do sistema imunológico do hospedeiro populações heterogêneas são selecionadas. Estas populações de vírions, com pequenas diferenças em sua seqüência genômica, mas estritamente relacionados, designa-se *quasispécies* e podem surgir simultaneamente no mesmo indivíduo (Farci e Purcell, 2000; Lyra *et al.*, 2004).

As *quasispécies* podem estar presentes no início da infecção ou surgir no decorrer da mesma como mecanismo de adaptação e escape às defesas do organismo. Esta capacidade do HCV parece facilitar a evolução da infecção aguda para crônica, condicionar a evolução da doença hepática, explicar a resistência às terapêuticas antivirais e torna muito difícil o desenvolvimento de vacinas (Honda *et al.*, 1994; Naito *et al.*, 1995).

1.3. Diagnóstico

O diagnóstico da infecção pelo HCV baseia-se em dados clínicos, laboratoriais, sorológicos e histológicos. Laboratorialmente, as alterações séricas mais frequentes referem-se às elevações dos níveis de transaminases alanino aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) (Hoofnagle, 1997).

Os testes sorológicos baseiam-se na detecção de anticorpos dirigidos contra antígenos virais, estruturais e não-estruturais, no plasma do indivíduo infectado. Os anticorpos são detectados por vários métodos, sendo o mais utilizado a reação imunoenzimática (ELISA) (Okamoto *et al.*, 1990).

Testes complementares ao ELISA são recomendados com o objetivo de identificar resultados falso positivos. O teste de confirmação mais utilizado é o imunoblot (*RIBA-Recombinant Immunoblotting Assays*), que detecta reação de anticorpos presentes no soro do indivíduo contra diferentes proteínas do HCV (Alter *et al.*, 1991; Jerome e Gretch, 2004).

Em pacientes positivos nos testes sorológicos é recomendada a pesquisa do HCV-RNA utilizando-se a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (*PCR*). Esta técnica pode ser utilizada não só para a detecção do HCV-RNA, como também para sua quantificação, e tem se tornado um procedimento de grande importância no acompanhamento de pacientes durante o tratamento (Nakatsuji *et al.*, 1992; Medeiros – Filho *et al.*, 2000).

Além do diagnóstico sorológico e molecular, a realização de uma biópsia hepática antes do início do tratamento é recomendada. A avaliação histológica é o método padrão para determinar a atividade da doença e o prognóstico e é, ainda, um dos critérios de decisão terapêutica (NIH, 2002).

A biópsia hepática é o melhor método para avaliar a progressão da fibrose. O grau de fibrose e a extensão das lesões inflamatórias podem prever a evolução para cirrose. Alterações como agregados linfocitários e esteatose são encontradas com frequência em casos de hepatite C (Freeman *et al.*, 2001; Marcellin *et al.*, 2002).

1.4. Tratamento

Desde a identificação do HCV, grandes avanços têm sido obtidos no desenvolvimento de terapias antivirais (Feld e Hoofnagle, 2005).

O IFN- α , um importante mediador da resposta imune antiviral inata, foi o escolhido para o tratamento da hepatite crônica pelo HCV. Durante os anos 80 foi utilizado em monoterapia, no entanto, apenas 6-12% dos pacientes tratados por seis meses e 16-20% dos pacientes tratados por doze meses apresentaram resposta virológica sustentada ao tratamento (Di Bisceglie e Hoofnagle, 2002).

A resposta sustentada é definida como HCV-RNA negativo por no mínimo seis meses após a suspensão da terapia (Marcellin *et al.*, 1997; Lau *et al.*, 1998).

Em 1998, foram publicados os primeiros resultados que mostravam uma melhora significativa da taxa de resposta sustentada quando se associava ao IFN- α um análogo de nucleosídeo de grande ação antiviral, a Ribavirina. Este esquema terapêutico apresentou 40% de resposta virológica sustentada, atingindo 50% entre os doentes que tinham recidivado sob monoterapia (Davis *et al.*, 1998).

Mc Hutchison e colaboradores (1998), mostraram que apenas 28% dos pacientes infectados com HCV genótipo 1 contra 66% dos pacientes infectados por HCV genótipo não-1 tiveram resposta virológica sustentada após 48 semanas de tratamento com IFN e Ribavirina.

A Ribavirina é um análogo nucleosídico da guanosina, que interfere na replicação viral. É administrada por via oral e seu uso tem aumentado a taxa de resposta sustentada ao tratamento, principalmente pela redução da porcentagem de recaídas virológicas após a suspensão da terapia (Poynard *et al.*, 1998; Davis, 1999).

Somam-se ao seu efeito antiviral leve (Pawlotsky *et al.*, 2000) outros efeitos: imunomodulador, modificando a resposta antiinflamatória para padrão Th1 (elevação de IL-2 e IFN), reduzindo a extensão da lesão dos hepatócitos circunvizinhos (Bergamini *et al.*, 2002); modificação dos nucleotídeos intracelulares e atividade mutagênica (Feld & Hoofnagle, 2005).

Recentemente foi desenvolvido o Interferon Peguilado (IFN-PEG), composto por uma molécula de polietilenoglicol associado ao IFN- α . Tal

composição resultou em uma molécula ativa com meia-vida longa, melhores características farmacocinéticas e melhores taxas de resposta sustentada (Glue *et al.*, 2000; Zeuzem *et al.*, 2000; Lindsay *et al.*, 2001).

A terapia combinada de IFN_PEG com Ribavirina alcançou taxas de resposta de 54%-56% (Fried *et al.*, 2002; Hadziyannis *et al.*, 2004), mas a maior desvantagem desta terapia ainda é seu elevado custo (Strader, 2002).

A resposta à terapia com IFN está relacionada a características do hospedeiro, tais como idade, sexo, duração da infecção, depósito de ferro e fibrose hepática, bem como a características do vírus, tais como genótipo, *quasispecies*, carga viral e mutações em determinadas regiões do genoma viral (Ferenci, 2004).

Em geral, pacientes infectados com HCV genótipos 2 e 3 respondem melhor à terapia com IFN do que pacientes infectados com o genótipo 1 (Poynard *et al.*, 1998), mas o fundamento virológico que justifique essa diferença na resposta ao INF entre os diferentes genótipos permanece desconhecido (Murphy *et al.*, 2002).

▪ Mecanismo de Ação do Interferon- α

O IFN- α induz a transcrição de uma série de genes codificantes de proteínas celulares efetoras que participam do processo antiviral desencadeado por ele. Entre estas proteínas estão a Proteína Kinase

(*PKR*), a Mx e a 2'-5'-oligoadenilato sintetase (Figura 4) (Sen e Lengyel, 1992; Mathews, 1996).

A proteína *PKR* participa do processo antiviral desencadeado pelo IFN- α inibindo a síntese protéica através da fosforilação da subunidade α do fator iniciador da tradução 2 (eIF-2 α), e conseqüentemente inibe a replicação viral (Gale *et al.*, 1997).

A proteína Mx pertence à família das *GTPases* envolvidas no processo de endocitose e transporte através de vesículas. A Mx interfere na replicação viral inibindo o transporte nuclear dos nucleocapsídeos virais e a transcrição do genoma viral (Staeheli *et al.*, 1990; Hsu *et al.*, 1995).

A 2'-5'-oligoadenilato sintetase induz a ativação de moléculas de Rnase L através da dimerização de monômeros inativos, uma vez ativada, a Rnase L promove a degradação do RNA viral nas células infectadas (Peters *et al.*, 1989; Silverman *et al.*, 1997).

▪ O HCV e a Inibição aos Efeitos do IFN- α

Proteína NS5A

Enomoto e colaboradores (1995) foram os primeiros a correlacionar a presença de mutações na sequência de aminoácidos da proteína NS5A (entre os códons 2209 e 2248) e a sensibilidade ao IFN- α . Esta região da proteína NS5A foi denominada *ISDR* (do inglês *Interferon Sensitivity Determining Region*).

Observaram em seus estudos que todos os pacientes infectados com HCV genótipo 1b que apresentavam no mínimo 4 mutações na região *ISDR* tiveram resposta sustentada a terapia com IFN- α (Enomoto *et al.*, 1995).

Em 1996, publicaram um estudo sugerindo a relação entre a presença de mutações na sequência da NS5A (*ISDR*) com o baixo nível sérico de HCV-RNA em pacientes com resposta sustentada ao IFN, mas o mecanismo pelo qual a NS5A afetaria a resposta ao IFN e os níveis de HCV-RNA não foi descrito (Enomoto *et al.*, 1996).

Yoshioka e colaboradores (2005) também demonstraram que pacientes infectados com HCV genótipo 1b que apresentavam um número maior de substituições no *ISDR* tinham carga viral baixa, sugerindo que estas substituições poderiam levar a perda da capacidade da NS5A em bloquear mecanismos antivirais e a apoptose dos hepatócitos.

Posteriormente, alguns estudos foram publicados confirmando a correlação entre a presença de mutações na *ISDR* com a resposta ao IFN (Chayama *et al.*, 1997; Kurosaki *et al.*, 1997; Saiz *et al.*, 1998). Outros estudos não confirmaram esta correlação (Squadrito *et al.*, 1997; Zeuzem *et al.*, 1997; Pawlotsky *et al.*, 1998).

Gale e colaboradores (1997 e 1998) demonstraram *in vitro* que a proteína NS5A se liga à *PKR* inibindo sua ação antiviral induzida pelo IFN (Figura 5). Esta ligação ocorre na região *ISDR* (40 aminoácidos) e nos 26 aminoácidos subsequentes, constituindo a região denominada

domínio de ligação da *PKR* (do inglês *PKR-binding*). Além disso, demonstraram que somente a NS5A sem mutações consegue se ligar à *PKR* e bloquear a supressão da síntese de proteínas induzida pelo IFN- α .

Figura 5 - Transcrição de proteínas com atividades antiproliferativas e imunomoduladoras induzidas pelo IFN em resposta à infecção viral. Ação da proteína quinase (*PKR*) e sua interação com as proteínas do HCV. Fonte: Forns *et al.*, 1999.

Polyak e colaboradores (2001) demonstraram *in vitro* que a expressão da proteína NS5A em células Hela induziu a produção da interleucina-8 (IL-8) resultando na inibição do IFN- α . Em concordância a estes resultados, pacientes infectados pelo HCV genótipo 1, com resposta virológica sustentada à terapia com IFN- α , apresentaram baixos níveis séricos de IL-8 quando comparados aos que não apresentaram resposta (Mihm *et al.*, 2004).

Proteína E2

A proteína E2 do HCV também apresenta uma região que interage com a *PKR* denominada *PePHD*, que é composta por uma sequência de 12 aminoácidos (Figura 5).

Em 1999, Taylor e colaboradores observaram que os isolados HCV genótipo 1a e 1b resistentes ao INF apresentavam na região *PePHD* grande similaridade com a *PKR* e ao sítio de fosforilação do eIF2- α , porém os isolados HCV genótipos 2a, 2b e 3a sensíveis ao INF apresentavam pouca similaridade nesta região (Figura 6).

Com base nesta observação, concluíram que a região *PePHD* da proteína E2 do HCV nos isolados resistentes pode funcionar como um pseudo-substrato para a *PKR* e dessa maneira inibirem a fosforilação do fator eIF2- α mediada pela *PKR* necessária para o bloqueio da síntese protéica.

A importância desta região na predição da resposta ao IFN ainda não está definida, pois resultados controversos foram obtidos por diferentes grupos (Chayama *et al.*, 2000; Lo *et al.*, 2001; Hung *et al.*, 2003).

e IF2 α		S	E	L	S	R	R	S						
PKR		K	K	A	V	S	P	L	L	L	T	T	T	
HCV	1a	R	S	E	L	S	P	L	L	L	T	T	T	IFN res.
	1b	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	IFN res.
	2a	.	.	Q	.	.	.	.	.	H	S	.	.	IFN sen.
	2b	.	C	Q	Q	.	.	.	.	H	S	.	.	IFN sen.
	3a	.	.	.	Q	H	.	.	.	H	S	.	.	IFN sen.

Figura 6 – Comparação entre a sequência do sítio de fosforilação do eIF2- α e da *PKR* com a sequência correspondente na proteína E2 dos diferentes isolados do HCV. Fonte: Taylor *et al.*, 1999.

1.5. Justificativa

Frente a estes achados, foram realizados estudos clínicos para verificar se *in vivo* a resposta ao tratamento combinado de IFN e Ribavirina estaria correlacionada à heterogeneidade genética encontrada nas regiões *PePHD* e *ISDR* das proteínas E2 e NS5A do HCV, respectivamente (Enomoto *et al.*, 1995, 1996; Chayama *et al.*, 2000; Zeuzem *et al.*, 1997; Squadrito *et al.*, 1997; Sarrazin *et al.*, 2001; Polyak *et al.*, 2000; Berg *et al.*, 2000).

Porém a maior parte destes estudos envolveram pacientes infectados pelo genótipo 1, pouca informação está disponível a respeito da relação de fatores virais e a resposta ao tratamento de pacientes infectados com genótipo 3, principalmente estudos envolvendo pacientes brasileiros.

Portanto o presente estudo tem a finalidade de contribuir para o maior conhecimento a respeito da relação entre fatores virais e resposta ao tratamento com IFN em pacientes brasileiros com infecção crônica pelo HCV genótipo 3a.

OBJETIVOS

2. Objetivos

- ✿ Padronizar as reações de PCR e seqüenciamento da região NS5A do HCV genótipo 3.
- ✿ Analisar as mutações encontradas ao longo da proteína NS5A, em especial nas regiões *CRS*, *ISDR*, região de ligação da PKR (*PKR-binding*), *NLS* e região *V3*.
- ✿ Analisar as mutações encontradas no domínio homólogo à proteína PKR (*PePHD*) localizado na glicoproteína E2.
- ✿ Correlacionar as mutações encontradas nestas regiões com a característica resposta virológica sustentada ao tratamento com IFN e Ribavirina de pacientes cirróticos e não-cirróticos, com infecção crônica pelo HCV genótipo 3a.

MÉTODOS

3. Métodos

3.1. Casuística

Foram selecionados pacientes infectados pelo HCV genótipo 3a tratados com IFN (três milhões de unidades 3 vezes por semana) e Ribavirina (800 a 1200 mg/dia), atendidos no Ambulatório de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os pacientes selecionados participaram anteriormente de dois estudos do nosso grupo, cujos títulos são: *“Análise da cinética do HCV durante o tratamento com IFN e Ribavirina”* (José Eymard Medeiros-Filho, 2002) e *“Aspectos epidemiológicos da infecção crônica pelo vírus da hepatite C (VHC) em pacientes atendidos no ambulatório de fígado da disciplina de gastroenterologia clínica do HC FMUSP”* (Suzete Notaroberto, 2004). Assim, foram utilizadas as amostras colhidas nestes estudos referentes ao período pré-tratamento de cada paciente.

O presente estudo foi submetido a CAPPesq (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 e foi aprovado por esta comissão (protocolo: 167/04) (Apêndice).

Critérios de inclusão

- Infecção crônica pelo HCV definida como positividade na pesquisa de anticorpos contra HCV por ELISA e HCV-RNA detectável por PCR, durante pelo menos 6 meses;
- Genotipagem do HCV atestando infecção pelo genótipo 3a;
- Histologia hepática por biópsia, demonstrando hepatite crônica com atividade periportal ou cirrose hepática;
- Ausência de tratamento prévio com IFN e/ou ribavirina;
- Sorologia anti-HIV negativa por ELISA

Critérios de exclusão

- Cirrose hepática descompensada ou com história de descompensação anterior;
- Diagnóstico atual ou passado de hepatocarcinoma;
- Doenças graves concomitantes (tireoidopatias, neoplasias, insuficiências renais, cardíacas, coronarianas 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).

A casuística deste estudo foi composta por 33 pacientes, sendo 11 do sexo feminino (33,3%) e 22 do sexo masculino (66,7%), com idades variando de 27 a 62 anos, infectados pelo HCV genótipo 3a e tratados com Interferon e Ribavirina.

Na análise de prontuário destes pacientes foram colhidas informações sobre a possível forma de aquisição do HCV (Gráfico 1), além da idade, profissão, naturalidade, resultado dos exames sorológicos pré-tratamento (níveis de ALT e AST), resultado da biópsia, e resposta ao tratamento (Tabela 1).

Gráfico 1 - Possíveis fontes de infecção pelo HCV dos pacientes estudados

O resultado da biópsia indicou 13 pacientes com padrão de cirrose, ou seja, estadiamento igual a 4 e 20 pacientes com estadiamento menor do que 4, indicando ausência de cirrose. Os marcadores etiológicos mais freqüentes na biópsia foram os folículos linfóides e a esteatose. As aminotransferases (ALT e AST) foram consideradas alteradas quando os valores excederam pelo menos 2 vezes o limite superior da normalidade (Tabela 1).

Tabela 1 - Dados obtidos na análise dos prontuários

Paciente	Sexo	Idade (no início do tratamento)	Possível forma de aquisição do HCV	Naturalidade	Profissão	Características		Estadiamento	Marcadores etiológicos		Exames pré-tratamento (múltiplos em relação ao limite superior da normalidade)	
						Cirrótico	Respondedor		Esteatose	Foliculos	AST	ALT
1	F	57	Hemotransfusão	Minas Gerais	—	Sim	Não	4	Sim	Sim	4,13	2,75
2	M	44	Desconhecida	—	—	Sim	Não	4	Sim	Sim	1,76	3,20
3	M	48	Usuário de drogas	São Paulo-SP	taxista	Sim	Não	4	Sim	Sim	2,06	2,20
4	M	44	Usuário de drogas	São Paulo-SP	—	Sim	Não	4	Sim	Não	3,34	2,87
5	F	34	Hemotransfusão	São Paulo-SP	—	Sim	Não	4	Sim	Sim	3,67	5,22
6	F	41	Hemotransfusão	Bahia	segurança	Sim	Não	4	Sim	Não	5,50	2,77
7	M	42	Desconhecida	Paraná	gerente de loja	Sim	Não	4	Sim	Sim	4,71	5,41
8	M	55	Esposa portadora do HCV	Cururipe-AL	segurança	Sim	Sim	4	Sim	Não	3,06	2,43
9	M	42	Desconhecida	Osasco-SP	Impressor off set	Sim	Sim	4	Sim	Sim	3,50	3,59
10	M	39	Usuário de drogas	São Paulo-SP	—	Sim	Sim	4	Sim	Sim	3,50	2,86
11	M	53	Desconhecida	São Paulo-SP	funcionário público	Sim	Sim	4	Não	Sim	2,26	1,73
12	M	41	Usuário de drogas	Mauá-SP	desempregado	Sim	Sim	4	Sim	Não	1,00	0,98
13	F	49	Ocupacional	Maranhão	enfermeira	Sim	Sim	4	Sim	Não	1,03	0,89
14	F	46	Hemotransfusão	Mocotó-SP	aposentada	Não	Não	1	Sim	Sim	1,30	1,53
15	M	34	Hemotransfusão	Piauí	mecânico	Não	Não	1	Sim	Sim	3,24	5,66
16	M	58	Usuário de drogas	São Paulo-SP	—	Não	Não	3	Sim	Sim	2,47	2,00
17	F	54	Hemotransfusão	Minas Gerais	—	Não	Não	2	Sim	Não	11,37	7,08
18	M	40	Desconhecida	Ourinhos-SP	comerciante	Não	Não	1	Sim	Não	0,91	1,52
19	M	45	Desconhecida	—	—	Não	Não	1	Sim	Não	0,89	1,60
20	F	62	Hemotransfusão	Minas Gerais	—	Não	Não	3	Não	Sim	1,77	2,33
21	M	39	Parceira portadora do HCV	Rio de Janeiro-RJ	oficial de justiça	Não	Não	1	Sim	Sim	2,24	2,47
22	M	37	Usuário de drogas	São Paulo	—	Não	Não	2	Não	Não	1,26	1,32
23	M	35	Usuário de drogas	Paraná	—	Não	Não	2	Sim	Sim	1,47	1,89
24	M	40	Desconhecida	São Paulo-SP	caminhoneiro	Não	Sim	0	Sim	Não	1,32	2,55
25	M	37	Esposa portadora do HCV	São Paulo-SP	taxista	Não	Sim	1	Sim	Sim	1,29	1,86
26	M	55	Desconhecida	São Paulo-SP	—	Não	Sim	3	Sim	Sim	1,85	1,59
27	M	40	Usuário de drogas	São Paulo-SP	desempregado	Não	Sim	1	Sim	Sim	2,00	2,23
28	F	48	Desconhecida	Minas Gerais	—	Não	Sim	2	Sim	Sim	2,30	2,11
29	F	37	Usuário de drogas	São Paulo-SP	—	Não	Sim	2	Não	Não	0,90	1,03
30	F	39	Ocupacional	São Paulo-SP	enfermeira	Não	Sim	1	Sim	Não	1,03	1,19
31	M	45	Desconhecida	Paraná	segurança	Não	Sim	1	Sim	Sim	0,85	1,18
32	F	30	Parceiro portador do HCV	São Paulo-SP	—	Não	Sim	1	Não	Não	1,53	3,94
33	M	27	Hemotransfusão	São Paulo-SP	—	Não	Sim	0	Sim	Não	2,62	3,05

Entre os 13 pacientes cirróticos, 6 tiveram resposta virológica sustentada ao tratamento com IFN e Ribavirina, enquanto 7 não responderam. Entre os 20 pacientes não cirróticos, 10 tiveram resposta virológica sustentada e 10 não responderam ao tratamento (Tabela 2).

Tabela 2 - Características dos pacientes selecionados

Pacientes	Resposta ao tratamento com IFN- α e Ribavirina		
	RS *	NR *	
Cirróticos	6	7	13
Não-Cirróticos	10	10	20
Total	16	17	33

* **RS**, resposta sustentada; **NR**, não respondedor.

Os exames de detecção do HCV-RNA, os exames sorológicos e a dosagem de enzimas hepáticas, bem como as biópsias hepáticas foram realizados no Hospital das Clínicas da FMUSP.

3.2. Extração de RNA

A extração de HCV-RNA foi realizada a partir 140 μ L 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).

3.3. Síntese do DNA complementar (cDNA)

Para a síntese do cDNA foi realizada a 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 μ L nas seguintes condições: 50 mM de Tris-HCl (pH= 8,3), 75 mM de KCl, 3 mM de $MgCl_2$, 10 mM de DTT, 0,5 mM de cada dNTP (10 mM), 450 ng 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).

3.4. 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 HCV foram amplificadas: região E2 (envelope) e a NS5A. Foram utilizados *primers* específicos para a

amplificação de cada região sendo que alguns destes foram desenhados por nós a partir do alinhamento de seqüências completas do HCV obtidas no “Genbank”, banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA) e outros de trabalhos já publicados.

As reações foram realizadas com volume final de 50 μ L nas seguintes condições: 20 mM de Tris-HCl (pH= 8,3), 50 mM de KCl, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP (10 mM), 0,4 pmol/ μ L de cada *primer* (específico para cada região), 2,5 unidades da enzima *Platinum Taq* DNA polimerase e 5 μ L de DNA. As condições das reações foram iguais para a amplificação das duas regiões. Foram utilizados reagentes da marca Invitrogen (Invitrogen TM Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Região E2

A região da proteína E2 foi amplificada parcialmente gerando um fragmento de 240 pares de bases. Este fragmento é interno ao amplificado na primeira reação de PCR e inclui a região do *PePHD* (Figura 7).

Os *primers* E2_616 e NS2_125 foram desenhados com base no alinhamento de 40 seqüências de diferentes genótipos obtidas no “GenBank”, e os *primers* E2_1S e E2_1AS estão descritos na literatura (Tabela 3).

Figura 7 - Esquema do sítio de anelamento dos *primers* utilizados para amplificação parcial da região E2 (1ª e 2ª PCR).

Tabela 3 - Seqüência dos *primers* utilizados nas reações de amplificação da região E2

<i>Primers</i>	Seqüência (5' → 3')	Posição ^a	Referência
E2_616	TGC CCC ACC GAC TGC TTC AG	2098-2117	Deste estudo
NS2_125^a	CAT ATG GTG TAC TGG TTC CAC C	2888-2909	Deste estudo
E2_1S	TTG TTC AAG GTG AGG ATG TT	2233-2252	Sarrazin <i>et al.</i> , 2000
E2_1AS	CCA ACG CCA TAA AGG TAT TG	2455-2474	Sarrazin <i>et al.</i> , 2000

^a numeração baseada na seqüência completa *HPCK3a* (número de acesso "Genbank" D28917).

Os ciclos de variação de temperatura utilizados para a 1ª e 2ª PCR foram: 95°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 95°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos e um ciclo final de extensão a 72°C por 5 minutos.

Região NS5A

A região NS5A foi amplificada utilizando-se duas estratégias. Os *primers* foram desenhados a partir de um alinhamento de seqüências completas de HCV genótipo 3a, algumas destas seqüências foram geradas em nosso laboratório e outras foram obtidas no “GenBank” (Tabela 4).

Tabela 4 - Seqüência dos *primers* utilizados nas reações de amplificação da região NS5A, primeira e segunda estratégias.

<i>Primers</i>	Seqüência (5' → 3')	Posição ^a	Referência
NS4B_595	GAG GGG GC <u>N</u> GT <u>N</u> CAG TGG ATG AA	6085-6106	Deste estudo
NS5B_159a	GGT AAC CTT A <u>T</u> CTG ACG	7771-7788	Deste estudo
NS5A_F1S	TAT GTT CCC GAG AGC GAT GC	6158-6177	Deste estudo
NS5A_F1AS	CGG CAC TTG GCA CGG ACA CTT GAG	6687-6708	Deste estudo
NS5A_F2S	GGT ACT TTC CCC ATC AAT GAG	6529-6549	Deste estudo
NS5A_F2AS	GCT GCC CAT CTC TTG CCG CCA	7054-7074	Deste estudo
NS5A_F3S	GCA AGC TCA TCC GCC AGC CA	6952-6971	Deste estudo
NS5A_F3AS	GCT AGC GCC GCG GAC ACA TT	7372-7391	Deste estudo
NS5A_F4S	TGT CCA TGG ATG CGC CTT ACC	7287-7307	Deste estudo
NS5A_F4AS	CTG AGT TGG GCT GAT GGG CAG	7690-7709	Deste estudo

Y = C ou T; N = A, T, C ou G.

Primeira estratégia de PCR

A primeira estratégia consistiu em amplificar na primeira etapa da PCR um fragmento de aproximadamente 1,7 kb e na segunda etapa quatro fragmentos de em média 480 pb, utilizando *primers* internos ao fragmento obtido na primeira etapa (Figura 8).

Figura 8- Esquema do sítio de anelamento dos *primers* utilizados para amplificação da região NS5A (1ª e 2ª PCR da primeira estratégia).

Os ciclos de variação de temperatura utilizados na 1ª PCR foram: 95°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 48°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos com uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

Para a 2ª PCR foram utilizados os seguintes ciclos: 95°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C por 15 segundos, 62°C por 30 segundos e 72°C por 40 segundos com uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

Segunda estratégia de PCR

Para amplificar as amostras que apresentaram resultado negativo quando utilizada a primeira estratégia, foi elaborada uma segunda estratégia que consistiu na geração de quatro fragmentos de 422-550 pb a partir da primeira etapa da PCR, sendo utilizado o mesmo conjunto de *primers* na 1ª e 2ª PCR (Figura 9).

Figura 9- Esquema do sítio de anelamento dos *primers* utilizados para amplificação da região NS5A (1ª e 2ª PCR da segunda estratégia).

Os ciclos de variação de temperatura utilizados na 1ª e 2ª PCR da segunda estratégia foram: 95°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C por 15 segundos, 62°C por 30 segundos e 72°C por 40 segundos com uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

3.5. Identificação e Quantificação dos Produtos de PCR

A identificação dos produtos amplificados na PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose com adição do corante SYBR Safe (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Para isto, foram misturados 4 µl do produto final da PCR com 1 µl do tampão 10X Bluejuice™ Gel Loading Buffer (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), a mistura foi aplicada em gel de agarose 2% preparado com tampão TBE 1X e 10 µl do corante SYBR Safe para cada 100 mL de gel. Foram também aplicados no gel o marcador de tamanhos moleculares de 100 pb 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.

Após a realização da eletroforese, os géis foram colocados em um transluminador de luz Ultra Violeta (U.V.) acoplado a um sistema de captura de imagem para visualização da imagem e posterior análise no programa Labworks (Image Acquisition and Analysis Software, UVP, INC. CA, USA). Após impressão da imagem do gel, os produtos foram quantificados através da comparação da intensidade de suas bandas com as bandas do padrão de massa, conforme orientação do fabricante.

3.6. Seqüenciamento dos Produtos de PCR

Foi utilizada a técnica de seqüenciamento derivada da metodologia de Sanger e colaboradores, 1977, utilizando-se dideoxinucleotídeos (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.

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 condições: 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), 50 mM de MgCl_2), 3,2 pmol de cada *primer*, DNA e H_2O q.s.p. 20 μL . As condições das reações de seqüenciamento foram as mesmas para todas as reações, com exceção da quantidade 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.

Purificação Após Reação de Seqüenciamento

A purificação foi realizada para remover resíduos de ddNTPs que não foram incorporados ao DNA durante a reação de seqüenciamento. 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 o cuidado de não aspirar o precipitado. Em seguida foram realizadas duas lavagens por centrifugação com 1000 μL de etanol 70% (Merck S.A), durante 15 minutos também 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 etanol.

Preparo de Amostras para Aplicação no Gel de Seqüenciamento

As amostras precipitadas foram ressuspensas em 4µL do tampão de corrida contendo 5 partes de formamida deionizada e 1 parte de blue dextran (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Posteriormente, as amostras foram incubadas a 95°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.

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 com 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 6 M 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.

3.7. Análise das Seqüências

As seqüências obtidas foram analisadas inicialmente utilizando os programas Phred-Phrap-Consed (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 Phred, 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), editadas no programa *Bioedit* e o alinhamento foi visualizado no programa *MEGA* (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versão 2.1 (Kumar *et al.*, 2001).

As seqüências foram alinhadas e comparadas à seqüência *NZL-1* (D17763 – n° de acesso “GenBank”) que é a seqüência referência para o genótipo 3a mais utilizada nos trabalhos publicados (Sakamoto *et al.*, 1994).

Análise da sequência de aminoácidos

As seqüências de nucleotídeos das regiões E2 e NS5A foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal X e traduzidas em aminoácidos no programa MEGA 2.

As seqüências de aminoácidos das regiões E2 e NS5A foram analisadas e as substituições encontradas foram classificadas em conservadoras, as que envolveram aminoácidos com características físico-químicas semelhantes (ou seja, pertencentes à mesma classe), e não conservadoras as que envolveram aminoácidos com características distintas (ou seja, classes distintas).

Os aminoácidos são classificados em seis classes de acordo com suas propriedades físico-químicas: os positivos (R e K), os negativos (D e E), os aromáticos (H, F, W e Y), os polares (N, Q, S e T), os alifáticos (A, I, L, M, V e C) e os aminoácidos com propriedades conformacionais especiais (G e P) (Mirny e Shakhnovich, 1999).

Esta classificação foi aplicada ao alinhamento das seqüências deste estudo com a seqüência de referência *NZL1* (D17763 – nº de acesso “GenBank”), onde foram destacados os aminoácidos divergentes em relação a seqüência *NZL1* e estes então, foram classificados em conservadoras e não-conservadoras dependendo da troca ou não de classe do aminoácido.

Foram analisadas as substituições na proteína E2 entre os códons 636 e 708, e entre os códons 665 e 676 que correspondem ao sítio *PePHD*.

As substituições na proteína NS5A foram analisadas entre os códons 1979 e 2414, especificamente em algumas regiões compreendidas entre estes códons: como a CRS (do códon 1979 ao 2005), a *ISDR* (do códon 2215 ao 2254), a *PKR-binding* (do códon 2215 ao 2280), a *NLS* (do códon 2332 ao 2340) e a *V3* (do códon 2369 ao 2390).

3.8. Análise Estatística

As variáveis classificatórias (estadiamento e marcadores etiológicos) foram avaliadas com o teste qui-quadrado ou teste da razão de verossimilhança ou teste exato de Fisher.

A variável idade foi avaliada com o teste t-Student ou análise de variância. As demais variáveis quantitativas (níveis séricos das enzimas hepáticas e substituições de aminoácidos) foram avaliadas com o teste da soma de postos de Wilcoxon ou teste de Kruskal-Wallis complementadas com o teste de Dunn quando significante.

Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. PCR

Foi possível amplificar a região da proteína *E2* do HCV nos 33 pacientes estudados, o fragmento amplificado e seqüenciado tinha aproximadamente 240 pb.

A primeira estratégia de *PCR* para amplificação da região NS5A apresentou resultado positivo em 15 amostras e negativo em 18 amostras. Nas 18 amostras que apresentaram *PCR* negativo foi aplicada uma segunda estratégia, resultando em 17 amostras com resultado positivo e apenas uma permaneceu com resultado negativo, totalizando 32 amostras amplificadas e seqüenciadas.

4.2. Análise da Seqüência de Aminoácidos

A análise da seqüência de aminoácidos foi realizada a partir da comparação das seqüências obtidas neste estudo, pelo seqüenciamento direto do produto de *PCR*, com a seqüência de referência *NZL-1*, o alinhamento possibilitou a visualização de substituições de aminoácidos que foram classificadas em conservadoras e não conservadoras.

4.2.1. *E2*

A Figura 10 mostra o alinhamento das seqüências da proteína *E2* com a seqüência de referência, este alinhamento foi utilizado para analisar as substituições presentes no *PePHD* entre os códons 665 e

676 de cada paciente, a classificação e a quantificação destas substituições estão demonstradas na Tabela 6.

Tabela 6 - Classificação das mutações encontradas na região do *PePHD* entre os códons 665 e 676 da proteína E2

Paciente	Características		Mutação	Do códon 665 ao 676 (só <i>PePHD</i>)		
	Cirrótico	Respondedor		C	NC	C + NC
1	Sim	Não	Q668L	0	0	0
2	Sim	Não		0	0	0
3	Sim	Não		0	1	1
4	Sim	Não		0	0	0
5	Sim	Não		0	0	0
6	Sim	Não		0	0	0
7	Sim	Não		0	0	0
8	Sim	Sim	H673Y	0	0	0
9	Sim	Sim		0	0	0
10	Sim	Sim		0	0	0
11	Sim	Sim		0	0	0
12	Sim	Sim		1	0	1
13	Sim	Sim		0	0	0
14	Não	Não	Q668L H669Q	0	0	0
15	Não	Não		0	0	0
16	Não	Não		0	0	0
17	Não	Não		0	2	2
18	Não	Não		0	0	0
19	Não	Não		0	0	0
20	Não	Não		0	0	0
21	Não	Não	H669Q	0	0	0
22	Não	Não		0	0	0
23	Não	Não		0	0	0
24	Não	Sim		0	1	1
25	Não	Sim		0	0	0
26	Não	Sim		0	1	1
27	Não	Sim		0	1	1
28	Não	Sim	H669Q	0	0	0
29	Não	Sim		0	1	1
30	Não	Sim		0	0	0
31	Não	Sim		0	0	0
32	Não	Sim		0	0	0
33	Não	Sim		0	0	0

C= Número total de mutações conservadoras;
NC= Número total de mutações não-conservadoras;
C+NC= Soma total do número de mutações conservadoras e não-conservadoras.

[illegible]

Figura 10 - Alinhamento utilizado para analisar mutações presentes na região da proteína E2, entre os códons 665 e 676, incluindo o *PePHD* (destacado em laranja). Os pontos representam aminoácidos iguais aos da sequência de referência NZL-1 e as letras correspondem aos aminoácidos mutados.

Na análise das seqüências de *E2* foi observado que somente os pacientes 03, 12, 17, 24, 26, 27 e 29 apresentaram mutações na região *PePHD* em relação seqüência padrão genótipo3 (NZL-1), como mostra a figura 11.

e IF2α		S	E	L	S	R	R	S		
PKR		K	K	A	V	S	P	L	L	T T T
HCV 1a	R	S	E	L	S	P	L	L	T T T	NR
1b	.	.	.	.	.	.	.	.	S . .	NR
2a	.	.	Q	.	.	.	.	H	S . .	R
2b	.	C	Q	Q	.	.	.	H	S . .	R
3a	.	.	.	Q	H	.	.	H	S . .	R
NZL-1	.	.	.	Q	H	.	.	H	S . .	
P03 3a	.	.	.	L	H	.	.	H	S . .	C/NR
P12 3a	.	.	.	Q	H	.	.	Y	S . .	C/R
P17 3a	.	.	.	L	Q	.	.	H	S . .	NC/NR
P24 3a	.	.	.	Q	Q	.	.	H	S . .	NC/R
P26 3a	.	.	.	L	H	.	.	H	S . .	NC/R
P27 3a	.	.	.	I	H	.	.	H	S . .	NC/R
P29 3a	.	.	.	Q	Q	.	.	H	S . .	NC/R

Taylor *et al.*, 1999

Deste estudo

C/R (pacientes cirróticos/respondedores); **C/NR** (pacientes cirróticos/não-respondedores); **NC/R** (pacientes não-cirróticos/respondedores); **NC/NR** (pacientes não-cirróticos/não-respondedores);

Figura 11 – Comparação entre as seqüências da região *PePHD* deste estudo, que diferiram da seqüência padrão genótipo3 (NZL-1), com as seqüências da *PKR*, do fator eIF2 α , e também com as seqüências de isolados HCV genótipos 1a, 1b, 2a e 2b publicadas por Taylor *et al.*, 1999.

4.2.2. Região NS5A

O alinhamento das seqüências da região NS5A com a NZL-1 está mostrado na Figura 12 (a-d). Com este alinhamento foram analisadas as substituições encontradas nas diferentes regiões da NS5A. A classificação e quantificação destas substituições estão resumidas nas tabelas 8 e 9.

As regiões da proteína NS5A estudadas foram: *CRS*, *ISDR*, “*PKR-binding*”, *NLS* e *V3* localizadas entre os códons 1979 e 2414.

Nas seqüências da região *CRS* da proteína NS5A geradas neste estudo, foram encontrados resíduos de triptofano (W) nos códons 1982, 1987, 1989 e 1998, com exceção do caso 11, também foram identificados os aminoácidos descritos por Brass e colaboradores (2002) como os mais conservados entre os diferentes isolados do HCV na região *CRS* (destacados por um asterisco na figura 12 a).

Nesta região, em relação a NZL-1, foram observados aminoácidos mutados nos códons 1980, 1985, 1992, 1995 e 1999, mas seqüências de outros estudos, de diferentes genótipos do HCV, apresentaram nestes códons estes mesmos aminoácidos (figura 12 a).

As seqüências da região *ISDR* apresentaram pouca variabilidade entre si e em relação a NZL-1 (Figura 12 c), apenas 7 pacientes apresentaram mutações de aminoácidos em sua seqüência, sendo 3 C/R, 2 NC/NR e 2 NC/R.

	2100	2120	2140	2160	2180
NZL1	WRVAANSYVEVRRVGDFHYITGATEDELKCPCQVPAAEFFTEVDGVR	LHRYAPPCKPLLRDDITFMVGLHSY	TIGSQLPCEPEPDVSVLTSMLRDP	SHITAETAARRLAR	
01 C/NR			E	N	S
02 C/NR			E	N	
03 C/NR			E	N	A
04 C/NR	S	I	T	V	
05 C/NR			E	V	A
06 C/NR			E	A	L
07 C/NR		P	E	T	N
08 C/R	S	IQ	Q	E	N
09 C/R	I		T	N	V
10 C/R			E	N	V
11 C/R			E	T	N
12 C/R			EE	S	A
13 C/R		S	I	E	V
15 NC/NR			I	E	T
16 NC/NR		P	R	EV	N
17 NC/NR	T	G	I	EEV	A
18 NC/NR			I	E	N
19 NC/NR				T	N
20 NC/NR		G		E	T
21 NC/NR	S	P		E	N
22 NC/NR	S			E	N
23 NC/NR		G	L	E	N
24 NC/R				T	N
25 NC/R	L	G		EE	A
26 NC/R				E	A
27 NC/R				E	N
28 NC/R	G	I		E	N
29 NC/R				T	N
30 NC/R		G		E	T
31 NC/R			R	E	T
32 NC/R		I	R	E	N
33 NC/R				N	VV

Figura 12 b - Alinhamento utilizado para analisar mutações presentes na região da proteína NS5A, entre os códons 2089 e 2198. Os pontos representam aminoácidos iguais aos da sequência de referência *NZL-1* e as letras correspondem aos aminoácidos mutados.

		2320	2332	2340	2359	2369	2373	2390	2400
			NLS			V3			
NZL1		KAPDYVPPTVHGCALPPRGAPPV	PPRRKRTIQ	LDGSNVSAALAALAEKSFPSKPEENSSSSGVDTQSSTTSKVPPSPGGESDSESCSSMPPLEGEPGDPDLSCD					
01 C/NR		 E Q	 V			 E		 E	
02 C/NR		 E							
03 C/NR		 E QS	 T	 T		 I	 S	 RV	
04 C/NR		 E	 T						
05 C/NR		 E G	 V	 D	 T	 T			
06 C/NR		 E	 K	 ND	 T	 L		 E	
07 C/NR		 E		 D	 T	 PN			 L
08 C/R		 E	 V	 S	 T	 P			 E
09 C/R		 E	 P						 L
10 C/R		 E Y	 V		 K	 T	 IL		
11 C/R		 E	 Q			 Q		 I	
12 C/R	R	 E	 K	 D	 T	 E		 A	 R
13 C/R	. S	 E			 RT	 T	 P	 A	 P
15 NC/NR		 E	 QS			 S	 R	 A	
16 NC/NR		 E		 K					 E
17 NC/NR		 E	 I	 S		 D		 T	 LP
18 NC/NR		 E				 D		 K	 T
19 NC/NR		 E		 A		 E		 T	
20 NC/NR		 E		 K					 AF
21 NC/NR		 E	 Q		 S			 T	
22 NC/NR		 E		 K				 L	
23 NC/NR		 E	 A			 RT			 IA
24 NC/R		 E	 S			 D		 T	
25 NC/R		 E						 P	 N
26 NC/R		 E				 ND		 T	 A
27 NC/R		 E							 P
28 NC/R		 E						 RT	
29 NC/R		 E	 S			 D		 K	 P
30 NC/R		 E							 G
31 NC/R		 E	 Q						 D
32 NC/R		 E		 T					 G
33 NC/R		 E							 SI

Figura 12 d - Alinhamento utilizado para analisar mutações presentes na região da proteína NS5A, entre os códons 2308 e 2414, a região destacada em azul e vermelho correspondem a região NLS e V3, respectivamente. Os pontos representam aminoácidos iguais aos da seqüência de referência *NZL-1* e as letras correspondem aos aminoácidos mutados.

Em relação a NZL-1, a região de ligação com a *PKR* (*PKR-binding*) apresentou uma maior variabilidade comparada às seqüências da região *ISDR*, mas entre si as seqüências não apresentaram variação significativa (Figura 12 c).

Na região *NLS*, nove pacientes apresentaram mutações em sua seqüência de aminoácido como mostra a tabela 7. Pode-se também observar que os pacientes cirróticos apresentaram mais mutações nesta região do que os não-cirróticos.

Tabela 7- Classificação das mutações encontradas na região *NLS* entre os códons 2332 e 2340

Paciente	Mutação	Classificação
01 C/NR	I2339V	Conservadora
05 C/NR	I2339V	Conservadora
06 C/NR	R2337K	Conservadora
08 C/R	I2339V	Conservadora
10 C/R	I2339V	Conservadora
12 C/R	R2337K	Conservadora
16 NC/NR	R2335K	Conservadora
19 NC/NR	T2338A	Não-conservadora
20 NC/NR	R2335K	Conservadora

C/R (pacientes cirróticos/respondedores); **C/NR** (pacientes cirróticos/não-respondedores); **NC/R** (pacientes não-cirróticos/respondedores); **NC/NR** (pacientes não-cirróticos/não-respondedores);

Em relação à variabilidade observada na proteína NS5A, a região V3 foi a que apresentou maior heterogeneidade entre as seqüências geradas neste estudo. Dos 32 pacientes estudados apenas seis não apresentaram mutações na seqüência de aminoácido da V3 (Figura 12 d).

Tabela 8- Classificação das mutações encontradas na região NS5A entre os códons 1979 e 2280

Paciente	Características		Do códon 1979 ao 2005 (CRS)			Do códon 2215 ao 2254 (ISDR)			Do códon 2215 ao 2280 (PKR-binding - inclui o ISDR)		
	Cirrótico	Respondedor	C	NC	C + NC	C	NC	C + NC	C	NC	C + NC
1	Sim	Não	1	4	5	0	0	0	4	1	5
2	Sim	Não	2	4	6	0	0	0	2	1	3
3	Sim	Não	1	4	5	0	0	0	2	1	3
4	Sim	Não	1	4	5	0	0	0	2	1	3
5	Sim	Não	1	4	5	0	0	0	2	1	3
6	Sim	Não	2	4	6	0	0	0	2	1	3
7	Sim	Não	1	4	5	0	0	0	3	1	4
8	Sim	Sim	1	4	5	0	1	1	2	2	4
9	Sim	Sim	1	4	5	0	0	0	1	1	2
10	Sim	Sim	2	4	6	1	2	3	2	3	5
11	Sim	Sim	1	6	7	0	0	0	1	2	3
12	Sim	Sim	1	4	5	0	0	0	2	1	3
13	Sim	Sim	1	4	5	1	4	5	4	7	11
15	Não	Não	1	4	5	0	0	0	1	1	2
16	Não	Não	1	4	5	0	4	4	1	6	7
17	Não	Não	1	5	6	1	0	1	3	0	3
18	Não	Não	1	4	5	0	0	0	2	1	3
19	Não	Não	1	4	5	0	0	0	1	3	4
20	Não	Não	1	4	5	0	0	0	0	2	2
21	Não	Não	1	4	5	0	0	0	2	1	3
22	Não	Não	1	4	5	0	0	0	2	2	4
23	Não	Não	1	3	4	0	0	0	3	0	3
24	Não	Sim	1	4	5	0	1	1	2	3	5
25	Não	Sim	1	4	5	0	0	0	1	1	2
26	Não	Sim	1	4	5	0	0	0	2	1	3
27	Não	Sim	2	4	6	0	0	0	2	1	3
28	Não	Sim	0	5	5	0	0	0	2	3	5
29	Não	Sim	1	4	5	0	0	0	2	2	4
30	Não	Sim	1	4	5	0	0	0	0	2	2
31	Não	Sim	1	4	5	0	0	0	1	1	2
32	Não	Sim	1	4	5	0	2	2	2	4	6
33	Não	Sim	2	4	6	0	0	0	2	1	3

C= Número total de mutações conservadoras; NC= Número total de mutações não-conservadoras; C+NC= Soma do número total de mutações conservadoras e não-conservadoras.

Tabela 9- Classificação das mutações encontradas na região NS5A entre os códons 2332 e 2414

Paciente	Características		Do códon 2332 ao 2340 (NLS)			Do códon 2369 ao 2390 (V3)			Do códon 1979 ao 2414 (NS5A inteira)		
	Cirrótico	Respondedor	C	NC	C + NC	C	NC	C + NC	C	NC	C + NC
1	Sim	Não	1	0	1	1	1	2	10	11	21
2	Sim	Não	0	0	0	0	0	0	7	9	16
3	Sim	Não	0	0	0	0	4	4	7	19	26
4	Sim	Não	0	0	0	0	0	0	6	11	17
5	Sim	Não	1	0	1	0	0	0	8	11	19
6	Sim	Não	1	0	1	0	1	1	8	14	22
7	Sim	Não	0	0	0	0	1	1	7	17	24
8	Sim	Sim	1	0	1	0	1	1	9	26	35
9	Sim	Sim	0	0	0	0	2	2	6	14	20
10	Sim	Sim	1	0	1	0	0	0	10	15	25
11	Sim	Sim	0	0	0	0	1	1	3	16	19
12	Sim	Sim	1	0	1	1	3	4	13	16	29
13	Sim	Sim	0	0	0	1	5	6	12	28	40
15	Não	Não	0	0	0	0	2	2	6	18	24
16	Não	Não	1	0	1	0	1	1	7	25	32
17	Não	Não	0	0	0	0	1	1	12	18	30
18	Não	Não	0	0	0	0	0	0	7	13	20
19	Não	Não	0	1	1	0	4	4	4	21	25
20	Não	Não	1	0	1	0	2	2	5	18	23
21	Não	Não	0	0	0	0	4	4	8	18	26
22	Não	Não	0	0	0	0	2	2	5	16	21
23	Não	Não	0	0	0	0	2	2	8	15	23
24	Não	Sim	0	0	0	1	1	2	7	16	23
25	Não	Sim	0	0	0	1	3	4	8	18	26
26	Não	Sim	0	0	0	0	0	0	5	14	19
27	Não	Sim	0	0	0	0	2	2	9	13	22
28	Não	Sim	0	0	0	1	2	3	6	19	25
29	Não	Sim	0	0	0	1	0	1	6	19	25
30	Não	Sim	0	0	0	1	3	4	5	19	24
31	Não	Sim	0	0	0	1	1	2	6	16	22
32	Não	Sim	0	0	0	0	1	1	7	14	21
33	Não	Sim	0	0	0	2	0	2	8	9	17

C= Número total de mutações conservadoras; **NC**= Número total de mutações não-conservadoras;

C+NC= Soma do número total de mutações conservadoras e não-conservadoras.

4.3. Análise Estatística

As regiões analisadas foram a *PePHD* do gene da proteína E2 e as regiões *CRS*, *ISDR*, *PKR-binding*, *NLS* e *V3* do gene da proteína NS5A de todos os pacientes selecionados. Os resultados descritos referem-se apenas às análises que apresentaram resultado estatisticamente significativo.

Para a realização da análise estatística, as seqüências primeiramente foram organizadas em quatro grupos para que fossem avaliados conjuntamente os perfis histológicos, os padrões de resposta ao tratamento e as variáveis quantitativas (enzimas hepáticas e substituições de aminoácidos):

C/R (pacientes cirróticos e respondedores)

C/NR (pacientes cirróticos e não-respondedores)

NC/R (pacientes não-cirróticos e respondedores)

NC/NR (pacientes não-cirróticos e não-respondedores)

O resultado da análise com os quatro grupos não mostrou diferença estatística significativa quando foram avaliados a idade dos pacientes ($p=0,387$), os marcadores etiológicos (esteatose, $p=0,449$; folículos linfóides, $p=0,808$) e níveis de ALT ($p=0,106$).

A diferença foi significativa para os níveis de AST entre os grupos C/NR e NC/R ($p=0,031$) como mostram a Tabela 10 e o Gráfico 2.

Tabela 10 - Média dos múltiplos do limite superior da normalidade da AST e o desvio padrão de cada grupo, $p=0,031$ (teste de Kruskal-Wallis, $p<0,05$)

GRUPOS	n	Média*	Desvio padrão
C/NR	7	3,60	1,35
C/R	6	2,39	1,16
NC/NR	10	2,69	3,14
NC/R	10	1,57	0,61
Total	33	2,49	1,99

C/R (pacientes cirróticos/respondedores); **C/NR** (pacientes cirróticos/não-respondedores); **NC/R** (pacientes não-cirróticos/respondedores); **NC/NR** (pacientes não-cirróticos/não-respondedores);

* cálculo a partir do múltiplo do limite superior da normalidade.

Teste de Dunn:

C/NR	x	C/R	>0,05
C/NR	x	NC/NR	>0,05
C/NR	x	NC/R	<0,05
C/R	x	NC/NR	>0,05
C/R	x	NC/R	>0,05
NC/NR	x	NC/R	>0,05

Gráfico 2 - Média dos múltiplos do limite superior da normalidade da AST e o desvio padrão de cada grupo, $p=0,031$ (teste de Kruskal-Wallis, $p<0,05$)

As substituições conservadoras encontradas na região V3 da NS5A apresentaram $p=0,008$ entre os grupos NC/NR e NC/R, como mostram a Tabela 11 e o Gráfico 3.

Tabela 11 - Média das substituições conservadoras encontradas na região V3 da NS5A e o desvio padrão de cada grupo, $p=0,008$ (teste de Kruskal-Wallis, $p<0,05$)

GRUPOS	n	Média	Desvio padrão
C/NR	7	0,14	0,38
C/R	6	0,33	0,52
NC/NR	9	0,00	0,00
NC/R	10	0,80	0,63
Total	32	0,34	0,55

C/R (pacientes cirróticos/respondedores); **C/NR** (pacientes cirróticos/não-respondedores); **NC/R** (pacientes não-cirróticos/respondedores); **NC/NR** (pacientes não-cirróticos/não-respondedores)

Teste de Dunn:

C/NR	x	C/R	>0,05
C/NR	x	NC/NR	>0,05
C/NR	x	NC/R	>0,05
C/R	x	NC/NR	>0,05
C/R	x	NC/R	>0,05
NC/NR	x	NC/R	<0,05

Gráfico 3 - Média das substituições conservadoras encontradas na região V3 da NS5A e o desvio padrão de cada grupo (teste de Kruskal-Wallis, $p<0,05$)

Devido ao pequeno número de pacientes em cada grupo, as seqüências foram agrupadas considerando o perfil histológico (cirrótico X não-cirrótico) e depois, considerando o padrão de resposta ao tratamento (respondedor X não-respondedor).

• CIRRÓTICOS X NÃO-CIRRÓTICOS

A análise do grupo cirróticos X não-cirróticos não mostrou diferença estatística significativa quando avaliamos a idade dos pacientes ($p=0,336$), os marcadores etiológicos (esteatose, $p=0,625$; folículos linfóides, $p=0,710$) e níveis de ALT ($p=0,167$).

Assim como na análise anterior, a diferença foi significativa para os níveis de AST ($p=0,011$) como mostram a Tabela 12 e o Gráfico 4.

Tabela 12 - Média dos múltiplos do limite superior da normalidade da AST e o desvio padrão de cada grupo (teste da soma de postos de Wilcoxon, $p=0,011$)

CIRRÓTICOS	n	Média*	Desvio padrão
NÃO	20	2,13	2,27
SIM	13	3,04	1,36
Total	33	2,49	1,99

* cálculo a partir do múltiplo do limite superior da normalidade.

Gráfico 4 - Média dos múltiplos do limite superior da normalidade da AST e o desvio padrão de cada grupo (teste da soma de postos de Wilcoxon, $p=0,011$)

A região *NLS* da NS5A apresentou maior número de substituições conservadoras entre os pacientes cirróticos e essa diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,026$), como mostram a Tabela 13 e o Gráfico 5.

Tabela 13 - Média das substituições de aminoácidos conservadoras encontradas na região *NLS* da NS5A e o desvio padrão de cada grupo (teste da soma de postos de Wilcoxon, $p=0,026$)

CIRRÓTICOS	n	Média	Desvio padrão
NÃO	19	0,11	0,32
SIM	13	0,46	0,52
Total	32	0,25	0,44

Gráfico 5 - Média das substituições de aminoácidos conservadoras encontradas na região *NLS* da NS5A e o desvio padrão de cada grupo (teste da soma de postos de Wilcoxon, $p=0,026$)

• RESPONDEDORES X NÃO-RESPONDEDORES

A análise envolvendo respondedores e não respondedores não mostrou diferença estatística significativa quando avaliamos a idade dos pacientes ($p= 0,336$), os marcadores etiológicos (esteatose, $p=0,625$; folículos linfóides, $p=0,710$), níveis de ALT ($p=0,167$) e AST ($p=0,145$).

Na região *V3*, a análise das substituições conservadoras apresentou diferença estatística significativa ($p= 0,003$) como mostram a Tabela 14 e o Gráfico 6.

Tabela 14 - Média das substituições de aminoácidos conservadoras encontradas na região *V3* da NS5A de cada grupo e o desvio padrão (teste da soma de postos de Wilcoxon, $p=0,003$)

RESPONDEDOR	n	Média	Desvio padrão
NÃO	16	0,06	0,25
SIM	16	0,63	0,62
Total	32	0,34	0,55

Gráfico 6 - Média das substituições de aminoácidos conservadoras encontradas na região V3 da NS5A de cada grupo e o desvio padrão (teste da soma de postos de Wilcoxon, $p=0,003$)

DISCUSSÃO

5. Discussão

Apesar de nos últimos anos uma série de progressos terem sido realizados no estudo da Hepatite C (tais como a caracterização do genoma viral, desenvolvimento de métodos de diagnóstico e monitorização laboratorial do vírus, caracterização do perfil epidemiológico da infecção, e aumento da eficácia terapêutica), a infecção pelo vírus da Hepatite C representa um grande desafio mundial em saúde pública.

Avanços foram obtidos em relação à terapêutica antiviral, sendo a combinação de Interferon (convencional ou peguilado) e Ribavirina que obteve as melhores taxas de resposta virológica sustentada, apesar de ainda longe dos valores ideais. (Mc Hutchison *et al.*, 1998; Pawlotsky, 2003; Hadziyannis *et al.*, 2004).

O sucesso da terapia está relacionado a fatores virais e do hospedeiro. Diversos estudos já publicados correlacionam estes fatores com os diferentes padrões de resposta ao tratamento.

Os fatores do hospedeiro relacionados com a resposta ao tratamento são: sexo, idade, obesidade, consumo de álcool, presença de fibrose e/ou cirrose.

Em geral pacientes com idade inferior a 40 anos e mulheres tendem a responder melhor ao tratamento com IFN + Ribavirina (Lindsay *et al.*, 2001; Manns *et al.*, 2001; Fried *et al.*, 2002).

Pacientes com esteatose hepática em decorrência da obesidade, diabetes ou consumo de álcool em geral respondem menos do que aqueles que não apresentam gordura no fígado (Rubbia-Brandt *et al.*, 2001).

Da mesma forma, pacientes com fibrose e/ou cirrose respondem menos que os não-cirróticos.

Angulo e colaboradores (1999), ao estudarem a associação de marcadores etiológicos no soro com a presença de fibrose, observaram que o índice AST/ALT superior a 1 estava associado com importante fibrose hepática. Outros trabalhos descrevem que pacientes que evoluem para cirrose tendem a apresentar maiores valores de AST, com índice AST/ALT superior a 1 (Sheth *et al.*, 1998; Matteoni *et al.*, 1999).

Nossos resultados estão de acordo com estes estudos, pois pacientes cirróticos apresentaram valores de AST (múltiplos do limite superior da normalidade) mais elevados do que os pacientes não-cirróticos. Este resultado na análise estatística mostrou diferença significativa.

Em relação aos fatores virais, estudos mostram que a resposta à terapia antiviral está diretamente relacionada ao genótipo viral.

Pacientes infectados pelos genótipos 2 ou 3 apresentam taxas de resposta sustentada elevadas em relação aos pacientes infectados pelo HCV genótipos 1 ou 4 (Fried *et al.*, 2002; Hadziyannis *et al.*, 2004; Zeuzem *et al.*, 2004).

Diversos estudos descreveram que as proteínas E2 e a NS5A, do HCV genótipo 1, apresentam ação antagonistas ao efeito antiviral do IFN por

inibirem *in vitro* a ação da *PKR* induzida pelo Interferon- α (Enomoto *et al.*, 1995; Taylor *et al.*, 1999).

Porém, poucos trabalhos mostram a influência da proteína E2 (região *PePHD*) e da NS5A na resposta ao tratamento do HCV genótipo 3 e a correlação do perfil de resposta com o perfil histológico (cirrótico x não-cirrótico).

Dessa maneira, a identificação dos fatores envolvidos na resposta à terapia com IFN + Rib, sejam eles virais ou do hospedeiro, é um objetivo importante na pesquisa sobre a infecção pelo HCV genótipo 3.

Na tentativa de elucidar os aspectos virológicos dos isolados HCV genótipo 3 que pudessem influenciar no perfil de resposta, realizamos este estudo com pacientes tratados com IFN e Ribavirina com características histológicas hepáticas diferentes (cirróticos e não-cirróticos), cronicamente infectados pelo HCV genótipo 3a.

Embora dados clínicos confirmem que o HCV genótipo 3 é mais sensível ao IFN em relação ao HCV genótipo 1, alguns pacientes infectados pelo HCV genótipo 3 não apresentam resposta virológica sustentada ao tratamento (Davis e Lau, 1997; Mc Hutchison *et al.*, 1998).

Com o objetivo de investigar a correlação de fatores virais com a resposta ao tratamento com IFN nos pacientes infectados pelo HCV genótipo 3a, foi realizado seqüenciamento parcial do gene da proteína E2 do envelope viral e do gene da proteína NS5A, descritas na literatura por estarem envolvidas com a resposta virológica ao tratamento com IFN.

O interferon é uma proteína produzida por células infectadas e exerce sua ação antiviral induzindo a síntese de proteínas efectoras do estado antiviral, sendo que uma dessas proteínas é a *PKR*.

Taylor e colaboradores, em 1999, demonstraram *in vitro* que a região *PePHD* da proteína E2 do HCV genótipo 1 interagia com a *PKR* e com o fator $eF12\alpha$, levando à inibição da *PKR*, e que mutações encontradas nesta região em isolados dos genótipos 2a, 2b e 3a impediam esta interação.

Sendo assim, a perda da interação entre *PKR* e E2 favoreceria a ação do IFN, o que poderia justificar o maior sucesso no tratamento de pacientes infectados pelo HCV genótipos 3.

No presente estudo, as seqüências da região *PePHD* dos HCV genótipo 3 sensíveis ao IFN bem como as dos resistentes, apresentaram similaridade parcial com a seqüência da *PKR* e com a do sítio de fosforilação do fator $eF12\alpha$. A análise estatística não mostrou diferença significativa quanto ao número de mutações encontradas com relação à resposta virológica ao tratamento bem como em relação ao perfil histológico dos pacientes (cirrótico ou não-cirrótico).

Portanto, os resultados encontrados estão de acordo com os dados descritos na literatura, nenhum resultado obtido comprova que a variação na seqüência da região *PePHD* da proteína E2 do HCV genótipo 3 contribuiu com a sensibilidade ao IFN (Abid *et al.*, 2000; Sarrazin *et al.*, 2000; Cochrane *et al.*, 2000; Puig-Basagoiti *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2002).

Diferentes funções têm sido atribuídas à proteína NS5A relacionadas com a persistência da replicação do HCV e com a não-resposta ao

tratamento (IFN e ribavirina), entretanto pouco está definido uma vez que na literatura encontramos resultados contraditórios.

Os primeiros estudos envolvendo a proteína NS5A do HCV genótipo 3 e a resistência ao IFN foram baseados na análise da região *ISDR*, e mostraram pouca ou nenhuma mudança de aminoácidos entre os isolados de pacientes respondedores e não-respondedores quando comparados com a seqüência NZL-1 (Saiz *et al.*, 1998).

Sarrazin e colaboradores (2000), analisaram a região denominada *PKR-binding* de isolados HCV genótipo 3 e também não encontraram associação com a resposta ao tratamento.

Em nosso estudo, as regiões *ISDR* e *PKR-binding* das seqüências geradas, apresentaram pouca variabilidade em relação a NZL-1, e as mutações encontradas não caracterizaram o padrão de resposta nem o perfil histológico dos pacientes estudados, indicando que pelo menos para o HCV genótipo 3 estas regiões não podem ser utilizadas como fator preditor da resposta virológica sustentada ao tratamento com IFN.

Foram analisadas outras regiões ao longo da proteína NS5A, entre elas: *CRS*, *NLS* e *V3*.

A porção N-terminal da proteína NS5A do HCV (*CRS*) foi caracterizada por Brass e colaboradores (2002) como um sítio de integração com membranas (*Membrane Anchor Domain*), uma α -hélice anfipática rica em resíduos de triptofano em sua porção hidrofóbica, sendo esta porção necessária e suficiente para mediar a associação entre a proteína NS5A e a membrana do retículo endoplasmático. Enquanto isso, a porção hidrofílica

(no citosol) faz o papel de suporte e garante a estabilidade do complexo de replicação do HCV (Huang *et al.*, 2005; Appel *et al.*, 2006).

Alguns artigos relatam que a presença de mutações em determinados códons nesta região poderia levar à perda da capacidade da NS5A interagir com membranas, o que poderia prejudicar, direta ou indiretamente, a replicação viral, indicando que esta região tem um papel importante no ciclo replicativo do HCV (Brass *et al.*, 2002; Macdonald & Harris, 2004; Penin *et al.*, 2004).

O fato de encontrarmos todos os resíduos de triptofano (exceto no paciente 11) bem como os nove aminoácidos mais conservados entre os diferentes isolados do HCV na região *CRS* da proteína NS5A em todas as seqüências deste estudo, confirma que esta região encontra-se altamente conservada também entre os nossos casos.

A análise estatística não mostrou diferença significativa entre a presença de mutações na região *CRS* em relação à resposta virológica ao tratamento e nem com o perfil histológico dos pacientes (cirróticos e não-cirróticos).

Quando os pacientes foram separados de acordo com o perfil histológico e com o padrão de resposta, foi observada uma correlação entre a resposta ao tratamento e a presença de mutações conservadoras na região *V3*.

Pacientes respondedores apresentaram mais mutações conservadoras do que os não-respondedores indicando que a mudança de

aminoácidos, mesmo sendo por outro da mesma classe, pode contribuir com o perfil de resposta ao IFN.

Na região *NLS* também foi observada correlação positiva envolvendo mutações conservadoras, mas em relação ao perfil histológico. Pacientes cirróticos apresentaram mais mutações conservadoras do que os não-cirróticos.

Bonte e colaboradores (2004) montaram um sistema recombinante onde a expressão de NS5A conferiu múltiplas vantagens ao vírus *Sindbis*, um vírus próximo ao HCV. Estas vantagens parecem estar relacionadas com a ação anti-apoptótica da proteína NS5A. Nos estágios avançados da replicação a NS5A foi encontrada no núcleo provavelmente devido à clivagem da mesma.

Neste sistema, os autores também observaram a indução do *RNA* de IL8 e a ativação da via NF- κ B pela NS5A, sugerindo que a ação anti-apoptótica da NS5A estaria relacionada com a ativação da via NF- κ B. Isso explica a vantagem conferida pela expressão da NS5A em relação à replicação viral.

Satoh e colaboradores (2000) atribuíram o fato da NS5A ser encontrada no núcleo à sua porção C-terminal, uma vez que formas com deleção da porção N-terminal foram localizadas no núcleo.

Contrariando as observações acima, Fan e colaboradores (2005) não encontraram a NS5A no núcleo de células infectadas.

Reyes (2002) discute que a NS5A não tem efeito direto na sinalização ou ativação do IFN- α , mas foram descritas interações com componentes do

sistema de sinalização, do mecanismo de ativação de transcrição e com quinases do ciclo regulatório celular (ex: ligação com receptor do fator de crescimento, com a p53 e ciclinas). Muitas destas interações bloqueiam a apoptose celular levando à persistência da infecção pelo HCV.

O autor também ressalta que a indução de IL-8 pela NS5A potencializa a replicação viral e consequentemente diminui a resposta antiviral do IFN intracelular não específica.

Estes resultados indicam o envolvimento da NS5A no complexo mecanismo da persistência viral, da patogênese e indiretamente da hepatocarcinogênese.

Apesar de encontrarmos mutações conservadoras na região *NLS* que a princípio não deveriam alterar as características dos aminoácidos, as evidências indicam que estas mutações podem estar influenciando na ação desta proteína em um dos mecanismos que podem contribuir para o desenvolvimento de cirrose.

O mesmo raciocínio pode ser utilizado em relação à região *V3*, onde foi observada uma correlação positiva entre mutações conservadoras e resposta sustentada ao tratamento com IFN.

É importante salientar que todas as análises das seqüências deste estudo foram realizadas tendo como referência a seqüência NZL-1 (D17763) de origem japonesa. Esta seqüência foi escolhida por ter sido a primeira seqüência do genótipo 3 a ser publicada e por ser a mais utilizada pelos autores de trabalhos com HCV genótipo 3, entretanto, o perfil de mutações

encontrados em nossas seqüências poderá ser alterado caso se utilize outra seqüência como referência.

Isto foi observado quando utilizamos como referência no alinhamento de seqüências a HPCK3a (D28917), também de origem japonesa (dados não mostrados). Algumas mutações previamente encontradas na maioria das seqüências do gene da proteína NS5A não foram observadas.

Numa primeira análise poderíamos sugerir que as seqüências do HCV genótipo 3 circulantes na população atendida no ambulatório de gastroenterologia do HC-FMUSP, possuíam um padrão genômico diferente, mas após a análise com a seqüência HPCK3a esta afirmação não foi sustentada.

Seria importante fazer um estudo comparativo entre as nossas seqüências e seqüências do HCV circulante em nosso país, contudo, não encontramos seqüências nacionais da região NS5A nos bancos de dados como *NCBI* e *Los Alamos*.

Quanto ao perfil de resposta ao tratamento da cepa NZL-1 não sabemos se é resistente ou não ao IFN, nem mesmo o autor soube nos informar.

Partindo do conceito de que a mutação conservadora é a substituição de um aminoácido por outro com propriedades físico-químicas similares, que não interferem na estabilidade e na função da proteína (Jonson & Petersen, 2001), estudos complementares são necessários para avaliar se a presença destas mutações levaria a uma alteração estrutural que justificasse a correlação com a resposta ao tratamento, bem como, com relação a cirrose.

Dessa maneira, os resultados deste estudo devem ser interpretados cuidadosamente, pois apesar dos resultados mostrarem uma correlação entre as mutações conservadoras na região V3 com resposta virológica ao tratamento e na NLS com a cirrose, não podemos afirmar que essas mutações tenham influência direta nestes perfis, mesmo por que a função precisa destas duas regiões dentro da NS5A não foi esclarecida.

Estudos estruturais e funcionais envolvendo a proteína NS5A, além de um número maior de pacientes, são necessários para que possamos avaliar o valor preditivo de cada resultado encontrado.

Sendo assim, a proteína NS5A merece atenção especial devido às inúmeras interações celulares em que ela está envolvida e ao pouco conhecimento que se tem a este respeito.

Recentemente um grande passo foi dado com o desenvolvimento de um sistema de cultura celular que permite a replicação do HCV (Wakita *et al.*, 2005; Lindenbach *et al.*, 2005b; Zhong *et al.*, 2005).

Uma nova fase de estudos está se iniciando, pois o cultivo do HCV permitirá estudos mais detalhados sobre a replicação viral, interação vírus-célula, mecanismos de ação antivirais induzidos pelo IFN bem como pelos novos antivirais em desenvolvimento (mais eficientes e menos tóxicos), além de ser uma ferramenta importante para o desenvolvimento de vacinas.

CONCLUSÕES

6. Conclusões

- ✿ Não foram obtidas evidências que comprovem que a presença de mutações na região E2 estaria relacionada com a sensibilidade ao IFN;
- ✿ Pacientes cirróticos apresentam valores de AST superiores comparados aos não-cirróticos;
- ✿ Pacientes respondedores apresentaram mais mutações conservadoras na região V3 da NS5A do que os não-respondedores;
- ✿ Pacientes cirróticos apresentam número maior de mutações conservadoras na região NLS da NS5A do que os não-cirróticos;
- ✿ Estudos funcionais envolvendo a proteína NS5A e um número maior de pacientes são necessários para que possamos avaliar o valor preditivo das mutações conservadoras e não-conservadoras encontradas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências Bibliográficas

Abid K, Quadri R, Negro F. Hepatitis C virus, the E2 envelope protein, and alpha-interferon resistance. *Science*. 2000; 287(5458):1555.

Appel N, Schaller T, Penin F, Bartenschlager R. From structure to function: new insights into hepatitis C virus RNA replication. *J Biol Chem*. 2006; 281(15):9833-6

Alter MJ, Hadler SC, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, Hu PY, Miller JK, Moyer LA, Fields HA, Bradley DW, *et al*. Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. *JAMA*. 1990 Nov 7; 264(17): 2231-5.

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.

Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 1999; 30(6):1356-62.

Armstrong GL, Alter MJ, McQuillan GM, Margolis HS. The past incidence of hepatitis C virus infection: implications for the future burden of chronic liver disease in the United States. *Hepatology*. 2000; 31(3): 777-82.

Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med*. 2003 Mar 3; 197(5): 633-42.

Behrens SE, Tomei L, De Francesco R. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J*. 1996 Jan 2;15(1): 12-22.

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.

Bergamini A, Cepparulo M, Bolacchi F, Araco A, Tisone G, Ombres D, Rocchi G, Angelico M. Ribavirin increases mitogen- and antigen-induced expression of CD40L on CD4+ T cells in vivo. *Clin Exp Immunol*. 2002; 130(2): 293-9.

Bonte D, Francois C, Castelain S, Wychowski C, Dubuisson J, Meurs EF, Duverlie G. Positive effect of the hepatitis C virus nonstructural 5A protein on viral multiplication. *Arch Virol*. 2004;149(7):1353-71.

Branch AD, Stump DD, Gutierrez JA, Eng F, Walewski JL. The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Semin Liver Dis*. 2005; 25(1): 105-17.

Brass V, Bieck E, Montserret R, Wolk B, Hellings JA, Blum HE, Penin F, Moradpour D. An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *Biol Chem*. 2002; 277(10):8130-9.

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.

Center for Disease Control-CDC. Hepatitis C. Division of Viral Hepatitis, Available from: http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/slideset/hep_c/hcv_epi_for_distrib_000925.pdf, acesso: outubro de 2005.

Chayama K, Tsubota A, Kobayashi M, Okamoto K, Hashimoto M, Miyano Y, Koike H, Kobayashi M, Koida I, Arase Y, Saitoh S, Suzuki Y, Murashima N, Ikeda K, Kumada H. Pretreatment virus load and multiple amino acid substitutions in the interferon sensitivity-determining region predict the outcome of interferon treatment in patients with chronic genotype 1b hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 1997; 25(3):745-9.

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.

Cochrane A, Orr A, Shaw ML, Mills PR, McCrudden EA. The amino acid sequence of the *PKR*-eIF2 α phosphorylation homology domain of hepatitis C virus envelope 2 protein and response to interferon- α . *J Infect Dis*. 2000; 182(5):1515-8.

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 Apr 21; 244(4902): 359-62.

Davis GL, Lau JY. Factors predictive of a beneficial response to therapy of hepatitis C. *Hepatology*. 1997; 26(3 Suppl 1):122S-127S.

Davis GL, Esteban-Mur R, Rustgi V, Hoefs J, Gordon SC, Treppe C, Shiffman ML, Zeuzem S, Craxi A, Ling MH, Albrecht J. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of

chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med*. 1998 Nov 19;339(21): 1493-9.

Davis GL. Treatment of chronic hepatitis C: impact of combination therapy. *Curr Gastroenterol Rep*. 1999; 1: 9-14.

De Francesco R, Steinkuhler C. Structure and function of the hepatitis C virus NS3-NS4A serine proteinase. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2000; 242: 149-69.

Di Bisceglie AM. Natural history of hepatitis C: its impact on clinical management. *Hepatology*. 2000; 31(4): 1014-8.

Di Bisceglie AM, Hoofnagle JH. Optimal therapy of hepatitis C. *Hepatology*. 2002 Nov; 36(5 Suppl 1): S121-7.

Dimitrova M, Imbert I, Kieny MP, Schuster C. Protein-protein interactions between hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol*. 2003; 77(9): 5401-14.

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

Einav S, Elazar M, Danieli T, Glenn JS. A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. *J Virol*. 2004; 78(20): 11288-95.

Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Izumi N, Marumo F, Sato C. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to

interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J Clin Invest.* 1995 Jul; 96(1): 224-30.

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 Jan 11; 334(2): 77-81.

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.

Fan W, Zhu W, Wei L, Wang Q, Yin L, Du S, Zhuang H. Nonstructural 5A gene variability of hepatitis C virus (HCV) during a 10-year follow up. *J Gastroenterol.* 2005; 40(1):43-51.

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

Feld JJ, Hoofnagle JH. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature.* 2005 Aug 18;436(7053):967-72.

Ferenci P. Predictors of response to therapy for chronic hepatitis C. *Semin Liver Dis.* 2004; 24 Suppl 2: 25-31.

Flint M, Maidens C, Loomis-Price LD, Shotton C, Dubuisson J, Monk P, Higginbottom A, Levy S, McKeating JA. Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J Virol.* 1999; 73 (8): 6235-44.

Focaccia R, da Conceicao OJ, Sette H Jr, Sabino E, Bassit L, Nitrini DR, Lomar AV, Lorenzo R, Vieira De Souza F, Kiffer CR, Santos EB,

Gonzales MP, Saez-Alquezar A, Riscal JR, Fischer D. Estimated Prevalence of Viral Hepatitis in the General Population of the Municipality of Sao Paulo, Measured by a Serologic Survey of a Stratified, Randomized and Residence-Based Population. *Braz J Infect Dis.* 1998; 2(6): 269-284.

Focaccia R, Baraldo DC, Ferraz ML, Martinelli AL, Carrilho FJ, Goncales FL Jr, Pedroso ML, Coelho HS, Lacerda MA, Brandao CE, Mattos AA, Lira LG, Zamin I Jr, Pinheiro JO, Tovo CV, Both CT, Soares JA, Dittrich S. Demographic and anthropometrical analysis and genotype distribution of chronic hepatitis C patients treated in public and private reference centers in Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2004; 8(5): 348-55.

Forns X, Purcell RH, Bukh J. Quasispecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus. *Trends Microbiol.* 1999; 7(10): 402-10.

Foy E, Li K, Wang C, Sumpter R Jr, Ikeda M, Lemon SM, Gale M Jr. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science.* 2003 May 16; 300(5622): 1145-8.

Freeman AJ, Dore GJ, Law MG, Thorpe M, Von Overbeck J, Lloyd AR, Marinos G, Kaldor JM. Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 2001; 34(4 Pt 1): 809-16.

Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL Jr, Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2002 Sep 26; 347(13): 975-82.

Gale MJ Jr, Korth MJ, Tang NM, Tan SL, Hopkins DA, Dever TE, Polyak SJ, Gretch DR, Katze MG. Evidence that hepatitis C virus

resistance to interferon is mediated through repression of the *PKR* protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology*. 1997 Apr 14; 230(2): 217-27.

Gale MJ Jr, Korth MJ, Katze MG. Repression of the *PKR* protein kinase by the hepatitis C virus NS5A protein: a potential mechanism of interferon resistance. *Clin Diagn Virol*. 1998 Jul 15; 10(2-3): 157-62.

Glue P, Fang JW, Rouzier-Panis R, Raffanel C, Sabo R, Gupta SK, Salfi M, Jacobs S. Pegylated interferon-alpha2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. Hepatitis C Intervention Therapy Group. *Clin Pharmacol Ther*. 2000; 68(5): 556-67.

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

Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, Ramadori G, Bodenheimer H Jr, Bernstein D, Rizzetto M, Zeuzem S, Pockros PJ, Lin A, Ackrill AM; PEGASYS International Study Group. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med*. 2004 Mar 2; 140(5): 346-55.

Honda M, Kaneko S, Sakai A, Unoura M, Murakami S, Kobayashi K. Degree of diversity of hepatitis C virus quasispecies and progression of liver disease. *Hepatology*. 1994; 20(5): 1144-51.

Hoofnagle JH. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology*. 1997; 26(3 Suppl 1): 15S-20S.

Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology*. 2002; 36(5 Suppl 1): S21-9.

Houghton M. Hepatitis C viruses. Fields BN, Knipe DM, and Howley PM, eds. *Fields Virology*. 3d ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1996; 1035-1058.

Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*. 1995 May 19; 81(4): 495-504.

Huang L, Hwang J, Sharma SD, Hargittai MR, Chen Y, Arnold JJ, Raney KD, Cameron CE. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *J Biol Chem*. 2005; 280(43): 36417-28.

Hung CH, Lee CM, Lu SN, Lee JF, Wang JH, Tung HD, Chen TM, Hu TH, Chen WJ, Changchien CS. Mutations in the NS5A and E2-PePHD region of hepatitis C virus type 1b and correlation with the response to combination therapy with interferon and ribavirin. *J Viral Hepat*. 2003; 10(2): 87-94.

Ishido S, Fujita T, Hotta H. Complex formation of NS5B with NS3 and NS4A proteins of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Mar 6; 244(1): 35-40.

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

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

Jonson PH, Petersen SB. A critical view on conservative mutations. *Protein Eng*. 2001; 14(6):397-402.

Kato N. Genome of human hepatitis C virus (HCV): gene organization, sequence diversity, and variation. *Microb Comp Genomics*. 2000; 5: 129-51.

Kato T, Furusaka A, Miyamoto M, Date T, Yasui K, Hiramoto J, Nagayama K, Tanaka T, Wakita T. Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *J Med Virol*. 2001; 64(3): 334-9.

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

Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, Gibo Y, Yoshizawa K, Nakano Y, Furuta S, Akahane Y, Nishioka K, Purcell RH, *et al*. Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology*. 1990; 12(4 Pt 1): 671-5.

Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*. 2001; 17(12): 1244-5.

Kunkel M, Lorinczi M, Rijnbrand R, Lemon SM, Watowich SJ. Self-assembly of nucleocapsid-like particles from recombinant hepatitis C virus core protein. *J Virol*. 2001; 75(5): 2119-29.

Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE, *et al*. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*. 1989 Apr 21; 244(4902): 362-4.

Kurosaki M, Enomoto N, Murakami T, Sakuma I, Asahina Y, Yamamoto C, Ikeda T, Tozuka S, Izumi N, Marumo F, Sato C. Analysis of

genotypes and amino acid residues 2209 to 2248 of the NS5A region of hepatitis C virus in relation to the response to interferon-beta therapy. *Hepatology*. 1997; 25(3):750-3.

Lai MM, Ware CF. Hepatitis C virus core protein: possible roles in viral pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2000; 242: 117-34.

Lau DT, Kleiner DE, Ghany MG, Park Y, Schmid P, Hoofnagle JH. 10-Year follow-up after interferon-alpha therapy for chronic hepatitis C. *Hepatology*. 1998; 28(4): 1121-7.

Lin C, Wu JW, Hsiao K, Su MS. The hepatitis C virus NS4A protein: interactions with the NS4B and NS5A proteins. *J Virol*. 1997; 71(9): 6465-71.

Lindenbach BD, Rice CM. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2001: 991-1042.

Lindenbach BD, Rice CM. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature*. 2005 a; 436(7053): 933-8.

Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*. 2005b; 309(5734):623-6.

Lindsay KL, Trepo C, Heintges T, Shiffman ML, Gordon SC, Hoefs JC, Schiff ER, Goodman ZD, Laughlin M, Yao R, Albrecht JK; Hepatitis Interventional Therapy Group. A randomized, double-blind trial comparing pegylated interferon alfa-2b to interferon alfa-2b as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2001; 34(2): 395-403.

Lo S, Lin HH. Variations within hepatitis C virus E2 protein and response to interferon treatment. *Virus Res.* 2001; 75(2): 107-12.

Lohmann V, Roos A, Korner F, Koch JO, Bartenschlager R. Biochemical and structural analysis of the NS5B RNA-dependent RNA polymerase of the hepatitis C virus. *J Viral Hepat.* 2000; 7(3): 167-74.

Lyra AC, Fan X, Di Bisceglie AM. Molecular biology and clinical implication of hepatitis C virus. *Braz J Med Biol Res.* 2004; 37(5): 691-5.

Macdonald A, Harris M. Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. *J Gen Virol.* 2004; 85(Pt 9): 2485-502.

Maertens, G., Stuyver, L. Genotypes and genetic variation of hepatitis C virus. In: Harrison, T.J., Zucherman, A.J. (eds). *The molecular medicine of viral hepatitis*. Wiley, Chichester, England, 1997; 182-233.

Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet.* 2001; 358(9286):958-65.

Marcellin P, Boyer N, Gervais A, Martinot M, Pouteau M, Castelnau C, Kilani A, Areias J, Auperin A, Benhamou JP, Degott C, Erlinger S. Long-term histologic improvement and loss of detectable intrahepatic HCV RNA in patients with chronic hepatitis C and sustained response to interferon-alpha therapy. *Ann Intern Med.* 1997; 127: 875-81.

Marcellin P, Asselah T, Boyer N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. *Hepatology.* 2002; 36: S47-56.

Mathews MB. Translational Control. Hershey JWB, Mathews MB, Sonenberg N Eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1996; 505-48.

Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*. 1999; 116(6):1413-9.

McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling MH, Cort S, Albrecht JK. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med*. 1998 Nov 19; 339(21): 1485-92.

McHutchison JG. Understanding hepatitis C. *Am J Manag Care*. 2004; 10(2 Suppl): S21-9.

McLauchlan J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat*. 2000; 7(1): 2-14.

Medeiros – Filho JEM, Neumann AU, Pinho JR, et al. IFN- α dosing frequency and HCV genotype affect early viral kinetics more than addition of ribavirin. Anais VII Internacional Symposium on Hepatitis C and Related viruses. Sydney, Austrália, 2000.

Mihm U, Herrmann E, Sarrazin U, von Wagner M, Kronenberger B, Zeuzem S, Sarrazin C. Association of serum interleukin-8 with virologic response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2004; 40(5): 845-52.

Murphy MD, Rosen HR, Marousek GI, Chou S. Analysis of sequence configurations of the ISDR, PKR-binding domain, and V3 region as predictors of response to induction interferon-alpha and ribavirin therapy in chronic hepatitis C infection. *Dig Dis Sci*. 2002; 47(6):1195-205.

Naito M, Hayashi N, Kamada T. Hepatitis C viral quasispecies in patients with type C chronic liver disease. *Nippon Rinsho*. 1995; 53 Suppl (Pt 1): 613-7.

Nakatsuji Y, Matsumoto A, Tanaka E, Ogata H, Kiyosawa K. Detection of chronic hepatitis C virus infection by four diagnostic systems: first-generation and second-generation enzyme-linked immunosorbent assay, second-generation recombinant immunoblot assay and nested polymerase chain reaction analysis. *Hepatology*. 1992; 16(2): 300-5.

National Institutes of Health. Consensus Statement on Management of Hepatitis C: 2002. NIH Consens State Sci Statements. 2002 Jun 10-12; 19(3):1-46.

Okamoto H, Munekata E, Tsuda F, Takahashi K, Yotsumoto S, Tanaka T, Tachibana K, Akahane Y, Sugai Y, Miyakawa Y, *et al*. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies against the capsid protein of hepatitis C virus with a synthetic oligopeptide. *Jpn J Exp Med*. 1990; 60(4): 223-33.

Pavlovic D, Neville DC, Argaud O, Blumberg B, Dwek RA, Fischer WB, Zitzmann N. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 13; 100(10): 6104-8.

Pawlotsky JM, Germanidis G, Neumann AU, Pellerin M, Frainais PO, Dhumeaux D. Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b:

relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J Virol.* 1998; 72(4):2795-805.

Pawlotsky JM, Neumann AU, Conrad A, et al. Hepatitis C virus (HCV) dynamics during induction therapy with IFN- α and/or ribavirin. *Hepatology.* 2000; 32: 223A.

Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology.* 2002; 122(6): 1554-68.

Pawlotsky JM. Mechanisms of antiviral treatment efficacy and failure in chronic hepatitis C. *Antiviral Res.* 2003; 59(1):1-11.

Pawlotsky JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol.* 2004; 12(2): 96-102.

Peters M. Mechanisms of action of interferons. *Semin Liver Dis.* 1989; 9(4): 235-9.

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

Pieroni L, Santolini E, Fipaldini C, Pacini L, Migliaccio G, La Monica N. In vitro study of the NS2-3 protease of hepatitis C virus. *J Virol.* 1997; 71(9): 6373-80.

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 Oct 30; 282(5390): 938-41.

Polyak SJ, Noursbaum JB, Larson AM, Cotler S, Carithers RL Jr, Gretch DR. The protein kinase-interacting domain in the hepatitis C virus envelope glycoprotein-2 gene is highly conserved in genotype 1-infected patients treated with interferon. *J Infect Dis.* 2000; 182(2):397-404.

Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM, Ezelle HJ, Duverlie G, Barber GN, Levy DE, Mukaida N, Gretch DR. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol.* 2001; 75(13): 6095-106.

Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet.* 1997 Mar 22; 349(9055): 825-32.

Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G, Bain V, Heathcote J, Zeuzem S, Trepo C, Albrecht J. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet.* 1998 Oct 31; 352(9138): 1426-32.

Pozzato G, Kaneko S, Moretti M, Croce LS, Franzin F, Unoura M, Bercich L, Tiribelli C, Crovatto M, Santini G, *et al.* Different genotypes of hepatitis C virus are associated with different severity of chronic liver disease. *J Med Virol.* 1994; 43(3): 291-6.

Puig-Basagoiti F, Saiz JC, Forns X, Ampurdanes S, Gimenez-Barcons M, Franco S, Sanchez-Fueyo A, Costa J, Sanchez-Tapias JM, Rodes J. Influence of the genetic heterogeneity of the ISDR and PePHD regions

of hepatitis C virus on the response to interferon therapy in chronic hepatitis C. *J Med Virol.* 2001; 65(1):35-44.

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.

Reyes GR. The nonstructural NS5A protein of hepatitis C virus: an expanding, multifunctional role in enhancing hepatitis C virus pathogenesis. *J Biomed Sci.* 2002; 9(3):187-97.

Roccasecca R, Ansuini H, Vitelli A, Meola A, Scarselli E, Acali S, Pezzanera M, Ercole BB, McKeating J, Yagnik A, Lahm A, Tramontano A, Cortese R, Nicosia A. Binding of the hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 is strain specific and is modulated by a complex interplay between hypervariable regions 1 and 2. *J Virol.* 2003; 77(3): 1856-67.

Rubbia-Brandt L, Giostra E, Mentha G, Quadri R, Negro F. Expression of liver steatosis in hepatitis C virus infection and pattern of response to alpha-interferon. *J Hepatol.* 2001; 35(2):307.

Saiz JC, Lopez-Labrador FX, Ampurdanes S, Dopazo J, Forns X, Sanchez-Tapias JM, Rodes J. The prognostic relevance of the nonstructural 5A gene interferon sensitivity determining region is different in infections with genotype 1b and 3a isolates of hepatitis C virus. *J Infect Dis.* 1998 ; 177(4): 839-47.

Sakamoto M, Akahane Y, Tsuda F, Tanaka T, Woodfield DG, Okamoto H. Entire nucleotide sequence and characterization of a hepatitis C virus of genotype V/3a. *J Gen Virol.* 1994; 75 (Pt 7): 1761-8.

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.

Sarrazin C, Bruckner M, Herrmann E, Ruster B, Bruch K, Roth WK, Zeuzem S. Quasispecies heterogeneity of the carboxy-terminal part of the E2 gene including the PePHD and sensitivity of hepatitis C virus 1b isolates to antiviral therapy. *Virology*. 2001; 289(1):150-63.

Satoh S, Hirota M, Noguchi T, Hijikata M, Handa H, Shimotohno K. Cleavage of hepatitis C virus nonstructural protein 5A by a caspase-like protease(s) in mammalian cells. *Virology*. 2000; 270(2):476-87.

Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2002; 36(5 Suppl 1): S35-46.

Sen GC, Lengyel P. The interferon system. A bird's eye view of its biochemistry. *J Biol Chem*. 1992 Mar 15; 267(8): 5017-20.

Sheth SG, Flamm SL, Gordon FD, Chopra S. AST/ALT ratio predicts cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol*. 1998; 93(1):44-8.

Silini E, Bono F, Cividini A, Cerino A, Maccabruni A, Tinelli C, Bruno S, Bellobuono A, Mondelli M. Molecular epidemiology of hepatitis C virus infection among intravenous drug users. *J Hepatol*. 1995; 22(6): 691-5.

Silverman RH, Cirino NM. mRNA metabolism and post-transcriptional gene regulation. In: Morris DR, Harford JB, eds. *Gene regulation*. New York: John Wiley & Sons. 1997; 295–309.

Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol.* 1993; 74 (Pt 11): 2391-9.

Simmonds P, Smith DB, McOmish F, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS, Holmes EC. Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. *J Gen Virol.* 1994a; 75 (Pt 5): 1053-61.

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.* 1994b; 19(5): 1321-4.

Squadrito G, Leone F, Sartori M, Nalpas B, Berthelot P, Raimondo G, Pol S, Brechot C. Mutations in the nonstructural 5A region of hepatitis C virus and response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Gastroenterology.* 1997; 113(2):567-72.

Staeheli P. Interferon-induced proteins and the antiviral state. *Adv Virus Res.* 1990; 38: 147-200.

Strader DB. Understudied populations with hepatitis C. *Hepatology.* 2002; 36(5 Suppl 1): S226-36.

Suzich JA, Tamura JK, Palmer-Hill F, Warrener 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.

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 Jul 2; 285(5424): 107-10.

Tellinghuisen TL, Rice CM. Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Curr Opin Microbiol*. 2002; 5(4): 419-27.

Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Gorbalenya AE, Rice CM. The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J Biol Chem*. 2004 Nov 19; 279(47): 48576-87.

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 Dec 15; 25(24): 4876-82.

Tomei L, Failla C, Santolini E, De Francesco R, La Monica N. NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein. *J Virol*. 1993; 67(7): 4017-26.

Tseng CT, Klimpel GR. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med*. 2002 Jan 7; 195(1): 43-9.

Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*. 2005; 11(7):791-6.

Walewski JL, Keller TR, Stump DD, Branch AD. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA*. 2001; 7(5): 710-21.

Weiner AJ, Brauer MJ, Rosenblatt J, Richman KH, Tung J, Crawford K, Bonino F, Saracco G, Choo QL, Houghton M, *et al*. Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology*. 1991; 180(2): 842-8.

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.

Yamaga AK, Ou JH. Membrane topology of the hepatitis C virus NS2 protein. *J Biol Chem*. 2002; 277(36): 33228-34.

Yoshioka K, Ito H, Watanabe K, Yano M, Ishigami M, Mizutani T, Sasaki Y, Goto H. Interferon sensitivity-determining region of nonstructural region 5A of hepatitis C virus genotype 1b correlates with serum alanine aminotransferase levels in chronic infection. *J Viral Hepat*. 2005; 12:139-45.

Zeuzem S, Lee JH, Roth WK. Mutations in the nonstructural 5A gene of European hepatitis C virus isolates and response to interferon alfa. *Hepatology*. 1997; 25(3):740-4.

Zeuzem S, Feinman SV, Rasenack J, Heathcote EJ, Lai MY, Gane E, O'Grady J, Reichen J, Diago M, Lin A, Hoffman J, Brunda MJ. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *N Engl J Med*. 2000; 343(23): 1666-72.

Zeuzem S, Hultcrantz R, Bourliere M, Goesser T, Marcelin P, Sanchez-Tapias J. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3. *JHepatol.* 2004; 40: 993-9.

Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T, Chisari FV. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(26):9294-9

APÊNDICE

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO – BRASIL

Recibo

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 28.08.03, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 607/03, intitulado: "Sequenciamento da região NS5A do genoma do vírus da hepatite C, genótipo 3, de pacientes brasileiros com infecção crônica", apresentado pela Área de Fisiopatologia Experimental.

Pesquisador(a) Responsável: Dr. João Renato Rebello Pinho

Pesquisador(a) Executante: Dra. Fernanda de Mello Malta

CAPPesq, 1 de setembro de 2003.

Euclides Ayres de Castilho

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
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")

Encaminhe-se à CPG-FMUSP
para as devidas providências.
S.P., 04.09.03

C. Austr Nuntou

Prof.ª Dra. Maria Mitsu Brentani
Coordenadora do Curso de
Pos-Graduação do programa
de Fisiopatologia Experimental

RECEBIDO SPG 05.09.03
ASS: *Euclides*