Karine Vieira Gaspareto

**Sequenciamento de nova geração para rastreamento
de mutações de resistência aos novos medicamentos
utilizados no tratamento da hepatite C.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP / Instituto Butantan / IPT, para obtenção
do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2016

Karine Vieira Gaspareto

Sequenciamento de nova geração para rastreamento de mutações de resistência aos novos medicamentos utilizados no tratamento da hepatite C.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP / Instituto Butantan / IPT da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. João Renato Rebello Pinho

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2016

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Gaspareto, Karine Vieira

Sequenciamento de nova geração para rastreamento de mutações de resistência aos novos medicamentos utilizados no tratamento da hepatite C / Karine Vieira Gaspareto; orientador João Renato Rebello Pinho. -- São Paulo, 2016.

104 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Vírus da hepatite C. 2. Sequenciamento genético. 3. Biologia molecular. 4. Mutação. 5. Antivirais. I. Pinho, João Renato Rebello, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Karine Vieira Gaspareto

Título da Tese: Sequenciamento de nova geração para rastreamento de mutações de resistência aos novos medicamentos utilizados no tratamento da hepatite C.

Orientador(a): Dr. João Renato Rebello Pinho

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS

São Paulo, 07 de outubro de 2013.

Parecer apresentado a Comissão de Ética e Pesquisa do Depto de Moléstias Infecciosas e Parasitárias em 07.10.13.

Ref.: Emenda (carta datada de 25.09.13) referente ao protocolo de pesquisa CAPPesq 0850/11: "Análise da evolução da infecção pelo vírus da hepatite C em doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo." Pesquisador responsável: Maria Cássia Jacintho Mendes Correa.

Trata-se de uma emenda de projeto já aprovado pela CAPPesq com a inclusão de 3 novos participantes, e aprimoramento da genotipagem do vírus C, conforme descrito abaixo:

Inclusão dos Pesquisadores, Karine Vieira Gaspareto, Soraia Mafra Machado e Gaspar Lisboa Neto, com as seguintes participações no projeto:

Dra Karine terá como orientador o Dr. João Renato Rabello Pinho, e estudará a presença de mutação de resistência a novos medicamentos.

O Dr. Gaspar Lisboa Neto terá amostras do projeto incluído em seu futuro doutoramento, no qual identificará mutações de resistência antiviral aos inibidores de protease.

A Dra Soraia já está inscrita na pós-graduação e terminará seu mestrado sob orientação da Dra Maria Cássia analisando as características demográficas dos doadores de sangue envolvidos no projeto.

Além da inclusão dos novos participantes propõe-se ainda ampliar a genotipagem do vírus da hepatite C, através do seqüenciamento das regiões NS3 e NS5b deste vírus.

Aprovada.

A Comissão aprovou a presente emenda com base no parecer do relator.

Aprovado pela Comissão de Ética
e Pesquisa do Depto de Moléstias Infecciosas e
Parasitárias da FMUSP em 07/10/2013.

Profª Maria Aparecida Shikanai Yasuda
Coordenadora da Comissão de Ética e Pesquisa
do Depto de Moléstias Infecciosas e Parasitárias

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Paulo e Clarice, ao meu irmão Paulo Henrique e ao meu companheiro, Fernando, pelo apoio incondicional.

Agradecimentos

À Deus, por ser o meu refúgio e a minha fortaleza ao longo desta jornada, e por permitir a concretização de mais uma etapa em minha vida.

Aos meus pais Paulo Fernandes Gaspareto e Clarice Vedevotto Vieira Gaspareto, por sempre me apoiarem, qualquer que fosse a minha decisão e por estarem ao meu lado em todos os momentos.

Ao meu irmão Paulo Henrique Gaspareto, por sempre me lembrar que é possível conquistar o que almejamos.

Ao meu companheiro Fernando Hideki Assakawa, pela paciência e por me mostrar que é possível caminhar junto em busca dos nossos sonhos.

Ao meu orientador Dr. João Renato Rebello Pinho, pela confiança e pela oportunidade de conduzir este trabalho.

À Dra. Fernanda de Mello Malta, por compartilhar conhecimento, orientar e me ajudar desde o início da pesquisa.

À Dra. Michele Soares Gomes-Gôuvea, pela importante colaboração e apoio.

Ao Roberto Marques Ribeiro, por toda ajuda, paciência e ensinamento para a realização da metodologia do sequenciamento de nova geração.

Aos colaboradores que contribuíram para a realização e a concretização do projeto de pesquisa, Dra. Maria Cássia Mendes-Correa, Dra. Ester Cerdeira Sabino, Dra. Camila Malta Romano, Dra. Nair Hideki Muto e Dr. Flair José Carrilho.

Ao Dr. Dennis Armando Bertolini, meu orientador de mestrado que me conduziu e proporcionou o início da minha caminhada na área de biologia molecular.

Às amigas que fiz ao longo desse caminho, por tornarem esta trajetória mais leve e divertida, Ariana Carolina Ferreira, Ketti Gleyzer de Oliveira, Paola Lara Faria, Max Diego Cruz Santos, João Paulo Moreira, Lívia de Souza Botelho Lima, Caroline Furtado Noble, Cristina Nackle, Clarice Lemos, Dirce Mary Correia Lima, Fabiana Martins de Paula, Marcelo Corral, Juliana Goldbaum, Mayara Gottardi e Francisca de Fátima Valentim.

Ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por conceder a bolsa de estudo. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por conceder auxílio financeiro (Processo nº 443152/2014-4).

O sonho

Sonhe com aquilo que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que quer.

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades
que aparecem em seus caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam,
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem
a importância das pessoas que passaram por suas vidas.

(Clarice Lispector)

RESUMO

Gaspareto KV. Sequenciamento de nova geração para rastreamento de mutações de resistência aos novos medicamentos utilizados no tratamento da hepatite C. [Tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

O vírus da Hepatite C (HCV) é conhecido por sua diversidade genética, sendo classificado em sete genótipos e 67 subtipos. A maioria dos isolados do HCV detectados no mundo pertence ao genótipo 1, correspondendo aproximadamente a 70% das infecções. Como o genótipo 1 não é somente o mais prevalente mas também o mais difícil de tratar com Interferon alfa-peguilado e Ribavirina, os primeiros agentes antivirais diretos (DAA) foram desenhados para atuar especificamente na protease do HCV genótipo 1. As proteínas NS3-5B formam um complexo associado à membrana que é responsável pela replicação do genoma do HCV, sendo as proteínas NS3-4A, NS5A e NS5B alvos para o desenvolvimento de inibidores. Vários DAA têm sido utilizados para uso em pacientes cronicamente infectados pelo HCV, incluindo os Inibidores da Protease NS3-4A (Telaprevir, Boceprevir, Simeprevir, Paritaprevir, Grazoprevir e Asunaprevir), os Inibidores da NS5A (Daclatasvir, Ledipasvir, Ombitasvir, Elbasvir e Velpatasvir) e os Inibidores da Polimerase (Sofosbuvir e Dasabuvir). O presente estudo teve como objetivo aplicar a metodologia de sequenciamento de nova geração para sequenciar a região codificadora do genoma do HCV genótipo 1, incluindo os subtipos 1a (n=51) e 1b (n=49), e identificar mutações que estejam associadas com a resistência aos DAA em pacientes sem tratamento prévio com esses medicamentos. No subtipo 1a do HCV, foram encontradas variantes associadas com resistência (RAV) para as regiões NS3-4A, NS5A e NS5B em 10%, 22% e 8% dos pacientes, respectivamente. RAVs detectadas foram: T54S (2%), V55A (2%), Q80K (4%) e R155K (2%) na protease NS3-4A; Q30H (4%), H58P (10%) e Q30H/R+Y93C/H/N (8%) na região NS5A; e A421V (8%) na polimerase NS5B. As frequências das RAVs encontradas nos pacientes infectados com o subtipo 1b foram 12%, 53% e 31% para as regiões da protease NS3-4A, NS5A e NS5B, respectivamente. Foram encontradas as mutações F43I (2%), T54S (4%), Q80H (2%), D168E (2%) e M175L (2%) na região NS3-4A; L28M (2%), R30Q (2%), L31M (2%), Q54H (27%), A92T (2%), Y93H (4%), Q54H+A92T (6%), Q54H+Y93H (6%) e A92T+Y93H (2%) na região NS5A e, L159F (2%), C316N (4%), A421V (7%), L159F+C316N (9%) e S556G (9%) na polimerase. Mutações em mais de uma região foram encontradas em nove pacientes, um portador do subtipo 1a e em oito do subtipo 1b. Utilizando esta metodologia, um recombinante entre os subtipos 1a e 1b foi também identificado neste estudo. Relatamos a primeira descrição de sequências quase completas dos genomas dos HCV subtipos 1a e 1b obtidos de pacientes brasileiros. Com a introdução da combinação de terapias sem o emprego do IFN, a detecção inicial de variantes de importância clínica pode ter aplicação significativa na redução de falha ao tratamento em decorrência da presença prévia de mutações de resistência viral.

Palavras-chave: Vírus da hepatite C. Sequenciamento genético. Mutação. Antivirais. Biologia molecular.

ABSTRACT

Gaspareto KV. Next-generation sequencing to identify resistance mutations on new antiviral drugs used for treatment of hepatitis C. [Thesis Ph.D. (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Hepatitis C virus (HCV) is known for its genetic diversity, being classified into seven genotypes and 67 subtypes. The majority of the HCV isolates identified worldwide belongs to genotype 1, accounting for approximately 70% of infections. As genotype 1 is not only the most prevalent but also the most difficult to treat with Peg-interferon-alfa and Ribavirin therapy, the first direct antiviral agents (DAAs) were designed to play a role specifically in HCV genotype 1 protease. The NS3-5B proteins form a membrane-associated complex that is responsible for the replication of the HCV genome, with NS3-4A, NS5A, and NS5B proteins as targets for development of inhibitors. Various DAAs have been used in chronically infected HCV patients, including NS3-4A protease inhibitors (Telaprevir, Boceprevir, Simeprevir, Paritaprevir, Grazoprevir and Asunaprevir), NS5A inhibitors (Daclatasvir, Ledipasvir, Ombitasvir, Elbasvir and Velpatasvir) and polymerase inhibitors (Sofosbuvir and Dasabuvir). This study aimed at executing the next-generation sequencing methodology for the HCV genome genotype 1 coding region, including subtypes 1a (n=51) and 1b (n=49) as well as identifying mutations that are associated with resistance to DAA in patients without prior treatment with these new drugs. Resistance associated variants (RAVs) were detected in HCV subtype 1a for NS3-4A, NS5A and NS5B regions in 10%, 22% and 8% of patients, respectively. RAVs found were: T54S (2%), V55A (2%), Q80K (4%) and R155K (2%) in NS3-4A protease region; Q30H (4%), H58P (10%) and Q30H/R+Y93C/H/N (8%) in NS5A region; and A421V (8%) in NS5B polymerase region. The frequencies of RAVs found in patients infected with subtype 1b were 12%, 53% and 31% for NS3-4A, NS5A and NS5B protease regions, respectively. F43I (2%), T54S (4%), Q80H (2%), D168E (2%) and M175L (2%) mutations were found in NS3-4A region; L28M (2%), R30Q (2%), L31M (2%), Q54H (27%), A92T (2%), Y93H (4%), Q54H+A92T (6%), Q54H+Y93H (6%) and A92T+Y93H (2%) in NS5A region and, L159F (2%), C316N (4%), A421V (7%), L159F+C316N (9%) and S556G (9%) in polymerase region. Mutations in more than one region were found in nine patients: one bearer of subtype 1a and eight bearer of subtype 1b. By using this methodology, a recombinant between subtypes 1a/1b was also identified in this study. We reported the first description of nearly full sequencing of HCV genomes (subtypes 1a and 1b) obtained from Brazilian patients. With the implementation of combined therapies without the use of IFN, the early detection of clinical importance variants may have significant application in reducing treatment failure due to the previous presence of viral resistance mutations.

Keywords: Hepatitis C virus. Genetic sequencing. Mutation. Antivirals. Molecular biology.

Lista de Figuras

Figura 1 – Patogênese do HCV associada com doença no fígado.....	18
Figura 2 – Representação da partícula viral do HCV.....	19
Figura 3 – Estrutura do genoma do HCV.....	20
Figura 4 – Representação esquemática do ciclo de replicação viral do HCV.....	23
Figura 5 – Prevalência relativa dos genótipos do HCV	26
Figura 6 – Barreira genética para o HCV em relação aos Agentes Antivirais de Ação Direta.....	28
Figura 7 – Representação da estrutura da NS3-4A Protease.....	31
Figura 8 – Representação da estrutura da proteína NS5A.....	32
Figura 9 - Representação da estrutura da NS5B Polimerase.....	33
Figura 10 – Representação do desenho do estudo.....	38
Figura 11 - Representação esquemática das etapas envolvidas no sequenciamento com o Ion Torrent™ PGM.....	44
Figura 12 – Visualização das variantes detectadas no sequenciamento de nova geração.....	48
Figura 13 - Padrão de bandas dos fragmentos amplificados obtido no estudo.....	49
Figura 14 - Relatório gerado ao final do sequenciamento.....	51
Figura 15 – Presença do recombinante inter-subtipo 1a/1b na amostra 051-1a confirmado pelo programa SimPlot.....	66
Figura 16 – Árvore filogenética baseada na região codificadora completa do HCV subtipos 1a e 1b.....	68
Figura 17- Árvore filogenética baseada nas sequências do HCV subtipo 1b e da amostra recombinante 051_1a # (846 pb).....	69

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores utilizados na RT-PCR para os subtipos 1a e 1b do HCV.....	38
Tabela 2 - Substituições no HCV que conferem diminuição da susceptibilidade aos medicamentos em fase de estudo e aprovados pelo <i>US Food and Drug Administration</i> (FDA).....	46
Tabela 3 - Dados demográficos dos pacientes HCV 1a (n=51) e HCV 1b (n=49).....	50
Tabela 4 - Frequência e cobertura das RAVs detectadas para a região NS3-4A do HCV subtipo 1a (n=50).....	53
Tabela 5 - Frequência e cobertura das RAVs detectadas para a região NS3-4A do HCV subtipo 1b (n=49).....	54
Tabela 6 - Frequência e cobertura das RAVs detectadas para a região NS5A do HCV subtipo 1a (n=50).....	56
Tabela 7 - Frequência e cobertura das RAVs detectadas para a região NS5A do HCV subtipo 1b (n=48).....	57
Tabela 8 - Frequência e cobertura das RAVs da região NS5B do HCV subtipo 1a (n=50).....	60
Tabela 9 - Frequência e cobertura das RAVs detectadas na região NS5B do HCV subtipo 1b (n=45).....	61
Tabela 10 - Frequência e cobertura das RAVs detectadas para as regiões NS3-4A, NS5A e NS5B do HCV subtipo 1a (n=50).....	63
Tabela 11 - Frequência e cobertura das RAVs detectadas para as regiões NS3-4A, NS5A e NS5B do HCV subtipo 1b (n=45).....	64

Lísta de Abreviaturas e Síglas

A	Alanina
ASV	Asunaprevir
BOC	Boceprevir
C	Cisteína
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CLDN1	Claudina 1
D	Ácido Aspártico
DAA	<i>Direct Antiviral Agent</i>
DCV	Daclatasvir
DNV	Danoprevir
DSV	Dasabuvir
E	Ácido Glutâmico
EBV	Elbasvir
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal
EphA2	Receptor Ephrin A2
F	Fenilalanina
F1	Fragmento 1
F2	Fragmento 2
F3	Fragmento 3
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
g	giro
G	Glicina
GAG	Glicosaminoglicanos
GZR	Grazoprevir
H	Histidina
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i>
I	Isoleucina
IFN	Interferon
IN	Inibidor Nucleotídeo
INN	Inibidor Não Nucleosídeo
IP	Inibidor da Protease
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>
ISP	<i>Ion Sphere Particle</i>
K	Lisina

Lista de Abreviaturas e Síglas

kb	quilobases
L	Leucina
LDLR	Receptor de lipoproteína de baixa densidade
LDV	Ledipasvir
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral-signaling protein</i>
µL	Microlitro
M	Metionina
motivo GDD	Motivo aminoacídico Glicina-Ácido Aspártico-Ácido Aspártico
N	Asparagina
ng	Nanograma
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
NPC1L1	Niemann-Pick C1 tipo 1
NS3/4A	<i>Non-structural protein 3-4A</i>
NS5A	<i>Non-structural protein 5A</i>
NS5B	<i>Non-structural protein 5B</i>
NTP	Dinucleosídeo Trifosfato
OCLN	Ocludina
OMB	Ombitasvir
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
P	Prolina
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Peg-IFN	Interferon α-Peguilado
PR	Interferon α-Peguilado e Ribavirina
PTV	Paritaprevir
Q	Glutamina
R	Arginina
RAV	<i>Resistance Associated Variant</i>
RBV	Ribavirina
RNA	Ácido Ribonucleico
RT	Transcrição Reversa
RVS	Resposta Viroológica Sustentada
S	Serina
SIM	Simeprevir

Lísta de Abreviaturas e Síglas

SOF	Sofosbuvir
SR-BI	Receptor scavenger classe B tipo I
T	Treonina
TLR3	<i>Toll Like Receptor 3</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
3D	Paritaprevir+Ombitasvir+Dasabuvir+Ritonavir
TVR	Telaprevir
UTR	<i>Untranslated Region</i>
V	Valina
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
VEL	Velpatasvir
VOX	Voxilaprevir
W	Triptofano
Y	Tirosina

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	Hepatite C.....	18
1.2	Vírus da hepatite C (HCV).....	19
1.3	Ciclo de replicação viral.....	22
1.4	Transmissão e Diagnóstico do HCV.....	24
1.5	Epidemiologia do HCV.....	25
1.6	Tratamento da Hepatite C.....	27
1.6.1	<i>Inibidores da Protease (IP).....</i>	29
1.6.2	<i>Inibidores da NS5A.....</i>	31
1.6.3	<i>Inibidores da Polimerase.....</i>	33
1.7	Detecção das variantes associadas à resistência.....	34
2	OBJETIVO.....	35
3	CASUÍSTICA E METODOLOGIA.....	36
3.1	População do estudo.....	36
3.2	Aspectos Éticos.....	36
3.3	Metodologia para Detecção das Variantes existentes no genoma do HCV.	37
3.3.1	<i>Extração do RNA viral.....</i>	37
3.3.2	<i>Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR).....</i>	37
3.3.3	<i>Etapas envolvidas no Sequenciamento de Nova geração.....</i>	39
3.3.3.1	<i>Construção da biblioteca.....</i>	40
3.3.3.1.1	<i>Fragmentação da biblioteca.....</i>	40
3.3.3.1.2	<i>Reparo das extremidades e ligação aos adaptadores.....</i>	40
3.3.3.1.3	<i>Seleção do tamanho da biblioteca e quantificação por PCR em tempo real</i>	41
3.3.3.1.4	<i>Amplificação da biblioteca.....</i>	41
3.3.3.2	<i>Preparo da biblioteca.....</i>	42
3.3.3.2.1	<i>PCR em emulsão e etapa de enriquecimento das esferas.....</i>	42
3.3.3.2.2	<i>Controle de qualidade das ISP.....</i>	42
3.3.3.3	<i>Reação de sequenciamento.....</i>	43
3.3.3.4	<i>Análise dos dados.....</i>	44
4	RESULTADOS.....	49
4.1	Resultados obtidos no Sequenciamento de Nova Geração.....	50
4.1.1	<i>Análise das mutações encontradas na região da protease NS3-4A dos subtipos 1a e 1b do HCV.....</i>	52

Sumário

4.1.2	<i>Análise das mutações encontradas na região NS5A dos subtipos 1a e 1b do HCV.....</i>	55
4.1.3	<i>Análise das mutações detectadas na região NS5B dos subtipos 1a e 1b do HCV.....</i>	59
4.1.4	<i>Análise das múltiplas substituições envolvendo as regiões NS3-4A, NS5A e NS5B dos subtipos 1a e 1b do HCV.....</i>	62
4.1.5	<i>Recombinante inter-subtipo 1a/1b.....</i>	66
5	DISCUSSÃO.....	70
6	CONCLUSÃO.....	78
	REFERÊNCIAS.....	79
	APÊNDICE.....	96
	A - Relatórios do sequenciamento de nova geração.....	96
	B - Artigos publicados.....	104

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hepatite C

Hepatite é um termo geral utilizado para designar a ocorrência de inflamação no fígado e pode ser causada por diversos mecanismos, inclusive por ação de agentes infecciosos. As hepatites virais podem ser causadas por diferentes vírus, conhecidos como vírus das hepatites A, B, C, D e E ¹.

A hepatite C é causada pelo vírus da hepatite C (HCV) e representa um importante problema de saúde pública, sendo que a maioria (50 a 80%) dos indivíduos infectados desenvolve a forma crônica da doença, com possibilidade de progressão para esteatose, fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular ² (Figura 1). Como o curso da doença apresenta uma progressão lenta e, na maioria das vezes, assintomática, a taxa de detecção das infecções é, provavelmente, subestimada ³.

Figura 1 - Patogênese do HCV associada com doença no fígado. Aproximadamente 3% da população mundial está infectada com o HCV. A maioria (cerca de 50 a 80%) dos indivíduos infectados apresenta infecção persistente, podendo desenvolver esteatose e cirrose hepática. A infecção crônica pode predispor a ocorrência de carcinoma hepatocelular em torno de 3 a 5% dos pacientes. Fonte: Modificado de Ke et al.⁴

1.2 Vírus da hepatite C

O HCV foi clonado e identificado em 1989, sendo o principal agente etiológico das hepatites conhecidas até então como “não-A, não-B” ⁵. Pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Hepacivirus*, é um vírus envelopado com cerca de 50 nanômetros de diâmetro ⁶ (Figura 2).

Figura 2 - Representação da partícula viral do HCV. Ilustração do envelope formado pelas glicoproteínas E1 e E2, o nucleocapsídeo formado pela proteína estrutural Core e o RNA fita simples de aproximadamente 9,6 Kb.

Fonte: Modificado de Lindenbach et al.⁷

O genoma do HCV é formado por uma fita simples de RNA de polaridade positiva com aproximadamente 9.600 nucleotídeos, contendo uma região aberta de leitura (ORF) capaz de produzir uma poliproteína precursora de aproximadamente 3.000 aminoácidos ⁸. A replicação ocorre no citoplasma e o vírus não se integra ao genoma do hospedeiro ⁹.

Duas regiões não traduzidas (UTR) altamente conservadas estão presentes nas extremidades do genoma, com a extremidade 5'UTR contendo o sítio interno de entrada do ribossomo (IRES), que inicia a etapa de tradução ^{10,11}. A poliproteína (Figura 3) é processada pela ação de proteases celulares e virais resultando em dez proteínas, classificadas como proteínas estruturais (proteínas que formam a partícula viral: Core, proteínas do envelope E1 e E2) e proteínas não estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) ^{11,12}.

Figura 3 - Estrutura do genoma do HCV. Representação da região codificadora do genoma flanqueada pelas extremidades não codificadoras 5'UTR e 3'UTR. As 10 proteínas virais estão identificadas com suas respectivas posições referentes aos aminoácidos codificados a partir do Core na poliproteína precursora.

Fonte: Gaspareto, Karine V.

A proteína estrutural Core é a mais conservada entre os diferentes genótipos do HCV e constitui o nucleocapsídeo, que engloba o RNA, sendo essencial para a montagem da partícula viral ^{13,14}. As glicoproteínas E1 e E2 encontram-se distribuídas no envelope do HCV, possuindo papel importante nos mecanismos de entrada do vírus nos hepatócitos e evasão do sistema imunológico ¹⁵.

A proteína p7 representa uma pequena proteína de membrana que é capaz de oligomerizar e formar canais de prótons. O preciso mecanismo de atuação da p7 ainda não foi determinado, entretanto tem sido mostrado ser essencial para a infecção, mas não para a replicação viral ¹⁶.

A proteína NS2 é uma protease que participa da montagem da partícula viral, realizando a clivagem entre as regiões NS2 e NS3. A proteína NS3 codifica uma serina protease na região N-terminal e uma RNA helicase-NTPase na região C-terminal. A NS3 protease possui uma ação crítica no processamento da poliproteína do HCV, pois cliva quatro sítios a partir da região NS3 (NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/NS5A e NS5A/NS5B). Outra ação dessa proteína é a clivagem da proteína adaptadora do TLR3 (TRIF) e da proteína sinalizadora mitocondrial antiviral (MAVS), resultando no bloqueio do mecanismo de indução celular do interferon (IFN) tipo I ¹⁷.

Outra proteína é a NS4A que forma um complexo estável com a NS3 de forma a atuar como um cofator para a NS3 protease. A proteína NS3-4A tem sido alvo para o desenvolvimento de inibidores. A NS3 helicase do HCV apresenta domínios semelhantes às proteínas celulares, por isso a dificuldade em desenvolver inibidores

específicos para esse alvo, pois os inibidores podem conferir toxicidade para o paciente. Como resultado, maior atenção foi dada para o desenvolvimento de inibidores com ação em regiões conservadas e que não afetam ATPases e GTPases celulares. Por esse motivo, foram desenvolvidos inibidores que atuam especificamente no sítio ativo essencial da protease NS3¹⁸.

A NS4B não tem seu mecanismo de ação completamente elucidado, embora estudos tenham relatado sua participação em induzir a formação do complexo de membrana junto ao retículo endoplasmático rugoso durante a replicação viral.

A NS5A é uma fosfoproteína dimérica que consiste em três domínios estruturais, sendo o domínio I (aminoácido 37 a 213) essencial para a replicação do RNA viral. Os domínios II (aminoácido 250 a 342) e III (aminoácido 356 a 447) são menos caracterizados. O domínio II está envolvido com a ligação à ciclofilina A e tem sido associado com o antagonismo da resposta imune inata ao HCV. O domínio III parece ser importante para a montagem da partícula viral infecciosa. Como a proteína NS5A está envolvida em múltiplas etapas da replicação do HCV, inibidores da NS5A podem ter atividade antiviral potente¹⁹⁻²¹.

NS5B é uma RNA polimerase RNA dependente (RdRp), enzima chave para o processo de replicação viral e um alvo atrativo para o desenvolvimento de inibidores. A estrutura da NS5B corresponde à comparação da arquitetura da mão direita, sendo dividida em três subdomínios, referidos como palma (*Palm*), polegar (*Thumb*) e dedos (*Fingers*). O sítio ativo da enzima, localizado dentro do domínio da palma, possui um motivo GDD altamente conservado e menos susceptível a mutações, sendo um alvo importante para o desenvolvimento de fármacos²². Quatro sítios alostéricos presentes na enzima NS5B, dois na região referida como polegar (domínios 1 e 2) e outros dois na região da palma (domínios 1 e 2), são alvos de estudo e desenvolvimento de inibidores²³.

A RNA polimerase viral apresenta uma taxa de mutação por ciclo de replicação de aproximadamente $2,5 \times 10^{-5}$ mutações por nucleotídeo²⁴. Como o HCV tem uma alta taxa de replicação, produzindo em torno de 10^{12} vírions por dia, possivelmente todas as posições no vírus poderiam ser mutadas diariamente, com o desenvolvimento de múltiplas mutações entre os genomas, originando as *quasispecies* (Neumann, 1998).

1.3 Ciclo de replicação viral

A partícula viral interage com receptores localizados na superfície celular e inicia o processo de entrada, que também pode ocorrer por transmissão direta entre as células. Após a fusão e liberação do RNA viral, o genoma do HCV é traduzido, resultando em uma poliproteína que é posteriormente processada. A etapa de replicação ocorre no retículo endoplasmático, onde será formado um complexo de membrana ²⁵. As proteínas NS3-4A, NS4B, NS5A e NS5B constituem as proteínas virais que participam da maquinaria de replicação, responsável por replicar o RNA fita positiva através da formação de um RNA fita negativa intermediária ²⁶.

A replicação do HCV é catalisada pela polimerase NS5B. Enquanto que o domínio NTPase/helicase da proteína NS3 apresenta funções significativas na replicação viral, incluindo a atividade da NTPase estimulada por RNA, ligação ao RNA e desdobramento de regiões do RNA que apresentam estruturas secundárias. A proteína NS4B inicia a formação do complexo de replicação e a proteína NS5A tem importante papel na regulação ²⁷.

O HCV utiliza a via de biossíntese da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) para produzir a partícula viral madura e exportá-la do hepatócito por mecanismos de secreção ^{28,29}. As interações entre as proteínas virais ou a maquinaria celular necessária no ciclo de replicação podem ser alvos potenciais para a ação de antivirais ²⁵ (Figura 4).

Figura 4 - Representação esquemática do ciclo de replicação viral do HCV. A partícula viral associada com lipoproteínas entram no hepatócito através da ligação com (co)receptores e endocitose mediada por clatrina. Os (co)receptores conhecidos tetraspanina, CD81, receptor scavenger classe B tipo I (SR-BI), Claudina 1 (CLDN1), Ocludina (OCLN), glicosaminoglicanos (GAG), receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR), receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), receptor Ephrin A2 (EphA2) e Niemann-Pick C1 tipo L1 (NPC1L1) estão indicados no esquema. Após a liberação do RNA viral de polaridade positiva, o mesmo é traduzido e processado em diferentes proteínas virais. As proteínas não-estruturais participam da replicação do RNA dentro do complexo de membrana. As partículas virais contendo o RNA viral recém-sintetizado e as proteínas estruturais formam uma nova partícula viral. Na figura, três alvos envolvendo diferentes etapas do ciclo viral foram destacados, ilustrando a possibilidade da ação de inibidores em proteínas não-estruturais específicas do HCV.
Fonte: Modificado de Ke et al.⁴

O único modelo animal que é infectado pelo HCV é o chimpanzé, que tem sido crucial nos estudos de imunidade e patogênese do HCV³⁰. Pequenos animais não são naturalmente infectados pelo HCV, havendo a necessidade do desenvolvimento de quimera com fígado humano³¹ e camundongos geneticamente modificados susceptíveis ao HCV³². O estabelecimento de sistemas de cultura de células tem sido um processo lento, mas atualmente estão disponíveis sistemas seletivos de replicação

³³, pseudo-partículas baseadas em retrovírus ^{34,35} e sistemas de replicação viral completo ³⁶⁻³⁸, que tem sido essenciais para a melhor compreensão do ciclo de replicação viral, possibilitando a identificação de alvos promissores e o desenvolvimento de compostos antivirais ²⁵.

1.4 Transmissão e Diagnóstico do HCV

A transmissão do HCV ocorre principalmente por via parenteral, incluindo o compartilhamento de seringas durante o uso de drogas injetáveis, acidentes com materiais perfuro-cortantes contaminados, confecção de tatuagem e colocação de *piercings*, transfusões de sangue e hemocomponentes. Em especial, pacientes com doenças hematológicas que necessitam constantemente de transfusões, estão mais expostos ao risco de contrair a infecção, bem como pacientes com insuficiência renal crônica pelo processo de diálise e aqueles submetidos a transplantes de órgãos sólidos e outros procedimentos nosocomiais ³⁹. Estes riscos eram maiores até 1993 quando a triagem da infecção pelo HCV foi iniciada nos bancos de sangue. Com a implantação do Teste de Ácido Nucléico nos bancos de sangue, houve uma maior redução na transmissão do HCV por transfusão de hemocomponentes ⁴⁰.

Outras formas mais raras, mas que também devem ser levadas em consideração são as transmissões verticais e por via sexual ^{41,42}. O compartilhamento de materiais de higiene pessoal pode contribuir para a transmissão do vírus ⁴³. Em cerca de 10% a 40% dos indivíduos infectados pelo HCV não se consegue identificar a via de transmissão, o que deixa ainda aberta a possibilidade que existam outros mecanismos de infecção não identificados ⁴⁴⁻⁴⁶.

O diagnóstico da hepatite C baseia-se na detecção do anticorpo anti-HCV e na detecção do RNA viral utilizando testes de amplificação do ácido nucléico ⁴⁷. O teste de genotipagem viral continua tendo significativa importância, pois, mesmo com a introdução dos novos medicamentos, alguns genótipos apresentaram reduzidas taxas de resposta. Com isso, possíveis alterações na dosagem, adição de novos medicamentos e/ou modificações na duração do tratamento serão necessários de forma a possibilitar a implantação de combinações livres de IFN para pacientes com diferentes genótipos ⁴⁸.

1.5 Epidemiologia do HCV

A infecção pelo HCV é uma das principais causas da doença inflamatória crônica do fígado, cirrose e hepatocarcinoma ⁴⁹. A prevalência global de anti-HCV foi estimada em 1,6% (1,3% – 2,1%), equivalente a 115 (92 – 149) milhões de pessoas. A presença do RNA viral a prevalência foi de 1,1% (0,9% - 1,4%), correspondendo a 80 (64 – 103) milhões de pacientes ⁵⁰.

O HCV é conhecido por sua diversidade genética, sendo classificado em sete genótipos e 67 subtipos confirmados. A maioria dos genótipos do HCV detectados no mundo pertence ao genótipo 1, correspondendo aproximadamente a 70% das infecções ⁵¹ (Figura 5).

Na Inglaterra, a prevalência do HCV foi estimada em 0,4% no ano de 2005, sendo detectado o genótipo 1 em 45% das amostras analisadas: os subtipos 1a e 1b foram detectados em 22% e 12% das amostras, respectivamente, e 11% correspondiam aos demais subtipos do genótipo 1 ⁵². Na Alemanha, a prevalência do vírus foi de 0,5% em 2012, sendo que o genótipo 1 foi detectado em 63% dos casos, com 25%, 33% e 5% correspondendo aos subtipos 1a, 1b e demais subtipos, respectivamente ⁵³. Na Espanha, os subtipos 1a e 1b correspondiam a 24% e 41% dos casos, respectivamente ⁵⁴.

Na Turquia, o genótipo 1 foi detectado em 92% das amostras analisadas, sendo o subtipo 1b o mais frequente (84%) ⁵⁵. A Áustria também apresentou um número alto de detecção do genótipo 1 (80%), com os subtipos 1a, 1b e demais subtipos correspondendo a 20%, 52% e 8%, respectivamente ⁵⁶. No Canadá foram detectados 61% de genótipo 1, com 37% de subtipo 1a, 21% de subtipo 1b e 3% aos outros subtipos do genótipo 1 ⁵⁷. Nos EUA, 70% das infecções crônicas são causadas pelo genótipo 1 do HCV e, dentre esses, 55% correspondem ao subtipo 1a e 35% ao subtipo 1b ⁵⁸.

No Brasil, o genótipo 1 foi o mais frequente, com 64%. Os subtipos 1a e 1b foram detectados numa frequência de 24% e 40%, respectivamente ⁵⁹. No período compreendido entre 2005 a 2011, a prevalência de detecção do anti-HCV positivo no Brasil foi estimada em 1,38% ⁶⁰.

No estudo realizado por Cavalheiro et al.⁶¹, no qual analisaram a sorotipagem de 166 pacientes atendidos no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo no período de 1990 a 1997, verificou-se a maior frequência do genótipo 1 do HCV (70%), seguido do genótipo 3 (22,3%) e do genótipo 2 (4,2%). Infecção com dois ou mais genótipos foi detectada em 3,6% das amostras.

Os subtipos 1b, 1a e 3a do HCV foram detectados em 45,5% (n=81), 32% (n=57) e 18% (n=32), respectivamente, dos doadores de sangue atendidos na Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo⁶².

No estudo realizado por Lampe et al.⁶³, do total de 676 sequências que tiveram a região NS5B analisada, 321 (47,5%) correspondiam ao subtipo 1a, 170 (25,1%) ao subtipo 1b e 185 (27,4%) ao subtipo 3a.

Figura 5 - Prevalência relativa dos genótipos do HCV. (a) Prevalência relativa dos genótipos do HCV. O tamanho dos gráficos é proporcional ao número de casos soroprevalentes, como estimado por Mohd Hanafiah et al.⁶⁴. **(b)** Prevalência relativa do genótipo 1, exibindo sua vasta extensão geográfica e elevada frequência.

Fonte: Modificado de Messina et al.⁶⁵

1.6 Tratamento da Hepatite C

Até o final de 2010, o tratamento preconizado para a hepatite C crônica consistia em uma terapia dupla com Interferon alfa-peguilado (Peg-IFN) e Ribavirina (RBV). A terapia dupla apresentava uma taxa de resposta virológica sustentada (RVS) em torno de 40 a 50% entre os pacientes infectados com o HCV genótipo 1, e 70-80% de RVS é observada entre os pacientes infectados com os genótipos 2 e 3 ⁶⁶⁻⁶⁸.

No primeiro semestre de 2011, foram aprovados pela *US Food and Drug Administration* (FDA) dois Inibidores de Protease (IP), Telaprevir (TVR, Incivo™, Janssen-Cilag) e Boceprevir (BOC, Victrelis™, Merck Sharp-Dohme), indicados para o tratamento da infecção pelo HCV genótipo 1 em combinação com Peg-IFN e RBV (PR) ^{69,70}. Essas drogas foram denominadas antivirais de ação direta (DAA). Diferentes estudos indicaram um aumento significativo na RVS com a introdução dos DAA (em torno de 80%) ^{71,72}.

Em contraste à ação do Peg-IFN e da RBV, os DAA inibem diretamente as proteínas virais que participam do ciclo de replicação viral. Teoricamente, cada etapa do ciclo viral pode se tornar um alvo potencial para uma intervenção terapêutica. Como o genótipo 1 não é somente o mais prevalente mas também o mais difícil de tratar com a terapia PR, os primeiros inibidores de protease foram desenhados para atuar especificamente na protease do HCV genótipo 1 ⁷³. E como as proteínas NS3-5B participam da formação do complexo associado à membrana que é responsável pela replicação do genoma do HCV, os inibidores têm sido desenvolvidos com base na ação desses alvos ⁷⁴.

Em 2013, mais dois DAA foram aprovados pelo FDA, o Simeprevir (SIM, Olysio™, Janssen-Cilag), um inibidor de protease, e o Sofosbuvir (SOF, Sovaldi™, Gilead Sciences), primeiro inibidor da polimerase (NS5B) indicado para o tratamento da infecção pelo HCV genótipos 1, 2, 3 e 4 ⁷⁵.

Em 2014 na Europa, e em 2015 no Brasil, foi aprovado o primeiro inibidor de NS5A, o daclatasvir (DCV, Daklinza™, Bristol-Myers Squibb), para o tratamento dos genótipos 1, 2, 3 e 4 em associação com outros DAA ⁷⁶.

O esquema em monoterapia com DAA não é indicado porque mutações de resistência são detectadas em poucos dias após o início do tratamento resultando no

aumento da carga viral e falha à terapia. Por isso, DAA com diferentes alvos virais estão sendo pesquisados, de forma a diminuir a possibilidade de resistência cruzada ⁷⁷.

Dados de estudos clínicos têm sugerido que regimes de tratamento tendo como alvos múltiplos componentes do ciclo do HCV seriam mais eficazes em induzir maiores taxas de RVS sem a necessidade de empregar o IFN ⁷⁸⁻⁸⁰. Cada vez mais nos aproximamos de combinações de DAA que efetivamente eliminam o HCV e minimizam os efeitos adversos relacionados ao tratamento ⁸¹.

Conforme demonstrado na figura 6, análogos nucleotídeos têm maior barreira para resistência quando comparados com inibidores da protease NS3-4A, análogos não nucleotídeos e inibidores da proteína NS5A ⁸². Esta maior barreira para a resistência deve-se ao fato da enzima polimerase ser crucial para a etapa de replicação viral, sendo então uma região mais conservada e com menor probabilidade de ocorrerem mutações.

Figura 6 - Barreira genética para o HCV em relação aos Agentes Antivirais de Ação Direta. A barreira genética é definida pelo número de mutações necessário para o vírus se tornar resistente e pela probabilidade de selecionar mutação na presença do tratamento. Os inibidores da protease (1ª geração) apresentam menor barreira genética quando comparados aos demais inibidores, sendo que a maior barreira genética é encontrada nos inibidores nucleotídeos.

Fonte: Modificado de Halfon et al. ⁷⁷

No manual europeu para tratamento do HCV, seis combinações de medicamentos foram disponibilizadas para o genótipo 1⁸³. Combinações incluindo Peg-IFN e RBV tiveram a adição de um terceiro medicamento, o inibidor da NS3-4A (SIM), da NS5A (Ledipasvir, LDV) ou da NS5B (SOF). As combinações de DAA sem a inclusão de Peg-IFN correspondem a associações de um inibidor da NS5B e da NS5A SOF+LDV (Harvoni®, Gilead Sciences) e SOF+DCV, uma associação do inibidor da NS5B e da protease NS3-4A (SOF+SIM) e uma associação denominada 3D (Viekira Pak™, AbbVie), referente à combinação de inibidores da NS3-4A, NS5A e NS5B [Paritaprevir (PTV) + Ombitasvir (OMB) + Dasabuvir (DSV), respectivamente], com inclusão do ritonavir, empregado para inibir uma enzima hepática especial que normalmente metaboliza os inibidores de protease, citocromo P450-3A4 (CYP3A4). No ano de 2016, o FDA aprovou a combinação de Elbasvir (EBV) e Grazoprevir (GZP) (Zepatier™, Merck Sharp Dohme), inibidores das regiões NS5A e NS3-4A, respectivamente⁸⁴⁻⁸⁶. A combinação SOF + Velpatasvir (VEL) (Epclusa®, Gilead Sciences) também foi aprovada em 2016 pelo FDA e, a combinação SOF + VEL + Voxilaprevir (VOX) encontra-se em fase III de estudo.

Os medicamentos aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para tratamento da hepatite C foram SOF, SIM, DCV e o esquema 3D. Com exceção do último, todos os demais estão presentes nos Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas⁸⁷.

1.6.1 Inibidores da Protease (IPs)

Os IPs atuam durante o estágio inicial do ciclo de replicação do HCV por interferir na clivagem da poliproteína, entretanto outros DAA possuem diferentes alvos na replicação viral⁸⁸. O HCV requer uma serina protease (contendo aproximadamente 631 aminoácidos) altamente conservada para clivar as demais proteínas estruturais¹¹.

Os medicamentos aprovados TVR, BOC, PTV e ASV (aprovado em 2014 no Japão com o nome comercial Sunvepra®, Bristol-Myers Squibb)⁸⁹ e, em desenvolvimento Sovaprevir são derivados α -cetoamida lineares que se unem covalentemente e de forma reversível à serina da protease NS3-4A do HCV com uma cinética de ligação e dissociação lenta^{71,90}, mas perdem sua eficiência devido à

ocorrência de mutações de resistência (por exemplo, D168V e R155K). Os inibidores macrocíclicos aprovados, como o SIM, GZR, Vaniprevir (Vanihep®, Merck Sharp-Dohme) e, em desenvolvimento Danoprevir (DNV), que atuam por interações não covalentes no sítio ativo da enzima propiciam uma maior barreira genética para a resistência⁹¹⁻⁹⁵. Os mais recentes IPs em desenvolvimento possuem ação pan-genotípica, como o VOX e o Glecaprevir.

A barreira genética para a ocorrência de resistência aos IPs pode variar de acordo com os diferentes subtipos do HCV. A frequência das mutações de resistência foi duas vezes maior nos pacientes com o subtipo 1a quando comparada com pacientes com o subtipo 1b. A substituição do aminoácido na posição R155K, por exemplo, requer somente uma mudança em um nucleotídeo (transição) para conferir resistência para o subtipo 1a do HCV, enquanto que para o subtipo 1b é necessário ocorrer modificação em dois nucleotídeos, sendo que uma dessas mudanças precisa ser uma transversão⁹⁶.

Resistência aos inibidores lineares da protease NS3-4A está relacionada, geralmente, com substituições nas posições V36, T54, V55 e V170. A combinação de substituições nas posições V36 e A156 ou R155 atuam sinergicamente aumentando o nível de resistência. Já os inibidores macrocíclicos tendem a selecionar substituições nas posições Q80 e D168^{71,97}. Os inibidores lineares e macrocíclicos apresentam variantes associadas com resistência (RAVs) em comum, tais como as substituições nas posições 155 e D168^{97,98} (Figura 7).

A presença de polimorfismos basais ou mutações associadas à resistência ao TVR é muito baixa (<1%), especialmente para mutações com maior impacto na resistência⁹⁹.

O polimorfismo Q80K, detectado em pacientes com o subtipo 1a do HCV, tem um modesto impacto na atividade do SIM *in vitro*, mas pode atuar de forma a facilitar a emergência de mutações adicionais, especialmente em pacientes com fraca resposta ao IFN, o que resulta em uma menor taxa de RVS¹⁰⁰.

Figura 7 - Representação da estrutura da NS3-4A Protease. Os possíveis alvos de ocorrência de mutação estão indicados na figura.

Fonte: Bartenschlager et al.²⁷

1.6.2 Inibidores da NS5A

NS5A é uma fosfoproteína ligadora de zinco de aproximadamente 448 aminoácidos, essencial para a replicação do HCV³³. A fosfoproteína consiste em 3 domínios, apresentando uma estrutura dimérica no domínio I que exibe um grau de flexibilidade conformacional o que facilita o envolvimento em diversos estágios dentro do ciclo do HCV, além de ser o domínio mais conservado entre os diferentes genótipos do HCV¹⁰¹.

A proteína multifuncional NS5A pode ser encontrada no estado basal e hiperfosforilada (p56 e p58, respectivamente). A hiperfosforilação parece regular diferentes funções da NS5A, especificamente, replicação e formação da partícula viral^{102,103}. Os inibidores da proteína NS5A podem atuar em diversos estágios do ciclo do HCV, de forma a interromper a replicação viral. A maioria desses inibidores agem na cadeia N-terminal da proteína NS5A (Domínio I)¹⁰⁴.

O inibidor da região NS5A, DCV, por exemplo, atua em todos os genótipos do HCV com um bom perfil de segurança para o paciente, entretanto apresenta uma baixa barreira genética. A mutação Y93H foi identificada como a mais comum e capaz de conferir resistência à essa classe de inibidores²⁷. Outros inibidores, como o OMB e LDV foram desenvolvidos e são utilizados combinados com outras classes de DAA⁸³.

Alguns inibidores encontram-se em fase de desenvolvimento, como o VEL, EBV, Ravidasvir, Odalasvir, JNJ56914845, Pibrentasvir e Ruzasvir^{93,105}.

Os polimorfismos associados à resistência geralmente ocorrem nas posições L28M, R30Q, L31F/M/V, Q54H, P58S e Y93H/N para o HCV subtipo 1b^{19,106-108} e para o subtipo 1a, as mudanças ocorrem geralmente nas posições M28T/V, Q30E/H/R, L31M/V, P32L e Y93C/H/N^{19,106,107} (Figura 8).

A ocorrência de resistência cruzada pode ser observada em toda a classe de inibidores da proteína NS5A e mutações de resistência pré-existent são frequentes¹⁰⁶.

Figura 8 - Representação da estrutura da proteína NS5A. Os alvos com ocorrência de algumas das mutações de resistência já descritas estão destacados na figura.
Fonte: Bartenschlager et al.²⁷

1.6.3 Inibidores da Polimerase

Duas classes de inibidores da polimerase NS5B (591 aminoácidos aproximadamente) têm sido desenvolvidas: inibidores nucleotídeos (INs) e inibidores não-nucleosídeos (INNs). Os INs mimetizam o substrato natural da RNA polimerase RNA dependente e inibem o sítio ativo por serem incorporados à etapa de elongação do RNA causando a terminação da cadeia. Os INNs representam um grupo heterogêneo de compostos antivirais com capacidade de ligação em diferentes sítios alostéricos, o que resulta em uma mudança conformacional da proteína antes do complexo de elongação ser formado ⁷³.

Os INs compartilham características dos substratos naturais encontrados nas células, sendo então incorporados como um falso substrato e, uma vez fosforilados a nucleosídeos-trifosfato, causam a terminação da replicação do genoma viral ¹⁰⁹. Este grupo de agentes é efetivo contra todos os genótipos do HCV, por se ligarem em regiões altamente conservadas da região NS5B causando uma alta barreira para resistência e um pequeno número de efeitos colaterais. O primeiro inibidor nucleotídeo desenvolvido mostrou uma atividade antiviral moderada e alta toxicidade ¹¹⁰. O inibidor da polimerase SOF foi o único medicamento desenvolvido com sucesso até o momento (Figura 9). Encontra-se em fase II de estudo o medicamento Uprifosbuvir (MK-3682).

Figura 9 - Representação da estrutura da NS5B Polimerase. A posição do aminoácido S282 na estrutura proteica está em destaque, sendo uma das primeiras posições detectadas *in vitro* que conferem resistência ao SOF.

Fonte: Bartenschlager et al. ²⁷

Os INNs constituem uma classe mais heterogênea, ligando-se a sítios alostéricos da NS5B (DSV, Radalbuvir, Beclabuvir e TMC-647055) ¹¹¹. A barreira de resistência é baixa, devido este grupo não se ligar em regiões altamente conservadas. Além disso, a maioria dos medicamentos desse grupo possui de baixa a moderada atividade antiviral, não sendo ativa em todos os genótipos. No entanto, podem ser incluídos em regimes combinados demonstrando altos níveis de eficácia ²⁷.

As substituições L159F, S282T, C316N, L320F e V321A estariam associadas com a diminuição da susceptibilidade ao SOF ^{111,112}. Enquanto as substituições C316N/Y, M414T/L, L419S, A421V, R422K, M423I/T/V, Y448H, Y452H, A486V, P495L, V499A, G554D, S556G e D559G estariam associadas a uma diminuição na resposta aos INNs ¹¹¹.

1.7 Detecção das variantes associadas à resistência

A seleção de variantes associadas à resistência é influenciada por fatores como: a barreira genética do DAA, a dose, a aderência ao tratamento, a farmacocinética e a farmacodinâmica das drogas ¹¹³.

A detecção da RAV depende do método escolhido, sendo que o sequenciamento de Sanger, o sequenciamento clonal e o sequenciamento de nova geração apresentam uma porcentagem de 25, 5 e 0,5, respectivamente, de variantes que não são detectadas ^{77,114}.

No estudo realizado por Abdelrahman et al. ¹¹⁵, em 100% (15/15) dos pacientes que apresentaram falha ao tratamento com DAA foram detectadas variantes virais no pré e pós-tratamento e, o método utilizado foi o sequenciamento de nova geração (pirosequenciamento).

O sequenciamento de nova geração é uma ferramenta poderosa para a obtenção de informações a respeito da dinâmica das variantes entre as *quasispecies* do HCV ¹¹⁶, permitindo estudar a presença de variantes virais presentes em baixa frequência. Dessa forma, visando estudar a frequência das mutações de resistência aos inibidores da protease NS3-4A, da proteína NS5A e da polimerase NS5B, foi realizado o sequenciamento de nova geração utilizando amostras de pacientes com hepatite C crônica e sem tratamento prévio com os DAA.

2 OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo aplicar a técnica de sequenciamento de nova geração para sequenciar a região codificadora do genoma do HCV genótipo 1, incluindo os subtipos 1a e 1b e, identificar mutações associadas com a resistência aos DAA em pacientes sem tratamento prévio a esses medicamentos.

3 CASUÍSTICA E METODOLOGIA

3.1 População do estudo

Para a realização do estudo, foram utilizadas amostras obtidas pelo Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. As amostras são provenientes de doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue do Hemocentro de São Paulo, atendidos no período de 1993 a 2010 e identificados como infectados para o HCV através de métodos sorológicos. Esses pacientes foram recrutados e entrevistados com o objetivo de descrever a evolução da hepatite C (Projeto 0850/11: “Análise da evolução da infecção pelo vírus da hepatite C em doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo”).

Amostras de soro e plasma foram obtidas a partir de acesso venoso e foram encaminhadas ao Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) para a realização de testes sorológicos para hepatite C. Para os exames de carga viral (PCR Quantitativo para pesquisa do HCV RNA no plasma) e subtipagem viral (sequenciamento de Sanger da região NS5B do genoma do HCV), alíquotas de plasma foram enviadas ao Laboratório de Técnicas Especiais do Hospital Israelita Albert Einstein.

Alíquotas de soro e plasma foram encaminhadas ao Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical do Instituto de Medicina Tropical da FMUSP para a realização do sequenciamento de nova geração da região codificadora do HCV. Para o presente estudo, foram selecionados 100 indivíduos portadores crônicos do HCV genótipo 1.

3.2 Aspectos Éticos

Os pacientes que participaram do projeto concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Para a realização do presente estudo, foi apresentado à Comissão de Ética e Pesquisa do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da FMUSP um parecer solicitando a aprovação da emenda referente ao protocolo de pesquisa CAPPesq 0850/11. A pesquisa obteve a aprovação pela Comissão de Ética.

3.3 Metodologia para Detecção das Variantes existentes no genoma do HCV

3.3.1 Extração do RNA viral

A extração do RNA viral foi realizada a partir de 140 µL do soro ou plasma (armazenado a -80 °C) utilizando o QIAamp *Viral* RNA *mini Kit* (Qiagen, Hilden, Germany). Ao final da extração, o RNA foi eluído em 60 µL de tampão AVE e armazenado a -80 °C.

3.3.2 Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR)

Para a realização do estudo, iniciadores específicos foram desenhados com base em um banco de sequências obtidas para os subtipos 1a e 1b do HCV, disponibilizado online em <http://hcv.lanl.gov/components/sequence/HCV/search/searchi.html>.

As sequências foram alinhadas no programa *Bioedit Sequence Aligment Editor* versão 7.0.9.0 ¹¹⁷. O programa *Oligo Calc (Oligonucleotides Properties Calculator)*, disponível online em <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>, foi utilizado para determinar os parâmetros (temperatura de anelamento, número de nucleotídeos, quantidade de Guanina e Citosina (GC), peso molecular e verificação da presença de regiões de complementaridade) dos iniciadores.

Para a amplificação da região 5'UTR (posição 89), foi utilizado o iniciador PTC1 (5'CGTTAGTATGAGTGTCGTGC3'), previamente descrito ¹¹⁸. Os demais iniciadores foram desenhados para este estudo e sintetizados pela empresa Thermo Fisher Scientific (InvitrogenTM, Life Technologies, Brasil) (Tabela 1).

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores utilizados na RT-PCR para os subtipos 1a e 1b do HCV.

Iniciador	Sequência (5'-3')	Posição (H77)	Temperatura (°C)
*PTC1	CGTTAGTATGAGTGTCTGTC	89-108	52
R1_1a_5313	TCGTGACGACCTCCAGGTC	5295-5313	55
F2_1a_2534	CTGCTCCTGCTTGTGGATGAT	2534-2554	54
R2_1a_7105	GAGTCCAGAATCACCACCTTTGTTC	7082-7105	56
F3_1a_6286	GGGACTGGATATGCGAGGTG	6286-6302	56
R3_1a_9577	GCCGTGACTAGGGCTAAGATG	9557-9577	56
R1_1b_4910	CGCGTCATAGCACTCACAGAG	4890-4910	56
F2_1b_2169	GACTACCCATACAGGCTTTGG	2169-2189	54
R2_1b_7114	GGGTCGAAAGAGTCCAGGATTA	7093-7114	55
F3_1b_6638	CCACTACGTGACGGGCAT	6638-6655	53
R3_1b_9552	GGGCTAAGATGGAGCCACC	9552-9567	55

*118

A estratégia utilizada para a amplificação do genoma completo do HCV consistiu na amplificação de três fragmentos parcialmente sobrepostos (Figura 10).

Figura 10 - Representação do desenho do estudo. Obtenção da região codificadora através da obtenção de três fragmentos com regiões sobrepostas. Para o subtipo 1a, o primeiro (F1), o segundo (F2) e o terceiro fragmentos (F3) foram obtidos com 5224, 4571 e 3291 nucleotídeos, respectivamente. Para o subtipo 1b, 4821, 4945 e 2914 nucleotídeos foram amplificados para obter F1, F2 e F3, respectivamente.

Fonte: Gaspareto, Karine V.

Os fragmentos foram amplificados em apenas uma etapa e a transcrição reversa foi realizada no mesmo tubo da PCR. Para tanto, foi utilizado o reagente *SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity* (Invitrogen™, Thermo Fisher Brand, Carlsbad, CA, USA). Para a reação foram empregados 5 µL do RNA viral extraído e 0,5 µL de cada iniciador (20 picomolar) no volume total de reação de 25 µL.

O protocolo aplicado foi específico para cada subtipo do HCV. Para o subtipo 1a foi utilizado o seguinte protocolo de ciclagem: 55 °C por 30 minutos e 95 °C por 2 minutos para a síntese de cDNA e desnaturação, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 50 segundos, 55 °C por 35 segundos e 68 °C durante 1 minuto por kb para a reação de amplificação e, 68 °C por 5 minutos para a extensão final. Para o subtipo 1b, o protocolo utilizado foi: 52 °C por 30 minutos e 95 °C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 50 segundos, 52 °C por 35 segundos e 68 °C durante 1 minuto por kb e, 68 °C por 5 minutos para a extensão final.

O produto da RT-PCR (*amplicon*) foi visualizado em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris - Ácido Acético - Ácido Etilenodiaminotetracético (TAE) 1X contendo SYBR® *Safe DNA gel stain* (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). As bandas foram selecionadas de acordo com o peso molecular *Gene Ruler Express DNA Ladder ready-to-use* (Thermo Scientific, Fermentas, Vilnius, Lithuania). As bandas específicas de cada fragmento foram recortadas do gel de agarose e então purificadas utilizando o *PureLink® PCR Purification Kit* (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). Os *amplicons* foram quantificados utilizando o *Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit* (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, USA) e a leitura foi feita no equipamento Qubit® 2.0 *fluorometer* (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, USA).

3.3.3 Etapas envolvidas no Sequenciamento de Nova Geração

As etapas envolvidas no sequenciamento de nova geração são basicamente: construção e preparo da biblioteca de DNA, reação de sequenciamento e análise dos dados gerados.

3.3.3.1 Construção da biblioteca

3.3.3.1.1 Fragmentação da biblioteca

Os *amplicons* obtidos na etapa de RT-PCR foram diluídos em *Low TE* (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) com o intuito de ajustar a concentração para 2 ng/μL e após o ajuste foram submetidos à etapa de fragmentação. Foi realizada fragmentação mecânica (sonicação), utilizando para esse procedimento o equipamento Bioruptor® UCD-200 (Diagenode, Denville, NJ, USA). Para a obtenção de fragmentos em torno de 400 pares de bases, foram realizados dois ciclos de sonicação, sendo o primeiro ciclo de 15 minutos e o segundo, 9 minutos.

3.3.3.1.2 Reparo das extremidades e ligação aos adaptadores

Após a fragmentação, as extremidades foram reparadas com a adição de *End Repair Enzyme* (fornecida no *Ion Plus Fragment Kit*) de forma a possibilitar a adição de um íon fosfato nas extremidades 5' do DNA alvo previamente fragmentado para permitir a ligação dos adaptadores e *barcodes*. Para isso, foi adicionado ao volume de 50 μL da amostra fragmentada, 29 μL de água livre de nucleases, 20 μL do reagente 5X *End Repair Buffer* e 1 μL do reagente *End Repair Enzyme*, sendo a reação mantida durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente ao protocolo de reparo, foi realizada a etapa de purificação com Agencourt® AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Após a primeira etapa de purificação, foram adicionados os *barcodes* e os adaptadores e, em seguida, uma nova purificação foi realizada utilizando o mesmo reagente Agencourt® AMPure XP (Beckman Coulter, USA).

Para a etapa de ligação aos adaptadores contendo *barcodes*, foi empregada a seguinte reação: 25 μL da amostra purificada e com as extremidades reparadas, 10 μL de 10 x *Ligase Buffer*, 2 μL de *Ion P1 Adapter*, 2 μL de *Ion Xpress™ Barcode*, 2 μL dNTP Mix, 49 μL de água livre de nucleases, 2 μL de *DNA Ligase* e 8 μL de *Nick Repair Polymerase*. A reação foi incubada a 25 °C por 15 minutos e a 72 °C por 5 minutos.

3.3.3.1.3 Seleção do tamanho da biblioteca e quantificação por PCR em tempo real

Após a adição dos *barcodes* e adaptadores, a biblioteca foi selecionada empregando o e-Gel® *SizeSelect*TM Agarose gels 2% (InvitrogenTM, Thermo Fisher Scientific, USA), reavendo fragmentos de aproximadamente 480 pares de bases.

Para proceder à etapa de PCR em emulsão, foi realizada previamente a quantificação por PCR em tempo real no equipamento 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA) para verificar a necessidade de diluição ou amplificação prévia da biblioteca. Para essa etapa, cinco diluições (10 x) seriadas da biblioteca controle *E. coli* DH10B e a diluição 1:20 das amostras foram realizadas de forma a obter a quantificação absoluta do DNA presente em cada amostra. Para a reação foi utilizado o volume de 5 µL da amostra diluída, 10 µL do reagente *Ion Library TaqMan® qPCR Mix 2 x*, 1 µL de *Ion Library TaqMan® Quantitation Assay 20 x* e 4 µL de água livre de nucleases. O protocolo utilizado foi: 50 °C por 2 minutos e 95 °C por 20 segundos, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 3 segundos e 60 °C por 30 segundos.

3.3.3.1.4 Amplificação da biblioteca

As amostras que apresentaram quantidades de DNA inferiores ao limite necessário para realizar a PCR em emulsão (26 picomolar) foram submetidas a uma nova etapa de amplificação para tentar obter a quantidade de DNA suficiente para proceder à próxima etapa (PCR em emulsão). Para a etapa de amplificação, foram utilizados 100 µL de *Platinum PCR SuperMix High Fidelity*, 5 µL de *Library Amplification Primer Mix* e 25 µL da biblioteca. O protocolo utilizado foi: 95 °C por 5 minutos, seguido por 8 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 58 °C por 15 segundos e 70 °C por 1 minuto.

Posteriormente, o produto da amplificação foi purificado (com o reagente AMPure) e quantificado novamente por PCR em tempo real. As bibliotecas foram diluídas para a obtenção de quantidades iguais de cada amostra e então, foi realizada a junção em uma mesma alíquota.

3.3.3.2 Preparo da biblioteca

3.3.3.2.1 PCR em emulsão e etapa de enriquecimento das esferas

Com a biblioteca em quantidades equimolares de cada amostra, foi realizada a PCR em emulsão no Equipamento *Ion OneTouch™ 2* (Thermo Fisher Scientific, USA) com o preparo da solução de amplificação (25 µL do Reagente X, 500 µL de *Ion PGM™ Template OT2 400 Reagent Mix*, 300 µL de *Ion PGM™ Template OT2 400 PCR Reagent B*, 50 µL de *Ion PGM™ Template OT2 400 Enzyme Mix*, 25 µL da biblioteca diluída e 100 µL do *Ion PGM™ Template OT2 400 Ion Sphere Particles*) e utilização do kit *Ion PGM™ Template OT2 400 Kit* (Thermo Fisher Scientific, USA). Os fragmentos de DNA, com sequências específicas de adaptadores ligados às extremidades, foram amplificados clonalmente por PCR em emulsão (na etapa de preparo do *template*), sobre a superfície de esferas de aproximadamente 3 micrômetros de diâmetro, denominadas *Ion Sphere Particles* (ISP) ¹¹⁹.

Após a PCR em emulsão, a biblioteca foi submetida à etapa de enriquecimento das ISPs, utilizando *Ion PGM™ Enrichment Beds* (Thermo Fisher Scientific, USA) e o equipamento *Ion OneTouch™ ES* (Thermo Fisher Scientific, USA). Para a etapa de enriquecimento, uma tira com 8 poços foi utilizada, sendo que no primeiro poço foi aliquoteado o volume de 100 µL da solução de ISPs contendo a biblioteca, no segundo poço foi aliquoteado 130 µL de *Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 Beads* ressuspendido em *MyOne™ Beads Wash Solution*, nos terceiro ao quinto poços foram aliquoteados 300 µL de *Ion OneTouch Wash Solution* e no sétimo poço foi aliquoteado 300 µL da Solução de *Melt-Off* (feita pela mistura de 280 µL de solução Tween e 40 µL de NaOH 1M).

3.3.3.2.2 Controle de qualidade das ISPs

Ao mesmo tempo, foi realizado o controle de qualidade das esferas para verificar a porcentagem de policlonalidade (Kit *Ion Sphere™ Quality Control*, Thermo Fisher Scientific, USA). Uma alíquota de 2 µL da amostra foi adicionada a 19 µL de *Annealing Buffer* e 1 µL de *Ion Probes*. A quantificação foi realizada no *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, USA), que permite a leitura das fluorescências

emitidas pelos fluoróforos Cy-5® e FAM™. A fluorescência FAM™ marca o adaptador P1, que está acoplado às *Ion Spheres*, enquanto que o Cy-5® marca o adaptador A, que se encontra na extremidade 3' dos fragmentos.

3.3.3.3 Reação de sequenciamento

O *Ion 314™ chip v2* possui cerca de 1 milhão de sensores e pode sequenciar em torno de 30 a 100 Mb em um período de 2 a 4 horas, gerando aproximadamente 400 a 550 mil leituras por corrida (Online: <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/4482261>). Para uma detecção com alta confiança de mutações presentes em frequências tipicamente baixas e variáveis, a taxa de cobertura total requerida deve ser de 1.000 a 2.000 X (Online: https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_marketing/documents/generaldocuments/cms_094273.pdf).

Para a realização do cálculo de cobertura, a taxa de cobertura foi superestimada para garantir a chamada de variantes. Como foram obtidos 3 fragmentos para cada amostra, o número de fragmentos foi multiplicado pelo número de cobertura que se pretendia obter, sendo obtido o valor de 10.000 X. Como o sequenciador gera em torno de 500.000 leituras, o valor das leituras foi dividido pela cobertura dos 3 fragmentos (10.000 X), resultando em 50 amostras por chip de 314.

A biblioteca pronta (ligada em partículas esféricas) foi inserida no chip semicondutor e, durante a reação de polimerização (ao serem adicionados os nucleotídeos), íons H^+ são gerados induzindo uma mudança local no pH que é detectada e medida¹²⁰. A figura 11 ilustra, de forma sucinta, todas as etapas envolvidas no sequenciamento de nova geração.

Figura 11 - Representação esquemática das etapas envolvidas no sequenciamento com o Ion Torrent™ PGM. Os fragmentos de DNA são flanqueados com sequências de adaptadores específicas, que são clonalmente amplificadas em partículas esféricas (*Ion Sphere™ Particles*) por PCR em emulsão. As partículas esféricas contendo a biblioteca amplificada são carregadas no chip que é introduzido no Ion PGM™. Os resultados do sequenciamento são exportados do equipamento para o *Torrent Browser* e podem ser analisados em programas de bioinformática

Fonte: Disponível online em https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_marketing/documents/generaldocuments/cms_094273.pdf.

Metade do volume da amostra recém-enriquecida foi aliquoteada e então, 5 µL do reagente *Control Ion Sphere Particles* foi adicionado. Após centrifugação a 15.500 g durante 2 minutos, o sobrenadante foi removido, restando aproximadamente 3 µL do volume inicial ao qual foi adicionado 3 µL de *Sequencing Primer*. Essa reação foi incubada a 95 °C por 2 minutos e a 37 °C por 2 minutos. Após o anelamento do *Sequencing Primer*, foi adicionado 1 µL do reagente *Ion PGM™ Sequencing 400 v2 Polymerase*, obtendo um volume de 7 µL, que foi utilizado para o carregamento do *Ion 314 chip*. A reação de sequenciamento foi realizada no sequenciador de terceira geração *Ion PGM Sequencer / Ion Torrent™ Next-Generation Sequencing* (Thermo Fisher Scientific, USA).

3.3.3.4 Análise dos dados

As sequências foram mapeadas e alinhadas com as sequências de referência H77 (1a.US.1977.H77_NC004102), para o subtipo 1a e Con1 (1b.DENC1_AJ238800), para o subtipo 1b do HCV, no programa *Torrent Suite™ Software* (Thermo Fisher Scientific, USA).

Para as análises de variantes, subtipos e cobertura das sequências foram utilizados os *plugins* *Variant Caller*, *Pathogen Analyzer* e *Coverage Analyzer*, respectivamente, todos disponibilizados no programa *Torrent Suite*. Para a análise das variantes, foram considerados os parâmetros de células somáticas (análise de baixa estringência), com frequência de alelo mínima de 0,02, qualidade mínima de 100 para a chamada de variantes, frequência de variantes mínima de 2, frequência de variantes mínima em cada fita de 1, viés máximo das fitas considerado de 0,95 e qualidade relativa mínima de leitura de 6,5. Foram analisadas as posições dos aminoácidos relacionadas com possibilidade de predispor à resistência aos DAA, sendo listadas na tabela 2.

Tabela 2 - Substituições no HCV que conferem diminuição da susceptibilidade aos medicamentos em fase de estudo e aprovados pelo *US Food and Drug Administration* (FDA)

Posições de aminoácidos descritas na literatura	
Inibidores da Protease (NS3-4A):	
Boceprevir	V36A/M , F43S, T54A/S/G/C , V55A/I , R155K/T , A156S/T/V , V158I, I*V170F*A/T , M175L
Telaprevir	V36A/I/M/G/L , T54A/S , I132V, R155K/T/G/M , A156F/N/S/T/V , D168N
Simeprevir	V36M, Q41R , F43I/S/V , Q80H/K/R/L , R109K , S122A/G/R , R155K , A156G/T/V , D168A/I/N/V/E/H/T , I170T
Asunaprevir	V36A/M , F43I/S , Q80K/R , R155K , A156S/T/V , D168A/G/H/V/Y
Grazoprevir	V36M , T54S , Q80K , R155K , A156T/V , D168E
Paritaprevir	V36M/A/G, V55I, R155K , A156T/V , D168A/V/Y/E/K
Danoprevir	V36M/A/G, V55I, R155K , D168E/T
Vaniprevir	Q41R , F43S, R155K , A156T , D168Y
Inibidor da Proteína NS5A:	
Daclastavir / Ledipasvir / Ombitasvir	M28V/A/T , Q30R/E/H , L31V/M/F , P32L, Q54H/N/Y , H58D, Q62R/E, A92K/T , Y93H/N/C
Inibidores da Polimerase NS5B:	
Sofosbuvir	S282T , L159F , C316N/Y , L320I/F , V321A
TMC 647055	A421V , P495L/S/T , V499A
Radalbuvir (GS-9669)	L419S , R422K , M423A/T/V , I482L, A486V
Dasabuvir	C316Y , S368T, M414T , Y448H , G554D , S556G , D559G
Beclabuvir	A421V , V499A
Variantes resistentes destacadas em negrito	

As sequências e as variantes obtidas foram visualizadas no programa *Integrative Genomics Viewer* (IGV) *version* 2.3.52 (disponível para download online em: <https://www.broadinstitute.org/software/igv/download>). A figura 12 ilustra as substituições geradas pelo *plugin Variant Caller* sendo visualizadas no *Torrent Suite* (a), no qual são fornecidas as variantes com base na posição do nucleotídeo da sequência de referência, assim como as frequências dessas variantes e a qualidade da análise e, (b) o programa IGV permite visualizar a distribuição das variantes na amostra sequenciada. Para a análise estatística foi utilizado o programa *GraphPad Prism* 5.

Para a obtenção das sequências consenso foi utilizado o programa *CLC Workbench* 6.0 (CLC Bio, Aarhus, Denmark). As sequências foram mapeadas e alinhadas com base nas sequências de referência obtidas do *Los Alamos HCV Sequence Database* (<http://www.hcv.lanl.gov>; H77 para o subtipo 1a e Con 1 para o subtipo 1b; *GenBank*: NC_004102 e AJ238799, respectivamente). Para a análise das sequências e verificação da subtipagem, foi empregado o programa *BioAfrica* (<http://www.bioafrica.net/rega-genotype/html/subtypinghcv.html>)¹²³, sendo o recombinante confirmado pelo programa *SimPlot* (*window width* e *step size* de 350-400 pb e 50 pb, respectivamente)¹²⁴. Na análise filogenética, as sequências foram alinhadas e editadas utilizando um banco de dados do *síte Los Alamos HCV Sequence Database* usando o software *BioEdit* e o programa *CLUSTAL W* (versão 7.0.8). A árvore filogenética foi construída através do método da máxima verosimilhança (bootstrap com 1.000 replicatas) e do modelo GTR+G+I de substituição dos nucleotídeos no software *MEGA* (versão 5.0). A árvore filogenética foi visualizada e editada em *FigTree* versão 1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Figura 12 - Visualização das variantes detectadas no sequenciamento de nova geração. As substituições podem ser visualizadas tanto (a) no programa *Torrent Suite™ Software (plugin Variant Caller)* quanto (b) no programa *IGV* versão 2.3.52. Ambos fornecem dados como a posição da substituição, frequência, qualidade e cobertura total. Essa figura detalha a variante Q80K (mudança de nucleotídeo na posição 3.316) encontrada na amostra do paciente 025-1a, com uma frequência de 78% (indicando a alteração de um único nucleotídeo: CAA (Q) para AAA (K)).

4 RESULTADOS

Para a realização do estudo, foram amplificadas 100 amostras (51 e 49 amostras correspondentes aos subtipos 1a e 1b, respectivamente). A figura 13 ilustra o padrão de bandas dos três fragmentos amplificados (F1, F2 e F3) para os subtipos 1a e 1b.

Figura 13 - Padrão de bandas dos fragmentos amplificados obtido no estudo. Gel de agarose 1,5% corado com SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, USA) para visualização das bandas de interesse obtidas após RT-PCR e purificação. As bandas enumeradas de 1 a 3 correspondem às amplificações dos 3 fragmentos de uma amostra do HCV subtipo 1a (1: 1º fragmento; 2: 2º fragmento e 3: 3º fragmento). Para a amostra do subtipo 1b do HCV, são as bandas enumeradas de 5 a 7 (5: 1º fragmento; 6: 2º fragmento e 7: 3º fragmento). 4: Peso molecular (*Gene Ruler Express DNA Ladder ready-to-use*, Thermo Scientific, Lithuania).

Na Tabela 3 estão descritos os dados demográficos desses 100 pacientes que tiveram as regiões de interesse amplificadas. Dentre os pacientes analisados, 44 (20 pacientes do subtipo 1a e 24 do subtipo 1b) tiveram tratamento prévio com PR e não foi possível associar tratamento prévio com a presença de determinada variante.

Tabela 3 - Dados demográficos dos pacientes HCV 1a (n=51) e HCV 1b (n=49).

	HCV 1a	HCV 1b	P valor
Sexo			
Masculino	34 (66,7%)	32 (65,3%)	
Feminino	17 (33,3%)	17 (34,7%)	1*
Idade (anos)			
Mediana (mínima-máxima)	41 (30-67)	53 (30-74)	
Média ± desvio padrão	43,2 ± 11,1	51,6 ± 12	0,0004*
Carga viral (Log UI/mL)			
Mediana (mínima-máxima)	6,5 (6,0 – 7,4)	6,6 (6,1 – 7,3)	
Média ± desvio padrão	6,5 ± 0,3	6,6 ± 0,3	0,4669*
Tratamento prévio com PR			
Variantes presentes	12	20	
Variantes ausentes	8	4	0,1024**

*Teste de Mann Whitney, **Teste exato de Fisher.

4.1 Resultados obtidos no Sequenciamento de Nova Geração

Na etapa de sequenciamento de nova geração, a média de leitura para as 50 amostras do subtipo 1a foi de 3.336.795 bases e, dentre essas, 2.983.585 bases correspondiam ao parâmetro de qualidade $\geq Q20$ (probabilidade de inserção de erro a cada 100 nucleotídeos). A média de cobertura das leituras foi de 13.177 bases e a média do comprimento do fragmento foi de 265 nucleotídeos. E para o subtipo 1b, a média de leitura foi de 2.302.510 bases, sendo 2.005.707 bases com parâmetro de qualidade $\geq Q20$. A média de cobertura das leituras foi de 11.555 bases e a média do comprimento do fragmento foi de 217 bases. Os dados descritos acima se encontram em anexo e estão detalhados de acordo com cada amostra. A figura 14 ilustra os dados gerados no relatório do sequenciamento.

As médias das coberturas obtidas para a análise das variantes das regiões NS3-4A, NS5A e NS5B para o subtipo 1a foram de 331,3 x, 800,1 x e 197,5 x, respectivamente. As médias das coberturas obtidas para o subtipo 1b foram 443,2 x, 233,3 x e 133,8 x, correspondendo às regiões NS3-4A, NS5A e NS5B, respectivamente.

Figura 14 - Relatório gerado ao final do sequenciamento. a) O preenchimento do chip pode ser visualizado em detalhes, sendo fornecido o total de bases filtradas e trimadas (retirada dos adaptadores e *barcodes* das sequências) geradas no sequenciamento, a quantidade de poços do chip preenchidos com ISPs, assim como o sinal da sequência chave. b) O relatório fornece o número total de leituras filtradas e trimadas, com a respectiva porcentagem das leituras que possuem qualidade o suficiente para serem analisadas. No enriquecimento do chip, são considerados os fragmentos que possuem o mesmo sinal chave que a biblioteca controle para que o equipamento tenha o reconhecimento do início da sequência em estudo. ISPs contendo fragmentos policlonais são detectadas e descontadas da biblioteca final. c) Gráfico com a média dos fragmentos de leituras sequenciados. d) Fluxo de liberação dos nucleotídeos (Timina, Citosina e Adenina) para análise e conferência do sinal chave. e) Quantidade de poços no chip ocupados com ISPs (fornecendo 901.432 leituras de bases), sendo que desse total, 887.992 leituras foram obtidas de ISPs enriquecidas. As leituras de bases obtidas do controle (*Test Fragment*) foram desconsideradas, como também as leituras de sequências policlonais, com baixa qualidade e dímeros de iniciadores, fornecendo o valor de leituras com qualidade aceitável. f) Em seguida, cada amostra pode ser identificada de acordo com o *barcode* selecionado, identificação da amostra, o número de bases totais geradas, a quantidade de bases geradas com $\geq Q20$, o número total de leituras e a média do fragmento de leitura em pares de bases.

4.1.1 *Análise das mutações encontradas na região da protease NS3-4A dos subtipos 1a e 1b do HCV.*

Para a análise das variantes, foram pesquisadas as posições 36, 41, 43, 54, 55, 80, 109, 122, 132, 155, 156, 158, 168, 170, 175 e 431 da região NS3-4A.

Dentre as 51 amostras amplificadas para o subtipo 1a do HCV, uma das amostras apresentou falha no sequenciamento e regiões de baixa cobertura, prejudicando a análise das variantes, sendo então desconsiderada no estudo. Dentre as 50 amostras sequenciadas para o subtipo 1a, 14 (28%) apresentaram substituições na região da protease (Tabela 4). Dentre as substituições verificadas, 4 (8%) estão associadas com resistência aos inibidores da protease (T54S, V55A, Q80K e R155K), sendo detectadas em 5 (10%) pacientes. Polimorfismos com impacto não significativo na resposta ao tratamento foram detectados nas posições 41, 80 e 122 (Q41H, Q80L e S122G) e verificados em 11 (22%) pacientes.

Do total de 49 amostras do subtipo 1b do HCV sequenciadas, substituições foram detectadas nas posições 43, 54, 80, 122, 168 e 175 em 24 (49%) amostras (Tabela 5). Seis (12%) pacientes apresentaram mutações associadas com resistência (F43I, T54S, Q80H, D168E e M175L). Outras substituições foram identificadas nas posições 80 e 122 (Q80L e S122G/T/N) em 18 (37%) pacientes.

Tabela 4 - Frequência e cobertura das RAVs detectadas na região NS3-4A do HCV subtipo 1a (n=50).

Pacientes	RAV da região NS3-4A do HCV subtipo 1a					
	41	54	55	80	122	155
010_1a				Q80L (14%, 23/167)		
016_1a					S122G (98%, 344/351)	
032_1a				Q80L (13%, 49/372)		
008_1a				Q80L (13%, 41/313)		
023_1a						R155K (3%, 16/487)
027_1a			V55A (100%, 268/268)			
001-1a				Q80K (11%, 45/403); Q80L (74%, 296/399)	S122G (11%, 46/432)	
026_1a				Q80L (99%, 404/408)		
004_1a	Q41H (9%, 25/273)					
003_1a				Q80L (8%, 33/389)		
013_1a		T54S (99%, 273/276)				
025_1a	Q41H (100%, 302/302)			Q80K (78%, 258/331)		
024_1a				Q80L (41%, 130/318)		
047_1a					S122G (64%, 92/143)	

% = frequência; Cobertura = nº de seqüências com a variante/nº de seqüências totais obtidas. RAVs foram destacadas em negrito.

Tabela 5 - Frequência e cobertura das RAVs detectadas na região NS3-4A do HCV subtipo 1b (n=49).

Pacientes	RAV da região NS3-4A do HCV subtipo 1b					
	43	54	80	122	168	175
085_1b				S122G (99%, 429/434)		
078_1b			Q80L (66%, 132/200)	S122G (62%, 98/158)		
079_1b				S122G (100%, 246/246)		
093_1b						M175L (99%, 456/459)
067_1b				S122G (100%, 601/601)		
059_1b		T54S (98%, 435/445)				
070_1b				S122G (48%, 221/464)		
088_1b				S122G (98%, 447/454)		
062_1b	F43I (60%, 749/1255)					
086_1b					D168E (97%, 373/383)	
094_1b			Q80H (98%, 286/291)			
052_1b				S122G (83%, 178/214)		
075_1b				S122G (99%, 357/359)		
091_1b				S122G (65%, 392/603)		
092_1b				S122G (96%, 436/453)		
100_1b		T54S (100%, 407/407)				
082_1b				S122G (100%, 531/531)		
069_1b				S122G (60%, 293/488)		
081_1b				S122G (99%, 387/391)		
066_1b				S122T (26%, 110/427)		
095_1b				S122T (100%, 552/552)		
098_1b				S122G (80%, 270/338)		
055_1b				S122G (94%, 632/675)		
087_1b				S122N (98%, 239/244)		

% = frequência; Cobertura = nº de sequências com a variante/nº de sequências totais obtidas. RAVs foram destacadas em negrito.

4.1.2 *Análise das mutações encontradas na região NS5A dos subtipos 1a e 1b do HCV.*

Para a região NS5A, foram analisadas as posições 28, 30, 31, 32, 54, 58, 62, 92 e 93, de forma a verificar a ocorrência de variantes.

Dentre as 50 amostras do subtipo 1a, 13 (26%) apresentaram variantes na região NS5A (Tabela 6). Onze pacientes (22%) apresentaram mutações que conferem resistência aos inibidores da proteína NS5A (Q30H/R, H58P e Y93C/H/N). Dois (4%) pacientes apresentaram as substituições M28L e H58R.

Dentre as 48 amostras do subtipo 1b que tiveram a região NS5A analisada, 30 (62%) amostras tiveram substituições detectadas nas posições 28, 30, 31, 54, 58, 62, 92 e 93 (Tabela 7). Mutações associadas com resistência foram verificadas em 26 (52%) amostras (L28M, R30Q, L31M, Q54H, A92T e Y93H). E seis (12%) pacientes apresentaram as substituições Q54Y, P58L, Q62E/R e A92V.

Além das posições 28, 30, 58 e 93, que também apresentaram substituições para o subtipo 1a, na análise das amostras do subtipo 1b foram detectadas substituições nas posições 31, 54, 62 e 92.

Tabela 6 - Frequência e cobertura das RAVs detectadas na região NS5A do HCV subtipo 1a (n=50).

Pacientes	RAV da região NS5A do HCV subtipo 1a			
	28	30	58	93
006_1a		Q30H (33%, 323/988)		Y93H (32%, 406/1260)
032_1a			H58P (44%, 454/1034)	
033_1a		Q30H (33%, 311/935)		Y93H (6%, 66/1188)
020_1a			H58P (12%, 44/376)	
029_1a		Q30H (12%, 49/398)		
009_1a			H58P (10%, 63/621)	
041_1a			H58R (100%, 807/807)	
026_1a	M28L (4%, 44/994)			
049_1a		Q30H (63%, 296/467)		
018_1a			H58P (98%, 596/608)	
024_1a		Q30H (10%, 53/539)		Y93H (11%, 66/620), Y93N (7%, 46/620), Y93C (11%, 68/622)
045_1a			H58P (8%, 81/1075)	
047_1a		Q30R (46%, 396/859)		Y93H (46%, 546/1187)

% = frequência; Cobertura = nº de sequências com a variante/nº de sequências totais obtidas. RAVs foram destacadas em negrito.

Tabela 7- Frequência e cobertura das RAVs detectadas na região NS5A do HCV subtipo 1b (n=48).

Pacientes	RAV da região NS5A do HCV subtipo 1b							
	28	30	31	54	58	62	92	93
078_1b								Y93H (97%, 87/90)
079_1b						Q62E (7%, 5/73)		
060_1b				Q54H (39%, 82/212)				
093_1b				Q54H (81%, 111/137)				
057_1b				Q54H (89%, 177/200)			A92T (90%, 195/216)	
056_1b				Q54H (98%, 284/289)				Y93H (84%, 248/297)
089_1b				Q54H (96%, 215/223)				
097_1b				Q54H (98%, 521/529)				
099_1b				Q54H (97%, 346/356)				
065_1b				Q54Y (94%, 240/254)				
070_1b							A92T (44%, 84/192)	Y93H (56%, 106/190)
080_1b				Q54H (19%, 13/70)				
090_1b				Q54H (97%, 319/330)	P58L (98%, 316/321)			
062_1b				Q54H (98%, 186/189)			A92T (29%, 56/192)	
086_1b	L28M (100%, 242/242)							
052_1b		R30Q (14%, 34/249)						
091_1b							A92T (96%, 275/286)	
092_1b				Q54H (98%, 317/324)				
077_1b				Q54H (100%, 32/32)				
082_1b				Q54H(99%, 344/350)				
069_1b				Q54H (67%, 156/234)				Y93H (53%, 112/213)
081_1b				Q54H (91%, 468/513)				
071_1b				Q54H (75%, 190/254)			A92T (98%, 235/241)	

Tabela 7- Frequência e cobertura das RAVs detectadas na região NS5A do HCV subtipo 1b (n=48) (Continuação).

Pacientes	RAV da região NS5A do HCV subtipo 1b							
	28	30	31	54	58	62	92	93
063_1b						Q62E (6%, 9/143)		
096_1b			L31M (95%, 104/110)					
064_1b				Q54H (100%, 407/407)				
095_1b				Q54H (98%, 321/328)				Y93H (11%, 33/294)
084_1b						Q62R (52%, 79/152)		
098_1b				Q54H (100%, 262/262)				
087_1b							A92V (96%, 49/51)	Y93H (98%, 48/49)

% = frequência; Cobertura = nº de sequências com a variante/nº de sequências totais obtidas. RAVs foram destacadas em negrito.

4.1.3 Análise das mutações detectadas na região NS5B dos subtipos 1a e 1b do HCV.

Para as 50 amostras do subtipo 1a, foram analisadas as posições 159, 282, 316, 320, 321, 368, 414, 419, 421, 422, 423, 445, 448 e 452 da região NS5B do HCV. Substituições na posição 421 da região NS5B foram verificadas em 4 (8%) pacientes (Tabela 8).

E para os 45 pacientes do subtipo 1b que tiveram a região NS5B sequenciada, foram analisadas as posições 159, 282, 316, 320, 321, 368, 414, 419, 421, 422, 423, 445, 448 e 452, 482, 486, 494, 495, 496, 499, 554, 556 e 559. As variantes associadas com resistência L159F e C316N foram detectadas em 5 (11%) e 6 (13%) amostras do HCV subtipo 1b, respectivamente. Substituições nas posições 421, 499, 554 e 556 foram detectadas em 6 pacientes (21%) (Tabela 9).

Tabela 8 - Frequência e cobertura das RAVs da região NS5B do HCV subtipo 1a (n=50).

Paciente	RAV na região NS5B do subtipo 1a
	421
019_1a	A421V (96%, 50/52)
037_1a	A421V (100%, 230/230)
012_1a	A421V (58%, 237/411)
025_1a	A421V (76%, 74/97)

% - frequência de detecção da variante, Cobertura = nº de sequências com a variante/nº de sequências totais obtidas.
RAVs foram destacadas em negrito.

Tabela 9 - Frequência e cobertura das RAVs detectadas na região NS5B do HCV subtipo 1b (n=45).

Pacientes	RAV da região NS5B do HCV subtipo 1b						
	159	316	421	452	499	554	556
093_1b	L159F (100%, 284/284)	C316N (88%, 51/58)					
072_1b	L159F (98%, 125/127)	C316N (98%, 91/93)			V499A (100%, 158/158)		S556G (38%, 29/76)
100_1b	L159F (98%, 50/51)						
063_1b	L159F (97%, 181/187)	C316N (99%, 139/140)					
054_1b	L159F (96%, 224/233)	C316N (54%, 116/214)					S556G (99%, 107/108)
059_1b		C316N (100%, 24/24)					
060_1b		C316N (86%, 43/50)					
090_1b						G554N (5%, 6/123)	
078_1b							S556G (18%, 71/395)
079_1b			A421V (100%, 226/226)				
058_1b				Y452H (100%, 146/146)			
065_1b			A421V (100%, 16/16)				
067_1b			A421V (96%, 26/27)				
070_1b							S556G (38%, 28/73)

% = frequência; Cobertura = nº de sequências com a variante/nº de sequências totais obtidas. RAVs foram destacadas em negrito.

4.1.4 Análise de múltiplas substituições envolvendo as regiões NS3-4A, NS5A e NS5B dos subtipos 1a e 1b do HCV.

Múltiplas mutações foram verificadas em um mesmo paciente, infectado pelo subtipo 1a do HCV, envolvendo as regiões NS3-4A (Q80K) e NS5B (A421V) (Tabela 10).

Dentre os 45 pacientes analisados para o subtipo 1b, 8 (18%) apresentaram múltiplas mutações de resistência envolvendo duas ou três regiões (NS3, NS5A e/ou NS5B) (Tabela 11). As mutações envolvendo as regiões NS3-4A e NS5A foram F43I+Q54H+A92T e D168E+L28M. Para as regiões NS3-4A e NS5B foram detectadas as mutações de resistência T54S+L159F e T54S+C316N e, para as regiões NS5A e NS5B foram Y93H+S556G, A92T+Y93H+S556G e Q54H+C316N. Mutações envolvendo as três regiões (NS3-4A, NS5A e NS5B) foram detectadas em um paciente (M175L+Q54H+L159F+C316N).

Tabela 10 - Frequência e cobertura das RAVs detectadas nas regiões NS3-4A, NS5A e NS5B do HCV subtipo 1a (n=50).

Pacientes	NS3-4A			NS5A				NS5B
	41	80	122	28	30	58	93	421
032_1a		Q80L (13%, 49/372)				H58P (44%, 454/1034)		
026_1a		Q80L (99%, 404/408)		M28L (4%, 44/994)				
024_1a		Q80L (41%, 130/318)			Q30H (10%, 53/539)		Y93H (11%, 66/620), Y93N (7%, 46/620), Y93C (11%, 68/622)	
047_1a			S122G (64%, 92/143)		Q30R (46%, 396/859)		Y93H (46%, 546/1187)	
025_1a	Q41H (100%, 302/302)	Q80K (78%, 258/331)						A421V (76%, 74/97)

% = frequência; Cobertura = nº de sequências com a variante/nº de sequências totais obtidas. RAVs foram destacadas em negrito.

Tabela 11 - Frequência e cobertura das RAVs detectadas nas regiões NS3, NS5A e NS5B do HCV subtipo 1b (n=45).

Pacientes	NS3-4A						NS5A							NS5B				
	43	54	80	122	168	175	28	30	54	58	62	92	93	159	316	421	554	556
078_1b			Q80L (66%, 132/200)	S122G (62%, 98/158)									Y93H (97%, 87/90)					S556G (18%, 71/395)
079_1b				S122G (100%, 246/246)							Q62E (7%, 5/73)					A421V (100%, 226/226)		
093_1b						M175L (99%, 456/459)			Q54H (81%, 111/137)					L159F (100%, 284/284)	C316N (88%, 51/58)			
070_1b				S122G (48%, 221/464)								A92T (44%, 84/192)	Y93H (56%, 106/190)					S556G (38%, 28/73)
090_1b									Q54H (97%, 319/330)	P58L (98%, 316/321)							G554N (5%, 6/123)	
062_1b	F43I (60%, 749/1255)								Q54H (98%, 186/189)			A92T (29%, 56/192)						
086_1b					D168E (97%, 373/383)		L28M (100%, 242/242)											
052_1b				S122G (83%, 178/214)				R30Q (14%, 34/249)										
091_1b				S122G (65%, 392/603)								A92T (96%, 275/286)						
092_1b				S122G (96%, 436/453)					Q54H (98%, 317/324)									
100_1b		T54S (100%, 407/407)												L159F (98%, 50/51)				
082_1b				S122G (100%, 531/531)					Q54H (99%, 344/350)									
069_1b				S122G (60%, 293/488)					Q54H (67%, 156/234)				Y93H (53%, 112/213)					

Tabela 11 - Frequência e cobertura das RAVs detectadas nas regiões NS3, NS5A e NS5B do HCV subtipo 1b (n=45) (continuação).

Pacientes	NS3-4A						NS5A							NS5B				
	43	54	80	122	168	175	28	30	54	58	62	92	93	159	316	421	554	556
081_1b				S122G (99%, 387/391)					Q54H (91%, 468/513)									
063_1b											Q62E (6%, 9/143)			L159F (97%, 181/187)	C316N (99%, 139/140)			
095_1b				S122T (100%, 552/552)					Q54H (98%, 321/328)				Y93H (11%, 33/294)					
098_1b				S122G (80%, 270/338)					Q54H (100%, 262/262)									
087_1b				S122N (98%, 239/244)								A92V (96%, 49/51)	Y93H (98%, 48/49)					
059_1b		T54S (98%, 435/445)													C316N (100%, 24/24)			
060_1b									Q54H (39%, 82/212)						C316N (86%, 43/50)			
067_1b				S122G (100%, 601/601)												A421V (96%, 26/27)		
065_1b									Q54Y (94%, 240/254)							A421V (100%, 16/16)		

% = frequência; Cobertura = nº de sequências com a variante/nº de sequências totais obtidas. RAVs foram destacadas em negrito.

4.1.5 Recombinante inter-subtipo 1a/1b

A estratégia de amplificação do genoma completo do HCV permitiu realizar a verificação dos subtipos, o que possibilitou a detecção de um recombinante inter-subtipo 1a/1b (Apêndice B). Todas as sequências obtidas foram submetidas às análises para a confirmação do subtipo nos programas *Pathogen Analyzer* e BioAfrica. Dentre as 100 amostras analisadas, apenas uma apresentou um recombinante dos subtipos 1a e 1b.

Posteriormente, o programa SimPlot foi utilizado com a finalidade de confirmar a presença do recombinante (Figura 15). A sequência correspondente ao recombinante teve início na posição 5179 e término na posição 6031, com similaridade ao subtipo 1b de 95% e 99%, respectivamente (<http://www.bioafrica.net/rega-genotype/html/subtyping/hcvSUB.html>).

Figura 15 - Presença do recombinante inter-subtipo 1a/1b na amostra 051-1a confirmado pelo programa SimPlot. Uma região de aproximadamente 846 pb apresentou maior similaridade ao subtipo 1b e, as demais regiões do genoma, ao subtipo 1a.

Ao realizar a construção da árvore filogenética com as sequências completas da região codificadora, a amostra recombinante 051_1a agrupou junto com as sequências do subtipo 1a, devido a pequena região de recombinação presente (Figura 16). No entanto, quando apenas a região recombinante foi analisada (sequência com 846 pb), a amostra foi agrupada com as sequências do subtipo 1b.

Figura 17 - Árvore filogenética baseada nas sequências do HCV subtipo 1b e da amostra recombinante 051_1a # (846 pb). As sequências caracterizadas neste estudo foram indicadas com o símbolo #. Foi aplicado bootstrap com 1.000 réplicas e somente valores acima de 70% foram mostrados.

5 DISCUSSÃO

A padronização de um teste para analisar a presença de variantes a partir da região codificadora completa do HCV é útil para detectar possíveis mutações associadas à resistência aos DAA, permitindo inclusive estudar a ocorrência de efeitos epistáticos das mutações em outras regiões do genoma. Entretanto, o desenho de iniciadores capazes de amplificar todos os genótipos e subtipos é dificultado devido à variabilidade do HCV, sendo necessário desenhar iniciadores específicos para cada subtipo ¹²⁵.

A despeito do pequeno número de pacientes com mutações de resistência antes do tratamento com DAA (detectadas por NGS e/ou sequenciamento de Sanger), o impacto dessas mutações quando da introdução do DAA não pode ser excluída, principalmente para aqueles pacientes que não apresentaram resposta virológica sustentada à terapia prévia ¹²⁶.

Diferentes estudos têm relatado maior facilidade em selecionar variantes para o subtipo 1a do HCV ^{106,127}. No entanto, foi detectado no presente estudo um maior número de mutações de resistência para o subtipo 1b (n= 59) do que para o subtipo 1a (n= 26), condizendo com o que foi encontrado no estudo realizado por Paolucci et al. ¹⁰⁷. Essa maior frequência de mutações verificadas no subtipo 1b pode ter ocorrido devido esse grupo apresentar uma média de idade superior ao grupo do subtipo 1a ($P=0,0004$) e, provavelmente, possuírem maior tempo de infecção pelo HCV, ocasionando maior número de mutações no genoma viral.

No presente estudo, foram detectadas substituições em baixa frequência (<20% da cobertura de sequências totais obtidas para cada amostra) em dezoito das posições analisadas para o subtipo 1a, incluindo as regiões NS3-4A, NS5A e NS5B, das quais 11 correspondiam a mutações de resistência.

Dentre as substituições encontradas nas regiões NS3-4A, NS5A e NS5B para o subtipo 1b, 6 foram detectadas em baixa frequência, sendo que 4 eram mutações que conferem resistência.

Para a região NS3-4A, a RAV T54S está associada a uma menor resposta aos DAA TVR e BOC, enquanto que a V55A associa-se a uma menor resposta ao BOC. A

RAV Q80K estaria relacionada a uma diminuição da sensibilidade aos inibidores SIM, ASV, DNV e PTV e, a R155K, aos inibidores lineares TVR e BOC e aos inibidores macrocíclicos, SIM, ASV, DNV e PTV ^{114,128-130}.

De 80 pacientes analisados em um estudo conduzido na Dinamarca, 27 (34%) não responderam ao tratamento com TVR ou BOC, sendo que 14 pacientes apresentaram variantes na região NS3-4A após o tratamento. Dentre as RAVs verificadas destacam-se V36A/M, V55A, R155K, A156T e I170T ¹³¹. No presente estudo, as variantes V55A e R155K foram detectadas em apenas duas amostras do subtipo 1a do HCV (em frequências de 100% e 3%, respectivamente).

No estudo de May et al. ¹³², dentre as 34 amostras de subtipo 1a analisadas, nove (28%) amostras apresentaram mutações de resistência na população viral dominante pré-tratamento pela metodologia de sequenciamento Sanger. Uma amostra apresentou as variantes V36M e Q80K, e uma segunda amostra, V36M e V55A. Seis amostras tiveram a mutação Q80K detectada e uma amostra continha a substituição Q80R. A substituição Q80K está associada com uma diminuição da susceptibilidade ao SIM (Inibidor de Protease de 2ª geração), conferindo uma redução de aproximadamente 10 vezes na atividade *in vitro* ^{100,133}. A mutação Q80K é raramente detectada em nosso país: em outro estudo realizado por nosso grupo, não foi detectada em 247 pacientes analisados pelo sequenciamento Sanger ¹³⁴.

A ocorrência de mutações na região NS3-4A, mais especificamente na posição Q80 confere um baixo nível de resistência, enquanto que substituições nas posições F43 e R155 conferem resistência moderada e, na posição D168, resistência elevada ¹³⁵.

A variante na posição 36 da região NS3-4A não foi detectada em ambos os subtipos estudados e a substituição na posição 80 (Q80K) foi verificada em dois pacientes do subtipo 1a, sendo detectada a variante Q80H no subtipo 1b. A variante Q80K foi detectada em baixa frequência em uma amostra, coexistindo com a substituição dominante Q80L e, em outra amostra, a presença da variante Q80K foi dominante.

A variante Q80K é uma RAV pré-existente detectada no HCV subtipo 1a, com uma prevalência de 9,1% na América do Sul, 19,4% na Europa e 48,1% na América do

Norte, sendo raramente encontrada no genótipo 1b (0,5%) ¹³⁶. De acordo com os protocolos recomendados, o teste de resistência para o HCV não deveria ser realizado antes da introdução da terapia, devido às taxas de RVS serem altas tanto nos pacientes com e sem RAVs detectáveis por sequenciamento, com exceção para os pacientes pertencentes ao subtipo 1a e que irão receber a combinação de Peg-IFN+RBV+SIM ⁸³.

Uma pesquisa conduzida no Rio de Janeiro, analisou a região NS3 de 16 pacientes (8 subtipo 1a e 8 subtipo 1b) antes de iniciar a terapia tripla e após 4 semanas do tratamento (TVR+PR). Foram detectadas, por sequenciamento de nova geração (plataforma Ion Torrent), as frequências de 29% e 42% de RAVs para os subtipos 1a e 1b, respectivamente, antes do início da terapia. Após 4 semanas, as RAVs permaneceram em frequências de 4,8% a 13,5% para os subtipos 1a e 1b, respectivamente. Dentre as variantes detectadas estavam V36A, T54S, V55I, Q80K, Q80R, V107I, I132V, D168E e M175L ¹³⁷.

Ao analisar as sequências obtidas para a região NS5A no presente estudo, 11 (22%) pacientes com o subtipo 1a apresentaram RAVs nas posições Q30H/R, H58P e Y93C/H/N e em 26 (53%) pacientes com o subtipo 1b foram encontradas RAVs nas posições L28M, R30Q, L31M, Q54H, A92T e Y93H. Essas variantes estariam associadas com uma diminuição da resposta aos inibidores DCV, OMB e LDV. As combinações preconizadas pelo guia EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C ⁸³, SOF+LDV, SOF+DCV e OMV+PTV+DSB+Ritonavir (3D), poderiam ter sua eficácia diminuída pela presença dessas variantes citadas anteriormente ^{106,107}.

Em um estudo realizado pela FIOCRUZ (Rio de Janeiro) em 2014, verificou-se que as sequências do HCV subtipo 1a de amostras de pacientes brasileiros apresentavam um padrão peculiar de composição dos aminoácidos, mutações e frequências, que difere das sequências obtidas previamente em outros países ¹³⁸. O sequenciamento pela metodologia de Sanger da região NS5A de 106 pacientes possibilitou, para o subtipo 1a, a detecção das mutações M28T e Y93H em dois (3,8%) pacientes, enquanto que sete (13,5%) pacientes apresentaram mutações secundárias como H58P e E62D. E para o subtipo 1b, a mutação Y93H foi encontrada em dois (3,7%) pacientes e as substituições R30Q, L31M, P58S e I280V foram verificadas em oito (14,8%) dos pacientes ¹³⁸.

Os resultados encontrados no presente estudo foram de acordo com o estudo de Peres-da-Silva, com detecção das variantes M28L em 1 (2%), Y93C/H/N em 4 (8%) e H58P/R em 6 (12%) pacientes para o subtipo 1a. Para o subtipo 1b, foram detectadas R30Q (2%), L31M (2%) e P58L (2%).

No estudo conduzido por Yoshimi et al.¹³⁹, 31 pacientes com HCV genótipo 1b foram tratados com a dupla terapia DCV e ASV. Com esse tratamento era esperado aumentar a taxa de RVS, no entanto, 5 pacientes não responderam a terapia devido à emergência de variantes associadas com resistência ao DCV (L31M e Y93H) e ao ASV (D168E). Verificaram que a mutação Y93H estava presente antes de introduzir a terapia e, em um paciente, foi detectada inicialmente numa frequência de 0,6%, passando para 99,8% após a introdução do DCV. Em apenas um paciente a variante L31M não estava presente previamente ao tratamento, mas foi detectada posteriormente à introdução do inibidor da NS5A. A substituição D168E foi detectada apenas após a introdução do ASV. Enquanto que as variantes associadas com resistência ao tratamento com ASV retornam rapidamente ao estado *wild-type* da sequência, as variantes associadas ao DCV persistem por um longo tempo na ausência do medicamento. No presente estudo, a mutação de resistência D168E foi verificada em apenas um paciente do subtipo 1b.

Forns et al.¹⁴⁰ estudou a associação de GZR + EBV com RBV em 79 pacientes com HCV-1. Após o término do tratamento, as RAVs A156T (NS3-4A) e Y93H (NS5A) foram detectadas em três e dois pacientes não respondedores, respectivamente.

Outros estudos mostraram que as substituições detectadas na região NS5A podem permanecer por um longo período, diferente do que ocorre com as substituições da região NS3-4A. Como a presença de RAVs na região NS5A tem sido relatada com maior frequência associada à resistência, é interessante monitorar a presença destas variantes com o emprego da metodologia de sequenciamento de nova geração, de forma a permitir analisar se as variantes detectadas em baixa frequência poderiam vir a interferir no sucesso da terapia. Este estudo pode verificar o custo-benefício de realizar essa metodologia de forma a garantir a melhor escolha dos medicamentos, possibilitando ao clínico uma ferramenta para assegurar a eficácia da terapia com os DAA. Neste estudo, foram detectadas variantes em baixa frequência (<20%) para a

região NS5A em 54,5% (6/11) dos pacientes do subtipo 1a e 11,5% (3/26) para o subtipo 1b.

No estudo conduzido por Hirotsu et al.¹⁴¹, também foi demonstrada a ocorrência natural da RAV Y93H em pacientes com hepatite C crônica e virgens de tratamento para o inibidor da região NS5A. A barreira genética para a resistência é menor para o subtipo 1a quando comparado ao subtipo 1b do HCV. As mutações Q30E e Y93N ainda tem seu efeito discutido na literatura, mas alguns autores propõem que quando detectadas no subtipo 1a conferem altos níveis de resistência, enquanto que para o subtipo 1b, não alteram a resposta ao DCV¹⁰⁶. No presente estudo, a variante Q30E não foi detectada para ambos os subtipos analisados e a variante Q93N estava presente em baixa frequência (7%) em uma amostra do subtipo 1a, coexistindo com outras substituições (Y93C/H).

Em relação à região NS5B, mutações de resistência relacionadas ao SOF (L159F e C316N) foram identificadas em 7 (15%) amostras do subtipo 1b analisadas neste estudo e, dentre essas, 4 (9%) amostras apresentaram ambas as mutações. No estudo conduzido por Pol et al.¹⁴², 17 pacientes não responderam ao tratamento com SOF, sendo que um desses pacientes, infectado com o subtipo 1b do HCV, apresentou as mutações L159F+C316N antes e depois da introdução do tratamento.

Análises *in vitro* mostraram que a capacidade de replicação viral na presença da variante L159F era de 0,24 a 0,25 vezes àquela do vírus selvagem e a concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo (EC50) para o SOF foi de 1,3 a 2,0 vezes maior. Nos casos em que ambas as variantes L159F e C316N eram detectadas, a capacidade de replicação representava 0,65 vezes comparada ao vírus selvagem e o EC50 para o SOF aumentava 1,6 vezes^{143,144}.

A combinação da terapia SOF e RBV, estudada por Chulanov et al.¹⁴⁵, mostrou que após 16 semanas de seguimento, um terço dos pacientes (12/32) apresentava a RAV L159F, com uma frequência de RVS de apenas 25% (3/12). Em outro estudo, conduzido na Itália, verificou-se a presença da substituição C316N/H em 43% (9/21) dos pacientes com o subtipo 1b do HCV e naíve para DAA¹⁴⁶.

A mutação primária S282T, selecionada *in vitro* nos genótipos 1 a 6, confere resistência ao DAA SOF. S282T confere nível baixo a alto de resistência e a

capacidade de replicação comparada ao vírus selvagem é reduzida significativamente¹⁴⁷. Em um estudo realizado em 127 amostras positivas para HCV de usuários de drogas injetáveis e virgens de tratamento para DAA, a mutação S282T selecionada *in vitro* para o SOF não foi identificada. Entretanto, as variantes S282G/C/R foram detectadas em 9 pacientes. Mais estudos envolvendo as variantes na posição S282 usando modelos moleculares *in silico* devem ser realizados para tentar associar com a possibilidade do desenvolvimento do mecanismo de resistência¹⁴⁸.

No estudo de fase II (ELECTRON), a substituição S282T foi detectada em um paciente portador do HCV genótipo 2 que havia recebido o SOF em monoterapia por 12 semanas e apresentou falha na quarta semana após o término do tratamento. A amostra apresentou uma susceptibilidade reduzida em 13,5 vezes ao SOF, no entanto, a mutação não foi detectada após 12 semanas do final do tratamento pela metodologia de NGS¹⁴⁹.

Assim como nos estudos citados, que verificaram ser baixa ou ausente a ocorrência de substituições na posição 282 da região NS5B *in vivo*, no presente estudo, não foi detectada substituição nessa posição.

A variante A421V foi encontrada em 4 (8%) pacientes do subtipo 1a e em 3 (10%) pacientes do subtipo 1b no presente estudo e essa mutação estaria associada com baixos níveis de resistência ao INN Beclabuvir (BMS-791325) com ação na região *Thumb I*^{128,129}. Mais estudos devem ser direcionados para a ação dessa variante no INN TMC647055, que está na fase II de desenvolvimento¹¹¹.

As variantes V499A e S556G, que estariam associadas com uma pequena redução da susceptibilidade aos INNs, ocorreram em 4 (14%) pacientes, sendo que a combinação V499A+S556G foi detectada em uma das amostras. A substituição Y452H, associada com a substituição Y448H, foram previamente descritas por conferirem resistência ao medicamento Tegobuvir, no entanto, este DAA foi descontinuado⁷⁷.

A frequência das variantes detectadas por sequenciamento de Sanger em uma pesquisa conduzida no Japão¹⁵⁰, em pacientes DAA *naïve*, foi de 53,1% (51/96) para a região NS3 (com detecção das variantes V36A, T54S, Q80L/R, S122C/G/N/T, D168A/E/V e V170I/G), de 12,5% (12/96) para a região NS5A (L31M/V e Y93H) e de 51% (49/96) para a região NS5B [C316N (46,9%; 45/96), V321I e L159F]. Neste mesmo

estudo, foi realizado o sequenciamento de nova geração (plataforma Ion Torrent) em apenas 20 amostras (10 com e 10 sem a RAV C316N), verificando a presença da RAV L159F em 3 pacientes dentre os que já apresentavam a variante C316N. No entanto, quando o sequenciamento por Sanger foi utilizado, a detecção da L159F ocorreu em apenas uma amostra.

No estudo conduzido por Chen et al.¹⁵¹, a prevalência de substituições em sequências obtidas a partir do NCBI *Nucleotide Database* foi de 58,7% (854/1.455). Ao realizarem uma análise considerando apenas as RAVs clinicamente relevantes (regiões NS3-4A, NS5A e NS5B), 37,9% do total das sequências tinham, no mínimo, uma RAV. A prevalência de variantes na América, Europa, Ásia e África foi de 53,5%; 51,4%; 74,1% e 71,9%; respectivamente. No entanto, a prevalência das RAVs clinicamente relevantes foi de 48,4% na América, 29,3% na Europa, 18,5% na Ásia e 31,3% na África.

A frequência de amostras com substituições detectadas nas posições escolhidas para o presente estudo foi de 52% (26/50) para o subtipo 1a e de 85,7% (42/49) para o subtipo 1b. Ao considerar apenas as variantes associadas com resistência, as frequências foram de 38% (19/50) e de 71,4% (35/49) para os subtipos 1a e 1b, respectivamente.

Em outro estudo¹⁵², foi realizado o sequenciamento de Sanger apenas da região NS3 e a porcentagem de RAVs antes do início do tratamento com TVR ou BOC foi de 44,8% (48/107) para o subtipo 1a e de 80,7% (46/57) para o subtipo 1b.

Sendo as respostas às diferentes classes de DAA específicas de acordo com o subtipo e considerando a frequência de infecções múltiplas entre os grupos com alta incidência e prevalência do HCV, faz-se necessária a utilização de um método acurado para a subtipagem do vírus, incluindo a detecção de mistura de subtipos. O sequenciamento de nova geração funcionaria como uma ferramenta importante para otimizar os regimes terapêuticos (atuais e futuros) permitindo a resolução de casos indeterminados¹⁵³.

A ocorrência de recombinação é um evento considerado raro para o HCV^{154,155}. Kalinina et al.¹⁵⁶ publicou, em 2002, o primeiro estudo relatando a ocorrência de um HCV recombinante inter-genotípico envolvendo os genótipos 2k e 1b. Em outro estudo

conduzido nas Filipinas, um HCV recombinante inter-genotípico 2b/1b foi identificado¹⁵⁷. Outros recombinantes descritos foram: 2i/6p no Vietnã¹⁵⁸, 2/5 na França¹⁵⁹, 2b/6w, 3a/1b e 2a/1a em Taiwan¹⁶⁰, 1b/1a no Peru¹⁶¹, 1a/1c na Índia¹⁶², 1b/1a no Uruguai¹⁶³ e 4a/4d em Portugal¹⁶⁴. O recombinante 3a/1b foi detectado no estudo conduzido por Du et al.¹⁶⁵ na China, e em outro estudo realizado no mesmo país, os recombinantes inter-genotípicos 2/5, 2b/6w, 2b/1a, 2b/1b e 2k/1b e os inter-subtipos 6a/6o, 6e/6o, 6e/6h e 6n/6o foram observados¹⁶⁶.

Doze vírus recombinantes inter-genotípicos 2/1 (envolvendo as associações entre 2b/1a, 2b/1b e 2k/1b) foram caracterizados em outra pesquisa que avaliou a resposta ao SOF em combinação com RBV. Esse estudo comparou a metodologia INNO-LiPA e os sequenciamentos das regiões do Core e da NS5B, possibilitando a detecção de 12 recombinantes em um total de 2.363 amostras. A recombinação estava situada na junção entre as proteínas NS2 e NS3, correspondendo ao genótipo 2 do Core até a região NS2 e, genótipo 1, da região NS3 até NS5B. Como os pacientes foram classificados como HCV-2 pelo método INNO-LiPA no momento do tratamento, a expectativa de resposta não estava de acordo com o esperado para o genótipo obtido, sendo explicada posteriormente com o sequenciamento da região NS5B, que correspondia ao genótipo 1¹⁶⁷.

O sequenciamento da região codificadora completa do HCV possibilitou a identificação de uma amostra recombinante inter-subtipo 1a/1b. Este foi o primeiro estudo conduzido no Brasil a relatar a presença de um HCV recombinante.

Com a introdução da combinação de terapias sem o emprego do IFN, a detecção inicial de variantes de importância clínica teria aplicação significativa na redução da falha ao tratamento em decorrência da presença prévia de mutações de resistência viral, de forma a permitir um melhor delineamento e adequação da terapia para o perfil viral presente no paciente.

6 CONCLUSÃO

- O sequenciamento de nova geração permitiu a detecção de variantes com baixa frequência, tornando essa metodologia uma escolha para a pesquisa de novas mutações associadas à resistência, principalmente no grupo de pacientes que não responderem aos novos esquemas de tratamento.
- Variantes que conferem resistência aos inibidores da protease, da NS5A e da polimerase foram encontradas em amostras de ambos os subtipos (1a e 1b) analisados no estudo, sendo detectadas com maior frequência em amostras do subtipo 1b.
- A região NS5B, especificamente a região de interação com o IN SOF, mostrou-se mais conservada (principalmente para o subtipo 1a), reforçando a utilidade do uso dessa classe de antivirais para o tratamento da hepatite C.
- O sequenciamento da região codificadora completa do HCV possibilitou a identificação de uma amostra recombinante inter-subtipo 1a/1b, sendo esse o primeiro estudo conduzido no Brasil a relatar a presença de um HCV recombinante.

REFERÊNCIAS*

1. WHO. World Health Organization. Disponível online: <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsrlyo2003/en/index1.html>. Acessado em 17 de setembro de 2015.
2. Zoulim F, Chevallier M, Maynard M, Trepo C. Clinical consequences of hepatitis C virus infection. *Reviews in Medical Virology*. 2003 Jan-Feb;13(1):57-68.
3. Parda N, Rosinska M, Stepień M. Hepatitis C in Poland in 2013. *Przegląd Epidemiologiczny*. 2015;69(2):257-61, 375-8.
4. Ke PY, Chen SS. Hepatitis C virus and cellular stress response: implications to molecular pathogenesis of liver diseases. *Viruses*. 2012 Oct;4(10):2251-90.
5. 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.
6. Bostan N, Mahmood T. An overview about hepatitis C: a devastating virus. *Critical Reviews in Microbiology*. 2010 May;36(2):91-133.
7. Lindenbach BD, Rice CM. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nature Reviews Microbiology*. 2013 Oct;11(10):688-700.
8. Alavian SM, Ande SR, Coombs KM, Yeganeh B, Davoodpour P, Hashemi M, et al. Virus-triggered autophagy in viral hepatitis - possible novel strategies for drug development. *Journal of Viral Hepatitis*. 2011 Dec;18(12):821-30.
9. Ben Ari Z, Weitzman E, Safran M. Oncogenic viruses and hepatocellular carcinoma. *Clinical Liver Disease*. 2015 May;19(2):341-60.
10. Honda M, Brown EA, Lemon SM. Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA. *Rna*. 1996 Oct;2(10):955-68.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

11. Lee LY, Tong CY, Wong T, Wilkinson M. New therapies for chronic hepatitis C infection: a systematic review of evidence from clinical trials. *International Journal of Clinical Practice*. 2012 Apr;66(4):342-55.
12. Yang PL, Gao M, Lin K, Liu Q, Villareal VA. Anti-HCV drugs in the pipeline. *Current Opinion in Virology*. 2011 Dec;1(6):607-16.
13. Dubuisson J. Hepatitis C virus proteins. *World Journal of Gastroenterology*. 2007 May 7;13(17):2406-15.
14. Khaliq S, Jahan S, Pervaiz A. Sequence variability of HCV Core region: important predictors of HCV induced pathogenesis and viral production. *Infection, Genetics and Evolution*. 2011 Apr;11(3):543-56.
15. Zeisel MB, Fofana I, Fafi-Kremer S, Baumert TF. Hepatitis C virus entry into hepatocytes: molecular mechanisms and targets for antiviral therapies. *Journal of Hepatology*. 2011 Mar;54(3):566-76.
16. Sakai A, Claire MS, Faulk K, Govindarajan S, Emerson SU, Purcell RH, et al. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 2003 Sep 30;100(20):11646-51.
17. Garcia-Sastre A, Biron CA. Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in detente. *Science*. 2006 May 12;312(5775):879-82.
18. Lam AM, Frick DN. Hepatitis C virus subgenomic replicon requires an active NS3 RNA helicase. *Journal of Virology*. 2006 Jan;80(1):404-11.
19. Fridell RA, Qiu D, Wang C, Valera L, Gao M. Resistance analysis of the hepatitis C virus NS5A inhibitor BMS-790052 in an in vitro replicon system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010 Sep;54(9):3641-50.
20. Lok SA. HCV NS5A Inhibitors in Development. *Clinics in Liver Disease*. 2013;17(1):111-21.
21. Kim H, Mazumdar B, Bose SK, Meyer K, Di Bisceglie AM, Hoft DF, et al. Hepatitis C virus-mediated inhibition of cathepsin S increases invariant-chain expression on hepatocyte surface. *Journal of Virology*. 2012 Sep;86(18):9919-28.

22. Lesburg CA, Cable MB, Ferrari E, Hong Z, Mannarino AF, Weber PC. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nature Structure & Molecular Biology*. 1999 Oct;6(10):937-43.
23. Delang L, Coelmont L, Neyts J. Antiviral therapy for hepatitis C virus: beyond the standard of care. *Viruses*. 2010 Apr;2(4):826-66.
24. Ribeiro RM, Li H, Wang S, Stoddard MB, Learn GH, Korber BT, et al. Quantifying the diversification of hepatitis C virus (HCV) during primary infection: estimates of the in vivo mutation rate. *PLoS Pathogens*. 2012;8(8):e1002881.
25. Scheel TK, Rice CM. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nature Medicine*. 2013 Jul;19(7):837-49.
26. Lohmann V. Hepatitis C virus RNA replication. *Curr Top Microbiology and Immunology*. 2013;369:167-98.
27. Bartenschlager R, Lohmann V, Penin F. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nature Reviews Microbiology*. 2013 Jul;11(7):482-96.
28. Lin CC, Tsai P, Sun HY, Hsu MC, Lee JC, Wu IC, et al. Apolipoprotein J, a glucose-upregulated molecular chaperone, stabilizes core and NS5A to promote infectious hepatitis C virus virion production. *Journal of Hepatology*. 2014 Nov;61(5):984-93.
29. Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V, Andre P. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends in Microbiology*. 2011 Feb;19(2):95-103.
30. Bukh J. Animal models for the study of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Gastroenterology*. 2012 May;142(6):1279-1287 e3.
31. Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, Douglas DN, Hao C, Rinfret A, et al. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nature Medicine*. 2001 Aug;7(8):927-33.
32. Dorner M, Horwitz JA, Robbins JB, Barry WT, Feng Q, Mu K, et al. A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature*. 2011 Jun 9;474(7350):208-11.

33. Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*. 1999 Jul 2;285(5424):110-3.
34. Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, Cheng-Mayer C, Rice CM, et al. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 2003 Jun 10;100(12):7271-6.
35. Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *The Journal of Experimental Medicine*. 2003 Mar 3;197(5):633-42.
36. Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, et al. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 2005 Jun 28;102(26):9294-9.
37. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Medicine*. 2005 Jul;11(7):791-6.
38. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*. 2005 Jul 22;309(5734):623-6.
39. Garg R, Kaur S, Aseri R, Aggarwal S, Singh JP, Mann S, et al. Hepatitis B & C among farmers - a seroprevalence study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2014 Nov;8(11):MC07-9.
40. Motta IJF, Sandim V, Alves G. Production and New Perspectives of a Blood Transfusion Service at the Brazilian National Cancer Institute in Rio de Janeiro, Brazil. *Blood Transfusion* 2010;8 (3):82-5.
41. Robinson JL. Vertical transmission of the hepatitis C virus: Current knowledge and issues. *Paediatrics and Child Health*. 2008 Jul;13(6):529-41.
42. Terrault NA. Sexual Activity as a Risk Factor for Hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36 (5) Suppl 1:99-105.

43. Cavaleiro Nde P, La Rosa A, Elagin S, Tengan FM, Barone AA. Hepatitis C virus: molecular and epidemiological evidence of male-to-female transmission. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2010 Sep-Oct;14(5):427-32.
44. Flamm SL, Parker RA, Chopra S. Risk factors associated with chronic hepatitis C virus infection: limited frequency of an unidentified source of transmission. *The American Journal of Gastroenterology*. 1998 Apr;93(4):597-600.
45. Zeuzem S, Teuber G, Lee JH, Ruster B, Roth WK. Risk factors for the transmission of hepatitis C. *Journal of Hepatology*. 1996;24(2 Suppl):3-10.
46. Ponde RA. Hidden hazards of HCV transmission. *Medical Microbiology and Immunology*. 2011 Feb;200(1):7-11.
47. Webster DP, Klenerman P, Dusheiko GM. Hepatitis C. *Lancet*. 2015 Mar 21;385(9973):1124-35.
48. Shueb D, Dearden J, Weatherall A, Bargery C, Moreea S, Alam S, et al. Extended duration therapy with pegylated interferon and ribavirin for patients with genotype 3 hepatitis C and advanced fibrosis: final results from the STEPS trial. *Journal of Hepatology*. 2014 Apr;60(4):699-705.
49. Veerapu NS, Park SH, Tully DC, Allen TM, Rehmann B. Trace amounts of sporadically reappearing HCV RNA can cause infection. *The Journal of Clinical Investigation*. 2014 Aug;124(8):3469-78.
50. Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology*. 2014 Nov;61(1 Suppl):S45-57.
51. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*. 2013 Jan;59(1):318-27.
52. Brant LJ, Ramsay ME, Tweed E, Hale A, Hurrelle M, Klapper P, et al. Planning for the healthcare burden of hepatitis C infection: Hepatitis C genotypes identified in England, 2002-2007. *Journal of Clinical Virology*. 2010 Jun;48(2):115-9.

53. Mauss S, Berger F, Vogel M, Pfeiffer-Vornkahl H, Alshuth U, Rockstroh JK, et al. Treatment results of chronic hepatitis C genotype 5 and 6 infections in Germany. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 2012 May;50(5):441-4.
54. Echevarria JM, Leon P, Pozo F, Avellon A. Follow-up of the prevalence of hepatitis C virus genotypes in Spain during a nine-year period (1996-2004). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2006 Jan;24(1):20-5.
55. Bruggmann P, Berg T, Ovrehus AL, Moreno C, Brandao Mello CE, Roudot-Thoraval F, et al. Historical epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in selected countries. *Journal of Viral Hepatitis*. 2014 May;21 Suppl 1:5-33.
56. Maieron A, Metz-Gercek S, Hackl F, Luger C, Ziachehabi A, Strauss R, et al. Chronic hepatitis C in Austria, 1992-2006: genotype distribution and demographic factors. *Euro Surveillance*. 2010 Feb 25;15(8):19492.
57. Antonishyn NA, Ast VM, McDonald RR, Chaudhary RK, Lin L, Andonov AP, et al. Rapid genotyping of hepatitis C virus by primer-specific extension analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005 Oct;43(10):5158-63.
58. Spach DH. In: HCV Epidemiology in the United States. Issue June 10, 2014 Online: <http://www.hepatitisc.uw.edu/go/screening-diagnosis/epidemiology-us/core-concept/all>.
59. Campiotto S, Pinho JR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJ, Spinelli V, et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2005 Jan;38(1):41-9.
60. Pereira LM, Martelli CM, Moreira RC, Merchan-Hamman E, Stein AT, Cardoso MR, et al. Prevalence and risk factors of Hepatitis C virus infection in Brazil, 2005 through 2009: a cross-sectional study. *BMC Infectious Diseases*. 2013;13:60.
61. Cavaleiro Nde P, Barone AA, Tengan FM. HCV serotypes in Brazilian patients. *International Journal of Infectious Diseases*. 2002 Sep;6(3):228-32.
62. Nishiya AS, de Almeida-Neto C, Ferreira SC, Alencar CS, Di-Lorenzo-Oliveira C, Levi JE, et al. HCV genotypes, characterization of mutations conferring drug resistance to protease inhibitors, and risk factors among blood donors in Sao Paulo, Brazil. *PLoS One*. 2014

9(1):e86413.

63. Lampe E, Lewis-Ximenez L, Espirito-Santo MP, Delvaux NM, Pereira SA, Peres-da-Silva A, et al. Genetic diversity of HCV in Brazil. *Antiviral Therapy*. 2013;18(3 Pt B):435-44.
64. Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology*. 2013 Apr;57(4):1333-42.
65. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2015 Jan;61(1):77-87.
66. Keam SJ, Cvetkovic RS. Peginterferon-alpha-2a (40 kD) plus ribavirin: a review of its use in the management of chronic hepatitis C mono-infection. *Drugs*. 2008;68(9):1273-317.
67. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of hepatitis C: 2002--June 10-12, 2002. *Hepatology*. 2002 Nov;36(5 Suppl 1):S3-20.
68. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of hepatitis C: 2002--June 10-12, 2002. *Hepatology*. National Institutes of Health, 2002 Nov;36(5 Suppl 1):S3-20.
69. FDA. US. Food and Drug Administration. FDA news release. FDA approves Victrelis for hepatitis C. Disponível online: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm256299.htm>. Acessado em 2 de dezembro de 2015
70. FDA. US. Food and Drug Administration. FDA news release. FDA approves Incivek for hepatitis C. Disponível online: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm255390.htm>. Acessado em 2 de dezembro de 2015
71. Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, Marcellin P, Vierling JM, Zeuzem S, et al. Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *The New England Journal of Medicine*. 2011 Mar 31;364(13):1207-17.
72. Vermehren J, Sarrazin C. New HCV therapies on the horizon. *Clinical Microbiology and Infection*. 2011 Feb;17(2):122-34.

73. Vermehren J, Sarrazin C. The role of resistance in HCV treatment. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2012 Aug;26(4):487-503.
74. Pawlotsky JM. New hepatitis C therapies: the toolbox, strategies, and challenges. *Gastroenterology*. 2014 May;146(5):1176-92.
75. FDA. US. Food and Drug Administration. Disponível online: <http://www.fda.gov/Drugs/ScienceResearch/ResearchAreas/Pharmacogenetics/default.htm>. Acessado em 21 de março de 2015.
76. EMA. European Medicines Agency. European Medicines Agency approves Daklinza for hepatitis C. Disponível online: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/003768/human_med_001792.jsp&mid=WC0b01ac058001d124. Acessado em 07 de março de 2016.
77. Halfon P, Sarrazin C. Future treatment of chronic hepatitis C with direct acting antivirals: is resistance important? *Liver International*. 2012 Feb;32 Suppl 1:79-87.
78. Lawitz E, Sulkowski MS, Ghalib R, Rodriguez-Torres M, Younossi ZM, Corregidor A, et al. Simeprevir plus sofosbuvir, with or without ribavirin, to treat chronic infection with hepatitis C virus genotype 1 in non-responders to pegylated interferon and ribavirin and treatment-naïve patients: the COSMOS randomised study. *Lancet*. 2014 Nov 15;384(9956):1756-65.
79. Poordad F, Hezode C, Trinh R, Kowdley KV, Zeuzem S, Agarwal K, et al. ABT-450/r-ombitasvir and dasabuvir with ribavirin for hepatitis C with cirrhosis. *The New England Journal of Medicine*. 2014 May 22;370(21):1973-82.
80. Sulkowski MS, Gardiner DF, Rodriguez-Torres M, Reddy KR, Hassanein T, Jacobson I, et al. Daclatasvir plus sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection. *The New England Journal of Medicine*. 2014 Jan 16;370(3):211-21.
81. Janardhan SV, Reau NS. Should NS5A inhibitors serve as the scaffold for all-oral anti-HCV combination therapies? *Journal of Hepatic Medicine*. 2015;7:11-20.
82. Delang L, Vliegen I, Froeyen M, Neyts J. Comparative study of the genetic barriers and pathways towards resistance of selective inhibitors of hepatitis C virus replication. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011 Sep;55(9):4103-13.

83. EASL. European Association for the Study of the Liver. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015. *Journal of Hepatology*. 2015 Jul;63(1):199-236.
84. Zeuzem S, Ghalib R, Reddy KR, Pockros PJ, Ben Ari Z, Zhao Y, et al. Grazoprevir-Elbasvir Combination Therapy for Treatment-Naive Cirrhotic and Noncirrhotic Patients With Chronic Hepatitis C Virus Genotype 1, 4, or 6 Infection: A Randomized Trial. *Annals of Internal Medicine*. 2015 Jul 7;163(1):1-13.
85. Roth D, Nelson DR, Bruchfeld A, Liapakis A, Silva M, Monsour H, Jr., et al. Grazoprevir plus elbasvir in treatment-naïve and treatment-experienced patients with hepatitis C virus genotype 1 infection and stage 4-5 chronic kidney disease (the C-SURFER study): a combination phase 3 study. *Lancet*. 2015 Oct 17;386(10003):1537-45.
86. FDA. US. Food and Drug Administration. FDA approves Zepatier for hepatitis C. Disponível online: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.DrugDetails>. Acessado em 25 de Fevereiro de 2016.
87. Sociedade Brasileira de Hepatologia (SBH) e Sociedade Brasileira de Infectologia (SBI). Consenso. Recomendações das Sociedades Brasileiras de Hepatologia (SBH) e Infectologia (SBI) para o tratamento da hepatite C no Brasil com novos medicamentos antivirais de ação direta (DAAs). *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2016;20(2):2-7.
88. Hayes CN, Chayama K. Emerging treatments for chronic hepatitis C. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2014 Mar;114(3):204-15.
89. Poole RM. Daclatasvir + asunaprevir: first global approval. *Drugs*. 2014 Sep;74(13):1559-71.
90. Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, Di Bisceglie AM, Reddy KR, Bzowej NH, et al. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *The New England Journal of Medicine*. 2011 Jun 23;364(25):2405-16.
91. Ali A, Aydin C, Gildemeister R, Romano KP, Cao H, Ozen A, et al. Evaluating the role of macrocycles in the susceptibility of hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitors to drug resistance. *ACS Chemical Biology*. 2013 Jul 19;8(7):1469-78.

92. De Clercq E. Current race in the development of DAAs (direct-acting antivirals) against HCV. *Biochemical Pharmacology*. 2014 Jun 15;89(4):441-52.
93. De Clercq E. Development of antiviral drugs for the treatment of hepatitis C at an accelerating pace. *Reviews in Medical Virology*. 2015 Jul;25(4):254-67.
94. Moreau B, O'Meara JA, Bordeleau J, Garneau M, Godbout C, Gorys V, et al. Discovery of hepatitis C virus NS3-4A protease inhibitors with improved barrier to resistance and favorable liver distribution. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2014 Mar 13;57(5):1770-6.
95. Kinoshita K, Iwasa T, Takase A, Nakamura K. [Preclinical and clinical properties of vaniprevir (VANIHEP(R) Capsules 150 mg), a novel therapeutic agent for hepatitis C]. *Nihon Yakurigaku Zasshi. Folia Pharmacologica Japonica*. 2015 Sep;146(3):159-70.
96. Sarrazin C, Zeuzem S. Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*. 2010 Feb;138(2):447-62.
97. Cento V, Mirabelli C, Salpini R, Dimonte S, Artese A, Costa G, et al. HCV genotypes are differently prone to the development of resistance to linear and macrocyclic protease inhibitors. *PLoS One*. 2012;7(7):e39652.
98. Hezode C, Chevaliez S, Scoazec G, Soulier A, Varaut A, Bouvier-Alias M, et al. Retreatment with sofosbuvir and simeprevir of patients with HCV GT1 or 4 who previously failed a daclatasvir-containing regimen. *Hepatology*. 2016 Feb 8.
99. Poveda E, Garcia F. Telaprevir resistance. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2013 Jul;31 Suppl 3:26-32.
100. Lenz O, Verbinnen T, Fevery B, Tambuyzer L, Vijgen L, Peeters M, et al. Virology analyses of HCV isolates from genotype 1-infected patients treated with simeprevir plus peginterferon/ribavirin in Phase IIb/III studies. *Journal of Hepatology*. 2015 May;62(5):1008-14.
101. Belda O, Targett-Adams P. Small molecule inhibitors of the hepatitis C virus-encoded NS5A protein. *Virus Research*. 2012 Dec;170(1-2):1-14.
102. Appel N, Pietschmann T, Bartenschlager R. Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *Journal of Virology*. 2005 Mar;79(5):3187-94.

103. Tellinghuisen TL, Foss KL, Treadaway J. Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathogens*. 2008 Mar;4(3):e1000032.
104. Lambert SM, Langley DR, Garnett JA, Angell R, Hedgethorne K, Meanwell NA, et al. The crystal structure of NS5A domain 1 from genotype 1a reveals new clues to the mechanism of action for dimeric HCV inhibitors. *Protein Science*. 2014 Jun;23(6):723-34.
105. Kohler JJ, Nettles JH, Amblard F, Hurwitz SJ, Bassit L, Stanton RA, et al. Approaches to hepatitis C treatment and cure using NS5A inhibitors. *Journal of Infection and Drug Resistance*. 2014;7:41-56.
106. Nakamoto S, Kanda T, Wu S, Shirasawa H, Yokosuka O. Hepatitis C virus NS5A inhibitors and drug resistance mutations. *World Journal of Gastroenterology*. 2014 Mar 21;20(11):2902-12.
107. Paolucci S, Fiorina L, Mariani B, Gulminetti R, Novati S, Barbarini G, et al. Naturally occurring resistance mutations to inhibitors of HCV NS5A region and NS5B polymerase in DAA treatment-naive patients. *Virology Journal*. 2013;10:355.
108. Targett-Adams P, Graham EJ, Middleton J, Palmer A, Shaw SM, Lavender H, et al. Small molecules targeting hepatitis C virus-encoded NS5A cause subcellular redistribution of their target: insights into compound modes of action. *Journal of Virology*. 2011 Jul;85(13):6353-68.
109. Membreno FE, Lawitz EJ. The HCV NS5B nucleoside and non-nucleoside inhibitors. *Clinical Liver Disease*. 2011 Aug;15(3):611-26.
110. Afdhal N, O'Brien C, Godofsky E, Rodriguez-Torres M, Pappas SC, Lawitz E, et al. Valopicitabine (NM283), alone or with peginterferon, compared to peginterferon/ribavirin (pegIFN/RBV) retreatment in patients with HCV-1 infection and prior non-response to pegIFN/RBV: one-year results. *Journal of Hepatology*. 2007;46:S5.
111. Di Maio VC, Cento V, Mirabelli C, Artese A, Costa G, Alcaro S, et al. Hepatitis C virus genetic variability and the presence of NS5B resistance-associated mutations as natural polymorphisms in selected genotypes could affect the response to NS5B inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014 May;58(5):2781-97.

112. Donaldson EF, Harrington PR, O'Rear JJ, Naeger LK. Clinical evidence and bioinformatics characterization of potential hepatitis C virus resistance pathways for sofosbuvir. *Hepatology*. 2014 Jan;61(1):56-65.
113. Mani N. Clinically Relevant HCV Drug Resistance Mutations Figure and Tables. HCV Phenotype Working Group, HCV Drug Development Advisory Group. *Annals of the Forum for Collaborative HIV Research*. 2012;14 (2):1-10.
114. Schneider MD, Sarrazin C. Antiviral therapy of hepatitis C in 2014: do we need resistance testing? *Antiviral Research*. 2014 May;105:64-71.
115. Abdelrahman T, Hughes J, Main J, McLauchlan J, Thursz M, Thomson E. Next-generation sequencing sheds light on the natural history of hepatitis C infection in patients who fail treatment. *Hepatology*. 2014 Jan;61(1):88-97.
116. Ninomiya M, Ueno Y, Funayama R, Nagashima T, Nishida Y, Kondo Y, et al. Use of illumina deep sequencing technology to differentiate hepatitis C virus variants. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011 Mar;50(3):857-66.
117. Hall TA, editor. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT; 1999.
118. Garson JA, Ring C, Tuke P, Tedder RS. Enhanced detection by PCR of hepatitis C virus RNA. *Lancet*. 1990 Oct 6;336(8719):878-9.
119. Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*. 2012;13:341.
120. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. 2011 Jul 21;475(7356):348-52.
121. Wyles DL. Beyond telaprevir and boceprevir: resistance and new agents for hepatitis C virus infection. *Topics in Antiviral Medicine*. 2012 Oct-Nov;20(4):139-45.
122. Eltahla AA, Luciani F, White PA, Lloyd AR, Bull RA. Inhibitors of the Hepatitis C Virus Polymerase; Mode of Action and Resistance. *Viruses*. 2015 Oct;7(10):5206-24.

123. Alcantara LC, Cassol S, Libin P, Deforche K, Pybus OG, Van Ranst M, et al. A standardized framework for accurate, high-throughput genotyping of recombinant and non-recombinant viral sequences. *Nucleic Acids Research*. 2009 Jul;37(Web Server issue):W634-42.
124. Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, et al. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *Journal of Virology*. 1999 Jan;73(1):152-60.
125. Cuypers L, Snoeck J, Vrancken B, Kerremans L, Vuagniaux G, Verbeeck J, et al. A near-full length genotypic assay for HCV1b. *Journal of Virological Methods*. 2014 Dec;209:126-35.
126. Dierynck I, Thys K, Ghys A, Sullivan JC, Kieffer TL, Aerssens J, et al. Deep-sequencing analysis of the gene encoding the hepatitis C virus nonstructural 3-4A protease confirms a low prevalence of telaprevir-resistant variants at baseline and the end of the REALIZE study. *The Journal of Infectious Diseases*. 2014 Dec 15;210(12):1871-80.
127. Wyles DL, Gutierrez JA. Importance of HCV genotype 1 subtypes for drug resistance and response to therapy. *Journal of Viral Hepatitis*. 2014 Apr;21(4):229-40.
128. Aissa Larousse J, Trimoulet P, Recordon-Pinson P, Papuchon J, Azzouz MM, Ben Mami N, et al. Natural prevalence of hepatitis C virus (HCV) variants resistant to protease and polymerase inhibitors in patients infected with HCV genotype 1 in Tunisia. *Journal of Medical Virology*. 2014 Aug;86(8):1350-9.
129. Margeridon-Thermet S, Le Pogam S, Li L, Liu TF, Shulman N, Shafer RW, et al. Similar prevalence of low-abundance drug-resistant variants in treatment-naïve patients with genotype 1a and 1b hepatitis C virus infections as determined by ultradeep pyrosequencing. *PLoS One*. 2014;9(8):e105569.
130. Shindo H, Maekawa S, Komase K, Sueki R, Miura M, Kadokura M, et al. Characterization of naturally occurring protease inhibitor-resistance mutations in genotype 1b hepatitis C virus patients. *Hepatology International*. 2012 Aug 18.
131. Solund C, Krarup H, Ramirez S, Thielsen P, Roge BT, Lunding S, et al. Nationwide experience of treatment with protease inhibitors in chronic hepatitis C patients in denmark: identification of viral resistance mutations. *PLoS One*. 2014;9(12):e113034.

132. May S, Ngui SL, Collins S, Lattimore S, Ramsay M, Tedder RS, et al. Molecular epidemiology of newly acquired hepatitis C infections in England 2008-2011: genotype, phylogeny and mutation analysis. *Journal of Clinical Virology*. 2015 Mar;64:6-11.
133. Hajji H, Aherfi S, Motte A, Ravaux I, Mokhtari S, Ruiz JM, et al. Diversity of 1,213 hepatitis C virus NS3 protease sequences from a clinical virology laboratory database in Marseille university hospitals, southeastern France. *Journal of Medical Virology*. 2015 May 8.
134. Lisboa-Neto G, Noble CF, Pinho JR, Malta FM, Gomes-Gouvea MS, Alvarado-Mora MV, et al. Resistance mutations are rare among protease inhibitor treatment-naïve hepatitis C genotype-1 patients with or without HIV coinfection. *Antiviral Therapy*. 2015;20(3):281-7.
135. Lenz O, Verbinnen T, Lin TI, Vijgen L, Cummings MD, Lindberg J, et al. In vitro resistance profile of the hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor TMC435. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010 May;54(5):1878-87.
136. Lenz O, Fevery B, Verbinnen T, Tambuyzer L, Vijgen L, Peeters M, et al. Resistance analyses of HCV isolates from patients treated with simeprevir in phase IIB/III studies. *Hepatology*. 2013;58:793A.
137. Hoffmann L, Faffe DS, Lima JF, Capitanio TA, Cabral BC, Ürményi TP, et al. No correspondence between resistance mutations in the HCV-NS3 protease at baseline and early telaprevir-based triple therapy. *BBA Clinical*. 2015;3:146-51.
138. Peres-da-Silva A, de Almeida AJ, Lampe E. NS5A inhibitor resistance-associated polymorphisms in Brazilian treatment-naïve patients infected with genotype 1 hepatitis C virus. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014 Mar;70(3):726-30.
139. Yoshimi S, Imamura M, Murakami E, Hiraga N, Tsuge M, Kawakami Y, et al. Long term persistence of NS5A inhibitor-resistant hepatitis C virus in patients who failed daclatasvir and asunaprevir therapy. *Journal of Medical Virology*. 2015 May 8.
140. Forns X, Gordon SC, Zuckerman E, Lawitz E, Calleja JL, Hofer H, et al. Grazoprevir/Elbasvir plus Ribavirin For Chronic HCV Genotype-1 Infection After Failure of Combination Therapy Containing a Direct-Acting Antiviral Agent. *Journal of Hepatology*. 2015 Apr 17.

141. Hirotsu Y, Kanda T, Matsumura H, Moriyama M, Yokosuka O, Omata M. HCV NS5A resistance-associated variants in a group of real-world Japanese patients chronically infected with HCV genotype 1b. *Hepatology International*. 2015 Jul;9(3):424-30.
142. Pol S, Sulkowski MS, Hassanein T, Gane EJ, Liu L, Mo H, et al. Sofosbuvir plus pegylated interferon and ribavirin in patients with genotype 1 hepatitis C virus in whom previous therapy with direct-acting antivirals has failed. *Hepatology*. 2015 Jul;62(1):129-34.
143. Tong X, Le Pogam S, Li L, Haines K, Piso K, Baronas V, et al. In vivo emergence of a novel mutant L159F/L320F in the NS5B polymerase confers low-level resistance to the HCV polymerase inhibitors mericitabine and sofosbuvir. *The Journal of Infectious Diseases*. 2014 Mar 1;209(5):668-75.
144. Svarovskaia ES, Dvory-Sobol H, Parkin N, Hebner C, Gontcharova V, Martin R, et al. Infrequent development of resistance in genotype 1-6 hepatitis C virus-infected subjects treated with sofosbuvir in phase 2 and 3 clinical trials. *Clinical Infectious Diseases*. 2014 Dec 15;59(12):1666-74.
145. Chulanov V, Zhdanov K, Kersey K. Sofosbuvir plus Ribavirin for the Treatment of Russian Patients with Chronic HCV Genotype 1 or 3 Infection. . 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD). Boston, MA. 2014;Abstract 982.
146. Costantino A, Spada E, Equestre M, Bruni R, Tritarelli E, Coppola N, et al. Naturally occurring mutations associated with resistance to HCV NS5B polymerase and NS3 protease inhibitors in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C. *Virology Journal*. 2015;12:186.
147. Rajyaguru S, Xu S, Hebner C, Svarovskaia E, Gontcharova V, Doehle B, et al. Sofosbuvir selects the NS5B S282T mutation in vitro in genotype 1-6 replicons and is not cross-resistant to resistance associated variants selected by other classes of antiviral inhibitors. *Hepatology*. 2013;58:793A.
148. Ji H, Kozak RA, Biondi MJ, Pilon R, Vallee D, Liang BB, et al. Next generation sequencing of the hepatitis C virus NS5B gene reveals potential novel S282 drug resistance mutations. *Virology*. 2015 Mar;477:1-9.

149. Gane EJ, Stedman CA, Hyland RH, Ding X, Svarovskaia E, Symonds WT, et al. Nucleotide polymerase inhibitor sofosbuvir plus ribavirin for hepatitis C. *The New England Journal of Medicine*. 2013 Jan 3;368(1):34-44.
150. Ito J, Suda G, Yamamoto Y, Nagasaka A, Furuya K, Kumagai K, et al. Prevalence and characteristics of naturally occurring sofosbuvir resistance-associated variants in patients with hepatitis C virus genotype 1b infection. *Hepatology Research*. 2016 Feb 20.
151. Chen ZW, Li H, Ren H, Hu P. Global prevalence of pre-existing HCV variants resistant to direct-acting antiviral agents (DAAs): mining the GenBank HCV genome data. *Scientific Reports*. 2016;6:20310.
152. Nguyen LT, Gray E, Dean J, Carr M, Connell J, De Gascun C, et al. Baseline prevalence and emergence of protease inhibitor resistance mutations following treatment in chronic HCV genotype-1-infected individuals. *Antiviral Therapy*. 2015;20(8):865-9.
153. Quer J, Gregori J, Rodriguez-Frias F, Buti M, Madejon A, Perez-del-Pulgar S, et al. High-resolution hepatitis C virus subtyping using NS5B deep sequencing and phylogeny, an alternative to current methods. *Journal of Clinical Microbiology*. 2015 Jan;53(1):219-26.
154. Yun Z, Lara C, Johansson B, Lorenzana de Rivera I, Sonnerborg A. Discrepancy of hepatitis C virus genotypes as determined by phylogenetic analysis of partial NS5 and core sequences. *Journal of Medical Virology*. 1996 Jul;49(3):155-60.
155. Gonzalez-Candelas F, Lopez-Labrador FX, Bracho MA. Recombination in hepatitis C virus. *Viruses*. 2011 Oct;3(10):2006-24.
156. Kalinina O, Norder H, Mukomolov S, Magnus LO. A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. *Journal of Virology*. 2002 Apr;76(8):4034-43.
157. Kageyama S, Agdamag DM, Alesna ET, Leano PS, Heredia AM, Abellanosa-Tac-An IP, et al. A natural inter-genotypic (2b/1b) recombinant of hepatitis C virus in the Philippines. *Journal of Medical Virology*. 2006 Nov;78(11):1423-8.
158. Noppornpanth S, Lien TX, Poovorawan Y, Smits SL, Osterhaus AD, Haagmans BL. Identification of a naturally occurring recombinant genotype 2/6 hepatitis C virus. *Journal of Virology*. 2006 Aug;80(15):7569-77.

159. Legrand-Abravanel F, Claudinon J, Nicot F, Dubois M, Chapuy-Regaud S, Sandres-Saune K, et al. New natural intergenotypic (2/5) recombinant of hepatitis C virus. *Journal of Virology*. 2007 Apr;81(8):4357-62.
160. Lee YM, Lin HJ, Chen YJ, Lee CM, Wang SF, Chang KY, et al. Molecular epidemiology of HCV genotypes among injection drug users in Taiwan: Full-length sequences of two new subtype 6w strains and a recombinant form_2b6w. *Journal of Medical Virology*. 2010 Jan;82(1):57-68.
161. Colina R, Casane D, Vasquez S, Garcia-Aguirre L, Chunga A, Romero H, et al. Evidence of intratypic recombination in natural populations of hepatitis C virus. *Journal of General Virology*. 2004 Jan;85(Pt 1):31-7.
162. Ross RS, Verbeeck J, Viazov S, Lemey P, Van Ranst M, Roggendorf M. Evidence for a complex mosaic genome pattern in a full-length hepatitis C virus sequence. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 2008 Oct 30;4:249-54.
163. Moreno P, Alvarez M, Lopez L, Moratorio G, Casane D, Castells M, et al. Evidence of recombination in Hepatitis C Virus populations infecting a hemophiliac patient. *Virology Journal*. 2009 Nov 18;6:203.
164. Calado RA, Rocha MR, Parreira R, Piedade J, Venenno T, Esteves A. Hepatitis C virus subtypes circulating among intravenous drug users in Lisbon, Portugal. *Journal of Medical Virology*. 2011 Apr;83(4):608-15.
165. Du H, Qi Y, Hao F, Huang Y, Mao L, Ji S, et al. Complex patterns of HCV epidemic in Suzhou: evidence for dual infection and HCV recombination in East China. *Journal of Clinical Virology*. 2012 Jul;54(3):207-12.
166. Shi W, Freitas IT, Zhu C, Zheng W, Hall WW, Higgins DG. Recombination in hepatitis C virus: identification of four novel naturally occurring inter-subtype recombinants. *PLoS One*. 2012;7(7):e41997.
167. Hedskog C, Doeble B, Chodavarapu K, Gontcharova V, Crespo Garcia J, De Knecht R, et al. Characterization of hepatitis C virus intergenotypic recombinant strains and associated virological response to sofosbuvir/ribavirin. *Hepatology*. 2015 Feb;61(2):471-80.

APÊNDICE

A - Relatórios do sequenciamento de nova geração

Run Report for Auto_user_SN2-113-Karine_Chip1_149

Run Summary

Barcode Name	Sample	Bases	≥ Q20	Reads	Mean Read Length
No barcode	none	1,341,750	1,133,903	9,730	138 bp
IonXpress_021	BSB1	7,189,130	6,601,988	41,009	175 bp
IonXpress_022	BSB2	8,142,069	7,488,802	46,524	175 bp
IonXpress_023	BSB3	5,073,655	4,690,503	29,096	174 bp
IonXpress_024	MITC1	8,760,722	8,069,445	52,625	166 bp
IonXpress_025	MITC2	7,269,420	6,649,146	46,107	158 bp
IonXpress_026	MITC3	6,283,109	5,835,049	34,279	183 bp
IonXpress_027	IVS1	7,242,864	6,653,166	37,014	196 bp
IonXpress_028	IVS2	8,938,541	8,239,298	43,384	206 bp

Run Report for Auto_user_SN2-113-Karine_Chip1_149

IonXpress_029	IVS3	7,608,390	6,958,610	34,865	218 bp
IonXpress_030	LOD1	2,929,149	2,665,422	12,895	227 bp
IonXpress_031	LOD2	11,876,853	10,616,603	55,873	213 bp
IonXpress_032	LOD3	8,491,314	7,653,526	38,810	219 bp

Test Fragment	Reads	Percent 50AQ17	Read Length Histogram
TF_A	3,146	82%

Run Report for user_SN2-126-Karine_11022015_duplicates

Run Summary

Barcode Name	Sample	Bases	$\geq Q20$	Reads	Mean Read Length
No barcode	none	2,569,127	2,166,253	12,992	198 bp
IonXpress_001	AAS	2,671,634	2,385,803	9,208	290 bp
IonXpress_002	DMP	2,946,128	2,631,403	10,040	293 bp
IonXpress_003	APSB	3,231,736	2,866,808	11,141	290 bp
IonXpress_004	NJVA	3,657,539	3,230,793	12,540	292 bp
IonXpress_005	MSS	3,426,296	3,038,451	11,718	292 bp
IonXpress_006	MNB	2,033,563	1,799,024	7,159	284 bp
IonXpress_007	DSR	3,046,335	2,717,198	11,030	276 bp
IonXpress_008	AFS	2,578,354	2,284,198	9,492	272 bp
IonXpress_009	ALSM	3,741,746	3,327,230	13,167	284 bp
IonXpress_010	EBA	3,064,896	2,716,516	11,245	273 bp
IonXpress_011	DRS	1,438,437	1,280,553	5,163	279 bp

Run Report for user_SN2-126-Karine.11022015_duplicates

IonXpress_012	JSAL	2,996,123	2,677,406	11,241	267 bp
IonXpress_013	ATL	3,762,233	3,319,122	13,468	279 bp
IonXpress_014	ASV	1,679,830	1,485,994	5,976	281 bp
IonXpress_015	PHT	2,360,806	2,090,999	8,290	285 bp
IonXpress_016	GSS	3,458,926	3,045,855	12,328	281 bp
IonXpress_017	ESO	3,385,279	3,011,246	12,143	279 bp
IonXpress_018	RBL	1,813,231	1,611,780	6,430	282 bp
IonXpress_019	JF	3,362,196	2,997,393	12,406	271 bp
IonXpress_020	WD	2,394,884	2,151,170	8,615	278 bp
IonXpress_021	ECP	2,696,281	2,394,506	10,039	269 bp
IonXpress_022	VS	3,221,230	2,884,785	11,338	284 bp
IonXpress_023	MN	1,635,624	1,452,298	5,864	279 bp
IonXpress_024	JST	2,459,478	2,192,489	8,971	274 bp
IonXpress_025	EPG	2,823,125	2,526,195	10,778	262 bp
IonXpress_026	RPS	3,254,891	2,921,994	12,113	269 bp
IonXpress_027	LAR	3,091,490	2,772,687	11,429	270 bp
IonXpress_028	AM	2,635,388	2,363,206	9,721	271 bp
IonXpress_029	MCLP	3,229,069	2,886,717	11,801	274 bp
IonXpress_030	MJGM	2,845,058	2,550,121	10,444	272 bp
IonXpress_031	MAS	2,785,454	2,507,698	10,430	267 bp
IonXpress_032	MCCSH	2,787,602	2,499,148	10,514	265 bp
IonXpress_033	MCCLDFK	2,739,828	2,458,838	10,443	262 bp
IonXpress_034	RCP	2,660,365	2,386,952	9,811	271 bp
IonXpress_035	AMG	2,786,315	2,482,745	10,224	273 bp
IonXpress_036	RCC	3,375,175	3,014,968	12,244	276 bp
IonXpress_038	BBM	2,719,569	2,434,797	10,504	259 bp
IonXpress_040	API	3,020,319	2,714,981	11,572	261 bp
IonXpress_042	SAD	2,613,158	2,350,964	9,799	267 bp
IonXpress_043	JCMM	2,372,945	2,121,988	8,857	268 bp
IonXpress_044	DAA	2,762,779	2,465,187	10,488	263 bp
IonXpress_045	FAS	3,362,156	3,018,818	12,348	272 bp
IonXpress_046	ALC	3,185,534	2,837,571	11,617	274 bp
IonXpress_047	SCMP	2,624,794	2,339,446	9,504	276 bp

Run Report for user_SN2-126-Karine.11022015_duplicates

IonXpress_048	JFO	2,738,313	2,456,114	9,861	278 bp
IonXpress_049	JMN	3,041,409	2,722,888	10,946	278 bp
IonXpress_050	JMGS	2,288,323	2,051,999	8,542	268 bp

Test Fragment	Reads	Percent 50AQ17	Read Length Histogram
---------------	-------	----------------	-----------------------

TF_A	3,180	83%
------	-------	-----	--

Run Report for Auto_user_SN2-144-Karine_270415_197

Run Summary

Consensus Key 1-Mer - Library Ave. Peak = 69

Addressable Wells 1,262,519

With ISPs	877,338	69.5%
Live	873,377	99.5%
Test Fragment	1,616	00.2%
Library	871,761	99.8%

Library ISPs 871,761

Filtered: Polyclonal	346,753	39.8%
Filtered: Low Quality	129,740	14.9%
Filtered: Primer Dimer	292	00.0%
Final Library ISPs	394,976	45.3%

Barcode Name	Sample	Bases	≥ Q20	Reads	Mean Read Length
No barcode	none	2,287,619	1,732,622	14,941	153 bp
IonXpress_001	AS	1,575,491	1,297,995	7,568	208 bp
IonXpress_002	RSO	1,416,508	1,178,547	6,385	222 bp
IonXpress_003	APA	2,109,104	1,740,557	9,411	224 bp
IonXpress_004	AMC	2,095,598	1,716,384	9,350	224 bp
IonXpress_005	ETF	1,862,745	1,523,137	8,163	228 bp
IonXpress_006	MPS	1,154,702	945,679	5,135	225 bp
IonXpress_007	ALSP	855,063	693,885	3,951	216 bp
IonXpress_008	AGP	806,944	657,262	3,728	216 bp
IonXpress_009	MP	1,522,229	1,237,285	6,887	221 bp
IonXpress_010	ALH	1,915,968	1,585,852	8,463	226 bp
IonXpress_011	NB	1,420,440	1,158,336	6,574	216 bp

Run Report for Auto_user_SN2-144-Karine_270415_197

IonXpress_012	VG	1,816,954	1,499,465	8,326	218 bp
IonXpress_013	VLS	972,943	804,130	4,259	228 bp
IonXpress_014	ACN	1,666,909	1,356,006	7,638	218 bp
IonXpress_015	ARO	1,430,284	1,163,793	6,516	220 bp
IonXpress_016	DJS	1,676,346	1,393,886	7,029	238 bp
IonXpress_017	FMS	2,208,237	1,811,477	9,596	230 bp
IonXpress_018	JUL	1,369,874	1,082,849	6,323	217 bp
IonXpress_019	IMPC	1,199,433	980,782	5,157	233 bp
IonXpress_020	PWP	1,644,721	1,343,282	7,103	232 bp
IonXpress_021	NL	1,966,630	1,597,105	9,078	217 bp
IonXpress_022	IMSS	2,523,356	2,052,182	12,418	203 bp
IonXpress_023	CHF	2,745,490	2,220,923	13,110	209 bp
IonXpress_024	MLCCO	1,404,010	1,147,040	6,553	214 bp
IonXpress_025	RDC	1,513,820	1,249,519	6,937	218 bp
IonXpress_026	AAO	1,206,255	985,887	5,655	213 bp
IonXpress_027	JFA	1,117,368	920,777	5,099	219 bp
IonXpress_028	RPS	2,481,899	2,055,222	11,019	225 bp
IonXpress_029	RS	1,092,810	890,335	5,091	215 bp
IonXpress_030	JCO	1,490,499	1,229,959	6,745	221 bp
IonXpress_031	JCS	1,369,202	1,124,577	6,168	222 bp
IonXpress_032	WOM	1,235,309	1,015,857	5,421	228 bp
IonXpress_033	JGF	1,568,575	1,279,586	7,155	219 bp
IonXpress_034	LMAO	2,075,147	1,694,103	9,212	225 bp
IonXpress_035	EFL	2,037,702	1,668,019	9,190	222 bp
IonXpress_036	JFFM	2,836,685	2,299,434	13,166	215 bp
IonXpress_037	FAO	1,578,827	1,283,491	7,369	214 bp
IonXpress_038	CNS	1,633,317	1,335,454	7,499	218 bp
IonXpress_039	DSJ	1,984,575	1,624,515	8,848	224 bp
IonXpress_040	ASP	1,625,194	1,340,382	7,210	225 bp
IonXpress_041	WOG	2,192,291	1,797,951	9,793	224 bp
IonXpress_042	AOS	1,728,339	1,423,039	7,748	223 bp
IonXpress_043	SASG	2,245,514	1,833,667	9,895	227 bp
IonXpress_044	EDC	2,374,646	1,957,839	10,336	230 bp

Run Report for Auto_user_SN2-144-Karine_270415_197

IonXpress_045	PRXB	1,806,212	1,484,460	8,174	221 bp
IonXpress_046	CMD	2,580,646	2,129,953	11,023	234 bp
IonXpress_047	SRS	1,902,110	1,569,877	8,581	222 bp
IonXpress_048	MAOM	1,853,349	1,519,929	8,596	216 bp
IonXpress_049	VSR	1,114,646	919,469	5,383	207 bp

Test Fragment	Reads	Percent 50AQ17	Read Length Histogram
TF_A	1,494	72%

B - Artigos Publicados

Arch Virol. 2016 Aug;161(8):2161-8. doi: 10.1007/s00705-016-2889-5. Epub 2016 May 18.

HCV inter-subtype 1a/1b recombinant detected by complete-genome next-generation sequencing.

[Gaspareto KV](#)^{1,2,3}, [Ribeiro RM](#)^{4,5}, [de Mello Malta F](#)^{6,7}, [Gomes-Gouvêa MS](#)^{1,2}, [Muto NH](#)⁸, [Mendes-Correa MC](#)^{5,9}, [Rozanski A](#)¹⁰, [Carrilho FJ](#)^{1,2}, [Sabino EC](#)^{4,5}, [Pinho JR](#)^{1,2,3,8}.

⊕ Author information

Abstract

Next-generation sequencing (NGS) provides a practical approach to HCV complete-genome sequencing, detecting low-frequency variants and allowing analysis of viral genetic diversity (quasispecies) in the sample, and so far, it is very useful for identifying preexisting drug-resistant mutants and emerging escape mutations, as well as detecting viral recombinants containing genomic regions from different genotypes and subtypes. The aim of this study was to analyze the complete coding region of hepatitis C virus (HCV) genotype 1 (subtypes 1a and 1b) from patients with chronic infection who were direct-acting antiviral (DAA) naïve. Next-generation sequencing (Ion Torrent™ PGM) was used to determine the sequence of the complete coding region of 100 HCV-monoinfected DAA-naïve patients (51 and 49 subtypes 1a and 1b, respectively). We report the first description of nearly complete HCV genome sequences of subtype 1a and 1b isolates from a large population of Brazilian patients with chronic hepatitis C, and HCV-1a grouped in two different clades. Using this methodology, an inter-subtype 1a/1b recombinant was identified in this study.

PMID: 27194536 DOI: [10.1007/s00705-016-2889-5](#)

[PubMed - in process]

Antivir Ther. 2016 Jun 17. doi: 10.3851/IMP3057. [Epub ahead of print]

Resistance-associated variants in HCV subtypes 1a and 1b detected by Ion Torrent sequencing platform.

[Gaspareto KV](#)¹, [Ribeiro RM](#), [Malta FM](#), [Gomes-Gouvêa MS](#), [Muto NH](#), [Romano CM](#), [Mendes-Correa MC](#), [Carrilho FJ](#), [Sabino EC](#), [Pinho JR](#).

⊕ Author information

Abstract

BACKGROUND: As a result of increased understanding of the hepatitis C virus (HCV) life cycle, a new generation of drugs known as direct-acting antivirals (DAAs) was developed and is constantly being improved. At baseline, HCV variants resistant to DAA therapy may pre-exist, increasing the likelihood of treatment failure. The aim of this study was to investigate the presence of resistance-associated variants (RAVs) in treatment-naïve patients infected with HCV subtypes 1a and 1b.

METHODS: Next-generation sequencing was used to assess the frequencies of NS3-4A, NS5A and NS5B RAVs in 100 HCV monoinfected DAA-naïve patients (HCV-1a: n=51; HCV-1b: n=49).

RESULTS: Complete HCV sequence information was obtained for most samples. RAVs were detected in the NS3-4A (T54S, V55A, Q80K and R155K), NS5A (Q30H/R, H58P and Y93C/H/N), and NS5B (A421V) regions in 10%, 22%, and 8%, respectively, of patients infected with HCV subtype 1a. Among the patients infected with HCV subtype 1b, mutations in the NS3-4A (F43I, T54S, Q80H, D168E and M175L), NS5A (L28M, R30Q, L31M, Q54H, A92T and Y93H) and NS5B (L159F and C316N), regions were observed in 12%, 53% and 31% of patients, respectively.

CONCLUSIONS: High-throughput DNA sequencing allows an easier and more complete analysis of DAAs RAVs, including mutations that represent only a minor variant of the whole viral population. RAVs to the three different classes of DAAs were found in our population. The characterization of their profile in the circulating virus is relevant to determine the better treatment option for infected individuals or to guide the implementation of treatment policies.

PMID: 27314166 DOI: [10.3851/IMP3057](#)

[PubMed - as supplied by publisher]