

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA

JOÃO PAULO VILELA RODRIGUES

Efetividade, segurança e dinâmica de seleção de mutações de resistência envolvendo o uso de fármacos de ação direta na infecção crônica pelo genótipo 3 do HCV

Ribeirão Preto
2023

JOÃO PAULO VILELA RODRIGUES

Efetividade, segurança e dinâmica de seleção de mutações de resistência envolvendo o uso de fármacos de ação direta na infecção crônica pelo genótipo 3 do HCV

Versão corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção de título de doutor em Clínica Médica.

Área de Concentração: Clínica Médica

Orientadora: Profa Dra Fernanda Fernandes Souza

Ribeirão Preto
2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Rodrigues, João Paulo Vilela

Efetividade, segurança e dinâmica de seleção de mutações de resistência envolvendo o uso de fármacos de ação direta na infecção crônica pelo genótipo 3 do HCV. Ribeirão Preto, 2023.

90 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica.

Orientadora: Souza, Fernanda Fernandes.

1. Vírus da Hepatite C. 2. Hepatite C crônica. 3. Antivirais de ação direta. 4. Resistência viral.

Nome: RODRIGUES, João Paulo Vilela.

Título: Efetividade, segurança e dinâmica de seleção de mutações de resistência envolvendo o uso de fármacos de ação direta na infecção crônica pelo genótipo 3 do HCV.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção de título de doutor em Clínica Médica.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, José Lucas e Josefina, pelo exemplo que sempre foram por meio de valores e de suas condutas e por ensinarem, desde muito cedo, que a educação é o agente transformador que pode fazer a diferença na vida das pessoas e tornar a sociedade mais justa!

Aos meus irmãos Carolline e Rodrigo, pela amizade e por também serem um exemplo de dedicação àquilo que fazem!

À Marina, pela parceria e paciência, especialmente na parte final desta jornada!

Ao amor da minha vida, Júlia, minha luz e o maior motivo para que eu siga em frente buscando ser um profissional e, principalmente, uma pessoa melhor!

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus por me proporcionar saúde para conduzir esse trabalho!

Ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, pela oportunidade!

À equipe médica da Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, em especial à Profa Dra Ana Martinelli, que abriu as portas do serviço onde o estudo foi conduzido e que participou ativamente da elaboração do projeto, e à equipe de enfermagem, representada pela enfermeira Patrícia, pelo auxílio com as coletas de sangue para a análise genética que foi parte fundamental do trabalho!

À equipe do Laboratório de Estudos Genômicos, da Universidade Estadual Paulista, campus de São José do Rio Preto, particularmente à Profa Paula e ao Guilherme, pela parceria e pelo aprendizado que me proporcionaram!

Aos colegas do CPAFF-USP Prof Dr Leonardo, Profa Dra Fabiana, à Marília e ao Vinícius, pela colaboração com o estudo e pela amizade!

Aos pacientes que concordaram em participar da pesquisa!

À Profa Dra Fernanda, minha orientadora, pelos ensinamentos. Obrigado por estar sempre disponível e por toda a gentileza dispensada a mim durante nossas conversas sobre a condução do trabalho!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“SCIENTIA VINCES.”

Lema da Universidade de São Paulo, que é citado em seu brasão criado por José Wasth Rodrigues.

RESUMO

Efetividade, segurança e dinâmica de seleção de mutações de resistência envolvendo o uso de fármacos de ação direta na infecção crônica pelo genótipo 3 do HCV.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a hepatite C crônica (HCC) acomete cerca de 58 milhões de pessoas no mundo. No Brasil, os fármacos antivirais de ação direta (DAAs) daclatasvir (DCV), que inibe a proteína *NS5A*, e o sofosbuvir (SOF), um inibidor da polimerase viral *NS5B*, foram incluídos no protocolo do Sistema Único de Saúde em 2015. Há evidências de que pacientes com HCC pelo genótipo viral 3 são a população de mais difícil manejo na era dos DAAs. A alta taxa de replicação e a falta de atividade corretiva da RNA polimerase promovem relevante taxa de substituições de aminoácidos associadas à resistência (SARs). Os objetivos deste estudo foram descrever a efetividade de esquemas de tratamento envolvendo os DAAs citados, analisar a associação das SARs na *NS5A* e na *NS5B* no *baseline* e no pós-tratamento, além de outros fatores clínicos, com a resposta à farmacoterapia, avaliar a segurança dos regimes terapêuticos e descrever desfechos em longo prazo após o tratamento. Trata-se de uma coorte prospectiva que incluiu adultos cronicamente infectados pelo genótipo 3 do vírus da hepatite C em acompanhamento no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP). Os esquemas de tratamento foram SOF + peginterferon (PEG) + ribavirina (RBV) ou DCV + SOF ± RBV, iniciados entre Janeiro de 2016 e junho de 2019. Dados clínicos e laboratoriais foram coletados via sistema informatizado do hospital. As análises genéticas foram conduzidas no Laboratório de Estudos Genômicos da Universidade Estadual Paulista, em São José do Rio Preto. Considerando os desfechos em longo prazo, analisou-se o impacto da resposta virológica sustentada (RVS) nos momentos um ano e três anos pós-tratamento pela evolução dos escores *Fibrosis-4 (FIB-4)*, *Child-Pugh-Turcotte* e *Model for End-stage Liver Disease (MELD)*. Foram incluídos 121 pacientes, dos quais 93 (76,9%) apresentavam cirrose hepática (CH). As taxas de RVS, calculadas por intenção de tratar, foram de 86% para a população geral, 87,6% para o grupo DCV + SOF ± RBV e 80% para o braço SOF + PEG + RBV. CH, tratamento prévio com interferon/PEG + RBV e presença de SARs no *baseline* foram variáveis associadas à não RVS. Os resultados indicaram que as substituições na *NS5A* A62S, A62T, A30K e Y93H seriam mutações relacionadas à falha. A SAR Y93H foi detectada apenas após a pressão da terapia, sempre com uma mutação na posição 62 associada. Este resultado sugere um efeito compensatório entre ambas. Foi observado também um possível efeito compensatório entre a A30K e a A62T. Considerando a análise da *NS5B*, a SAR L159F foi detectada em um paciente não respondedor ao esquema DCV + SOF + RBV. O uso de PEG foi associado à maior incidência de reações adversas e à maior incidência de descontinuidade do tratamento por evento adverso. A análise dos desfechos em longo prazo mostrou redução significativa do *FIB-4* entre o *baseline* e o ponto um ano pós-tratamento. Entre os indivíduos com CH, não houve impacto sobre os escores de *Child-Pugh* e *MELD*. Os desfechos de três anos pós-tratamento mostraram incidência de cerca de 10% de carcinoma hepatocelular (CHC) após a RVS. Além disso, todos os pacientes do estudo, que evoluíram para CHC, transplante hepático ou óbito, até o terceiro ano pós-terapia, tinham CH. O conhecimento sobre a condição clínica do indivíduo com HCC e a detecção de SARs combinada com o entendimento sobre a dinâmica de seleção dessas podem contribuir para a oferta de terapias mais efetivas para as populações de difícil manejo. O acompanhamento de pacientes com fibrose avançada deve ser mantido em centros especializados, mesmo após a RVS.

Palavras-chave: Vírus da Hepatite C. Hepatite C Crônica. Antivirais de ação direta. Resistência viral.

ABSTRACT

Effectiveness, safety and selection dynamics of resistance mutations involving the use of direct-acting drugs in chronic HCV genotype 3 infection.

According to the World Health Organization, chronic hepatitis C (CHC) affects approximately 58 million people worldwide. In Brazil, the direct acting antivirals (DAAs) daclatasvir (DCV), which inhibits the NS5A protein, and sofosbuvir (SOF), an NS5B viral polymerase inhibitor, were included in the public health system guideline in 2015. Patients with CHC by hepatitis C virus genotype 3 have emerged as the most difficult-to-cure population in DAAs era. The high replication rate and the lack of proofreading activity of the viral RNA polymerase NS5B result in a relevant resistance associated substitutions (RASs) rate. The aims of the study were to describe the effectiveness of treatment regimens involving the mentioned DAAs, analyze the association of NS5A and NS5B RASs at baseline and post-treatment, in addition to other clinical factors, with the response to DAAs treatment regimens, evaluate the safety of these drug regimens and analyze long-term outcomes. This was a prospective cohort study conducted at the University Hospital of the Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (HCFMRP-USP), which included adults chronically infected with hepatitis C virus genotype 3. These patients were treated with DCV + SOF ± ribavirin (RBV) or SOF + peginterferon (PEG) + RBV and started treatment between January 2016 and June 2019. Clinical and laboratory data were collected through hospital computerized system. The molecular experiments were conducted in the Genomic Studies Laboratory of the São Paulo State University, city of São José do Rio Preto. The impact of sustained virological response (SVR) was analyzed through the evolution of scores Fibrosis-4 (FIB-4), Child-Pugh-Turcotte and Model for End-stage Liver Disease (MELD), one year and three years post treatment. A total of 121 patients were included, 93 (76.9%) of whom presented cirrhosis. SVR rates, calculated by intention to treat, were 86% for the general study population, 87.6% for the DCV + SOF ± RBV group and 80% for the SOF + PEG + RBV arm. Cirrhosis, previous treatment with INF/PEG + RBV and presence of baseline RASs at NS5A were factors associated with a higher risk of treatment failure. Our results indicated that NS5A RASs A62S, A62T, A30K and Y93H would be related to therapy failure. The Y93H emerged only after treatment pressure, always with a mutation at position 62 associated, suggesting a compensatory effect between both. A possible compensatory effect was observed between the SARs A30K and A62T as well. Regarding NS5B region, the L159F RAS was detected in a non-responder patient to the SOF + DCV + RBV regimen. The use of PEG was associated with higher incidence of adverse reactions and higher incidence of treatment discontinuation due to adverse events. Long-term follow-up analysis showed a significant reduction in FIB-4 from baseline to one year after treatment. There was no impact on Child-Pugh, and MELD scores among individuals with cirrhosis. Three-year post-treatment follow-up showed an incidence of about 10% of hepatocellular carcinoma (HCC) after SVR. In addition, all patients who developed HCC, underwent a liver transplantation or died up to the third year after therapy, had cirrhosis. In conclusion, knowledge about the clinical condition of the patient with CHC and the detection of RASs combined with RASs selection dynamics understanding can contribute to provision of more effective therapies for the difficult-to-manage population. Therefore, follow-up of patients with advanced fibrosis must be maintained, even after SVR.

Keywords: Hepatitis C Virus. Hepatitis C, Chronic. Direct Acting Antivirals. Drug Resistance, Viral.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Formação das proteínas virais a partir do RNA viral	18
Tabela 1 – Classificação METAVIR baseada em histologia hepática	24
Tabela 2 – Escore de Child-Turcotte-Pugh	25
Figura 2 – Esquema de coleta de sangue para análise das SARs	36
Tabela 3 – Características demográficas e clínicas dos pacientes incluídos no estudo no <i>baseline</i>	39
Tabela 4 – Substituições de aminoácidos associados à resistência viral no <i>baseline</i> ..	41
Figura 3 – Desfechos da terapia farmacológica, por grupo	43
Tabela 5 – Taxas de RVS por subgrupos de variáveis demográficas e clínicas e análise de associação das variáveis com a RVS	44
Tabela 6 – Características demográficas e clínicas dos pacientes que não alcançaram RVS	48
Tabela 7 – Frequências das reações adversas observadas, por grupo, e análise de associação entre as reações adversas mais comuns e o esquema de tratamento	49
Figura 4 – Análise do impacto da RVS em longo prazo por meio da evolução do <i>FIB-4</i> e dos parâmetros clínicos utilizados para o cálculo do escore	51
Figura 5 – Análise do impacto da RVS por meio da evolução dos escores Child-Turcotte-Pugh e <i>MELD</i> entre os indivíduos com CH	52
Figura 6 – Desfechos em longo prazo (três anos pós-tratamento) de todos os indivíduos incluídos no estudo	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
APRI	<i>Aspartate Aminotransferase to Platelet Ratio Index</i>
AST	Aspartato aminotransferase
BOC	Boceprevir
BT	Bilirrubina total
cDNA	DNA complementar
CH	Cirroze hepática
CHC	Carcinoma hepatocelular
DAA	Antiviral de ação direta
DCV	Daclatasvir
DM	Diabetes Mellitus
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio-Padrão
EBR	Elbasvir
<i>FC</i>	<i>Fold-Change</i>
<i>FDA</i>	<i>Food and Drug Administration</i>
<i>FIBROSIS-4</i>	<i>FIB-4</i>
GLE	Glecaprevir
GZR	Grazoprevir
HVA	Vírus da hepatite A
HBV	Vírus da hepatite B
HCA	Hepatite C aguda

HCC	Hepatite C crônica
HCV	Vírus da hepatite C
HDV	Vírus da hepatite D
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HCFMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP
HPCS	Hipertensão portal clinicamente significativa
IMC	Índice de massa corporal
INF	Interferon
INR	Razão Normalizada Internacional
LDV	Ledipasvir
MEH	Manifestação extrahepática
<i>MELD</i>	<i>Model for End-stage Liver Disease</i>
<i>NS</i>	<i>Non Structural</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCDT	Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Interferon peguilado
PIB	Pibrentasvir
RAM	Reação adversa a medicamentos
RBV	Ribavirina
RI	Resistência insulínica
RR	Risco relativo
RNA	Ácido ribonucleico
RVS	Resposta virológica sustentada
SAR	Substituição de aminoácido associada à resistência

SMV	Simeprevir
SOF	Sofosbuvir
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TVR	Telaprevir
UDI	Usuário de drogas injetáveis
VEL	Velpatasvir
VOX	Voxilaprevir

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	História das hepatites virais	15
1.2	Identificação dos agentes virais	16
1.3	O vírus da hepatite C	17
1.4	Epidemiologia da hepatite C	19
1.5	Transmissão do HCV e populações vulneráveis	20
1.6	Evolução da hepatite C	21
1.6.1	Fase Aguda	21
1.6.2	Fase Crônica	23
1.7	Tratamento farmacológico da HCC	27
1.7.1	Objetivos do tratamento	27
1.7.2	Evolução da terapia farmacológica para a HCC	28
1.7.2.1	Período pré-liberação dos fármacos de ação direta	28
1.7.2.2	Fármacos antivirais de ação direta	28
1.7.2.3	Era dos regimes de tratamento <i>interferon-free</i>	29
1.8	Substituições de aminoácidos associadas à resistência viral	30
1.9	Justificativa para a realização do trabalho	31
2	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivo geral	32
2.2	Objetivos específicos	32

3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	33
3.1	Local e desenho do estudo	33
3.2	População de estudo e esquemas de tratamento	33
3.3	Coleta de dados clínicos e demográficos	34
3.4	Análise das substituições de aminoácidos associadas à resistência	36
3.4.1	Regiões do genoma viral analisadas	36
3.4.2	Coleta das amostras de sangue	36
3.4.3	Extração do RNA e amplificação das regiões genômicas de interesse	37
3.4.4	Sequenciamento Sanger	37
3.4.5	Análise estatística	37
3.5	Aspectos éticos	39
4	RESULTADOS	39
5	DISCUSSÃO	55
6	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
	ANEXOS	83
	APÊNDICES	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 História das hepatites virais

A literatura científica sugere que as hepatites virais estariam relacionadas à morbimortalidade da população mundial há milhares de anos. Há relatos de icterícia epidêmica em regiões da Suméria e na Babilônia há cerca de 5000 e 2500 anos atrás, respectivamente (FONSECA, 2010; TREPO, 2014). Registros de Hipócrates, que viveu entre 300 e 400 anos a.C, citam a ocorrência de icterícia de provável origem infecciosa, incluindo casos de evolução fulminante e óbito em poucos dias (OON, 2012). Durante a Idade Média, houve epidemias de icterícia, conhecidas como icterícia de campanha, que se caracterizaram por acontecerem em períodos de catástrofes humanas ou de guerras (SCHMID, 2001). A provável relação do aumento expressivo destes casos com momentos históricos em que as condições sanitárias se mostraram especialmente desfavoráveis foi também observada em guerras que sucederam à Idade Média.

Entre os séculos XVIII e XIX, milhares de soldados, que combateram em conflitos napoleônicos e na guerra da independência dos Estados Unidos da América (EUA), teriam falecido em consequência de uma icterícia infecciosa (OON, 2012). Dados que se referem às duas guerras mundiais, que ocorreram na primeira metade do século XX, reforçam as evidências supracitadas. Na primeira guerra mundial, forças militares diversas teriam sido acometidas por hepatite infecciosa, particularmente da frente russa. Sobre a segunda grande guerra, estimativas indicam que 16 milhões de mortes foram causadas por hepatite, grande parte dessas de soldados alemães que foram os mais afetados. Em surtos, epidemias ou sob outras situações em que há precárias condições de higiene e ausência de ferramenta diagnóstica, é plausível que uma parte relevante dos casos de icterícia ou de hepatite tenha sido causada por um agente infeccioso causador de doença hepática cuja transmissão é fecal-oral, como, por exemplo, o vírus da hepatite A (HAV) (SCHMID, 2001).

Por outro lado, ainda no século XIX, foi documentada a provável existência de uma forma de hepatite de transmissão parenteral. Estudo conduzido na Alemanha, em 1885, evidenciou um surto de icterícia entre trabalhadores de um porto na cidade de Bremen. Cerca de 200 trabalhadores, de um total de 1289, desenvolveram quadro característico entre um e sete meses após receberem vacina contra a varíola preparada a partir de linfa humana. Não houve casos entre os não vacinados (SCHMID, 2001; FONSECA, 2010; TREPO, 2014). No Brasil, ocorreu, no ano de 1940, no estado do Espírito Santo, um surto de icterícia pós-vacinação contra a febre amarela. Mais de 1000 casos foram investigados e há registros de óbitos. A vacina foi preparada utilizando-se material biológico humano (MINISTÉRIO DA

SAÚDE, 1969). Mais tarde, em 1942, aproximadamente 50 mil pessoas do exército dos EUA foram acometidas por hepatite com icterícia após vacinação contra febre amarela realizada por meio de vacinas produzidas com soro humano (SEEFF *et al.*, 1987). Há plausibilidade em se considerar que uma alta incidência de determinada doença ou condição, que acomete o fígado e que cursa com icterícia, após campanhas vacinais, tenha como causa a infecção por microrganismos transmitidos por via parenteral, tais como, o vírus da hepatite B (HBV) ou o vírus da hepatite C (HCV).

1.2 Identificação dos agentes virais

A partir de meados do século XX, o desenvolvimento de exames laboratoriais de função e lesão hepáticas, além do aprimoramento de técnicas de biópsia do fígado tornaram mais factível a realização de trabalhos com o objetivo de identificar agentes causadores dos surtos e epidemias caracterizados por quadros clínicos sugestivos de dano hepático (BEESON, 1979). Em 1963, o geneticista Baruch Blumberg, do *National Institute of Health*, nos EUA, ao estudar anticorpos contra lipoproteínas séricas de pacientes que receberam transfusão de sangue, identificou, no soro de um aborígene australiano, um antígeno que reagiu com o soro de dois indivíduos hemofílicos politransfundidos. Esse antígeno recebeu o nome de antígeno Austrália (BLUMBERG; ALTER; VISNICH, 1965). Nos anos subsequentes, novos estudos evidenciaram a relação entre a presença do antígeno Austrália em doadores de sangue e hepatite pós-transfusional. Observou-se que o antígeno Austrália correspondia a uma proteína de superfície e, a partir de então, novas partes estruturais do agente infeccioso foram identificadas (PRINCE, 1968; DANE; CAMERON; BRIGGS, 1970). No fim da década de 1970, este novo agente foi caracterizado como um vírus de ácido desoxirribonucleico (DNA) que causa a hepatite viral do tipo B (BLUMBERG, 1977).

Em 1973, Feinstone, Kapikian e Purcell, três pesquisadores americanos, visualizaram, por microscopia eletrônica, partículas similares a vírus em amostras de fezes de voluntários com hepatite aguda (FEINSTONE; KAPIKIAN; PURCELL, 1973). Esse vírus, reconhecido como o HAV, teve o seu genoma, representado por ácido ribonucleico (RNA), clonado e sequenciado 10 anos após (TICEHURST *et al.*, 1983). A identificação e o sequenciamento do material genético do HAV e do HBV foram o primeiro passo para a produção de vacinas contra as hepatites A e B. Ainda na década de 1970, um novo complexo antígeno-anticorpo foi identificado em indivíduos soropositivos para o antígeno de superfície do HBV (RIZZETTO, 1990). Tratava-se de um vírus de RNA cujo ciclo de vida é dependente do HBV, ou seja, a transmissão ocorre apenas de forma concomitante ao HBV ou em

pacientes cronicamente acometidos pelo HBV. Esse novo vírus, o menor conhecido por infectar humanos, foi denominado vírus da hepatite D (HDV) ou vírus delta. O HDV causa a hepatite crônica mais grave entre as hepatites virais, com progressão mais rápida para cirrose hepática (CH) e para desfechos, como, carcinoma hepatocelular (CHC) e morte (FATTOVICH *et al.*, 2000; ODENWALD; PAUL, 2022). A vacinação contra o HBV é uma forma efetiva de prevenção à hepatite D.

A despeito da identificação do HAV, do HBV e do HDV, muitos casos de hepatite aguda e crônica causados por um agente infeccioso desconhecido foram descritos entre a segunda metade dos anos 1970 e o fim dos anos 1980 (FONSECA, 2010). Essa condição passou a ser denominada de hepatite não A não B. Em 1989, após a clonagem do seu genoma, o HCV foi isolado e apresentado como um causador da hepatite não A e não B (CHOO *et al.*, 1989). Outros vírus causadores de hepatites, de menor relevância quanto à morbimortalidade, são conhecidos. Entre esses, cita-se o vírus da hepatite E e o vírus da hepatite G (ODENWALD; PAUL, 2022).

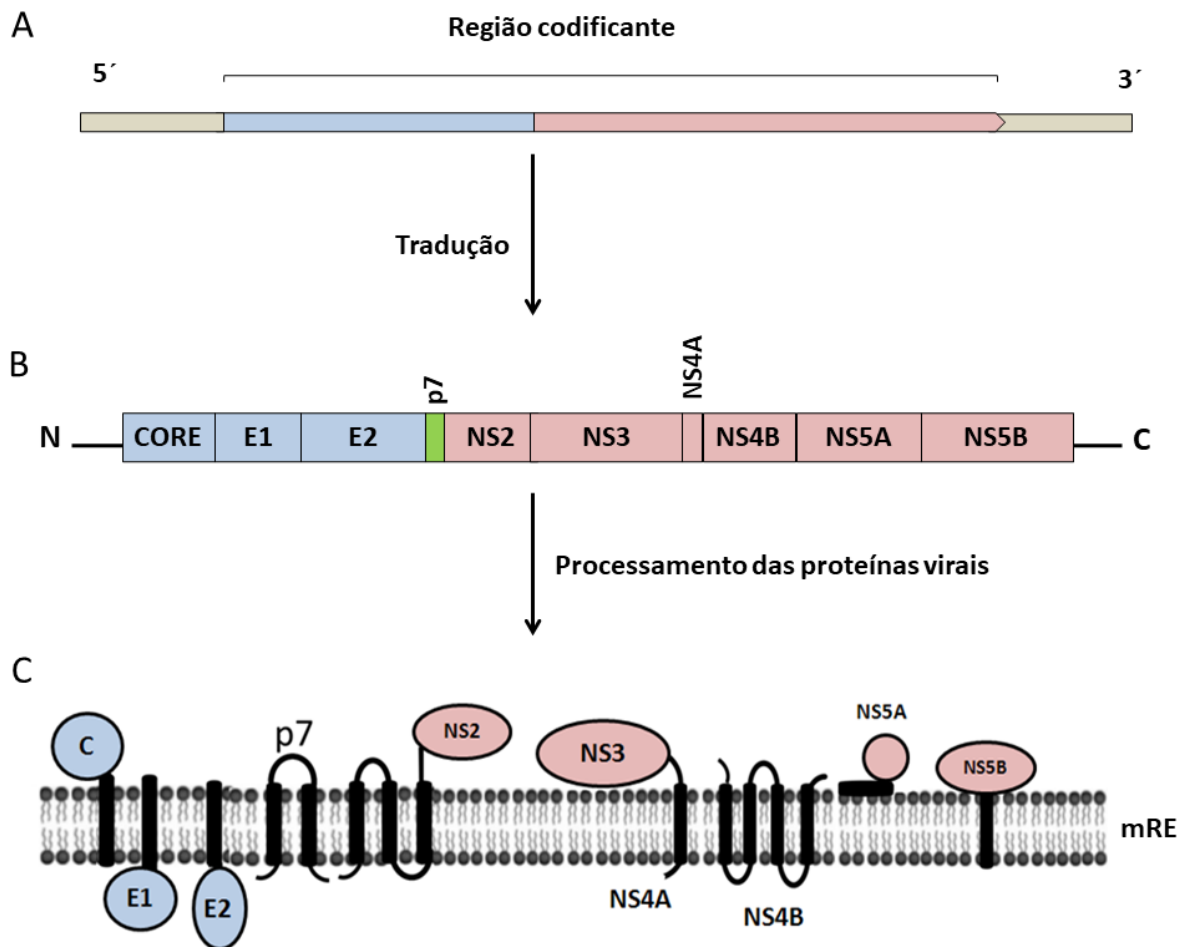
1.3 O vírus da hepatite C

O HCV, que pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Hepacivirus*, é um vírus que apresenta uma cadeia simples e positiva de RNA composta por cerca de 9600 nucleotídeos e envolvida por um envelope lipídico (ELGRETLI *et al.*, 2023). As glicoproteínas E1 e E2, presentes no envelope viral, formam o complexo E1/E2 que participa ativamente da entrada do vírus na célula hospedeira. A porção E2 do complexo interage com proteínas da membrana do hepatócito, particularmente os receptores *scavenger* B1 e a proteína CD81 (KUMAR *et al.*, 2023). Outras proteínas de superfície da célula infectada têm ativa participação na adsorção e entrada do vírus, como, por exemplo, os glicosaminoglicanos, receptores de lipoproteínas de baixa densidade, claudina-1 e a ocludina (PLOSS *et al.*, 2009; ALBECKA *et al.*, 2012; CHEVALIEZ; PAWLOTSKY, 2012; FÉNÉANT; LEVY; COCQUEREL, 2014).

Após a entrada do HCV na célula do indivíduo infectado, a cadeia simples de RNA é liberada no citoplasma. A fita de RNA contém uma região central codificante e duas extremidades não codificantes (regiões 3' e 5'). Forma-se uma poliproteína precursora de aproximadamente 3000 aminoácidos por meio de um processo de tradução que é mediado pela ligação entre o sítio de entrada ribossomal, presente na região 5' não traduzida, e o ribossomo. A poliproteína, que possui uma porção terminal formada por proteínas estruturais (porção N) e uma porção terminal C composta por proteínas não estruturais, é direcionada à membrana do retículo endoplasmático da célula hospedeira. Após, é clivada originando

diferentes proteínas que incluem três estruturais (proteína *core* ou *C*, glicoproteína E1 e glicoproteína E2) e sete não estruturais: a proteína p7, que modula a permeabilidade da membrana, e outras seis proteínas reconhecidas pela sigla *NS* (*non structural*) (*NS2*, *NS3*, *NS4A*, *NS4B*, *NS5A* e *NS5B*) (LI; LO, 2015; MARTINEZ; FRANCO, 2021) (Figura 1).

Figura 1 – Formação das proteínas virais a partir do RNA viral.



A: cadeia simples de RNA viral. B: poliproteína precursora. C: proteínas virais estruturais e não estruturais. : proteínas estruturais. : Proteínas não estruturais. mRE: Membrana do retículo endoplasmático. *NS*: *non structural*.

Fonte: Rodrigues (2017).

O processamento das proteínas virais estruturais ocorre pela ação de peptidases do retículo endoplasmático, enquanto duas proteases virais atuam e propiciam a formação de proteínas *NS*. A primeira protease, denominada *NS2*, é uma metaloproteinase dependente de zinco, que quebra a poliproteína no sítio entre as partes *NS2* e *NS3*. Por sua vez, a protease viral *NS3/4A* cliva a poliproteína nas regiões de junção *NS3/NS4A*, *NS4A/NS4B*, *NS4B/NS5A* e

NS5A/NS5B. A proteína não estrutural *NS4B* promove a formação de um complexo de replicação, que suporta a ação da *NS5B* como uma RNA polimerase dependente de RNA (MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007; EASL, 2010; LI; LO, 2015; MARTINEZ; FRANCO, 2021). Cada fita de RNA pode ser traduzida, replicada ou empacotada juntamente com as proteínas estruturais formando os vírions. Tais situações ocorrem de uma forma dinâmica e concomitante. As proteínas p7, a *NS2*, a *NS3* e a *NS5A*, além de moléculas de gordura presentes no citoplasma do hepatócito, atuam ainda na etapa de estruturação final das partículas virais (EASL, 2010; BARTENSCHLAGER *et al.*, 2011; CHEVALIEZ; PAWLITSKY, 2012).

O HCV apresenta uma relevante diversidade genotípica representada por oito principais genótipos virais, designados por algarismos arábicos, que podem variar entre 30 e 35% em relação à sequência de nucleotídeos. Há também a classificação em subgenótipos que ocorre de acordo com a similaridade genotípica observada dentro de cada genótipo. Os subtipos virais são classificados por meio de letras do alfabeto (MARTINEZ; FRANCO, 2021; PIMENOV *et al.*, 2022). A região 5' não traduzida do genoma viral é a mais conservada entre os genótipos do HCV. Por outro lado, regiões que codificam as proteínas de membrana E1 e E2 são hipervariáveis (LI; LO, 2015). A hipervariabilidade estrutural de proteínas importantes para a entrada do vírus e para a replicação viral dificultam a descoberta de uma vacina contra o HCV (FREEDMAN *et al.*, 2016; WRIGHTON, 2022).

1.4 Epidemiologia da hepatite C

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 58 milhões de pessoas vivem com hepatite C crônica (HCC) e 1,5 milhão de novas infecções ocorrem a cada ano no mundo. As maiores prevalências de HCC são observadas no Mediterrâneo Oriental, Europa e África, com taxas de 2,3%, 1,5% e 1%, respectivamente. Outras regiões têm taxas de prevalência inferiores a 1%, sendo que nas Américas 0,7% das pessoas apresentam HCC (WHO, 2017a). Os dados globais estimam-se ainda que, no ano de 2019, aproximadamente 290 mil pessoas morreram por complicações da hepatite C, tais como, CH ou CHC (WHO, 2022).

Estudo conduzido por Benzaken *et al.* (2019), que utilizou modelagem matemática, estimou que 0,53% da população brasileira apresenta anticorpos contra o HCV e que 0,31% das pessoas têm carga viral positiva. Em 2021, a taxa de detecção de casos confirmados de hepatite C no Brasil foi de 5,2 por 100 mil habitantes. As maiores taxas foram observadas nas regiões sul e sudeste com 11,7 e 6 casos por 100 mil habitantes, respectivamente. Entre 2000

e 2021, a forma clínica mais comumente notificada no Sistema de Informação de Agravos de Notificação foi a crônica, perfazendo quase 80% dos casos. Por último, destaca-se que a hepatite C é a causa de óbito mais comum entre as hepatites virais no Brasil. Em 2020, a mortalidade foi de 0,5 por 100 mil habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Com relação aos tipos ou genótipos virais, o genótipo 1, responsável por 44% de todas as infecções, é o mais prevalente no mundo. Por sua vez, o genótipo 3 causa 25% das infecções, seguido pelo genótipo 4, presente em 15% dos indivíduos infectados. O genótipo 1 é particularmente mais comum em países de alta renda, onde compreende cerca de 60% dos casos. O tipo 3 é mais prevalente em países de renda média-baixa (36%) em relação a outras regiões e a prevalência do genótipo 4 atinge 45% em países de baixa renda. No Brasil, aproximadamente 65% dos pacientes com HCV foram infectados pelo genótipo 1, 30,2% pelo genótipo 3 e 4,6% pelo genótipo 2 (BLACH *et al.*, 2017).

1.5 Transmissão do HCV e populações vulneráveis

A transmissão do HCV ocorre especialmente por via parenteral em situações de exposição percutânea a sangue ou hemoderivados contaminados. Em países de baixa renda, onde medidas de prevenção à infecção pelo HCV são precárias ou insuficientes, a transmissão associada ao cuidado em saúde é uma realidade. Práticas inseguras de aplicação de medicamentos injetáveis, de procedimentos médicos, como, cirurgias, hemodiálise, transfusão de sangue, além do cuidado odontológico, entre outras, estão relacionadas com a transmissão (WHO, 2018). Transplantes de órgãos, a partir de doadores infectados, também podem transmitir o HCV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Neste sentido, pessoas que receberam transfusão sanguínea até o início da década de 1990, período anterior à identificação do vírus e à obrigatoriedade de testes de detecção do HCV em bancos de sangue, receptores de transplante em qualquer época, profissionais de saúde cujas funções envolvem a realização de procedimentos invasivos e indivíduos que compartilham seringas e agulhas para o uso de drogas ilícitas ou de qualquer outra substância injetável são exemplos de populações que têm maior risco de se infectarem (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Globalmente, a injeção de drogas injetáveis por usuários é responsável por cerca de um quarto das novas infecções (WHO, 2017a). Um estudo brasileiro, de caráter multicêntrico, indicou que 64,6% dos usuários de drogas injetáveis (UDIs) incluídos apresentavam anti-HCV positivo (CARDOSO, 2005). Os UDIs que apresentam HCC têm um maior risco de morte como resultado dos efeitos da doença, do uso das drogas, de fatores socioeconômicos não favoráveis, da falta de acesso ao sistema de saúde e de fatores

ambientais (WHO, 2018). A utilização de drogas por via inalatória é outro fator de risco para infecção pelo HCV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

O risco de transmissão é maior também se considerados indivíduos com tatuagem ou *piercing* ou pessoas expostas a outras fontes de transmissão por meio de condutas profissionais que não respeitam a legislação sanitária vigente. Tal situação pode ser observada, por exemplo, em procedimentos de manicure ou pedicure (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). O não compartilhamento de objetos pessoais como lâminas de barbear e escovas de dentes é uma prática que previne a transmissão.

Embora esteja associada a um risco menor, a exposição de mucosas também pode transmitir o vírus. A transmissão sexual é incomum entre casais heterossexuais, sendo mais frequente em homens que fazem sexo com homens, especialmente quando há coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Em adição, relações sexuais com múltiplos parceiros e sem uso de preservativo são situações facilitadoras da transmissão por essa via (CHAN *et al.*, 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). A transmissão vertical afeta entre 4 e 8% dos filhos de mães infectadas, número que aumenta para 10,8 a 25% se a mãe é coinfectada pelo HIV (BENOVA *et al.*, 2014).

A hepatite C encontrou ainda oportunidade para propagação em grupos que apresentam fatores relacionados à maior vulnerabilidade, como privação de liberdade e transtornos mentais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). No Brasil, no ano de 2021, o compartilhamento de material durante o uso de drogas foi a forma de transmissão notificada em 20,7% dos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

1.6 Evolução da hepatite C

1.6.1 Fase Aguda

A evolução da hepatite C é, historicamente e de uma maneira didática, dividida em hepatite C aguda (HCA) e HCC. A HCA é reconhecida como a doença e suas características clínicas observadas nos primeiros seis meses após a transmissão. Considerando que a HCA é benigna e cursa de forma assintomática em 80% dos casos e que o diagnóstico da hepatite C é, em geral, baseado em testes de rotina ou doações de sangue, o momento exato da transmissão é difícil de se estabelecer na maioria das situações. Em alguns países, agências financiadoras têm recusado o reembolso do custo do tratamento a indivíduos tratados, uma vez que os estudos para a liberação dos medicamentos atualmente utilizados na prática clínica incluíram pacientes com HCC (EASL, 2020). A dificuldade em se definir o momento da transmissão limita ainda a realização de estudos bem desenhados que analisem a evolução

natural da hepatite C. Aproximadamente 30% (15-45%) dos indivíduos apresentam clareamento viral espontâneo como desfecho da HCA (WHO, 2022). O HCV é um gatilho para as respostas imunes inata e adaptativa, sendo que a resposta celular, que envolve uma robusta ação dos linfócitos T CD8⁺, seria a principal responsável pela erradicação do vírus nessa fase (NEGRO, 2020).

Quando presentes, os sinais e sintomas se manifestam entre quatro e 12 semanas após a exposição ao vírus (ORLAND; WRIGHT; COOPER, 2001; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Perda de apetite, dor abdominal, mialgia, fadiga, febre baixa e náuseas são exemplos de sintomas inespecíficos reportados. A icterícia é o sinal clínico característico da doença hepática de maior incidência (DETERDING *et al.*, 2009; LOOMBA *et al.*, 2011, EASL, 2020). Pelo exposto em relação à evolução da HCA, a hepatite C não é comumente diagnosticada nesse período, mesmo nos casos de evolução sintomática (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Hepatite fulminante, com falência hepática grave, é um evento raro durante a HCA (MAASOUMY; WEDEMEYER, 2012; EASL, 2020).

Do ponto de vista histológico, a HCA caracteriza-se pela presença de alterações necroinflamatórias no parênquima hepático (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Os valores de carga viral aumentam rapidamente e se tornam detectáveis duas semanas após a infecção. Entre a quarta e 12^a semanas, ocorre aumento da concentração sérica da alanina aminotransferase (ALT) e, em alguns casos, alterações de exames de função hepática. O valor de ALT pode superar em até 10 vezes o limite superior do intervalo de normalidade (BERTOLETTI; FERRARI, 2003; DETERDING *et al.*, 2009; EASL, 2020). Geralmente, a soroconversão, caracterizada pela detecção de anticorpos anti-HCV, ocorre no segundo mês após a exposição em indivíduos com a imunidade preservada (COX *et al.*, 2005). Este tempo pode se estender para até 48 semanas em pessoas imunodeprimidas (MAASOUMY; WEDEMEYER, 2012).

De acordo com o protocolo brasileiro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019), a confirmação de HCA ocorre se houver:

- soroconversão recente (há menos de seis meses) indicada por anti-HCV não reagente no início dos sinais e sintomas ou no momento da exposição e anti-HCV reagente em um intervalo de 90 dias ou;
- anti-HCV não reagente e carga viral sanguínea positiva (detecção do HCV-RNA) em até 90 dias após o início dos sinais e sintomas ou a partir da data de exposição, desde que essa seja conhecida.

A terapia farmacológica indicada e disponibilizada no Brasil para o tratamento da HCA envolve fármacos antivirais de ação direta (DAAs) utilizados por meio de esquemas similares àqueles recomendados para a HCC (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

1.6.2 Fase Crônica

A HCC se apresenta como um processo inflamatório predominantemente portal, diferente da HCA cuja inflamação envolve o parênquima hepático de forma mais importante. Anti-HCV reagente e carga viral (HCV-RNA) detectável por mais de seis meses definem a HCC (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Considerando a frequência de cura espontânea e que uma parte pequena dos infectados são diagnosticados e tratados com sucesso na fase aguda, cerca de 70% (55-85%) das pessoas acometidas pelo HCV evoluem para infecção crônica, com fibrose hepática progressiva (WHO, 2022). Na maioria dos pacientes, a evolução da HCC ocorre por anos de forma silenciosa ou são observados sinais e sintomas inespecíficos. Nestes casos, as características clínicas que evidenciam o comprometimento do fígado estão presentes apenas em estágios avançados de fibrose (WESTBROOK; DUSHEIKO, 2014).

A fibrose hepática é o resultado de um processo de cicatrização relacionado à lesão contínua do fígado. Após a lesão aguda causada, por exemplo, pelas hepatites virais, células do parênquima hepático se regeneram e substituem outras células que sofreram necrose ou apoptose. Há, nesse momento, inflamação e deposição limitada de matriz extracelular. Se a lesão persiste, ocorre falha da regeneração e maior acúmulo de matriz extracelular, incluindo colágeno fibrilar, em substituição aos hepatócitos lesados (BATALLER; BRENNER; 2005). Durante a lesão contínua do fígado, células estreladas, responsáveis por secretar colágeno, são ativadas e a taxa de progressão da fibrose depende da extensão da inflamação (LEANDRO *et al.*, 2006). Nesse sentido, pacientes com doença crônica, que evoluem com ALT normal, têm um infiltrado inflamatório menor e a progressão da fibrose seria mais lenta (ZEUZEM *et al.*, 2006).

Entre as pessoas cronicamente infectadas pelo HCV, de 15 a 30% desenvolvem CH após 20 anos de evolução da doença, dados que variam de acordo com características pessoais e comportamentais (WHO, 2022). Fatores de risco para progressão mais rápida serão abordados adiante. As definições dos estágios de atividade necroinflamatória e da fibrose hepática são condutas recomendadas para que estratégias de acompanhamento e tratamento da HCC sejam melhor definidas. A biópsia é o exame “padrão-ouro” para avaliação do grau de fibrose na HCC, além de ser útil para o diagnóstico de outras morbidades, como, a esteatose

hepática. Entretanto, trata-se de um exame invasivo que exige uma estrutura adequada para a sua realização. Nos últimos anos, métodos não invasivos de avaliação da fibrose do fígado têm sido a primeira opção, destacando-se as diferentes formas de elastografia hepática, entre as quais a elastografia transitória, a elastografia por ultrassonografia e a elastografia por ressonância magnética. Os métodos que utilizam dados bioquímicos são outra possibilidade de estadiamento da gravidade da doença hepática, recomendados pela praticidade e baixo custo. Nesse caso, índices são calculados por fórmulas matemáticas que utilizam dados sobre idade, valores de transaminases e contagem de plaquetas no sangue. Os índices mais amplamente utilizados na prática clínica são o *Aspartate Aminotransferase to Platelet Ratio Index (APRI)* e o *Fibrosis-4 (FIB-4)* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). A combinação da elastografia com o *APRI* ou *FIB-4* aumentam a acurácia da avaliação. Cabe ressaltar ainda que a CH, que configura o grau máximo de fibrose, pode ser clinicamente diagnosticada por meio de achados clínicos, como, ascite e varizes de esôfago (EASL, 2020).

Os principais guidelines sobre o manejo da hepatite C publicados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019; EASL, 2020; AASLD; IDSA, 2022) recomendam a utilização do escore METAVIR, proposto por um grupo de pesquisadores franceses de mesmo nome, para que se descreva o grau de fibrose, a partir dos resultados obtidos pelo método de avaliação do dano hepático utilizado. Para o estadiamento, a classificação METAVIR considera características histológicas, como, atividade inflamatória periportal, atividade inflamatória lobular e o grau de fibrose hepática (BEDOSSA, 1993).

Tabela 1 – Classificação METAVIR baseada em histologia hepática.

Atividade histológica	Fibrose hepática
A0 – sem atividade	F0 – sem fibrose
A1 – atividade leve	F1 – fibrose portal sem septos
A2 – atividade moderada	F2 – fibrose moderada, poucos septos
A3 – atividade grave	F3 – fibrose avançada, numerosos septos
	F4 – cirrose

Adaptado de Gaggini *et al.* (2015).

A definição da gravidade da CH, que também suporta condutas relacionadas ao acompanhamento e ao tratamento da HCC, pode ser feita com base no escore Child-Turcotte-Pugh. Trata-se de um índice amplamente utilizado, que classifica a CH a partir informações clínicas e laboratoriais (PUGH *et al.*, 1973).

Tabela 2 – Escore de Child-Turcotte-Pugh.

Pontuação	1	2	3
BT sérica (mg/dL)	< 2,0	2,0-3,0	> 3,0
Ascite	ausente	controlada	refratária
Albumina sérica (g/dL)	> 3,5	2,8-3,5	< 2,8
Encefalopatia hepática	ausente	grau I/II	grau III/IV
INR	< 1,7	1,7-2,3	> 2,3

BT: bilirrubina total. INR: razão normalizada internacional.

Child-Turcotte-Pugh A (Cirrose compensada): 5-6 pontos.

Child-Turcotte-Pugh B (Cirrose descompensada): 7-9 pontos.

Child-Turcotte-Pugh C (Cirrose descompensada): 10-15 pontos.

Fonte: CHILD; TURCOTTE, 1964; PUGH *et al.*, 1973.

O escore *Model for End-stage Liver Disease (MELD)* é outra ferramenta bastante utilizada para avaliações clínica e prognóstica da CH. Trata-se de um índice utilizado no Brasil, desde 2006, para definição de prioridade para o transplante hepático. O cálculo do *MELD* considera valores de bilirrubina total (BT), creatinina e da razão normalizada internacional (INR) para o cálculo do escore (BRASIL, 2006). Como a hiponatremia pode ser uma consequência da CH, foi proposto um novo escore *MELD*, cujo cálculo e análise exigem o valor do sódio sérico do paciente (*MELD-Na*) (BIGGINS *et al.*, 2006).

A CH pode levar ao desenvolvimento de hipertensão portal, que é um preditor determinante de maior gravidade. De acordo com o Consenso Baveno VII, hipertensão portal clinicamente significativa (HPCS), definida como um aumento da pressão portal estimada para valores ≥ 10 mmHg, identifica pacientes com maior risco para descompensação da HCC. Este mesmo documento propõe quatro estágios para a CH: o primeiro estágio caracteriza-se por ausência de HPCS e de outras complicações da CH; no 2º estágio, há HPCS (pressão portal até 12 mmHg), com ou sem varizes esofágicas; o estágio 3 é caracterizado por uma pressão portal entre 12 e 16 mmHg associada a sinais de descompensação; no 4º estágio, observa-se, em geral, uma pressão portal acima de 16 mmHg e características clínicas, como, ascite recorrente, peritonite bacteriana espontânea, sangramento de varizes recorrente, encefalopatia hepática persistente e/ou síndrome hepatorenal (TÉLLEZ; GUERRERO; ALBILLOS, 2022).

Entre as complicações, que são consequência da hipertensão portal e que caracterizam um quadro descompensado, a ascite é condição inicial da descompensação mais comum, sendo ainda uma causa frequente de internação hospitalar de pacientes cirróticos (LUCENA *et al.*, 2002). Varizes esofágicas são uma outra consequência da hipertensão portal que, em geral, não estão presentes no estágio inicial da CH, portanto, sua presença está relacionada à

gravidade da doença hepática (ZOLI *et al.*, 2000; ZAMAN *et al.*, 2001). A hemorragia de varizes esofágicas é uma emergência médica de elevada mortalidade (entre 10 e 20% em seis semanas) (DE FRANCHIS, 2015). A encefalopatia hepática é uma condição neuropsiquiátrica complexa que pode variar de um estado confusional leve até um quadro de coma e morte (NUSRAT *et al.*, 2014). Esplenomegalia e alterações hematológicas, especialmente a plaquetopenia, são exemplos de outras complicações conhecidas da CH e da hipertensão portal (MARTINELLI, 2004; POORDAD, 2015).

Os riscos anuais de descompensação da doença hepática e de CHC em indivíduos com CH são de 3-6% e de 1-5%, respectivamente (WESTBROOK; DUSHEIKO, 2014). Embora seja uma complicação da CH, o CHC pode também se manifestar em indivíduos com doença crônica não cirróticos, principalmente se há fibrose avançada (fibrose F3) (LOK *et al.*, 2009). O transplante hepático é uma opção terapêutica para pacientes com CHC ou em situações de descompensação grave (EASL, 2020).

Inúmeros fatores clínicos relacionados ao hospedeiro, que podem ser divididos em modificáveis e não modificáveis, estão associados com a progressão mais rápida da fibrose hepática na HCC. Entre os fatores modificáveis estão o consumo de álcool, a esteatose hepática, a obesidade e a resistência insulínica (RI). Há evidências robustas de que o consumo de álcool tem associação com a progressão mais rápida da fibrose para CH e com o desenvolvimento de CHC (AASLD; IDSA, 2022), relação que se torna particularmente relevante se o consumo superar 50 g ao dia (WESTBROOK; DUSHEIKO, 2014). O dano hepático pelo álcool envolve o acúmulo de pequenas moléculas de gordura nos hepatócitos, seguido de inflamação, fibrogênese e potencial carcinogênese (LUCEY, 2019). Idade acima de 40 anos, sexo masculino e genética são exemplos de fatores não modificáveis que têm relação com a progressão mais rápida da fibrose hepática (MAASOUMY; WEDEMEYER, 2012; WESTBROOK; DUSHEIKO, 2014). As menores taxas de progressão para CH em mulheres estariam associadas a fatores hormonais (BISSELL, 1999).

Considerando fatores virais relacionados à progressão da doença hepática, coinfeção pelo HBV e/ou pelo HIV têm associação com evolução mais rápida e pior prognóstico da hepatite C (HAJARIZADEH; GREBELY; DORE, 2013). Pessoas infectadas pelo HCV devem ser testadas para possíveis infecções pelo HIV e pelo HBV e a vacinação contra a hepatite B deve ser recomendada sempre que não houver contra-indicação (AASLD; IDSA, 2022). Com relação aos tipos virais, há evidências robustas que indicam que indivíduos acometidos pelo genótipo 3 têm evolução mais rápida da fibrose hepática e maior risco de desenvolvimento de CH e CHC (BOCHUD *et al.*, 2009; PROBST *et al.*, 2011; KANWAL *et*

al., 2014; KATTAKUZHLY *et al.*, 2016). O desenvolvimento de esteatose hepática em pessoas com HCC é genótipo dependente, sendo a infecção pelo genótipo 3 um fator de risco. Em pacientes acometidos pelo genótipo 1, a esteatose hepática seria, principalmente, uma expressão da síndrome metabólica, enquanto em indivíduos com HCC pelo genótipo 3 há um efeito citopático mais pronunciado do próprio vírus sobre as células hepáticas (RAFI *et al.*, 2011). O HCV pode causar alterações no metabolismo da glicose, o que piora ou leva à RI e potencialmente ao Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), doença que é considerada uma manifestação extra-hepática (MEH) da HCC. Infecção pelo genótipo 3 estaria ainda relacionada a uma maior prevalência de RI (AMPUERO; ROMERO-GÓMEZ; REDDY, 2014).

Além do DM2, a infecção crônica pelo HCV está relacionada ao diagnóstico de outras MEHs (GILL *et al.*, 2016). A maior parte dos dados disponíveis se referem a MEHs decorrentes de desordens imunomediadas e/ou linfoproliferativas. Crioglobulinemia é uma MEH caracterizada pela presença de imunoglobulinas (crioglobulinas) que se tornam insolúveis à temperatura menor que 37° C, formam precipitados no sangue e causam danos funcionais a diferentes órgãos, entre os quais os rins. Outros exemplos de MEHs incluem linfoma não-Hodgkin, alterações dermatológicas, como, por exemplo, porfiria cutânea tardia e líquen plano, alterações oculares, cardiovasculares e neuropsiquiátricas (ZIGNEGO *et al.*, 2007).

1.7 Tratamento farmacológico da HCC

1.7.1 Objetivos do tratamento

O objetivo primário da terapia farmacológica para a HCC é a cura virológica demonstrada por meio da resposta virológica sustentada (RVS). A RVS, definida como HCV-RNA indetectável por ao menos 12 semanas após o fim do tratamento, está relacionada à redução da inflamação do fígado, regressão da fibrose hepática e diminuição do risco de complicações (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019; AASLD; IDSA, 2022). De uma forma geral, há uma queda de 70% do risco de CHC e de 90% do risco de transplante hepático e da mortalidade com a cura virológica. A RVS reduz ainda a morbimortalidade por MEHs, incluindo doenças proliferativas, como, o linfoma não-Hodgkin, que apresentam remissão após o tratamento da HCC (AASLD; IDSA, 2022).

1.7.2 Evolução da terapia farmacológica para a HCC

1.7.2.1 Período pré-liberação dos fármacos de ação direta

As taxas de RVS aos esquemas de tratamento medicamentoso indicados para o manejo da HCC aumentaram substancialmente desde o início da década de 1990 até a disponibilização dos DAAs que fazem parte dos regimes de tratamento atualmente recomendados pelos principais guidelines publicados no mundo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019, 2023; EASL, 2020; AASLD; IDSA, 2022). Durante a maior parte da década de 1990, a terapia indicada à HCC se baseava na monoterapia com interferon (INF) convencional α -2a ou α -2b, medicamentos cuja ação envolve a modulação da resposta imune. As taxas de RVS de pacientes com HCC pelo genótipo 1 não ultrapassavam 20%, valor que alcançava cerca de 30%, se consideradas infecções crônicas pelo genótipo 3 (CARTER; CONNELLY; STRUBLE, 2017). Em 1998, o *Food and Drug Administration (FDA)* aprovou o uso da ribavirina (RBV), fármaco com ação antiviral por um mecanismo não completamente elucidado, para o tratamento da HCC. A associação de INF convencional com a RBV aumentou as taxas de RVS para cerca de 30% entre indivíduos com doença crônica pelo genótipo 1 e para até 65% entre aqueles acometidos pelo genótipo 3 (MCHUTCHISON *et al.*, 1998; LIM; TAN; MUTIMER, 2014; BURSTOW *et al.*, 2017). No início dos anos 2000, o *FDA* aprovou duas apresentações de INF peguilado (PEG), o PEG α -2a e o PEG α -2b. O desenvolvimento destes, a partir de alterações estruturais nas moléculas de INF, permitiu maior comodidade posológica e melhora do perfil de segurança. Além disso, o uso da terapia dupla (PEG associado à RBV) promoveu aumento das taxas de RVS que alcançavam aproximadamente 50% e 70% para os genótipos 1 e 3, respectivamente (MULLER *et al.*, 2012; LIM; TAN; MUTIMER, 2014; CARTER; CONNELLY; STRUBLE, 2017). A terapia dupla envolvendo PEG e RBV foi o tratamento padrão para HCV no mundo por uma década.

1.7.2.2 Fármacos antivirais de ação direta

Os inibidores da protease *NS3/4A* de primeira geração boceprevir (BOC) e telaprevir (TVR) representaram a primeira possibilidade de terapia viral com ação direta sobre o ciclo de vida do HCV. Ambos foram licenciados pelo *FDA* e registrados no Brasil, no ano de 2011, para o tratamento da HCC pelo genótipo 1 (AASLD, 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Ensaios clínicos pré-comercialização, que analisaram a efetividade de regimes de tratamento com BOC ou TVR, mostraram taxas de RVS de cerca de 70% (BACON *et al.*, 2011; JACOBSON *et al.*, 2011; POORDAD *et al.*, 2011; SHERMAN *et al.*, 2011). Entretanto, estudos de vida real conduzidos posteriormente indicaram taxas de respostas

inferiores aos estudos de fase II e III. Além disso, como indicava-se BOC ou TVR em associação com RBV e PEG, o uso das terapias triplas não se mostrou favorável do ponto de vista de segurança (SALMERÓN *et al.*, 2015; ASCIONE *et al.*, 2016; RODRIGUES, 2017).

1.7.2.3 Era dos regimes de tratamento *interferon-free*

Em 2014, o daclatasvir (DCV), o sofosbuvir (SOF) e o simeprevir (SMV), três novos DAAs, foram aprovados nos EUA para o tratamento da HCC. A liberação destes três medicamentos estabeleceu um marco histórico no que se refere ao manejo da infecção pelo HCV. A partir daquele momento, seria possível a indicação de esquemas sem a presença do PEG, cujo uso se associava a uma elevada incidência de reações adversas a medicamentos (RAMs) que, em muitos casos, resultavam em descontinuidade da terapia e falha terapêutica.

O DCV é um inibidor pangenotípico que age ao interagir com o domínio I da proteína não estrutural *NS5A*, o que causa alterações estruturais e de função da enzima. É utilizado na dose de 60 mg ao dia, em administração única, pela maioria dos adultos infectados pelo HCV. Por ser substrato para o citocromo P-450 e para a glicoproteína-P, recomenda-se o ajuste de dose do DCV quando este é indicado com determinados fármacos indutores ou inibidores do seu metabolismo hepático, como, o efavirenz ou o itraconazol, respectivamente. O uso do DCV sempre ocorre por meio de esquemas dos quais faz parte também o SOF, com ou sem RBV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015, 2017; EASL, 2017). O SOF, um inibidor pangenotípico da *NS5B*, que é utilizado na dose de 400 mg uma vez ao dia, compõe esquemas de tratamento em associação com diferentes inibidores da *NS5A*, com ou sem RBV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017, 2019; EASL, 2017, 2020; AASLD; IDSA, 2022). Outro esquema recomendado por guidelines publicados após a aprovação do SOF envolve a sua associação com RBV e PEG (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015, 2017).

Diversos estudos mostraram taxas de RVS próximas a 90% em populações acometidas por diferentes genótipos submetidas a regimes de tratamento envolvendo o SOF associado a DCV com ou sem RBV (NELSON *et al.*, 2015; DALGARD *et al.*, 2017; POL *et al.*, 2017; BELPERIO *et al.*, 2019; CHARATCHAROENWITTHAYA *et al.*, 2020) ou SOF associado a PEG e RBV (LAWITZ *et al.*, 2013; FOSTER *et al.*, 2015; DALGARD *et al.*, 2017). Entretanto, evidências indicam que indivíduos cronicamente acometidos pelo genótipo 3, especialmente aqueles que têm CH, apresentam menores taxas de RVS aos regimes de tratamento que incluem DAAs (AMPUERO; ROMERO-GÓMEZ; REDDY, 2014; AASLD; IDSA, 2022). Atualmente, os guidelines americano e europeu recomendam o uso de outros DAAs para o tratamento da HCC, entre eles os inibidores de *NS5A* velpatasvir (VEL),

ledipasvir (LDV), elbasvir (EBR) e pibrentasvir (PIB), além dos inibidores da protease *NS3/4A* glecaprevir (GLE), voxilaprevir (VOX) e grazoprevir (GZR). Os regimes de tratamento para a HCC pelo genótipo 3 envolvem desde terapias duplas para pacientes sem CH ou com CH compensada até terapias triplas para casos de doença mais grave, sempre com combinações de medicamentos de mecanismos de ação diferentes (EASL, 2020; AASLD; IDSA, 2022). No Brasil, uma nota técnica publicada em 2023 estabelece como opções para o tratamento da HCC as combinações SOF + VEL ou GLE + PIB, independente do genótipo viral. O esquema indicado, o tempo de tratamento e um possível acréscimo da RBV dependem da gravidade e da história de tratamento prévio (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023). O DCV permanece como opção ao tratamento da HCC, especialmente em países subdesenvolvidos (EASL, 2020; WHO, 2021a).

1.8 Substituições de aminoácidos associadas à resistência viral

Em um hospedeiro acometido pelo HCV, estima-se que bilhões de novos vírus sejam produzidos diariamente. A cada ciclo replicativo, que produz uma partícula viral, entre um e três erros são inseridos nas novas fitas de RNA (AASLD, IDSA; 2022), fato que está relacionado à alta taxa de replicação e à limitada atividade corretiva da RNA polimerase *NS5B* (DAVIS, 1999; BOWEN; WALKER, 2005; SORBO *et al.*, 2018). Esta frequência de ocorrência de mutações proporciona ao HCV uma importante característica: a capacidade de circular no indivíduo infectado como *quasispecies*, variantes virais geneticamente similares, que permitem que o vírus se adapte a cada novo hospedeiro por meio de mutações de escape à resposta imune (DAVIS, 1999; DOMINGO; HOLLAND, 1997; FORNS; BUKH, 1999; MIZOKAMI *et al.*, 1999). Substituições de aminoácidos associadas à resistência (SARs), que são responsáveis pela emergência de variantes virais potencialmente resistentes aos DAAs, são desenvolvidas durante a terapia. Entretanto, as SARs que circulam no *baseline* também podem impactar negativamente na resposta à terapia farmacológica (PALANISAMY *et al.*, 2018; SORBO *et al.*, 2018). Substituições de aminoácidos nas proteínas *NS5A* e/ou na *NS3* são comumente selecionadas em pacientes que falham a tratamentos envolvendo DAAs que agem nessas regiões.

Por outro lado, SARs na *NS5B* raramente são detectadas após falha a terapias com inibidores dessa enzima (AASLD, IDSA; 2022). Considerando a *NS5A*, substituições entre os aminoácidos 24 e 93 são aquelas mais descritas na literatura como as mutações associadas à resistência. Sobre a *NS3*, substituições nos aminoácidos 80, 156 e 168 estão relacionadas a redução da susceptibilidade do HCV aos DAAs que fazem parte dos esquemas atuais de

tratamento, enquanto a S282T seria a SAR mais relevante na *NS5B* (EASL, 2020; AASLD, IDSA; 2022). O estudo da resistência aos DAAs é uma área que evoluiu de forma importante nos últimos anos e tem demonstrado que SARs podem influenciar a resposta ao tratamento em situações específicas. As SARs de maior relevância clínica são aquelas presentes na *NS5A* dos genótipos virais 1 e 3. Por isso e por todas as outras questões já mencionadas em relação ao genótipo 3, a população de pessoas com HCC por este tipo viral se consolidou como aquela de mais difícil manejo na era *interferon-free*. Por fim, cabe ressaltar que há erros ou substituições nucleotídicas que resultam em redução do *fitness* viral ou até na incapacidade de replicação das novas cepas (AASLD, IDSA; 2022). Estas são também fundamentais para explicar a dinâmica viral no hospedeiro.

1.9 Justificativa para a realização do trabalho

Nesse contexto, a realização do trabalho se justifica pelo fato da hepatite C ser uma doença de importante morbimortalidade no mundo, especialmente em países de renda média ou baixa onde há maior dificuldade de acesso aos medicamentos. Com a aprovação dos novos DAAs, pessoas infectadas pelo genótipo 3 se tornaram o maior desafio relacionado ao manejo da HCC. Uma vez que o genótipo viral 1 é o mais prevalente no mundo, destaca-se que há uma escassez de estudos de vida real que incluíssem somente indivíduos cronicamente infectados pelo genótipo 3 e que analisaram fatores associados à efetividade dos DAAs DCV e SOF, particularmente o impacto da emergência das SARs sobre as taxas de RVS.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Descrever e analisar dados relacionados à efetividade e à segurança dos esquemas de tratamento DCV + SOF ± RBV e SOF + PEG + RBV indicados a pacientes com HCC pelo genótipo 3.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a população de estudo por meio da descrição de dados sociodemográficos e clínicos no *baseline*;
- Descrever as taxas de RVS global e de cada um dos regimes de tratamento estudados;
- Descrever as prevalências de SARs na *NS5A* e na *NS5B* no *baseline* e analisar a associação destas com a não resposta à terapia farmacológica;
- Descrever as SARs detectadas no pós-tratamento e analisar sua associação com a não resposta;
- Analisar a associação de características demográficas e clínicas dos indivíduos incluídos com a RVS;
- Descrever as incidências das RAMs por grupo de estudo;
- Analisar a associação entre as incidências das RAMs mais comuns com o esquema utilizado;
- Analisar o impacto da RBV sobre as incidências das RAMs mais comuns no grupo DCV + SOF ± RBV;
- Descrever desfechos do acompanhamento em longo prazo da população de estudo;
- Analisar o impacto da RVS na evolução de variáveis laboratoriais e da fibrose hepática a partir do acompanhamento em longo prazo.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Local e desenho do estudo

Este estudo trata-se de uma coorte prospectiva realizada no ambulatório de hepatites virais do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). O HCFMRP-USP é uma instituição pública que suporta atividades de ensino e pesquisa. Considerando a assistência prestada, é um hospital terciário, vinculado ao Sistema Único de Saúde (SUS), que atende demandas de municípios que são parte dos Departamentos Regionais de Saúde de Ribeirão Preto, Franca, Araraquara e Barretos. Ademais, oferece assistência a outras regiões do estado e do país para condições clínicas específicas para as quais é uma referência em âmbitos estadual ou nacional. Os testes genéticos foram conduzidos no Laboratório de Estudos Genômicos, do Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, da Universidade Estadual Paulista, *campus* de São José do Rio Preto.

3.2 População de estudo e esquemas de tratamento

Foram incluídos indivíduos com idade maior ou igual a 18 anos, infectados pelo genótipo 3 do HCV, cuja terapia farmacológica para a HCC foi iniciada entre janeiro de 2016 e junho de 2019. Os regimes de tratamento foram baseados em protocolos (PCDTs – Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Hepatite C e Coinfecções) publicados nos anos de 2015, 2017 e 2018 pelo Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015, 2017, 2018). Durante esse período, os esquemas disponibilizados para o manejo da HCC pelo genótipo 3 foram DCV + SOF ± RBV por 12 semanas, DCV + SOF ± RBV por 24 semanas e SOF + PEG + RBV por 12 semanas. A partir disso, a população do estudo foi dividida em dois grupos: DCV + SOF ± RBV ou SOF + PEG + RBV. De acordo com estes documentos, o acréscimo da RBV à terapia dupla com DCV e SOF deveria ser considerado para indivíduos com CH e/ou história de falha a tratamento prévio. Sobre o tempo de tratamento, os PCDTs de 2017 e 2018 recomendavam terapia por 24 semanas para pacientes com CH. Por sua vez, o regime SOF + PEG + RBV não era recomendado para pessoas com CH descompensada (Child-Pugh B ou C) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017, 2018). Pacientes coinfectados pelo HIV e/ou pelo HBV não foram incluídos no estudo e aqueles tratados em dois momentos diferentes, com qualquer das combinações de medicamentos estudadas, foram analisados como indivíduos diferentes.

3.3 Coleta de dados clínicos e demográficos

Os dados demográficos e a maior parte dos dados clínicos foram coletados por meio do sistema informatizado do HCFMRP-USP em três momentos (pré-tratamento, durante o tratamento e pós-tratamento). Considerando a caracterização da população de estudo no *baseline*, as seguintes informações foram levantadas: dados demográficos (idade, sexo, cor da pele), dados antropométricos (peso e altura), que permitiram o cálculo do índice de massa corporal (IMC), além de informações clínicas relacionadas à hipertensão arterial sistêmica, Diabetes Mellitus (DM), dislipidemia, história de diálise, estágio da fibrose hepática, encefalopatia hepática, ascite, varizes esofágicas, esplenomegalia, terapia prévia com INF/PEG + RBV, terapia prévia com DAA, história de CHC, esteatose hepática, MEHs, uso de álcool, tabagismo, esquema de tratamento prescrito, tempo de tratamento, uso de RBV e presença de SARs. Sobre os exames laboratoriais de sangue pré-tratamento, foram coletados valores da ALT, aspartato aminotransferase (AST), albumina, BT, INR, hemograma, creatinina e carga viral. Para cada um desses parâmetros laboratoriais, considerou-se o exame com data mais próxima ao início do uso dos medicamentos, desde que realizado em até seis meses antes da data de administração da primeira dose. As informações sobre ascite e encefalopatia, além dos valores de BT, albumina e do INR, embasaram a classificação dos indivíduos incluídos segundo o escore Child-Turcotte-Pugh, enquanto o *MELD* foi calculado levando-se em conta informações sobre realização recente de diálise e valores de creatinina, BT e INR. O *FIB-4* foi calculado por meio de fórmula que utiliza dados sobre idade, AST, ALT e contagem de plaquetas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

O estadiamento da fibrose hepática foi determinado pela classificação METAVIR a partir de resultados de exames de biópsia do fígado ou de elastografia hepática. Apenas biópsia ou elastografia realizadas em até três anos antes do início da terapia farmacológica foram consideradas. Para os casos em que havia dois exames disponíveis dentro desse prazo, aquele realizado em data mais próxima ao início da terapia foi utilizado para o estadiamento. Pacientes que apresentavam os sinais clínico-laboratoriais ascite, esplenomegalia, varizes de esôfago e/ou encefalopatia hepática foram classificados como cirróticos ou F4, independentemente de haver biópsia ou elastografia disponíveis. A presença de esteatose hepática foi definida por meio de resultados de biópsia hepática, ultrassom ou ressonância magnética de abdome, de até seis meses antes do tratamento. Ressonância magnética, tomografia computadorizada de abdome, biópsia hepática ou relato médico em prontuário permitiram a avaliação sobre história de CHC. Sobre a obesidade, pessoas com IMC maior ou igual que 30 Kg/m² foram classificadas como obesas (WHO, 2021b). A classificação dos

indivíduos de acordo com a função renal ocorreu por meio da taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) calculada pela *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration creatinine equation (CKD-EPI)* (KDIGO, 2013). A população do estudo foi classificada ainda de acordo com a história de uso de álcool, como segue: uso abusivo de álcool, uso não abusivo de álcool ou sem história de ingestão de álcool. Considerou-se etilistas abusivos os homens com história de consumo semanal de álcool maior ou igual a 210 g e as mulheres que relataram história de consumo semanal maior ou igual a 112 g (CDC, 2023).

Durante o tratamento, a segurança das terapias foi analisada. Anemia, neutropenia, linfopenia e plaquetopenia foram diagnosticadas de acordo com as seguintes concentrações séricas, respectivamente: hemoglobina < 13,5 g/dL para homens e < 12,0 g/dL para mulheres; neutrófilos < 1700/mm³; linfócitos < 900/mm³; plaquetas < 130000/mm³. Descompensação hepática foi definida como a piora do escore Child-Turcotte-Pugh, exceto quando essa piora ocorreu como consequência de um aumento da bilirrubina indireta ou não conjugada. Aumentos de creatinina sérica maiores ou iguais a 0,3 mg/dL entre o *baseline* e um exame realizado durante o tratamento ou entre dois exames realizados durante o tratamento foram considerados lesão renal.

Para a verificação da resposta à terapia, analisou-se o HCV-RNA realizado 12 semanas pós-tratamento para o grupo DCV + SOF ± RBV e as cargas virais de 12 e 24 semanas pós-tratamento para o braço SOF + PEG + RBV. Todos os exames de carga viral foram realizados por reação em cadeia da polimerase (PCR), com limite de detecção de 12 UI/mL. A partir da avaliação da evolução durante o tratamento e das cargas virais pós-terapia, foram definidos os seguintes desfechos à terapia farmacológica: RVS; recidiva; óbito; não RVS associada à descontinuidade por RAM. Analisou-se também desfechos da RVS em longo prazo. Para tanto, foram coletados, de pacientes que alcançaram a RVS, dados clínicos e resultados de exames necessários aos cálculos dos escores *FIB-4*, *MELD* e Child-Turcotte-Pugh nos momentos um ano e três anos pós-tratamento. Levou-se em conta dados clínicos e laboratoriais de até três meses antes ou três meses após cada um dos pontos de análise. Ainda em relação aos desfechos em longo prazo, classificou-se os pacientes incluídos no estudo, a partir de dados do ponto três anos pós-tratamento, da seguinte forma: indivíduos ainda em acompanhamento no ambulatório de hepatites virais onde o estudo foi realizado; indivíduos encaminhados ao ambulatório de CHC por desenvolvimento de câncer hepático; pacientes encaminhados ao ambulatório de transplante hepático; perda de acompanhamento; alta do ambulatório de hepatites virais; óbito; transferência para outro serviço.

3.4 Análise das substituições de aminoácidos associadas à resistência

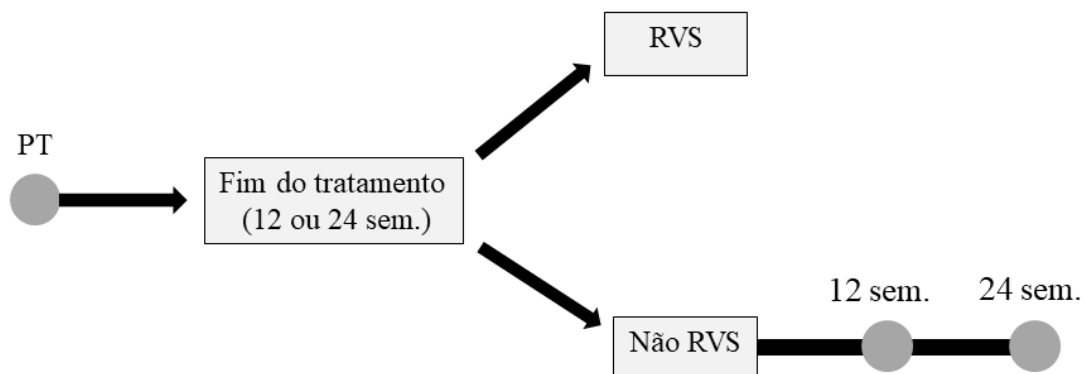
3.4.1 Regiões do genoma viral analisadas

O gene que codifica a proteína viral *NS5B* foi analisado em todas as amostras de sangue coletadas e amplificadas, uma vez que todos os pacientes incluídos no estudo utilizaram o SOF. Por sua vez, o gene que codifica a proteína *NS5A* foi analisado a partir de amostras de indivíduos tratados com DCV.

3.4.2 Coleta das amostras de sangue

Considerando o período pré-tratamento, uma amostra de sangue foi coletada de todos os indivíduos que compareceram ao ambulatório de hepatites virais em até 15 dias antes do início do tratamento e que consentiram com o procedimento de coleta. Para aqueles pacientes que completaram o tratamento indicado e que não alcançaram RVS, amostras foram coletadas 12 e 24 semanas após o término da terapia farmacológica. Para estes pontos, as coletas ocorreram em até 15 dias antes ou após as semanas 12 e 24 pós-tratamento. Os pontos de coleta para as análises genéticas estão representados na figura 2.

Figura 2 – Esquema de coleta de sangue para análise das SARs.



○: pontos de coleta. PT: pré-tratamento. RVS: resposta virológica sustentada. SARs: substituições associadas à resistência. Sem.: semanas.

Para a realização dos testes genéticos, a cada procedimento de coleta, cerca de 8,0 mL de sangue foram coletados em um tubo vacutainer com ativador de coágulo presente nas paredes. Após, realizou-se a centrifugação, a separação do soro em duas amostras e o armazenamento em freezer a -80°C . O transporte das amostras para o laboratório onde as análises do genoma viral foram realizadas ocorreu em caixa térmica com gelo seco.

3.4.3 Extração do RNA e amplificação das regiões genômicas de interesse

A extração do RNA viral ocorreu por meio de uma solução de TRIzol. Para cada amostra, 250 µL de material biológico foram adicionados a 750 µL de TRIzol (*Thermo Fisher Scientific*®). Após homogeneização, a mistura foi incubada à temperatura de 25° C, por cinco minutos. Em seguida, o RNA foi separado, precipitado e eluído em água livre de nucleases. Este RNA foi, então, usado como molde para a síntese de DNA complementar (cDNA) por meio do *High Capacity cDNA Archive Kit* (*Life Technologies*®). Após a síntese da cDNA, as regiões de interesse dos genes *NS5A* e *NS5B* foram amplificadas por Nested-PCR, processo que utilizou o *Long PCR Enzyme Mix* (*Thermo Fisher Scientific*®), de acordo com o protocolo de ciclagem do fabricante. O Nested-PCR consiste na realização de duas reações de PCR consecutivas, com o objetivo de otimizar a amplificação. Considerando o *NS5B*, todo o gene foi amplificado, uma vez que as SARs são encontradas distribuídas em toda a proteína viral. A amplificação dessa região ocorreu após a fragmentação do gene *NS5B* em duas partes (*NS5B-I* e *NS5B-II*). Primers específicos foram desenhados para este processo (Tabela Suplementar 1). Para a *NS5A*, primers previamente desenhados e descritos na literatura foram usados para amplificar os primeiros 300 nucleotídeos, o que se justifica pelo fato das SARs na *NS5A* se concentrarem no domínio I da proteína (BITTAR *et al.*, 2013).

3.4.4 Sequenciamento Sanger

Após as amplificações, os produtos do Nested-PCR foram submetidos a uma reação de sequenciamento usando o *BigDye Terminator v3.1* (*Life Technologies*®). Para o gene *NS5A*, os primers da segunda reação do Nested-PCR foram usados para o sequenciamento. Sobre o *NS5B*, além dos primers da segunda reação do Nested-PCR, utilizou-se um par adicional de primers para garantir o sequenciamento de todo o gene (Tabela Suplementar 2). A leitura do sequenciamento foi realizada pelo equipamento *ABI 3130 XL Genetic Analyzer* (*Life Technologies*®) e as sequências obtidas foram ajustadas pelo programa *Clustal W nested in the BioEdit 7.1.11* (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994; HALL, 1999). Este *software* permitiu o alinhamento, tradução e comparação das sequências obtidas com a sequência referência para o genótipo 3: NZL1 (número de acesso no *GenBank* D17763).

3.4.5 Análise estatística

As variáveis quantitativas idade e carga viral pré-tratamento foram descritas por meio de média e desvio padrão (DP). As demais variáveis coletadas no *baseline* foram categorizadas e as frequências absoluta e relativa dessas foram citadas. Para a descrição das

frequências das SARs no *baseline*, o cálculo ocorreu em relação ao total de amostras amplificadas. Nesse sentido, descreveu-se também a eficiência da amplificação, por gene estudado. As taxas de RVS global e por grupo foram calculadas por intenção de tratar.

As análises de associação entre o esquema de tratamento e a RVS e entre as variáveis demográficas e clínicas categorizadas e a RVS ocorreram por risco relativo (RR) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Essa última análise foi realizada para a população geral de estudo e por grupo. Foi proposta ainda a realização de regressão logística binária, considerando as variáveis cujas análises evidenciaram associação estatisticamente significativa com a RVS. Sobre a segurança dos regimes terapêuticos estudados, as prevalências absoluta e relativa de todas as RAMs observadas nos dois braços do estudo foram descritas. Realizou-se também os estudos de associação entre os eventos adversos mais comuns (incidência de, no mínimo, 10% em pelo menos um dos grupos) e o esquema de tratamento utilizado e da associação entre o regime prescrito e a descontinuidade de uso por RAM. Dentro do grupo DCV + SOF ± RBV, foi feito o estudo da associação entre o uso da RBV e as RAMs mais comuns. As análises envolvendo a segurança foram realizadas por RR e IC 95%.

Sobre as SARs pós-tratamento, foi elaborada uma tabela que descreveu as mutações detectadas e outras características clínicas daqueles indivíduos que não alcançaram RVS. O impacto da RVS em longo prazo foi analisado por comparação das médias dos escores *FIB-4*, Child-Turcotte-Pugh e *MELD* no *baseline*, um ano pós-tratamento e três anos pós-tratamento. Além disso, comparou-se as médias dos parâmetros clínicos cujos valores são utilizados para o cálculo do *FIB-4*. A comparação de médias ocorreu pelo teste de ANOVA de medidas repetidas, com posterior análise pelo *post-hoc* Bonferroni. Por fim, foram construídos gráficos com o objetivo de ilustrar as diferenças das médias, por meio do *software GraphPad Prism 6*, e realizou-se regressão linear para verificar a associação da CH com a evolução do *FIB-4*. Tanto para as regressões quanto para o estudo do impacto da RVS em longo prazo, considerou-se que houve significância estatística quando a análise indicou $p < 0,05$.

As análises estatísticas foram realizadas no programa *Statistical Package for Social Sciences (SPSS) (SPSS Inc., Version 21.0)*. Para as análises de associação, foi estabelecido um nível de significância (α) de 5%.

3.5 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP (número de aprovação: 1317982). Todos os pacientes incluídos assinaram o termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Aqueles que tiveram amostras de sangue coletadas em algum dos momentos definidos no projeto assinaram ainda o Termo de Consentimento para Guarda de Material Biológico.

4 RESULTADOS

Foram incluídos no estudo 121 pacientes cronicamente infectados pelo genótipo 3 do HCV, dos quais 82 (67,8%) eram homens. A média de idade foi de $56,4 \pm 8,5$ anos (média \pm DP) e 93 (76,9%) dos indivíduos apresentavam CH. Sobre os regimes de tratamento indicados, 105 (86,8%) pacientes foram tratados com DCV + SOF \pm RBV, outros 15 (12,4%) utilizaram SOF + PEG + RBV e um paciente (0,8%) foi tratado com um esquema composto por DCV + SOF + PEG + RBV por 24 semanas. Os dados demográficos e clínicos dos indivíduos incluídos no estudo estão descritos na tabela 3.

Tabela 3 - Características demográficas e clínicas dos pacientes incluídos no estudo no *baseline*.

Característica	Todos (n = 121)*	DCV + SOF \pm RBV (n = 105)	SOF + PEG + RBV (n = 15)
Idade (anos), média (DP)	56,4 (8,5)	56,8 (8,3)	53,1 (9,2)
Homens, n (%)	82 (67,8)	68 (64,8)	13 (86,7)
Cor da pele, n (%)			
Branco	104 (86,0)	89 (84,8)	14 (93,3)
Outros	17 (14,0)	16 (15,2)	1 (6,7)
Diabetes Mellitus 2, n (%)	35 (28,9)	30 (28,6)	4 (26,7)
Hipertensão Arterial, n (%)	50 (41,3)	44 (41,9)	6 (40,0)
Obesidade, n (%)	36 (29,8)	32 (30,5)	3 (20,0)
Dislipidemia, n (%)	26 (21,5)	22 (21,0)	4 (26,7)
Manifestação extra-hepática	12 (9,9)	9 (8,6)	3 (20,0)
Estágio da fibrose hepática, n (%)			
F0/F1	6 (5,0)	5 (4,8)	1 (6,7)
F2	10 (8,3)	9 (8,6)	1 (6,7)
F3	12 (9,9)	8 (7,6)	4 (26,7)
F4	93 (76,9)	83 (79,0)	9 (60,0)

Escore Child-Turcotte-Pugh, n (%)**

A	75 (80,6)	68 (81,9)	7 (77,8)
B	13 (14,0)	12 (14,5)	1 (11,1)
C	2 (2,2)	2 (2,4)	0 (0,0)
Dado indisponível	3 (3,2)	1 (1,2)	1 (11,1)
<hr/>			
Escore <i>MELD</i> , n (%)**			
≤ 9	50 (53,8)	44 (53,0)	6 (66,7)
10-19	36 (38,7)	34 (41,0)	2 (22,2)
20-29	4 (4,3)	4 (4,8)	0 (0,0)
≥ 30	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Dado indisponível	3 (3,2)	1 (1,2)	1 (11,1)
<hr/>			
Escore <i>FIB-4</i>			
< 3,25	51 (42,1)	42 (40,0%)	9 (60,0)
≥ 3,25	70 (57,9)	63 (60,0%)	6 (40,0)
<hr/>			
HCV-RNA, média x 10 ⁶ UI/mL (DP)	1,1 (1,2)	1,1 (1,3)	1,1 (0,9)
<hr/>			
AST ≥ 3x LSN, n (%)	36 (29,8)	32 (30,5)	4 (26,7)
<hr/>			
ALT ≥ 3x LSN, n (%)	41 (33,9)	36 (34,3)	4 (26,7)
<hr/>			
Plaquetas < 100.000 mm ³ , n (%)	41 (33,9)	37 (35,2)	3 (20,0)
<hr/>			
História de CHC, n (%)	13 (10,7)	13 (12,4)	0 (0,0)
<hr/>			
Terapia prévia, n (%)			
INF/PEG + RBV	53 (43,8)	43 (41,0)	9 (60,0)
SOF	3 (2,5)	2 (1,9)	0 (0,0)
DCV + SOF	2 (1,7)	2 (1,9)	0 (0,0)
<hr/>			
Tempo de tratamento, n (%)			
12 semanas	94 (77,7)	79 (75,2)	15 (100,0)
24 semanas	27 (22,3)	26 (24,8)	0 (0,0)
<hr/>			
Uso de RBV, n (%)	106 (87,6)	90 (85,7)	15 (100,0)
<hr/>			
TFGe (<i>CKD-EPI</i>), n (%)			
G1 (> 90 ml/min/1,73m ²)	61 (50,4)	49 (46,7)	11 (73,3)
G2 (60-89 ml/min/1,73m ²)	43 (35,5)	40 (38,1)	3 (20,0)
G3a (45-59 ml/min/1,73m ²)	5 (4,1)	4 (3,8)	1 (6,7)
G3b (30-44 ml/min/1,73m ²)	7 (5,8)	7 (6,7)	0 (0,0)
G4 (15-29 ml/min/1,73m ²)	2 (1,7)	2 (1,9)	0 (0,0)
G5 (< 15 ml/min/1,73m ²)	3 (2,5)	3 (2,9)	0 (0,0)
<hr/>			
Esteatose hepática, n (%)	39 (32,2)	33 (31,4)	5 (33,3)
<hr/>			
Consumo prévio de álcool, n (%)			
Consumo abusivo***	48 (39,7)	41 (39,0)	7 (46,7)
Consumo não abusivo	42 (34,7)	36 (34,3)	5 (33,3)
<hr/>			
Tabagismo			
Fumante	25 (20,7)	23 (21,9)	2 (13,3)
Ex-fumante	38 (31,4)	35 (33,3)	3 (20,0)

ALT: alanina aminotransferase. AST: aspartato aminotransferase. CHC: carcinoma hepatocelular. *CKD-EPI*: *chronic kidney disease epidemiology collaboration creatinine equation*. DCV: daclatasvir. DP: desvio padrão. *FIB-4*: *Fibrosis-4*. HCV-RNA: carga viral ou RNA do vírus da hepatite C. INF: interferon. LSN: limite superior da normalidade. *MELD*: *escore model for end-stage liver disease*. Obesidade: índice de massa corporal $\geq 30,0$ Kg/m². PEG: interferon peguilado. RBV: ribavirina. SOF: sofosbuvir. TFGe: taxa de filtração glomerular estimada.

*Resultados consideram um paciente que foi tratado com SOF + DCV + PEG + RBV.

**Considerando pacientes com cirrose (n = 93, n = 83, n = 9).

***Consumo abusivo de álcool: superior a 210 g por semana para homens e 112 g por semana para mulheres.

Sobre a análise descritiva das SARs, considerando a proteína *NS5A*, 94 amostras (79 pré-tratamento e 15 pós-tratamento) foram coletadas e observou-se 92,6% de eficiência do processo de amplificação (87 amostras amplificadas). Para a região *NS5B*, 106 amostras (91 pré e 15 pós-terapia farmacológica) foram analisadas e a taxa de sucesso da amplificação foi de 80,2% (85 amostras amplificadas). A análise das frequências das SARs no *baseline*, calculadas a partir do total de amostras amplificadas, mostrou uma alta prevalência de mutações no sítio 62 da *NS5A* (92,4% dos indivíduos do grupo DCV + SOF ± RBV). A respeito da *NS5B*, o sítio 554 foi aquele com a maior prevalência de mutações. A SAR G554A foi encontrada em 3 pacientes ou 3,7% de todas as amostras amplificadas para a região. As prevalências de todas as SARs no período pré-tratamento, por regime terapêutico indicado e por proteína viral analisada, estão citadas na tabela 4. Não foi coletada amostra de sangue para análise pré-tratamento das SARs do paciente tratado com DCV + SOF + PEG + RBV.

Tabela 4 - Substituições de aminoácidos associadas à resistência viral no *baseline*.

	DCV + SOF ± RBV (n = 79)*	SOF + PEG + RBV
<i>NS5A</i>	n (%)	n (%)
M28	0 (0,0)	NA
P29	0 (0,0)	NA
A30K	6 (7,6)	NA
A30T	2 (2,5)	NA
A30S	1 (1,3)	NA
L31	0 (0,0)	NA
P32	0 (0,0)	NA
P58T	1 (1,3)	NA
A62F	2 (2,5)	NA
A62I	1 (1,3)	NA
A62L	1 (1,3)	NA

A62T	19 (24,1)	NA
A62S	50 (63,3)	NA
E92D	1 (1,3)	NA
Y93	0 (0,0)	NA
	DCV + SOF ± RBV (n = 70)*	SOF + PEG + RBV (n = 11)*
<i>NS5B</i>	n (%)	n (%)
L159F, n (%)	1 (1,4)	0 (0,0)
S282, n (%)	0 (0,0)	0 (0,0)
C316, n (%)	0 (0,0)	0 (0,0)
V321, n (%)	0 (0,0)	0 (0,0)
S368, n (%)	0 (0,0)	0 (0,0)
N411, n (%)	0 (0,0)	0 (0,0)
M414, n (%)	0 (0,0)	0 (0,0)
V421A, n (%)	1 (1,4)	0 (0,0)
Y448, n (%)	0 (0,0)	0 (0,0)
P495, n (%)	0 (0,0)	0 (0,0)
V553, n (%)	0 (0,0)	0 (0,0)
G554A, n (%)	3 (4,3)	0 (0,0)
G556, n (%)	0 (0,0)	0 (0,0)
D559, n (%)	0 (0,0)	0 (0,0)

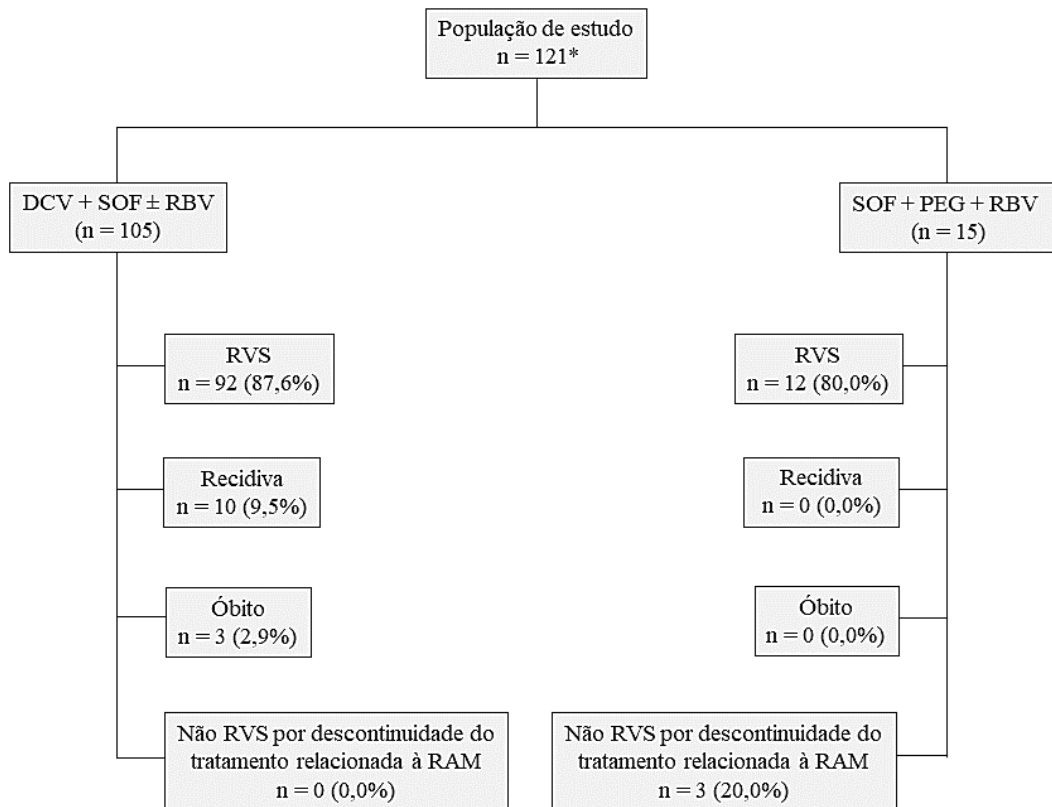
DCV: daclatasvir. NA: não se aplica. PEG: interferon peguilado. RBV: ribavirina. SOF: sofosbuvir.
*Número de amostras amplificadas para cada gene.

As taxas de RVS, calculadas por intenção de tratar, foram de 86% para a população geral do estudo, 87,6% para o grupo DCV + SOF ± RBV e 80% para o braço SOF + PEG + RBV. Se considerados os pacientes com dados de resposta disponíveis, as taxas de RVS seriam de 88,1% para a população geral do estudo e 90,2% para o grupo DCV + SOF ± RBV. Sobre o braço SOF + PEG + RBV, todos os pacientes apresentavam dado de resposta representado pela carga viral de 24 semanas pós-tratamento. Este mesmo grupo alcançou 100% de RVS, se analisadas somente as pessoas tratadas que completaram a terapia.

Os indivíduos incluídos no estudo que completaram o tratamento e não alcançaram a RVS foram recidivantes, ou seja, apresentaram carga viral indetectável no fim da terapia, incluindo aquele que utilizou DCV + SOF + PEG + RBV. Os três indivíduos que morreram eram cirróticos, sendo que dois apresentavam CH descompensada. Um desses morreu durante a terapia medicamentosa e os outros dois após o fim do tratamento, porém antes da 12^a semana pós-terapia e da coleta da carga viral que permitiria a análise da resposta. A

comparação entre as taxas de RVS dos esquemas SOF + PEG + RBV e DCV + SOF ± RBV não evidenciou diferença (RR = 0,887; IC 95% = 0,683-1,151). Os desfechos do tratamento farmacológico, para cada um desses regimes terapêuticos, estão descritos na figura 3.

Figura 3 – Desfechos da terapia farmacológica, por grupo.



DCV: daclatasvir. PEG: interferon peguilado. RAM: reação adversa a medicamento. RVS: resposta virológica sustentada. RBV: ribavirina; SOF: sofosbuvir.

*Um paciente incluído foi tratado com DCV + SOF + RBV + PEG.

As taxas de RVS, por subgrupos das variáveis demográficas e clínicas que foram categorizadas para as análises de associação com a resposta ao tratamento, estão descritas na tabela 5. Na mesma tabela, constam os resultados das análises de associação das variáveis com a RVS para cada grupo (população geral do estudo, grupo DCV + SOF ± RBV e braço SOF + PEG + RBV). A análise da população geral mostrou que diagnóstico de CH e história de tratamento com INF/PEG + RBV foram estatisticamente associados a um maior risco de não resposta à terapia medicamentosa. Considerando a análise do grupo DCV + SOF ± RBV, evidenciou-se que diagnóstico de CH e presença de SAR na proteína NS5A aumentaram o risco de recidiva.

Tabela 5 - Taxas de RVS por subgrupos de variáveis demográficas e clínicas e análise de associação das variáveis com a RVS.

	Todos*		DCV + SOF ± RBV		SOF + PEG + RBV	
	RVS (%)	RR (IC 95%)	RVS (%)	RR (IC 95%)	RVS (%)	RR (IC 95%)
Idade		1,006 (0,874-1,157)		0,930 (0,826-1,049)		1,818 (0,670-4,931)
< 60 anos	88,3		87,9		90,9	
≥ 60 anos	87,8		94,4		50,0	
Sexo		0,936 (0,824-1,064)		0,930 (0,826-1,049)		1,692 (0,415-6,898)
Masculino	86,3		87,9		84,6	
Feminino	92,1		94,4		50,0	
Cirrose hepática		1,184 (1,084-1,294)		1,143 (1,052-1,242)		1,500 (0,945-2,381)
Não	100,0		100,0		100,0	
Sim	84,4		87,5		66,7	
Estágio da cirrose**		1,022 (0,797-1,311)		1,057 (0,808-1,381)		0,714 (0,447-1,141)
Compensada	86,5		88,1		71,4	
Descompensada	84,6		83,3		100,0	
Diabetes Mellitus 2		1,040 (0,891-1,214)		1,003 (0,871-1,155)		1,091 (0,581-2,050)
Não	89,2		90,3		81,8	
Sim	85,7		90,0		75,0	
Obesidade		1,031 (,885-1,201)		0,990 (0,863-1,136)		1,250 (0,540-2,893)
Não	88,8		89,7		83,3	
Sim	86,1		90,6		66,7	
Estágio da DRC***		0,966 (0,791-1,180)		0,991 (0,812-1,209)		---

	Todos*		DCV + SOF ± RBV		SOF + PEG + RBV	
	RVS (%)	RR (IC 95%)	RVS (%)	RR (IC 95%)	RVS (%)	RR (IC 95%)
Não grave	87,9		90,1		80,0	
Grave	90,9		90,9		---	
Plaquetas		0,900 (0,766-1,059)		0,926 (0,796-1,078)		0,800 (0,346-1,852)
< 100.000/mm ³	82,1		85,7		66,7	
≥ 100.000/mm ³	91,1		92,5		83,3	
ALT		1,096 (0,938-1,281)		1,127 (0,962-1,321)		0,727 (0,506-1,044)
< 3x LSN	90,9		93,9		72,7%	
≥ 3x LSN	82,9		83,3		100,0%	
AST		1,083 (0,921-1,274)		1,101 (0,935-1,295)		1,091 (0,581-2,050)
< 3x LSN	90,2		92,9		81,8	
≥ 3x LSN	83,3		84,4		75,0	
Tempo de tratamento		NA		0,984 (0,850-1,139)		NA
12 semanas	NA		89,9		80,0	
24 semanas	NA		91,3		NA	
Uso de RBV		NA		1,034 (0,880-1,216)		NA
Não	NA		92,9		NA	
Sim	NA		89,8		80,0	
Terapia prévia com						
INF/PEG + RBV		1,157 (1,002-1,336)		1,134 (0,981-1,310)		1,071 (0,650-1,767)
Não	93,9		94,9		83,3	

	Todos*		DCV + SOF ± RBV		SOF + PEG + RBV	
	RVS (%)	RR (IC 95%)	RVS (%)	RR (IC 95%)	RVS (%)	RR (IC 95%)
Sim	81,1		83,7		77,8	
<i>SARs no baseline****</i>						
<i>NS5A</i>		NA		1,125 (1,037-1,221)		NA
Não	NA		100,0		NA	
Sim	NA		88,9		NA	
<i>A62T (NS5A)</i>		NA		1,200 (0,929-1,550)		NA
Não	NA		93,3		NA	
Sim	NA		77,8		NA	
<i>A62S (NS5A)</i>		NA		0,932 (0,785-1,106)		NA
Não	NA		85,7		NA	
Sim	NA		92,0		NA	
<i>NS5B</i>		1,133 (0,727-1,767)		1,152 (0,739-1,797)		---
Não	90,7		92,2		81,8	
Sim	80,0		80,0		---	

ALT: alanina aminotransferase. AST: aspartato aminotransferase. DCV: daclatasvir. DRC: doença renal crônica. IC: intervalo de confiança. INF: interferon. NA: não se aplica. PEG: interferon peguilado. RBV: ribavirina. RR: risco relativo. RVS: resposta virológica sustentada. SARs: substituições de aminoácidos associadas à resistência. SOF: sofosbuvir. ---: não calculado pela ausência de indivíduos em subgrupo da variável analisada.

Obesidade: índice de massa corporal $\geq 30,0 \text{ Kg/m}^2$

*n total inclui um paciente tratado com SOF + DCV + PEG + RBV, por 24 semanas.

**Compensada: Child-Pugh A; Descompensada: Child-Pugh B ou C.

***DRC não grave: estágio 1-3a; DRC grave: estágio 3b-5.

****Análises consideraram as amostras amplificadas.

A partir da regressão logística binária, considerando a população geral do estudo, foi evidenciado que CH e terapia prévia com INF/PEG + RBV seriam variáveis associadas com o não alcance de RVS de forma independente ($p < 0,05$). A regressão logística binária, realizada com os dados do grupo DCV + SOF ± RBV, mostrou que CH seria uma variável mais fortemente associada à RVS ($p < 0,05$) em relação à presença de SAR no baseline.

A tabela 6 descreve as SARs detectadas no pós-tratamento daqueles indivíduos que apresentavam resultado do exame de HCV-RNA coletado após o fim da terapia e que não alcançaram a RVS. Nesta mesma tabela, constam ainda dados demográficos e outros dados clínicos desses pacientes.

Tabela 6 - Características demográficas e clínicas dos pacientes que não alcançaram a RVS.

Caso	Idade	Sexo	CH	Terapia prévia com INF/PEG + RBV	Terapia prévia com DAA	Esquema de tratamento	Tempo de terapia*	SARs na NS5A no <i>baseline</i>	SARs na NS5B no <i>baseline</i>	SARs na NS5A pós-tratamento	SARs na NS5B pós-tratamento
1	42	F	Sim	Sim	Não	DCV+SOF+RBV	12 sem	A62S	---	A62S Y93H	---
2	48	M	Sim	Sim	Não	DCV+SOF+RBV	12 sem	A62S	L159F	A62S Y93H	L159F
3	67	M	Sim	Sim	Não	SOF+PEG+RBV	5 dias**	NA	---	NA	NA
4	66	M	Sim	Não	Não	DCV+SOF	12 sem	A30K A62T	Não	A30K A62T	---
5	62	M	Sim	Sim	Não	DCV+SOF+RBV	12 sem	A62S	---	A62S Y93H	---
6	56	F	Sim	Não	Não	DCV+SOF+RBV	12 sem	A62S	Não	---	---
7	55	M	Sim	Não	Não	DCV+SOF+RBV	12 sem	---	---	---	---
8	62	M	Sim	Sim	SOF	DCV+SOF+PEG+RBV	24 sem	---	---	A62T	---
9	51	F	Sim	Não	Não	SOF+PEG+RBV	2 sem**	NA	Não	NA	NA
10	62	M	Sim	Sim	Não	SOF+PEG+RBV	3 sem**	NA	Não	NA	NA
11	49	M	Sim	Sim	Não	DCV+SOF+RBV	12 sem	A30K A62T	Não	A30K A62T E92D	Não
12	50	M	Sim	Sim	DCV+SOF	DCV+SOF+RBV	24 sem	A30K A62T E92D	Não	A30K A62T	Não
13	54	M	Sim	Sim	Não	DCV+SOF+RBV	12 sem	---	---	A62T Y93H	Não
14	57	M	Sim	Sim	DCV+SOF	DCV+SOF+RBV	24 sem	A62T	Não	---	---

CH: cirrose hepática. DAA: antivirais de ação direta. DCV: daclatasvir. INF: interferon. NA: não se aplica. PEG: interferon peguilado. RBV: ribavirina. RVS: resposta virológica sustentada. SARs: substituições de aminoácidos associadas à resistência. SOF: sofosbuvir. ---: amostra não coletada/não amplificada. *sem = semanas.

**Descontinuidade por evento adverso.

Sobre a segurança dos regimes terapêuticos estudados, as análises mostraram altas incidências de eventos, tais como, RAMs hematológicas e eventos *flu-like*. Foi evidenciado que o uso do PEG seria um fator de risco para a maior incidência dessas e de outras RAMs, conforme representado na tabela 7.

Tabela 7 – Frequências das reações adversas observadas, por grupo, e análise de associação entre as reações adversas mais comuns e o esquema de tratamento.

	DCV + SOF ± RBV (n = 105)	SOF + PEG + RBV (n = 15)	
	n (%)	n (%)	RR (IC 95%)
Anemia	76 (72,4)	14 (93,3)	1,289 (1,077-1,543)
Neutropenia	6 (5,7)	10 (66,7)	11,667 (4,960-27,444)
Plaquetopenia	14 (13,3)	11 (73,3)	5,500 (3,094-9,777)
Linfopenia	9 (8,6)	5 (33,3)	3,889 (1,504-10,055)
Astenia/fatiga	43 (41,0)	8 (53,3)	1,302 (0,770-2,204)
Descompensação	8 (7,6)	5 (33,3)	4,375 (1,646-11,630)
Dermatológicas	10 (9,5)	4 (26,7)	2,800 (1,004-7,808)
Cefaleia	19 (18,1)	2 (13,3)	0,737 (0,190-2,850)
Tosse seca	4 (3,8)	3 (20,0)	5,250 (1,300-21,200)
Epigastria	8 (7,6)	2 (13,3)	1,750 (0,410-7,475)
Náuseas e/ou vômitos	25 (23,8)	3 (20,0)	0,840 (0,289-2,445)
Reações <i>flu-like</i>	1 (1,0)	8 (53,3)	56,000 (7,524-416,788)
Tontura	13 (12,4)	2 (13,3)	1,077 (0,269-4,310)
Sonolência	7 (6,7)	2 (13,3)	2,000 (0,457-8,746)
Perda de apetite	13 (12,4)	9 (60,0)	4,846 (2,516-9,334)
Neuropsiquiátricos	3 (2,9)	4 (26,7)	9,333 (2,311-37,689)
Aumento da PA	2 (1,9)	0 (0,0)	-----
Redução da PA	1 (1,0)	0 (0,0)	-----
Hipotensão postural	1 (1,0)	0 (0,0)	-----
Hipercalemia	1 (1,0)	0 (0,0)	-----
Hipocalemia	0 (0,0)	1 (6,7)	-----
Taquicardia	3 (2,9)	0 (0,0)	-----
Diarreia	9 (8,6)	1 (6,7)	-----
Constipação	1 (1,0)	1 (6,7)	-----

Melena	1 (1,0)	0 (0,0)	----
Tenesmo	2 (1,9)	0 (0,0)	----
Hematoquezia	2 (1,9)	0 (0,0)	----
Dor abdominal	7 (6,7)	0 (0,0)	----
Febre	3 (2,9)	0 (0,0)	----
Edema periférico	4 (3,8)	0 (0,0)	----
Boca seca	3 (2,9)	0 (0,0)	----
Disgeusia	2 (1,9)	0 (0,0)	----
Anosmia	1 (1,0)	0 (0,0)	----
Epistaxe	1 (1,0)	0 (0,0)	----
Insônia	9 (8,6)	1 (6,7)	----
Mialgia/cãimbras	4 (3,8)	1 (6,7)	----
Artralgia	1 (1,0)	0 (0,0)	----
Aumento de apetite	4 (3,8)	0 (0,0)	----
Dispneia	10 (9,5)	0 (0,0)	----
Lesão renal	9 (8,6)	1 (6,7)	----
Urina alaranjada	2 (1,9)	0 (0,0)	----
Hiperemia conjuntival	0 (0,0)	1 (6,7)	----
Alopecia	0 (0,0)	1 (6,7)	----
Sudorese	2 (1,9)	0 (0,0)	----
Turvação visual	0 (0,0)	1 (6,7)	----
Aumento de transaminases	1 (1,0)	0 (0,0)	----

DCV: daclatasvir. IC: intervalo de confiança. PA: pressão arterial. PEG: peginterferon. RBV: ribavirina. RR: risco relativo. SOF: sofosbuvir. Descompensação: descompensação da doença hepática caracterizada por piora do escore de Child-Turcotte-Pugh, exceto quando esta alteração ocorreu por aumento dos valores da bilirrubina indireta. Neuropsiquiátricos: irritabilidade, ansiedade, labilidade emocional e/ou agitação. Dermatológicas: *rash* e/ou prurido. Reações *flu-like*: ocorrência concomitante de, pelo menos, dois dos seguintes eventos: febre, cefaleia, calafrio, sudorese, mialgia, indisposição, artralgia. Lesão renal: exame de creatinina sérica mostrando um aumento de, no mínimo, 0,3 mg/dL entre o *baseline* e um segundo exame realizado durante a terapia farmacológica ou entre dois exames realizados durante o tratamento.

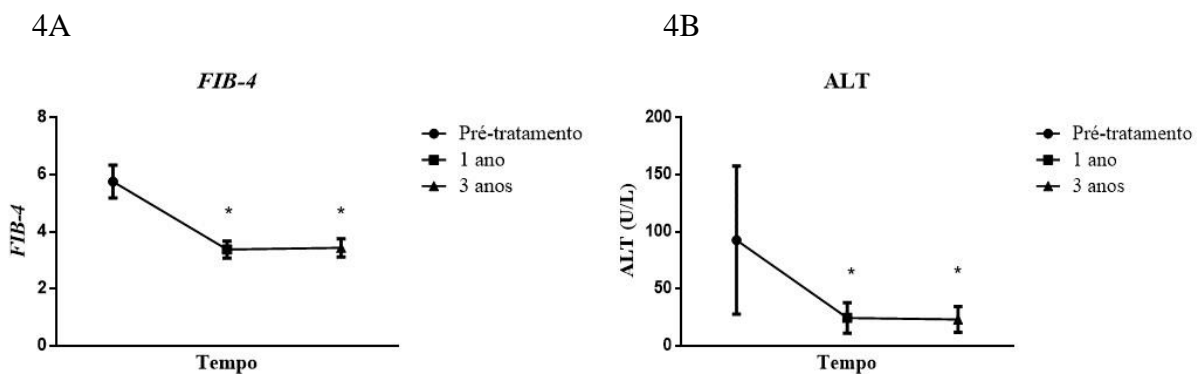
O impacto da RBV para a ocorrência das RAMs comuns dentro do grupo DCV + SOF ± RBV foi também estudada. Indivíduos tratados com RBV apresentaram risco significativamente maior de desenvolverem anemia (RR = 12,500; IC 95% 1,878-83,220). Um único paciente tratado com terapia dupla DCV + SOF (n = 15) apresentou anemia, caracterizada por um quadro leve (Hemoglobina \geq 10,0 g/dL). Embora não tenha sido observada relevância estatística, astenia/fadiga (RR = 3,417; IC 95% = 0,922-12,661),

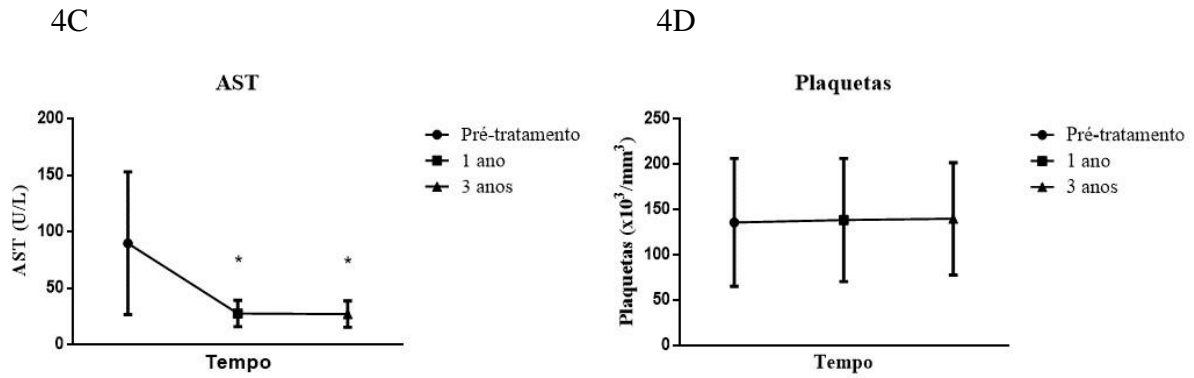
náuseas e/ou vômitos (RR = 1,917; IC 95% = 0,503-7,302) e cefaleia (RR = 1,417; IC 95% = 0,364-5,516) foram outras RAMs com maior incidência no subgrupo que utilizou RBV. Com relação aos eventos tontura e perda de apetite, cabe ressaltar que, embora também não tenha sido evidenciada diferença estatística entre os grupos, nenhum paciente que utilizou terapia dupla (DCV + SOF) apresentou qualquer uma destas reações. A indicação de RBV não implicou em diferença na incidência de plaquetopenia entre os subgrupos. Por último, o indivíduo que usou DCV + SOF + PEG + RBV apresentou anemia leve e relatou cefaleia, tontura, astenia, fadiga e perda de libido.

A análise sobre descontinuidade do tratamento motivada por RAM mostrou que pacientes que utilizaram PEG apresentaram um risco maior de interrupção de terapia por evento adverso (RR = 35,000; IC 95% = 4,382-279,528). No total, seis indivíduos tiveram seus tratamentos descontinuados por RAM, cinco destes foram tratados com SOF + PEG + RBV e um paciente utilizou o esquema DCV + SOF + RBV. Este último apresentou eventos gastrointestinais (náuseas, vômitos, diarreia e dor abdominal) que causaram a interrupção. Sobre aqueles tratados com PEG, a terapia medicamentosa de dois foi interrompida por descompensação hepática, um indivíduo apresentou reações dermatológicas (*rash* e prurido) que motivaram a descontinuidade, outro evoluiu com lesão renal e o último apresentou descompensação hepática e lesão renal.

O impacto da RVS nos momentos um e três anos pós-tratamento está representado na figura 4 por meio da evolução do *FIB-4* e dos parâmetros cujos resultados são utilizados para o seu cálculo.

Figura 4 – Análise do impacto da RVS em longo prazo por meio da evolução do *FIB-4* e dos parâmetros clínicos utilizados para o cálculo do escore.



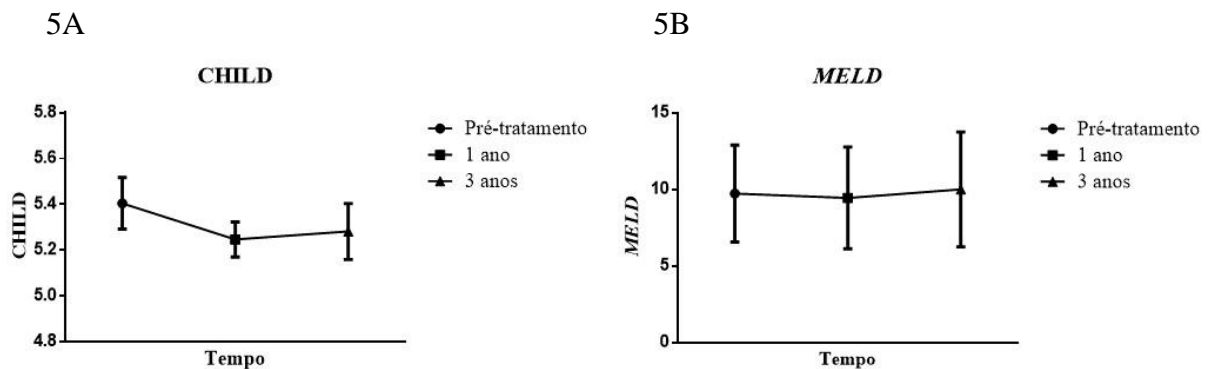


ALT: alanina aminotransferase. AST: aspartato aminotransferase. *FIB-4*: *Fibrosis-4*. RVS: resposta virológica sustentada.

* $p < 0,05$ (indica diferença estatisticamente significativa, em relação ao ponto pré-tratamento, pelo teste de ANOVA de medidas repetidas, com posterior análise por *post-hoc* Bonferroni).

A regressão linear evidenciou que indivíduos cirróticos apresentaram redução significativamente maior do *FIB-4* [$F(1,96) = 7,314$, $p = 0,008$; $R^2 = 0,062$]. A figura 5 representa o impacto da RVS nos momentos um e três anos pós-terapia, entre os indivíduos com CH no *baseline*, por meio das análises das evoluções de Child-Pugh e *MELD*.

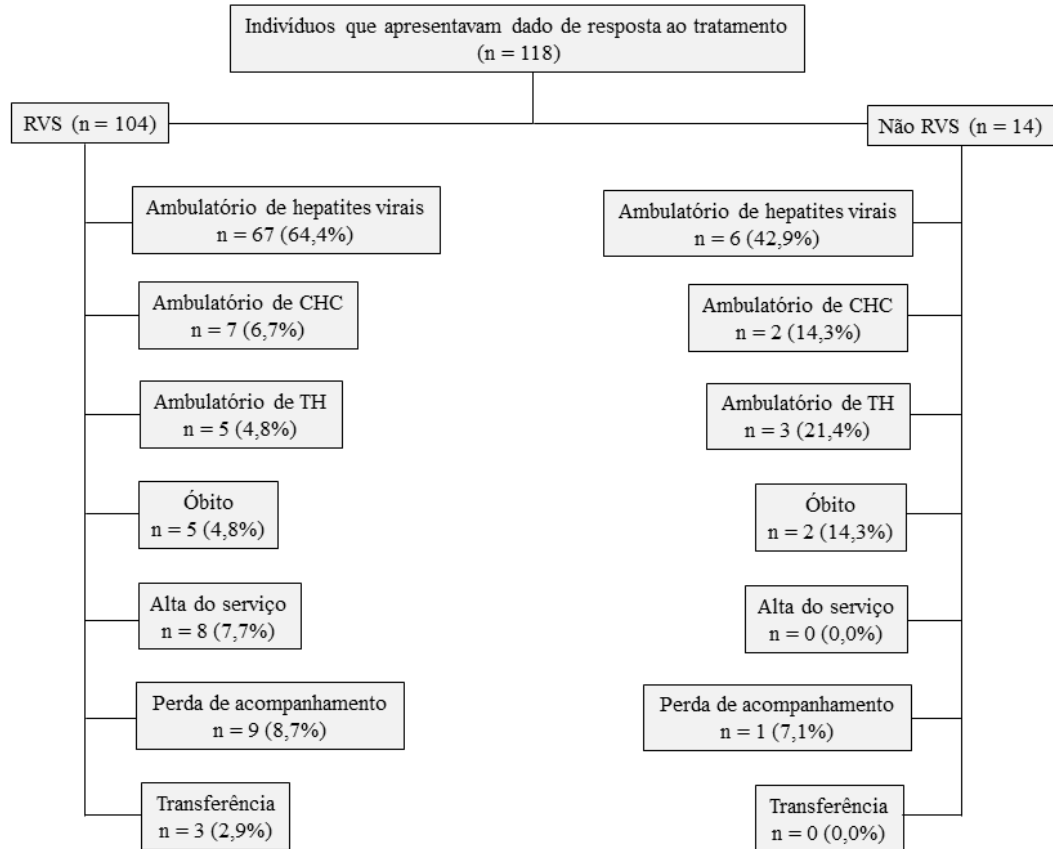
Figura 5 – Análise do impacto da RVS por meio da evolução dos escores de Child-Turcotte-Pugh e de *MELD* entre os indivíduos com CH.



Child: escore Child-Pugh-Turcotte. *MELD*: escore *Model for End-stage Liver Disease*. RVS: resposta virológica sustentada.

Os desfechos em longo prazo (três anos) de todos os pacientes que apresentavam dados de resposta ao tratamento estão representados na figura 6.

Figura 6 – Desfechos em longo prazo (três anos pós-tratamento) de todos os indivíduos incluídos no estudo.



CHC: carcinoma hepatocelular. TH: transplante hepático. RVS: resposta virológica sustentada.

Considerando os indivíduos que alcançaram RVS, sete foram encaminhados para acompanhamento no ambulatório de CHC, dos quais seis foram diagnosticados com câncer primário de fígado após o fim do tratamento medicamentoso. Esses receberam terapia alternativa ao transplante hepático. Entre aqueles que se encontravam em acompanhamento no ambulatório de transplante no 3º ano após o fim do tratamento, dois foram transplantados em decorrência de descompensação da doença hepática, um por CHC diagnosticado pré-tratamento, um por CHC diagnosticado após a terapia e o último apresentava história de CHC no *baseline*, com recidiva pós-tratamento. Sobre os óbitos, todos foram causados pela doença hepática. Entre esses, dois pacientes foram diagnosticados com CHC antes do tratamento, submetidos ao transplante de fígado após a terapia e morreram por complicações pós-transplante. Outros dois morreram pelo CHC diagnosticado após o tratamento, mas não foram submetidos a transplante. O último recebeu o diagnóstico de CHC durante o uso do regime

farmacológico para HCC, foi transplantado logo após o tratamento e faleceu nove meses após. Os indivíduos que receberam alta do serviço apresentavam fibrose leve ou moderada.

Com relação aos pacientes que não alcançaram RVS, seis permaneceram em acompanhamento no ambulatório de hepatites virais. Entre estes, apenas um havia sido retratado com sucesso até o 3º ano pós-falha ao tratamento estudado. Trata-se de um paciente que teve a terapia com SOF + PEG + RBV descontinuada por evento adverso e que foi retratado com DCV + SOF ± RBV. Nenhum outro teve acesso à terapia farmacológica alternativa para retratamento. Dois indivíduos foram encaminhados ao ambulatório de CHC e receberam tratamento alternativo ao transplante de fígado. Um desses foi diagnosticado com câncer de fígado pré-tratamento e o outro pós-tratamento. Outros três pacientes foram encaminhados ao ambulatório de transplante hepático e submetidos ao transplante por CHC diagnosticado pós-tratamento. Além disso, houve dois óbitos. Um apresentou a doença hepática como causa relatada, porém sem diagnóstico de CHC, e o segundo não apresentava causa da morte citada em prontuário.

Levando-se em conta apenas aqueles pacientes com RVS (n = 104), 10 indivíduos (9,6%) foram diagnosticados com CHC após a confirmação da resposta ao tratamento para a HCC. Entre os não respondedores (n = 14), 4 (28,6%) receberam diagnóstico de CHC após o fim da terapia. Todos os pacientes, com ou sem RVS, que evoluíram para CHC, transplante hepático ou óbito tinham CH.

5 DISCUSSÃO

A análise descritiva das variáveis clínicas referentes ao *baseline* mostrou alta prevalência de CH na população de estudo (76,9%). Este achado pode ser explicado pelos critérios de tratamento preconizados nos protocolos brasileiros publicados pelo Ministério da Saúde durante o período de inclusão dos pacientes. O PCDT de 2015 recomendava a prescrição de terapia farmacológica para indivíduos com HCC pelo genótipo 3, sem história de uso de DCV e/ou SOF, que apresentavam fibrose hepática avançada (METAVIR F3 ou F4). Pacientes com condições clínicas determinadas, tais como, coinfeção pelo HIV, MEHs, doença renal crônica, história de transplante de fígado ou outro órgão sólido, insuficiência hepática com ausência de CHC, doenças hematológicas malignas ou grau de fibrose hepática F2 demonstrado por biópsia hepática realizada há mais de três anos também poderiam ser tratados, independentemente do grau da fibrose hepática (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). O PCDT de 2017 manteve a recomendação de uso dos esquemas farmacológicos para virgens de tratamento com as DAAs estudadas que apresentavam fibrose hepática avançada ou condições clínicas específicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Apenas no ano de 2018, com a publicação de um novo PCDT, o tratamento para HCC passou a ser recomendado para todos os pacientes com esta condição, sem qualquer critério adicional quanto ao estadiamento da doença ou à condição clínica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Estas novas diretrizes representaram um avanço importante do cuidado aos pacientes com HCC no Brasil, uma vez que o tratamento precoce tem o potencial de prevenir a progressão da fibrose e da doença hepática, reduzir transmissão e diminuir custos ao sistema de saúde relacionados ao manejo de complicações da HCC.

A prevalência de DM2 na população de estudo (28,9%) foi cerca de três vezes maior do que as prevalências de DM na população geral adulta no Brasil e no mundo (IDF, 2021). Duas metanálises, publicadas em 2016 e 2019, analisaram a relação entre HCC por diferentes genótipos virais e DM2 e encontraram, respectivamente, prevalências de DM2 de 15% e 19% nos grupos com HCC (YOUNOSSI *et al.*, 2016, 2019). Evidenciou-se, em ambas, diferença estatisticamente relevante em relação aos dados referentes aos grupos controle sem infecção. As prevalências inferiores de DM2 entre os indivíduos com HCC nesses estudos em relação ao resultado do nosso trabalho pode ter relação com o perfil de pacientes que se refere ao genótipo viral. Há maior risco de DM2 em pessoas acometidas pelo genótipo 3 quando comparadas aos pacientes infectados por outros genótipos (AMPUERO; ROMERO-GÓMEZ; REDDY, 2014). A alta frequência de cirróticos pode também estar relacionada com a maior

prevalência de DM2. Há evidências de que CH seria um fator de risco adicional para DM2 entre aqueles indivíduos que têm HCC (HAMMERSTAD *et al.*, 2015). Conforme mencionado anteriormente, RI é um conhecido fator de risco para progressão da fibrose hepática e o DM2 se caracteriza por ser uma MEH da HCC. O HCV se replica nas células β do pâncreas, o que causa redução da reserva destas células. Em adição, por meio de suas proteínas estruturais e não estruturais, afeta vias de sinalização da insulina e inibe a expressão de receptores desse hormônio (MAZZARO *et al.*, 2021; SALAMA *et al.*, 2022).

Dados sobre obesidade na população geral do estudo evidenciaram prevalência de 29,8%, maior do que aquelas observadas no Brasil e globalmente. Estima-se que cerca de 22% e que aproximadamente 15% dos adultos tenham $IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$ no Brasil e no mundo, respectivamente (WHO, 2017b; WOF, 2022). Sabe-se que a obesidade é um fator de risco para a progressão da doença hepática (CHAUDHARI *et al.*, 2021; LESLIE *et al.*, 2022). Dessa forma, é plausível que a maior prevalência de pessoas obesas tenha alguma relação com a alta frequência de CH na população estudada. Em suma, os resultados encontrados de prevalência de DM2 e obesidade sugerem que estas condições, que fazem parte da síndrome metabólica, têm relação com a progressão da fibrose para CH.

Sobre o estudo das SARs, há dois métodos de análise genotípica que podem ser usados para a detecção de substituições nas proteínas *NS5A* e *NS5B*: o sequenciamento populacional (Sequenciamento Sanger) e o *deep sequencing* (sequenciamento de nova geração). Ambos, a partir da sequência de nucleotídeos do RNA do HCV, identificam a sequência de aminoácidos e inferem a presença de SARs. O *deep sequencing* é um método que detecta SARs em cepas mutantes pouco frequentes que representam cerca de 1% da população viral. Portanto, é um método de maior sensibilidade e seu uso está relacionado a um custo maior (AASLD; IDSA, 2022). Por sua vez, o método Sanger tem uma sensibilidade de detecção à partir de 10% (PAWLOTSKY, 2016). Para decisões clínicas, as SARs presentes em, ao menos, 15% da população viral são aquelas com potencial para reduzirem a chance dos indivíduos com HCC tratados com DAAs alcançarem a RVS (AASLD; IDSA, 2022). Portanto, o uso do método Sanger para a análise genotípica foi adequado, considerando o objetivo do estudo de analisar substituições de aminoácidos clinicamente relevantes. A respeito da amplificação dos genes, a eficiência acima de 90% para a *NS5A* foi similar àquela encontrada por Walker *et al.* (2017). Por outro lado, a eficiência de amplificação do gene *NS5B* foi inferior à encontrada pelos mesmos autores. O gene *NS5B*, que codifica a proteína *NS5B*, é maior que a região genômica *NS5A* (LI; LO, 2015). Em adição, pela necessidade de

análise de todo o gene, a amplificação da *NS5B* foi um processo mais complexo que envolveu a fragmentação da região. Isso justifica a menor eficiência encontrada.

A análise das SARs no *baseline* mostrou elevada frequência de substituições na posição 62 da *NS5A* (63,3% dos pacientes tratados com DCV apresentaram a SAR A62S e 24,1% apresentaram a A62T). O sítio 30 da mesma proteína apresentou uma frequência de 10,1% para a A30T/K e não foi detectada SAR na posição 93. Estes resultados de frequência de SARs no *baseline* estão de acordo a literatura. Dois estudos que analisaram as prevalências de mutações de resistência na *NS5A* no período pré-tratamento mostraram que substituições na posição 62 foram as mais frequentes. Em ambos, cerca de um terço dos indivíduos com HCC pelo genótipo 3 apresentavam SAR no sítio 62 (MCPHEE; HERNANDEZ; ZHOU, 2017; KYUREGYAN *et al.*, 2020). Em relação às SARs na posição 30, Rahimi *et al.* (2021), por meio de um estudo que envolveu a análise de prevalência de SARs de ocorrência natural na *NS5A*, encontraram uma frequência de 9,5% das substituições A30T/K no genótipo 3. Trabalho conduzido no Brasil por Santos *et al.* (2021) e o estudo realizado por McPhee, Hernandez e Zhou (2017), que incluíram apenas amostras de pacientes com doença crônica pelo genótipo 3, indicaram prevalências de 11,2% para a SAR A30K e de 10,3% para A30, respectivamente. Sobre a Y93H, a literatura está em consonância com os achados descritos ao mostrar que essa SAR não é, em geral, encontrada com alta frequência em pacientes com HCC pelo genótipo 3 virgens de tratamento com as DAAs (MCPHEE; HERNANDEZ; ZHOU, 2017; WELZEL *et al.*, 2017; BERTOLI *et al.*, 2018; KYUREGYAN *et al.*, 2020; RAHIMI *et al.* 2021). No estudo brasileiro supracitado, a Y93H foi identificada em apenas dois pacientes (1,2% do total de amostras amplificadas para a *NS5A*). Nos dois casos, identificou-se outras SARs concomitantemente (SANTOS *et al.*, 2021).

Considerando a *NS5B*, há evidências robustas sobre a menor frequência de SARs em relação à proteína *NS5A* (WELZEL *et al.*, 2017; MALANDRIS *et al.*, 2021). A S282T é a principal mutação potencialmente causadora de resistência ao SOF *in vitro* para todos os genótipos virais (SARRAZIN, 2016; SORBO *et al.*, 2018; YOUNAS *et al.*, 2022). Não foi encontrada nenhuma SAR na posição 282 à partir das análises pré-tratamento, o que corrobora os achados de outros trabalhos (BERTOLI *et al.*, 2018; RAHIMI *et al.* 2021; SANTOS *et al.*, 2021). Ao mesmo tempo em que a S282T causa resistência *in vitro*, o *fitness* viral das cepas virais que desenvolvem essa SAR é substancialmente reduzido em relação ao vírus selvagem (CENTO; CHEVALIEZ; PERNO, 2015; AASLD; IDSA, 2022).

Com relação ao total de pacientes em cada braço do estudo, houve uma diferença considerável entre o número de indivíduos que utilizaram o regime DCV + SOF ± RBV (n = 105) e aqueles que foram tratados com SOF + PEG + RBV (n = 15). O planejamento e o início do estudo ocorreram em um período de transição entre a exclusão da orientação de uso de esquemas que envolvem o PEG dos principais guidelines e o começo da era *interferon free*. Nesse período, recomendava-se o uso de SOF + PEG + RBV com base em ensaios clínicos que mostraram taxas de RVS próximas a 90% (FOSTER *et al.*, 2015; LAWITZ *et al.*, 2015). Conforme discutido previamente, a população do estudo tem uma alta frequência de pessoas com CH. Sabe-se que o uso de PEG está associado à elevada incidência de eventos adversos graves que, em muitos casos, causa descontinuidade e falha da terapia, especialmente em pacientes cirróticos (EASL, 2015). Em adição, 43,8% dos indivíduos incluídos no estudo apresentavam história de uso prévio de INF ou PEG. Nesse sentido, o maior número de indivíduos que utilizaram DCV + SOF ± RBV tem provável relação com um critério médico que considerou o melhor perfil de segurança.

A comparação das efetividades dos regimes terapêuticos entre os dois braços do estudo não evidenciou diferença estatisticamente significativa. Este resultado está de acordo com outros estudos que encontraram taxas de RVS similares para os dois regimes de tratamento estudados, incluindo trabalhos conduzidos em um contexto de vida real (NELSON *et al.*, 2015; FOSTER *et al.*, 2015; DALGARD *et al.*, 2017; WEHMEYER *et al.*, 2018; ZAREBSKA-MICHALUK *et al.*, 2018). Sobre o esquema SOF + PEG + RBV, a taxa de RVS de 100%, quando analisados apenas os pacientes que completaram a terapia medicamentosa, evidenciou que trata-se de um regime terapêutico efetivo para a HCC pelo genótipo 3, particularmente para pessoas cronicamente infectadas sem CH ou que apresentam CH compensada. Tal esquema tem o seu uso limitado pela segurança desfavorável. Todos os pacientes desse grupo que não alcançaram a RVS tiveram suas terapias descontinuadas por RAMs.

A análise da associação das variáveis clínicas e demográficas categorizadas com a RVS mostrou que indivíduos com CH têm um risco significativamente maior de não alcançarem a RVS, se considerados a população geral e o braço DCV + SOF ± RBV. A regressão logística binária corroborou os resultados e confirmou a força dessa associação. No grupo SOF + PEG + RBV, mostrou-se um risco 50% maior de não RVS entre os cirróticos (RR = 1,500). A não associação estatística tem provável relação com o n reduzido do grupo. Todos os pacientes incluídos no estudo, que não responderam ao tratamento, apresentavam

CH. Inúmeros trabalhos que incluíram pacientes com HCC pelo genótipo 3 também encontraram associação entre CH e não resposta à terapia antiviral com DAAs. O ALLY-3, um ensaio clínico de fase III, avaliou efetividade e segurança de DCV + SOF por 12 semanas em pessoas cronicamente infectadas pelo genótipo 3 e encontrou uma taxa de RVS de 96% entre aqueles sem CH e de 63% entre os cirróticos (NELSON *et al.*, 2015). Hézode *et al.* (2017) realizaram um estudo de vida real que analisou a efetividade do regime DCV + SOF ± RBV, indicado para uso por 24 semanas, em 333 pacientes com HCC pelo genótipo 3. Foi evidenciado que CH é um fator de risco para não RVS. Dois estudos multicêntricos europeus já citados, que estudaram a infecção pelo genótipo 3 e o impacto de diferentes esquemas farmacológicos, entre os quais DCV + SOF ± RBV por 12 ou 24 semanas e SOF + PEG + RBV por 12 semanas, mostraram taxas de RVS menores entre os cirróticos em relação àqueles sem CH (DALGARD *et al.*, 2017; ZAREBSKA-MICHALUK *et al.*, 2018). Outros trabalhos sugerem que o manejo de pacientes com CH cronicamente infectados pelo genótipo 3 são o maior desafio da era interferon *free* também quando são analisados outros DAAs cujo uso é atualmente recomendado pelos principais guidelines publicados (LLANERAS *et al.*, 2019; MARGUSINO-FRAMIÑÁN *et al.*, 2020).

História de uso prévio de INF/PEG + RBV foi outra variável que associou-se de forma significativa à não RVS pela análise da população geral, o que foi demonstrado pelo RR e IC 95%, além da regressão logística binária que mostrou associação independente. As análises de cada braço do estudo, especialmente do grupo DCV + SOF ± RBV, sugere essa relação, embora não tenha sido observada associação estatística. Por meio de um estudo de vida real, que incluiu cerca de 3000 pacientes com HCC pelo genótipo 3, Belperio *et al.* (2019) avaliaram a efetividade de DCV + SOF ± RBV e de VEL + SOF ± RBV e evidenciaram a associação entre história de terapia prévia com INF/PEG + RBV e não resposta ao tratamento com os esquemas envolvendo DAAs, em todos os subgrupos analisados. Resultados semelhantes foram encontrados por dois outros trabalhos de vida real. O primeiro incluiu apenas indivíduos com infecção crônica pelo genótipo 3 e encontrou relação entre a variável terapia prévia com INF/PEG e não RVS, especialmente entre os cirróticos (taxa de RVS de 90,9% entre os cirróticos não experimentados e de 81,8% entre aqueles com CH tratados previamente com INF/PEG) (SARWAR *et al.*, 2019). O segundo estudo analisou aproximadamente 16000 pacientes com HCC por diferentes tipos virais, incluindo o genótipo 3, tratados com diferentes regimes de tratamento, entre os quais SOF + PEG + RBV e SOF +

LDV + RBV. Uma das variáveis que impactou negativamente na taxa global de RVS foi a história de tratamento prévio com INF/PEG (DANIEL; SAEIAN; RIZVI, 2020).

Além da inclusão de pacientes ter sido iniciada com a publicação do primeiro protocolo brasileiro que recomendou o uso de DAAs a pessoas com HCC pelo genótipo 3 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015), observou-se poucos pacientes com falha aos DAAs para retratamento durante a condução do projeto, como consequência das altas taxas de RVS. Por último, as possibilidades de retratamento recomendadas nos PCDTs, publicados no período de estudo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015, 2017, 2018), eram escassas. Portanto, o pequeno número de pacientes experimentados com DAA na amostra impossibilitou a análise de associação entre a variável história de uso de DAA e RVS. Estudo multicêntrico de vida real realizado por Xie *et al.* (2022), que analisou fatores associados à não resposta a diferentes regimes de tratamento com DAAs, incluindo DCV, SOF e outros cujo uso é atualmente recomendado, encontraram que valores maiores de transaminases aumentaram o risco de não RVS em pacientes com HCC pelo genótipo 3. Embora não tenha sido constatada associação estatística, nossos resultados mostraram taxas de RVS cerca de 10% superiores entre os pacientes com valores menores de transaminases no *baseline* (inferiores a um valor que supera em três vezes o limite superior da normalidade), particularmente na população geral e no grupo DCV + SOF ± RBV.

Sobre a possível associação entre presença de mutação no *baseline* e resposta terapêutica, a análise do grupo DCV + SOF ± RBV evidenciou que SAR na NS5A previamente ao tratamento reduz significativamente a chance de cura virológica. Todos os indivíduos não respondedores tratados com DCV, que tiveram amostras de sangue coletadas e amplificadas, apresentaram, pelo menos, uma SAR na NS5A em cada uma das amostras analisadas (pré e pós-tratamento). Este achado está de acordo com a literatura que indica alta prevalência de SARs na NS5A em pacientes não respondedores a esquemas com inibidores dessa proteína (PETRUZZIELLO *et al.*, 2016; CECCHERINI-SILBERSTEIN *et al.*, 2018; SHARAFI; ALAVIAN, 2018). Este impacto seria maior em pacientes cirróticos com HCC pelo genótipo 3 (NELSON *et al.*, 2015; SHARAFI; ALAVIAN, 2018; BAGAGLIO *et al.*, 2019).

As SARs na NS5A são mais estáveis, ou seja, causam menor efeito sobre a capacidade replicativa do HCV. Por isso, em geral, variantes virais com SAR apenas nessa região têm um *fitness* viral mais próximo das cepas selvagens. Mutações na NS5A desenvolvidas pela pressão do tratamento podem persistir por anos e impactar na resposta ao retratamento de

pacientes com falha aos DAAs. Por outro lado, SARs na *NS5B* e na *NS3*, desenvolvidas sob tratamento, são menos persistentes e tendem a desaparecer em poucos meses (CENTO; CHEVALIEZ; PERNO, 2015; SORBO *et al.*, 2018; AASLD; IDSA, 2022). Ademais, inibidores da *NS5A* são parte de todos os regimes de tratamento recomendados nos principais guidelines (EASL, 2020; AASLD; IDSA, 2022; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023). Como consequência, as SARs na *NS5A* e as variantes virais que as possuem têm uma destacada relevância clínica. Segundo a *European Association for the Study of the Liver*, médicos que têm acesso a testes de resistência confiáveis no *baseline* devem levá-los em consideração no momento da decisão sobre a indicação da farmacoterapia, especialmente em regiões do mundo onde os esquemas que são menos impactados pelas SARs ainda não estão disponíveis (EASL, 2020).

Substituições no sítio 62 e a A30K, que foram as SARs mais comumente detectadas nas amostras coletadas no período pré-tratamento em pacientes tratados com DCV + SOF ± RBV, são citadas na literatura pelo seu potencial de reduzir o efeito farmacológico de diferentes inibidores da *NS5A* quando esses são indicados ao tratamento da doença crônica pelo tipo 3 do HCV (CECCHERINI-SILBERSTEIN *et al.*, 2018; EASL, 2020). Os resultados não mostraram associação entre a presença isolada da A62S no *baseline* e a não RVS. Entretanto, essa mutação foi observada no pós-tratamento em todos os indivíduos que não alcançaram RVS, apresentavam a A62S no pré-tratamento e cujas amostras foram amplificadas após a falha à terapia. Nesses pacientes, a SAR A62S foi detectada, sempre concomitantemente à SAR Y93H, após a pressão exercida pelo tratamento. Há evidências robustas de que a Y93H é a SAR mais relevante e que mais impacta negativamente nas taxas de RVS de pacientes com HCC acometidos por diferentes genótipos tratados com inibidores da *NS5A*. A SAR Y93H confere, considerando o genótipo 3, um *Fold-Change (FC) in vitro* de 2154 a 3733 para o DCV e de 724 para o VEL. Ressalta-se que as SARs que promovem um *FC* superior a 100 são aquelas relacionadas a um alto nível de resistência *in vivo* (HARRINGTON *et al.*, 2018; SORBO *et al.*, 2018). A ocorrência concomitante da A62S com a Y93H pode ser explicada por um possível efeito compensatório da primeira em relação à segunda no sentido de aumentar a capacidade replicativa e o *FC*. Estudos indicam que variantes que carregam a Y93H, sem efeito compensatório, apresentam *fitness* viral reduzido (KELLY *et al.*, 2017; JEONG *et al.*, 2018; ZHOU *et al.*, 2018).

Ainda sobre as substituições na posição 62 da *NS5A*, a SAR A62T, assim como a A62S, mostrou uma alta frequência entre os não respondedores, quando analisadas as

amostras do ponto pré-tratamento. Apesar da não associação estatística, os resultados indicaram um risco 20% maior de não resposta para os indivíduos que apresentavam a A62T no *baseline* (RR = 1,200). Também de forma similar à A62S, a A62T se manteve após a pressão do tratamento. Embora as SARs no sítio 62 não sejam citadas na literatura como mutações cuja presença afete de forma importante o *FC*, nossos achados sugerem que essas podem ter impacto nas taxas de RVS de terapias farmacológicas envolvendo o DCV e na dinâmica de seleção viral. Um paciente (caso 8, tabela 6) foi tratado com DCV + SOF + PEG + RBV, por 24 semanas, e não alcançou RVS. Este paciente apresentou apenas a A62T no pós-tratamento. Outro indivíduo não respondedor apresentou a A62T concomitantemente à Y93H. Estudo publicado por Campos *et al.* (2021) evidenciou que a SAR Y93H pode produzir um efeito de aumento da resistência quando associada a outras mutações na *NS5A*. McPhee, Hernandez e Zhou (2017) analisaram amostras de pacientes infectados pelo genótipo 3 tratados com DCV e encontraram que a presença da A62L com a Y93H aumentou em três vezes o *FC* em relação à presença da Y93H isolada. SARs associadas à falha da terapia viral com inibidores da *NS5A* são desenvolvidas durante a terapia, entretanto, a pressão seletiva imposta pelos DAAs pode alterar a população de *quasispecies* ao selecionar substituições que circulavam em menor frequência previamente ao tratamento ou no *baseline*. A pressão exercida pelo DCV, associada ao efeito compensatório das SARs no sítio 62, explicaria a emergência e detecção da Y93H no pós-tratamento.

O impacto negativo das SARs no sítio 30 da *NS5A* sobre a resposta à terapia farmacológica com DAAs em diferentes genótipos é conhecido e bem descrito (CENTO; CHEVALIEZ; PERNO, 2015; HARRINGTON *et al.*, 2018; SORBO *et al.*, 2018; EASL, 2020). A SAR A30K, presente em seis pacientes no *baseline*, confere um *FC* de 117 para o DCV e de 50 para VEL em relação ao genótipo 3 (CECCHERINI-SILBERSTEIN *et al.*, 2018; HARRINGTON *et al.*, 2018; AASLD; IDSA, 2022). *FC* entre 20 e 100 resulta em risco intermediário para resistência, indicando resistência possível (SORBO *et al.*, 2018). Em todos os pacientes que apresentaram a SAR A30K no *baseline*, houve detecção concomitante de uma mutação na posição 62 (três pacientes apresentaram a A30K e a A62S e em outros três identificou-se a A30K e a A62T). Destaca-se que, entre esses, apenas os pacientes que apresentaram A30K + A62T não responderam à terapia e que as duas SARs foram mantidas após a pressão do tratamento. Estes resultados sugerem um efeito compensatório entre a A62T e a A30K, o que não foi observado entre a A62S e a A30K, e reforça a possível relação da A62T com a falha ao tratamento. Presença concomitante de SARs no sítios 30 e 62 causam

um aumento da FC ao DCV para valores acima de 10000 para o genótipo 1a (SORBO *et al.*, 2018).

Outra SAR observada entre os não respondedores ao esquema de tratamento com DCV + SOF ± RBV foi a E92D. Essa substituição foi identificada com a A30K e a A62T que, conforme já discutido, foram detectadas em outros não respondedores que não apresentaram a mutação no sítio 92. Apesar de ser possível que a SAR E92D tenha sido um fator que contribuiu para a não resposta, a frequência reduzida desta mutação na amostra limita a análise sobre o seu impacto na resposta ao tratamento. A literatura sugere que SARs na posição 92 da *NS5A* teriam uma maior relevância quando presentes ao mesmo tempo que outras SARs em indivíduos com HCC por outros tipos virais (CECCHERINI-SILBERSTEIN *et al.*, 2018; SORBO *et al.*, 2018). Dados sobre a relação destas SARs com o genótipo 3 são escassos.

Embora o DCV tenha sido excluído dos guidelines que tratam do manejo da HCC em regiões mais desenvolvidas, esse medicamento permanece como opção ao tratamento da doença crônica pelo HCV, especialmente em países de renda média ou baixa a partir de apresentações genéricas de custo mais acessível (EASL, 2020; WHO, 2021a). Em adição, a resistência cruzada entre os inibidores da *NS5A* é uma característica da classe, portanto, o estudo de SARs na *NS5A* é relevante pelo possível impacto das mutações sobre a efetividade de outros fármacos de mecanismo de ação similar. Além do impacto das SARs, como, a Y93H e a A30K, sobre a resposta ao tratamento com o VEL, a identificação dessas SARs ao mesmo tempo em indivíduos com HCC pelo genótipo 1 ou genótipo 3 pode reduzir as taxas de RVS de regimes de tratamento envolvendo o PIB (KRISHNAN *et al.*, 2018; SORBO *et al.*, 2018).

Considerando a análise das SARs da *NS5B*, a L159F foi encontrada em um indivíduo não respondedor (paciente 2, tabela 4). Esta SAR pode conferir resistência contra o SOF por meio de sua relação estrutural com o resíduo S282, situado no sítio catalítico da RNA polimerase. É possível, por meio da visualização da estrutura terciária da *NS5B*, observar que as regiões L159 e S282 estão separadas por apenas quatro angstroms de distância. Supõe-se que há uma interação que levaria à alteração do sítio catalítico e a uma possível influência na atividade do SOF (TONG *et al.*, 2014; DONALDSON *et al.*, 2015).

Trabalhos de vida real indicaram que terapias mais longas (24 semanas) e prescrição de RBV poderiam amenizar o impacto das SARs em cirróticos (BELPERIO *et al.*, 2019; CHARATCHAROENWITTHAYA *et al.*, 2020). O guideline americano reconhece que a

RBV aumenta as chances de RVS em determinadas situações e recomenda o acréscimo de RBV ao esquema com VEL + SOF para indivíduos com HCC pelo genótipo 3, cujo teste prévio ao tratamento identifique a Y93H (AASLD; IDSA, 2022). Entretanto, não houve associação entre tempo de tratamento ou uso de RBV com a RVS no grupo DCV + SOF ± RBV, resultados que corroboram os achados de um estudo de vida real conduzido na Alemanha que encontrou uma taxa de RVS maior entre os indivíduos tratados com DCV + SOF em relação àqueles que utilizaram a terapia tripla (WEHMEYER *et al.*, 2018). Nesse mesmo estudo, não foi encontrada associação entre o tempo de tratamento (12 semanas x 24 semanas) e RVS entre os pacientes cirróticos tratados com DCV + SOF ± RBV ou LDV + SOF ± RBV. Resultados similares foram observados por Alonso *et al.* (2017) que, por meio de um estudo multicêntrico, também não encontraram associação entre o acréscimo de RBV a esquemas com DCV + SOF ou LDV + SOF e a RVS, tampouco entre tempo de tratamento (12 semanas x 24 semanas) e RVS. No braço DCV + SOF ± RBV da presente coorte, um único paciente não usou RBV e não alcançou RVS.

Conforme mencionado previamente, um paciente não respondedor (identificado como paciente 13 na tabela 6) apresentou as SARs A62T e Y93H na NS5A após o tratamento. Três anos após o fim da primeira terapia com DAAs, esse indivíduo foi submetido ao retratamento (paciente 14, tabela 6). O teste genético prévio ao segundo tratamento identificou apenas a mutação A62T. Este resultado evidencia que as variantes virais que carregavam a Y93H não se mantiveram entre as mais prevalentes três anos após o uso do primeiro regime terapêutico e sugere que a A62T é uma SAR com um *fitness* viral mais pronunciado em relação à Y93H.

Sobre a segurança dos esquemas de tratamento estudados, foi evidenciado que os indivíduos do braço SOF + PEG + RBV apresentaram maior risco de descontinuidade da terapia por evento adverso (83,3% dos pacientes cuja terapia farmacológica foi descontinuada estavam em uso de PEG) e incidência significativamente maior de RAMs hematológicas, de descompensação hepática, de eventos neuropsiquiátricos, de reações dermatológicas, perda de apetite, tosse seca e reações *flu-like*. Estudo de vida real que comparou efetividade e segurança dos esquemas DCV + SOF ± RBV e SOF + PEG + RBV encontrou maior incidência de descontinuidade de tratamento por evento adverso entre aqueles pacientes tratados com PEG (ZARĘBSKA-MICHALUK *et al.*, 2018). Ensaios clínicos pré-comercialização, que foram importantes para a aprovação de uso de SOF + PEG + RBV, também encontraram elevadas incidências de eventos, como, anemia, neutropenia, trombocitopenia, reações *flu-like*, irritabilidade, tosse e perda de apetite (incidências superiores a 10%) (FOSTER *et al.*,

2015; LAWITZ *et al.*, 2015). A respeito dos eventos neuropsiquiátricos e da descompensação da doença hepática, o uso de PEG + RBV é, inclusive, contraindicado se há diagnóstico prévio de quadros graves de depressão ou psicose, ou de doença hepática avançada (Child-Pugh C) (EASL, 2015). A conhecida relação entre a ocorrência de eventos adversos graves e o uso de INF/PEG era um dos maiores desafios das terapias baseadas nesses medicamentos e contribuiu decisivamente para os esforços que objetivaram a aprovação de novos fármacos.

Quando analisada a associação entre a indicação da RBV e a ocorrência de eventos adversos mais comuns no grupo DCV + SOF ± RBV, evidenciou-se uma incidência significativamente maior de anemia no subgrupo que utilizou RBV. Um estudo multicêntrico realizado na Itália, com pacientes cirróticos cronicamente infectados pelo genótipo 3, analisou os efeitos terapêuticos e a segurança de DCV + SOF ± RBV por 24 semanas. Foi mostrada maior incidência de eventos adversos no grupo que utilizou RBV, sendo anemia a RAM mais comum. Em um terço dos pacientes com anemia, foi necessária a redução da dose da RBV (LIONETTI *et al.*, 2019). O ajuste de dose da RBV é recomendado pelo PCDT de 2019. A redução deve ser considerada nos casos que evoluem com hemoglobina entre 8,5 e 10 g/dL e o medicamento deve ser descontinuado se observada queda da hemoglobina para valores inferiores a 8,5 g/dL (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Os resultados do nosso estudo evidenciaram que esquemas livres de PEG são mais seguros e que a presença de RBV aumenta as incidências de eventos adversos.

A análise dos desfechos em longo prazo, especialmente em populações que apresentam alta prevalência de indivíduos com fibrose hepática avançada é relevante, uma vez que o impacto da RVS na redução do risco para complicações, como, o desenvolvimento de CHC seria menor nesses indivíduos (OKANOUE *et al.*, 1999; SALAMA *et al.*, 2022). A manutenção do acompanhamento dos pacientes com fibrose hepática F3 ou com CH é recomendada por diferentes guidelines (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019; EASL, 2020). Para pacientes com doença avançada, sem CHC diagnosticado, deve ser mantido o rastreamento para CHC por meio de exames, como, o ultrassom de abdome, a cada seis meses. Além disso, para aqueles com CH, sugere-se rastreamento de hipertensão portal por meio de endoscopia digestiva alta para investigação da presença de varizes gastroesofágicas. O acompanhamento deve envolver ainda orientações sobre possível reinfecção e cuidados com o controle de outros fatores de risco para progressão da fibrose no fígado, tais como, sobrepeso, etilismo e RI (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

O impacto da RVS no acompanhamento em longo prazo foi analisado por meio da evolução das médias dos valores de *FIB-4*. Mostrou-se uma queda significativa dos valores entre o *baseline* e o ponto um ano pós-terapia, com posterior estabilização entre os momentos um ano pós e três anos pós-tratamento. A redução evidenciada tem relação com a eliminação do HCV como um fator de agressão ao fígado proporcionada pela RVS. A estabilização entre os pontos um ano e três anos pós-tratamento pode ser justificada pelo fato de não haver HCV-RNA presente nos dois momentos. Este resultado corrobora achados de estudos que analisaram o impacto da RVS pela evolução do escore *FIB-4*. Nakajima *et al.* (2022) também analisaram o *FIB-4* pós-RVS em pacientes com HCC e mostraram resultados similares no que se refere à queda importante entre o pré-tratamento e o ponto um ano pós-terapia, com posterior estabilização. Os mesmos autores evidenciaram que a queda do *FIB-4* ocorreu às custas das reduções dos valores de AST e ALT dos pacientes com cura virológica, resultados que também estão de acordo com o nosso trabalho. Outro estudo, que comparou o *FIB-4* antes e 12 semanas após o tratamento em indivíduos com HCC pelo genótipo 1 tratados com DAAs, encontrou resultados similares, ou seja, redução de *FIB-4* associada à importante redução das transaminases (MELENDEZ-MENA *et al.*, 2021). Por sua vez, Kwan *et al.* (2023) evidenciaram melhora relevante dos escores *FIB-4* e *APRI* pela comparação dos valores do ponto 12 semanas pós-tratamento com o *baseline*. Nesse estudo, foram incluídos pacientes infectados por diferentes genótipos tratados com PIB e GLE. A melhora das aminotransferases reflete a melhora da inflamação no fígado (VAN DER MEER; BERENQUER, 2016; NAKAGAWA *et al.*, 2023). Por fim, evidenciou-se que pacientes com CH apresentam uma melhora mais importante do *FIB-4* em relação aos não cirróticos. Esse resultado justifica-se pelo maior efeito da redução das aminotransferases sobre valores mais elevados de *FIB-4* que têm uma margem maior para queda. Valores mais altos do escore ($\geq 3,25$) caracterizam estágio de fibrose hepática F3 ou F4.

Regressão da fibrose e melhora da gravidade da doença hepática podem ser observadas, após a RVS, a partir de qualquer estágio de fibrose hepática. Se analisados indivíduos cirróticos, as evoluções dos escores de Child-Turcotte-Pugh e *MELD* são parâmetros que indicariam essa melhora (VAN DER MEER; BERENQUER; 2016). Não foram evidenciados impactos importantes sobre tais parâmetros, o que tem provável relação com o perfil da população de estudo. Cerca de 82% dos pacientes com CH apresentavam doença compensada no *baseline* (Child-Pugh A, escore 5 ou 6). Em relação ao *MELD*, mais de 90% dos cirróticos encontravam-se nos dois estágios de menor gravidade.

Sobre a análise dos desfechos três anos após o tratamento, aproximadamente 10% dos pacientes com RVS foram diagnosticados com CHC após a terapia medicamentosa. Entre os indivíduos tratados que não alcançaram RVS, a incidência de diagnóstico de CHC pós-tratamento foi três vezes maior. Tais resultados sugerem que a RVS reduz o risco de CHC entre os pacientes com HCC acometidos pelo genótipo 3. A incidência de CHC de cerca de 10% em três anos no grupo que alcançou cura virológica e os resultados que mostraram que todos os pacientes do estudo que evoluíram para CHC, transplante hepático ou óbito após o tratamento apresentavam CH no *baseline* corroboram dados de estudos que referem que há um risco importante de CHC em cirróticos, mesmo após a RVS (OKANOUE *et al.*, 1999; SALAMA *et al.*, 2022), e a recomendação de manutenção de acompanhamento de pacientes curados, que têm fibrose avançada, em centros especializados no manejo de doenças hepáticas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019; EASL, 2020). Ainda sobre os desfechos de longo prazo, somente um paciente, do total de seis que falharam ao tratamento e que permaneceram em acompanhamento no ambulatório de hepatites virais, foi retratado com sucesso, o que evidencia a escassez de opções para retratamento de indivíduos com falha a terapias com DAAs durante a condução do estudo. Conforme discussão prévia, os PCDTs publicados a partir de 2018 trouxeram importantes avanços ao permitirem tratamento mais precoce, independente do estágio da fibrose hepática, e ao recomendarem esquemas farmacológicos específicos para o retratamento de pacientes experimentados com DAAs (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018, 2019, 2023).

O estudo apresentou limitações. Uma dessas limitações se refere ao tamanho amostral que inviabilizou ou limitou a robustez de algumas análises de associação, considerando a população geral e, especialmente, os subgrupos. Por se tratar de um estudo de vida real conduzido no contexto do SUS, a seleção de pacientes e a indicação dos regimes de tratamento foram condicionadas pelos PCDTs publicados pelo Ministério da Saúde durante a realização do trabalho. Não foram coletadas ou amplificadas amostras de sangue para a análise da associação das SARs com a resposta ao tratamento de todos os pacientes em todos os momentos definidos na metodologia.

6 CONCLUSÃO

Considerando a população incluída no estudo, os esquemas de tratamento com os novos DAAs estudados foram mais efetivos em relação às terapias baseadas em INF/PEG previamente disponibilizadas para o tratamento da HCC pelo genótipo 3, sendo o esquema DCV + SOF ± RBV mais seguro quando comparado a SOF + PEG + RBV. As variáveis clínicas CH e presença de SARs na proteína viral *NS5A* foram fatores associados a menor chance de RVS ao tratamento de indivíduos com HCC pelo genótipo 3 tratados com DCV + SOF ± RBV. A análise do comportamento do vírus da hepatite C sob pressão da terapia farmacológica com DCV e SOF mostrou que as SARs, particularmente aquelas detectadas no sítio 62 da *NS5A*, a A30K e a Y93H, podem impactar na resposta, especialmente quando presentes de forma concomitante, por um provável mecanismo compensatório. A identificação do genótipo viral e o estudo das mutações de resistência são estratégias que devem ser consideradas em regiões onde o tratamento envolve inibidores da *NS5A* de primeira geração, como, o DCV ou quando pretende-se tratar pacientes com reconhecida menor chance de RVS, como aqueles infectados pelo genótipo 3 que apresentam CH. Por último, os dados do presente estudo ratificam que, embora a RVS tenha um impacto importante para a redução da inflamação do fígado e da incidência de desfechos desfavoráveis, como, o CHC, a manutenção do acompanhamento de pacientes com fibrose hepática avançada em centros especializados, após a cura virológica, é uma conduta fundamental no sentido de oferecer diagnóstico e manejo adequados de eventuais complicações da doença hepática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBECKA, A. *et al.* Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. **Hepatology**, Baltimore, v. 55, n. 4, p. 998-1007, Abr. 2012.

ALONSO, S. *et al.* Effectiveness and safety of sofosbuvir-based regimens plus an NS5A inhibitor for patients with HCV genotype 3 infection and cirrhosis. Results of a multicenter real-life cohort. **Journal of viral hepatitis**, Oxford, v. 24, n. 4, p. 304-311, Abr. 2017.

AMERICAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER DISEASE (AASLD). An Update on Treatment of Genotype 1 Chronic Hepatitis C Virus Infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, Baltimore, v. 54, n. 4, p. 1433-1444, Out. 2011.

AMERICAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER DISEASE (AASLD); INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA (IDSA). **HCV Guidance: Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C**. Alexandria: AASLD, 2022. 73 p.

AMPUERO, J.; ROMERO-GÓMEZ, M.; REDDY, K.R. Review article: HCV genotype 3 – the new treatment challenge. **Alimentary pharmacology and therapeutics**, Oxford, v. 39, n. 7, p. 686-698, Abr. 2014.

ASCIONE, A. *et al.* Boceprevir or telaprevir in hepatitis C virus chronic infection: The Italian real life experience. **World journal of hepatology**, Beijing, v. 8, n. 22, p. 949-956, Ago. 2016.

BACON, B.R. *et al.* HCV RESPOND-2 Investigators. Boceprevir for Previously Treated Chronic HCV Genotype 1 Infection. **The New England journal of medicine**, Boston, v. 364, n. 13, p. 1207-1217, Mar. 2011.

BAGAGLIO, S. *et al.* Geographic Distribution of HCV-GT3 Subtypes and Naturally Occurring Resistance Associated Substitutions. **Viruses**, Basel, v. 11, n. 2, p. 148, Fev. 2019. doi: 10.3390/v11020148.

BARTENSCHLAGER, R. *et al.* Assembly of infectious hepatitis C virus particles. **Trends in microbiology**, Cambridge, v. 19, n. 2, p. 95-113, Fev. 2011.

BATALLER, R.; BRENNER, D.A. Liver fibrosis. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v. 115, n. 2, p. 209-218, Fev. 2005.

BEDOSSA, P. Presentation of a grid for computer analysis for compilation of histopathologic lesions in chronic viral hepatitis C. Cooperative study of the METAVIR group. **Annales de pathologie**, Paris, v. 13, n. 4, p. 260-265, 1993.

BEESON, P.B. The growth of knowledge about a disease: hepatitis. **The American journal of medicine**, New York, v. 67, n. 3, p. 366-370, Set. 1979.

BELPERIO, P.S. *et al.* Real-world effectiveness of daclatasvir plus sofosbuvir and velpatasvir/sofosbuvir in hepatitis C genotype 2 and 3. **Journal of hepatology**, Amsterdam, v. 70, n. 1, p. 15-23, Jan. 2019.

BENZAKEN, A.S. *et al.* Hepatitis C disease burden and strategies for elimination by 2030 in Brazil. A mathematical modeling approach. **The Brazilian journal of infectious diseases**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 3, p. 182-190, Mai-Jun. 2019.

BENOVA, L. *et al.* Vertical transmission of hepatitis C virus: systematic review and meta-analysis. **Clinical infectious diseases**, Chicago, v. 59, n. 6, p. 765-773, Set. 2014.

BERTOLETTI, A.; FERRARI, C. Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection. **Hepatology**, Baltimore, v. 38, n. 1, p. 4-13, Jul. 2003.

BERTOLI, A. *et al.* Prevalence of Single and Multiple Natural NS3, NS5A and NS5B Resistance-Associated Substitutions in Hepatitis C Virus Genotypes 1-4 in Italy. **Scientific reports**, London, v. 8, n. 1, p. 8988, Jun. 2018. doi: 10.1038/s41598-018-26862-y.

BIGGINS, S.W. *et al.* Evidence-based incorporation of serum sodium concentration into MELD. **Gastroenterology**, v. 130, n. 6, p. 1652-1660, Mai. 2006.

BISSELL, D.M. Sex and hepatic fibrosis. **Hepatology**, Baltimore, v. 29, n. 3, p. 988-989, Mar. 1999.

BITTAR, C. *et al.* On hepatitis C virus evolution: the interaction between virus and host towards treatment outcome. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 4, Abr. 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0062393.

BLACH, S. *et al.* Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. **The lancet. Gastroenterology & hepatology**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 161-176, Mar. 2017.

BLUMBERG, B.S.; ALTER, H.J.; VISNICH, S. A "New" Antigen in Leukemia Sera. **JAMA**, Chicago, v. 191, p. 541-546, Fev. 1965.

BLUMBERG, B.S. Australia antigen and the biology of hepatitis B. **Science**, New York, v. 197, n. 4298, p. 17-25, Jul. 1977.

BOCHUD, P.Y. *et al.* Genotype 3 is associated with accelerated fibrosis progression in chronic hepatitis C. **Journal of hepatology**, Amsterdam, v. 51, n. 4, p. 655-666, Out. 2009.

BOWEN, D.G.; WALKER, C.M. The origin of quasispecies: cause or consequence of chronic hepatitis C viral infection? **Journal of hepatology**, Amsterdam, v. 42, n. 3, p. 408-417, Mar. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria N° 1.160, de 29 de maio de 2006. Modifica os critérios de distribuição de fígado de doadores cadáveres para transplante, implantando o critério de gravidade de estado clínico do paciente. **Diário Oficial da União**: Brasília, 2006.

BURSTOW, N.J. *et al.* Hepatitis C treatment: where are we now? **International journal of general medicine**, Auckland, v. 10, p. 39-52, Fev. 2017.

CAMPOS, G.R.F. *et al.* A novel substitution in NS5A enhances resistance of hepatitis C virus genotype 3 to daclatasvir. **The Journal of general virology**, London, v. 102, n. 3, Mar. 2021. doi: 10.1099/jgv.0.001582.

CARDOSO, M.N. **Projeto Ajude – Brasil II: Incidência de AIDS e mortalidade em usuários de drogas injetáveis**. 2005. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Medicina, Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

CARTER, W.; CONNELLY, S.; STRUBLE, K. Reinventing HCV Treatment: Past and Future Perspectives. **Journal of clinical pharmacology**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 287-296, Mar. 2017.

CECCHERINI-SILBERSTEIN, F. *et al.* Viral resistance in HCV infection. **Current opinion in virology**, Amsterdam, v. 32, p. 115-127, Out. 2018.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Alcohol and Public Health**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/alcohol/faqs.htm#heavyDrinking>. Acesso em 05 fev. 2023.

CENTO, V.; CHEVALIEZ, S.; PERNO, C.F. Resistance to direct-acting antiviral agents: clinical utility and significance. **Current Opinion in HIV and AIDS**, Hagerstown, v. 10, n. 5, p. 381-389, Set. 2015.

CHAN, D.P. *et al.* Sexually acquired hepatitis C virus infection: a review. **International journal of infectious diseases**, Hamilton, v. 49, p. 47-58, Ago. 2016.

CHARATCHAROENWITTHAYA, P. *et al.* Real-world effectiveness and safety of sofosbuvir and nonstructural protein 5A inhibitors for chronic hepatitis C genotype 1, 2, 3, 4, or 6: a multicentre cohort study. **BMC gastroenterology**, London, v. 20, n. 1, p. 47, Mar. 2020. doi: 10.1186/s12876-020-01196-0.

CHAUDHARI, R. *et al.* Metabolic complications of hepatitis C virus infection. **World journal of gastroenterology**, Beijing, v. 27, n. 13, p. 1267-1282, Abr. 2021.

CHEVALIEZ, S.; PAWLOTSKY, J.M. Virology of hepatitis C virus infection. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, Amsterdam, v. 26, n. 4, p. 381-389, Ago. 2012.

CHILD, C.; TURCOTTE, J. Surgery and portal hypertension. **Major problems in clinical surgery**, Philadelphia, v. 1, p. 1-85, 1964.

CHOO, Q.L. *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, New York, v. 244, n. 4902, p. 359-362, Abr. 1989.

COX, A.L. *et al.* Prospective evaluation of community-acquired acute-phase hepatitis C virus infection. **Clinical infectious diseases**, Chicago, v. 40, n. 7, p. 951-958, Abr. 2005.

DALGARD, O. *et al.* Sofosbuvir based treatment of chronic hepatitis C genotype 3 infections-A Scandinavian real-life study. *PLoS One*, San Francisco, v. 12, n. 7, Jul 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0179764.

DANE, D.S.; CAMERON, C.H.; BRIGGS, M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. **Lancet**, London, v. 1, n. 7649, p. 695-698, Abr. 1970.

DANIEL, K.E.; SAEIAN, K.; RIZVI, S. Real-world experiences with direct-acting antiviral agents for chronic hepatitis C treatment. **Journal of viral hepatitis**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 195-204, Fev. 2020.

DAVIS, G.L. Hepatitis C virus genotypes and quasispecies. **The American journal of medicine**, New York, v. 107, n. 6B, p. 21S-26S, Dez. 1999.

DE FRANCHIS, R. Expanding consensus in portal hypertension. Report of the Baveno VI Consensus Workshop: Stratifying risk and individualizing care for portal hypertension. **Journal of hepatology**, Amsterdam, v. 63, n. 3, p. 743-752, Set. 2015.

DETERDING, K. *et al.* The German Hep-Net acute hepatitis C cohort: impact of viral and host factors on the initial presentation of acute hepatitis C virus infection. **Zeitschrift für Gastroenterologie**, München, v. 47, n. 6, p. 531-540, Jun. 2009.

DONALDSON, E.F. *et al.* Clinical evidence and bioinformatics characterization of potential hepatitis C virus resistance pathways for sofosbuvir. **Hepatology**, Baltimore, v. 61, n. 1, p. 56-65, Jan. 2015.

DOMINGO, E.; HOLLAND, J.J. RNA virus mutations and fitness for survival. **Annual review of microbiology**, Palo Alto, v. 51, p. 151-178, 1997.

ELGRETLI, W. *et al.* Hepatitis C Virus-Lipid Interplay: Pathogenesis and Clinical Impact. **Biomedicines**, Basel, v. 11, n. 2, p. 271, Jan. 2023. doi: 10.3390/biomedicines11020271.

EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER (EASL). Hepatitis C virus replication cycle. **Journal of hepatology**, Amsterdam, v. 53, n. 3, p. 583-585, Set. 2010.

EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER (EASL). EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015. **Journal of hepatology**, Amsterdam, v. 63, n. 1, p. 199-236, Jul. 2015.

EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER (EASL). EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016. **Journal of hepatology**, Amsterdam, v. 66, n. 1, p. 153-194, Jan. 2017.

EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER (EASL). EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C: Final update of the series. **Journal of hepatology**, Amsterdam, v. 73, n. 5, p. 1170-1218, Nov. 2020.

FATTOVICH, G. *et al.* Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. **Gut**, London, v. 46, n. 3, p. 420-426, Mar. 2000.

FEINSTONE, S.M.; KAPIKIAN, A.Z.; PURCELL, R.H. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. **Science**, New York, v. 182, n. 4116, p. 1026-1028, Dez. 1973.

FÉNÉANT, L.; LEVY, S.; COCQUEREL, L. CD81 and Hepatitis C Virus (HCV) Infection. **Viruses**, Basel, v. 6, n. 2, p. 535-572, Fev. 2014.

FONSECA, J.C.F. Histórico das hepatites virais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 43, n. 3, p. 322-330, Mai./Jun. 2010.

FORNS, X.; BUKH, J. The molecular biology of hepatitis C virus. Genotypes and quasispecies. **Clinics in liver disease**, Philadelphia, v. 3, n. 4, p. 693-716, Nov. 1999.

FOSTER, G.R. *et al.* Efficacy of sofosbuvir plus ribavirin with or without peginterferon-alfa in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection and treatment-experienced patients with cirrhosis and hepatitis C virus genotype 2 infection. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 149, n. 6, p. 1462-1470, Nov. 2015.

FREEDMAN, H. *et al.* Structure and Function of the Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins E1 and E2: Antiviral and Vaccine Targets. **ACS infectious diseases**, Washington, DC, v. 2, n. 11, p. 749-762, Nov. 2016.

GAGGINI, M.C.R. *et al.* Correlation between METAVIR scores and Raman spectroscopy in liver lesions induced by hepatitis C virus: a preliminary study. **Lasers in medical science**, London, v. 30, n. 4, p. 1347-1355, Mai. 2015.

GILL, K. *et al.* Hepatitis C virus as a systemic disease: reaching beyond the liver. **Hepatology international**, New York, v. 10, n. 3, p. 415-423, Mai. 2016.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic acids symposium series**, London, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAJARIZADEH, B.; GREBELY, J.; DORE, G.J. Epidemiology and natural history of HCV infection. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, London, v. 10, n. 9, p. 553-562, Set. 2013.

HAMMERSTAD, S.S. *et al.* Diabetes and Hepatitis C: A Two-Way Association. **Frontiers in endocrinology**, Lausanne, v. 6, p. 134, Set. 2015. doi: 10.3389/fendo.2015.00134.

HARRINGTON, P.R. *et al.* Impact of hepatitis C virus polymorphisms on direct-acting antiviral treatment efficacy: Regulatory analyses and perspectives. **Hepatology**, Baltimore, v. 67, n. 6, p. 2430-2448, Jun. 2018.

HÉZODE, C. *et al.* Daclatasvir plus sofosbuvir, with or without ribavirin, for hepatitis C virus genotype 3 in a French early access programme. **Liver international**, Oxford, v. 37, n. 9, p. 1314-1324, Set. 2017.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). **IDF Diabetes Atlas**. 10th ed. Brussels: IDF, 2021. 135 p. ISBN: 978-2-930229-98-0.

JACOBSON, I.M. *et al.* ADVANCE Study Team. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. **The New England journal of medicine**, Boston, v. 364, n. 25, p. 2405-2416, Jun. 2011.

JEONG, Y. *et al.* Evolution and persistence of resistance-associated substitutions of hepatitis C virus after direct-acting antiviral treatment failures. **Journal of viral hepatitis**, Oxford, v. 25, n. 11, p. 1251-1259, Nov. 2018.

KANWAL, F. *et al.* HCV genotype 3 is associated with an increased risk of cirrhosis and hepatocellular cancer in a national sample of U.S. Veterans with HCV. **Hepatology**, Baltimore, v. 60, n. 1, p. 98-105, Jul. 2014.

KATTAKUZHAY, S. *et al.* Hepatitis C genotype 3 disease. **Hepatology international**, New York, v. 10, n. 6, p. 861-870, Nov. 2016.

KELLY, L. *et al.* Manipulation of both virus- and cell-specific factors is required for robust transient replication of a hepatitis C virus genotype 3a sub-genomic replicon. **The Journal of general virology**, London, v. 98, n. 10, p. 2495-2506, Oct. 2017.

KIDNEY DISEASE: IMPROVING GLOBAL OUTCOMES (KDIGO). KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. **Kidney international. Supplement**, Malden, v. 3, n. 1, p. 1-150, 2013.

KRISHNAN, P. *et al.* Pooled Resistance Analysis in Patients with Hepatitis C Virus Genotype 1 to 6 Infection Treated with Glecaprevir-Pibrentasvir in Phase 2 and 3 Clinical Trials. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 62, n. 10, Oct. 2018. doi: 10.1128/AAC.01249-18.

KUMAR, A. *et al.* Regions of hepatitis C virus E2 required for membrane association. **Nature communications**, London, v. 14, n. 1, p.433, Jan. 2023. doi: 10.1038/s41467-023-36183-y.

KWAN, B.S. *et al.* Efficacy and safety of glecaprevir/pibrentasvir treatment in Koreans with chronic hepatitis C: A retrospective study. **Arab journal of gastroenterology**, Cairo, Jan. 2023. doi: 10.1016/j.ajg.2023.01.006.

KYUREGYAN, K.K. *et al.* Factors Influencing the Prevalence of Resistance-Associated Substitutions in NS5A Protein in Treatment-Naive Patients with Chronic Hepatitis C. **Biomedicines**, Basel, v. 8, n. 4, p.80, Apr. 2020. doi: 10.3390/biomedicines8040080.

LAWITZ, E. *et al.* Sofosbuvir in combination with peginterferon alfa-2a and ribavirin for non-cirrhotic, treatment-naive patients with genotypes 1, 2, and 3 hepatitis C infection: a randomised, double-blind, phase 2 trial. **The Lancet. Infectious diseases**, New York, v. 13, n. 5, p. 401-408, May. 2013.

LAWITZ, E. *et al.* Sofosbuvir with peginterferon-ribavirin for 12 weeks in previously treated patients with hepatitis C genotype 2 or 3 and cirrhosis. **Hepatology**, Baltimore, v. 61, n. 3, p. 769-775, Mar. 2015.

LEANDRO, G. *et al.* Relationship between steatosis, inflammation, and fibrosis in chronic hepatitis C: a meta-analysis of individual patient data. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 130, n. 6, p. 1636-1642, Mai. 2006.

LESLIE, J. *et al.* Metabolic dysfunction and cancer in HCV: Shared pathways and mutual interactions. **Journal of hepatology**, v. 77, n. 1, Jul. 2022.

LI, H.C.; LO, S.Y. Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and treatment. **World journal of hepatology**, Beijing, v. 7, n. 10, p. 1377-1389, Jun. 2015.

LIM, T.R.; TAN, B.H.; MUTIMER, D.J. Evolution and emergence of a new era of antiviral treatment for chronic hepatitis C infection. **International journal of antimicrobial agents**, Amsterdam, v. 43, n. 1, p. 17-25, Jan. 2014.

LIONETTI, R. *et al.* Daclatasvir, sofosbuvir with or without ribavirin for 24 weeks in hepatitis C genotype 3 cirrhosis: A real-life study. **Annals of hepatology**, México, v. 18, n. 3, p. 434-438, Mai. 2019.

LLANERAS, J. *et al.* Effectiveness and safety of sofosbuvir/velpatasvir/voxilaprevir in patients with chronic hepatitis C previously treated with DAAs. **Journal of hepatology**, Amsterdam, v. 71, n. 4, p. 666-672, Out. 2019.

LOK, A.S. *et al.* Incidence of hepatocellular carcinoma and associated risk factors in hepatitis C-related advanced liver disease. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 136, n. 1, p. 138-148, Jan. 2009.

LOOMBA, R. *et al.* The natural history of acute hepatitis C: clinical presentation, laboratory findings and treatment outcomes. **Alimentary pharmacology and therapeutics**, Oxford, v. 33, n. 5, p. 559-565, Mar. 2011.

LUCENA, M.I. *et al.* Multicenter hospital study on prescribing patterns for prophylaxis and treatment of complications of cirrhosis. **European journal of clinical pharmacology**, Berlin, v. 58, n. 6, p. 435-440, Set. 2002.

LUCEY, M.R. Alcohol-Associated Cirrhosis. **Clinics in liver disease**, Philadelphia, v. 23, n. 1, p. 115-126, Fev. 2019.

MAASOUMY, B.; WEDEMEYER, H. Natural history of acute and chronic hepatitis C. **Best practice & research. Clinical gastroenterology**, Amsterdam, v. 26, n. 4, p. 401-412, Ago. 2012.

MALANDRIS, K. *et al.* The Role of RASs /RVs in the Current Management of HCV. **Viruses**, Basel, v. 13, n. 10, p. 2096, Out. 2021. doi: 10.3390/v13102096.

MARGUSINO-FRAMIÑÁN, L. *et al.* Effectiveness and safety of sofosbuvir/velpatasvir ± ribavirin vs glecaprevir/pibrentasvir in genotype 3 hepatitis C virus infected patients. **European journal of hospital pharmacy**, London, v. 27, n. e1, p. e41-e47, Mar. 2020.

MARTINELLI, A.C.L. Hipertensão Portal. **Medicina. Ribeirão Preto**, Ribeirão Preto, v. 37, p. 253-261, Dez. 2004.

MARTINEZ, M.A.; FRANCO, S. Therapy Implications of Hepatitis C Virus Genetic Diversity. **Viruses**, Basel, v. 13, n. 1, p. 41, Jan. 2021. doi: 10.3390/v13010041.

MAZZARO, C. *et al.* A Review on Extrahepatic Manifestations of Chronic Hepatitis C Virus Infection and the Impact of Direct-Acting Antiviral Therapy. **Viruses**, Basel, v. 13, n. 11, p. 2249, Nov. 2021. doi: 10.3390/v13112249.

MCHUTCHISON, J.G. *et al.* Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. **The New England journal of medicine**, Boston, v. 339, n. 21, p. 1485-1492, Nov. 1998.

MCPHEE, F.; HERNANDEZ, D.; ZHOU, N. Effect of minor populations of NS5A and NS5B resistance-associated variants on HCV genotype-3 response to daclatasvir plus sofosbuvir, with or without ribavirin. **Antiviral therapy**, London, v. 22, n. 3, p. 237-246, 2017.

MELENDEZ-MENA, D. *et al.* Effectiveness, tolerability and safety of Direct Acting Antivirals in Mexican individuals with Hepatitis C virus genotype-1 and previous pegylated interferon and ribavirin therapy. **PeerJ**, Corte Madera, v. 9. Set. 2021. doi: 10.7717/peerj.12051.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Departamento Nacional de Endemias Rurais. **História da Febre-Amarela no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 1969. 208 p.

MINISTERIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. **Procolocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções: manejo do paciente infectado cronicamente pelo genótipo 1 do HCV e fibrose avançada**. Suplemento 1. Brasília: MS, 2013. 52 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções**. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 101 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/AIDS e das Hepatites Virais. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 138 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/AIDS e das Hepatites Virais. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções**. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. 89 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/AIDS e das Hepatites Virais. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções**. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. 68 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico – Hepatites Virais 2022**. Brasília: Ministério da Saúde, 2022. 79 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de HIV/AIDS, Tuberculose, Hepatites Virais e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Nota Técnica N° 30** - estabelece os esquemas terapêuticos disponíveis para o tratamento da hepatite C no âmbito do SUS. Brasília: Ministério da Saúde, 2023. 3 p.

MIZOKAMI, M. *et al.* Interferon-alpha therapy exerts selective pressure on hepatitis C virus quasispecies equilibrium. **Antiviral therapy**, London, v. 4, n. 1, p. 15-19, 1999.

MORADPOUR, D.; PENIN, F.; RICE, C.M. Replication of hepatitis C virus. **Nature reviews. Microbiology**, London, v. 5, n. 6, p. 453-463, Jun. 2007.

MULLER, K. *et al.* Single centre experience with pegylated interferon and ribavirin for hepatitis C: looking back before moving forward. **Internal medicine journal**, Carlton, v. 42, n. 7, p. 765-772, Jul. 2012.

NAKAGAWA, M. *et al.* Impact of eradication of hepatitis C virus on liver-related and -unrelated diseases: morbidity and mortality of chronic hepatitis C after SVR. **Journal of gastroenterology**, Tokyo, Fev. 2023. doi: 10.1007/s00535-023-01961-4.

NAKAJIMA, T. *et al.* Aging impairs fibrosis-4 index after sustained virologic response by direct-acting antivirals in chronic hepatitis C infection. **Annals of hepatology**, México, v. 27, n. 1, Jan-Fev. 2022. doi: 10.1016/j.aohep.2021.100566.

NEGRO, F. Natural History of Hepatic and Extrahepatic Hepatitis C Virus Diseases and Impact of Interferon-Free HCV Therapy. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, Woodbury, v. 28, n. 4, Abr. 2020. doi: 10.1101/cshperspect.a036921.

NELSON, D.T. *et al.* All-oral 12-week treatment with daclatasvir plus sofosbuvir in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection: ALLY-3 phase III study. **Hepatology**, Baltimore, v. 61, n. 4, p. 1127-1135, Abr. 2015.

NUSRAT, S. *et al.* Cirrhosis and its complications: evidence based treatment. **World journal of gastroenterology**, Beijing, v. 20, n. 18, p. 5442-5560, Mai. 2014.

ODENWALD, M.A.; PAUL, S. Viral hepatitis: Past, present, and future. **World journal of gastroenterology**, Beijing v. 28, n. 14, p. 1405-1429, Abr. 2022.

OKANOUE, T. *et al.* Interferon therapy lowers the rate of progression to hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C but not significantly in an advanced stage: a retrospective study in 1148 patients. Viral Hepatitis Therapy Study Group. **Journal of hepatology**, Amsterdam, v. 30, n. 4, p. 653-659, Abr. 1999.

OON, G.C.J. Viral Hepatitis – The Silent Killer. **Annals of the Academy of Medicine**, Singapore, v. 41, n. 7, p. 279-280, Jul. 2012.

ORLAND, J.R.; WRIGHT, T.L.; COOPER, S. Acute hepatitis C. **Hepatology**, Baltimore, v. 33, n. 2, p. 321-327, Fev. 2001.

PALANISAMY, N. *et al.* Worldwide prevalence of baseline resistance-associated polymorphisms and resistance mutations in HCV against current direct-acting antivirals. **Antiviral therapy**, London, v. 23, n. 6, p. 485-493, 2018.

PAWLOTSKY, J.M. Hepatitis C Virus Resistance to Direct-Acting Antiviral Drugs in Interferon-Free Regimens. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 151, n. 1, 70-86, Jul. 2016.

PETRUZZIELLO, A. *et al.* Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. **World journal of gastroenterology**, Beijing, v. 22, n. 34, p. 7824-7840, Set. 2016.

PIMENOV, N. *et al.* Epidemiology and Genotype Distribution of Hepatitis C Virus in Russia. **Pathogens**, Basel, v. 11, n. 12, p. 1482, Dez. 2022. doi: 10.3390/pathogens11121482.

PLOSS, A. *et al.* Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. **Nature**, London, v. 457, n. 7231, p. 882-886, Fev. 2009.

POL, S. *et al.* Safety and efficacy of daclatasvir-sofosbuvir in HCV genotype 1-mono-infected patients. **Journal of hepatology**, Amsterdam, v. 66, n. 1, p. 33-47, Jan. 2017.

POORDAD, F. *et al.* SPRINT-2 Investigators. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. **The New England journal of medicine**, Boston, v. 364, n. 13, p. 1195-1206, Mar. 2011.

POORDAD, F.F. Presentation and complications associated with cirrhosis of the liver. **Current medical research and opinion**, London, v. 31, n. 5, p. 925-937, Mai. 2015.

PRINCE, A.M. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 60, n. 3, p. 814-821, Jul. 1968.

PROBST, A. *et al.* Role of hepatitis C virus genotype 3 in liver fibrosis progression--a systematic review and meta-analysis. **Journal of viral hepatitis**, Oxford, v. 18, n. 11, p. 745-759, Nov. 2011.

PUGH, R. N. H. *et al.* Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. **The British journal of surgery**, v. 60, n. 8, p. 646-649, Ago. 1973.

RAHIMI, P. *et al.* Prevalence of Naturally-Occurring NS5A and NS5B Resistance-Associated Substitutions in Iranian Patients With Chronic Hepatitis C Infection. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, v. 11, Jan. 2021. doi: 10.3389/fmicb.2020.617375.

RAFI, H. *et al.* Influence of steatosis on progression of fibrosis and virological response in chronic hepatitis C cases. **Arab journal of gastroenterology**, Cairo, v. 12, n. 3, p. 136-138, Set. 2011.

RIZZETTO, M. Hepatitis delta: the virus and the disease. **Journal of hepatology**, Amsterdam, v. 11, Suppl. 1, p. S145-S148, 1990.

RODRIGUES, J.P.V. **Efetividade e segurança dos inibidores da protease de primeira geração indicados ao tratamento de pacientes cronicamente infectados pelo genótipo 1 do HCV**. 2017. Dissertação (Mestrado em Assistência Farmacêutica) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

SALAMA, I.I. *et al.* Impact of direct-acting antiviral regimens on hepatic and extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection. **World journal of hepatology**, Beijing, v. 14, n. 6, p. 1053-1073, Jun. 2022.

SALMERÓN, J. *et al.* Effectiveness and safety of first-generation protease inhibitors in clinical practice: Hepatitis C virus patients with advanced fibrosis. **World journal of gastroenterology**, Beijing, v. 21, n. 30, p. 9163-9174, Ago. 2015.

SANTOS, A.P.T. *et al.* Prevalence and Pattern of Resistance in NS5A/NS5B in Hepatitis C Chronic Patients Genotype 3 Examined at a Public Health Laboratory in the State of São Paulo, Brazil. **Infection and drug resistance**, Auckland, v. 14, p. 723-730, Fev. 2021.

SARRAZIN, C. The importance of resistance to direct antiviral drugs in HCV infection in clinical practice. **Journal of hepatology**, Amsterdam, v. 64, n. 2, p. 486-504, Fev. 2016.

SARWAR, S. *et al.* Effect of adding daclatasvir in sofosbuvir-based therapy in genotype 3 hepatitis C: real-world experience in Pakistan. **European journal of gastroenterology and hepatology**, London, v. 31, n. 8, p. 1035-1039, Ago. 2019.

SCHMID, R. History of viral hepatitis: A tale of dogmas and misinterpretations. **Journal of gastroenterology and hepatology**, Melbourne, v. 16, n. 7, p. 718-722, Jul. 2001.

SEEFF, L.B. *et al.* A Serologic Follow-up of the 1942 Epidemic of Post-Vaccination Hepatitis in the United States Army. **The New England journal of medicine**, Boston, v. 316, n. 16, p. 965-970, Abr. 1987.

SHARAFI, H.; ALAVIAN, S.M. Hepatitis C resistance to NS5A inhibitors: Is it going to be a problem? **World journal of hepatology**, Beijing, v. 10, n. 9, p. 543-548, Set. 2018.

SHERMAN, K.E. *et al.* ILLUMINATE Study Team. Response-guided telaprevir combination treatment for hepatitis C virus infection. **The New England journal of medicine**, Boston, v. 365, n. 11, p. 1014-1024, Set. 2011.

SORBO, M.C. *et al.* Hepatitis C virus drug resistance associated substitutions and their clinical relevance: Update 2018. **Drug resistance updates**, Edinburgh, v. 37, p. 17-39, Mar. 2018.

TÉLLEZ, L.; GUERRERO, A.; ALBILLOS, A. Update on the diagnosis and management of portal hypertension in cirrhosis according to the Baveno VII Consensus Conference recommendations. **Revista española de enfermedades digestivas**, Madrid, v. 114, n. 9, p. 534-542, Set. 2022.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, London, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, Nov. 1994.

TICEHURST, J.R. *et al.* Molecular cloning and characterization of hepatitis A virus cDNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 80, n. 19, p. 5885-5889, Out. 1983.

TONG, X. *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**, Oxford, v. 209, n. 5, p. 668-675, Mar. 2014.

TREPO, C. A brief history of hepatitis milestones. **Liver international**, Oxford, v. 34, Suppl. 1, p. 29-37, Fev. 2014.

VAN DER MEER, A.J.; BERENGUER, M. Reversion of disease manifestations after HCV eradication. **Journal of hepatology**, Amsterdam, v. 65, Suppl. 1, S95-S108, Out. 2016.

WALKER, A. *et al.* A genotype independent, full-genome reverse-transcription protocol for HCV genotyping and resistance testing. **Journal of clinical virology**, Amsterdam, v. 91, p. 42-48, Jun. 2017.

WEHMEYER, M.H. *et al.* Real-world effectiveness of sofosbuvir-based treatment regimens for chronic hepatitis C genotype 3 infection: Results from the multicenter German hepatitis C cohort (GECCO-03). **Journal of medical virology**, New York, v. 90, n. 2, p. 304-312, Fev. 2018.

WELZEL, T.M. *et al.* Global epidemiology of HCV subtypes and resistance-associated substitutions evaluated by sequencing-based subtype analyses. **Journal of hepatology**, Amsterdam, v. 67, n. 2, p. 224-236, Ago. 2017.

WESTBROOK, R.H.; DUSHEIKO, G. Natural history of hepatitis C. **Journal of hepatology**, Amsterdam, v. 61, Suppl. 1, p. S58-S68, Nov. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global Hepatitis Report, 2017**. Geneva: WHO, 2017a. 68 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The Global Health Observatory. **Prevalence of obesity among adults, BMI \geq 30 (crude estimate) (%)**. 2017b. Disponível em: [https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/prevalence-of-obesity-among-adults-bmi-30-\(crude-estimate\)-\(-\)](https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/prevalence-of-obesity-among-adults-bmi-30-(crude-estimate)-(-)). Acesso em 20 fev. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for the care and treatment of persons diagnosed with chronic hepatitis c virus infection**. Geneva: WHO, 2018. 84 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Accelerating access to hepatitis C diagnostics and treatment**. Overcoming barriers in low- and middle-income countries. Global Progress Report 2020. Geneva: WHO, 2021a. 62 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Obesity and overweight. Key Facts**. 2021b. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em: 05 fev. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Hepatitis C. Key Facts**. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c#:~:text=Globally%2C%20an%20estimated%2058%20million,with%20chronic%20hepatitis%20C%20infection>. Acesso: 15 jan. 2023.

WORLD OBESITY FEDERATION (WOF). **World Obesity Atlas 2022**. London: WOF, 2022. 288 p.

WRIGHTON, K.H. Structure of the HCV glycoprotein. **Nature structural and molecular biology**, New York, v. 29, n. 12, p. 1147, Dez. 2022. doi: 10.1038/s41594-022-00901-9.

XIE, Z. *et al.* Efficacy and safety of direct-acting antiviral therapies and baseline predictors for treatment outcomes in hepatitis C patients: A multicenter, real-world study in Guangdong, China. **Journal of medical virology**, New York, v. 94, n. 9, p. 4459-4469, Set. 2022.

YOUNAS, S. *et al.* Identification of NS5B resistance against SOFOSBUVIR in hepatitis C virus genotype 3a, naive and treated patients. **Journal of applied microbiology**, Oxford, v. 133, n. 5, p. 2826-2834, Nov. 2022.

YOUNOSSI, Z. *et al.* Extrahepatic Manifestations of Hepatitis C: A Meta-analysis of Prevalence, Quality of Life, and Economic Burden. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 150, n. 7, p. 1599-1608, Jun. 2016.

YOUNOSSI, Z.M. *et al.* Systematic review with meta-analysis: extrahepatic manifestations in chronic hepatitis C virus-infected patients in East Asia. **Alimentary pharmacology and therapeutics**, Oxford, v. 49, n. 6, p. 644-653, Mar. 2019.

ZAMAN, A. *et al.* Risk factors for the presence of varices in cirrhotic patients without a history of variceal hemorrhage. **Archives of internal medicine**, Chicago, v. 161, n. 21, p. 2564-2570, Nov. 2001.

ZARĘBSKA-MICHALUK, D. *et al.* Is Interferon-Based Treatment of Viral Hepatitis C Genotype 3 Infection Still of Value in the Era of Direct-Acting Antivirals? **Journal of interferon and cytokine research**, New York, v. 38, n. 2, p. 93-100, Fev. 2018.

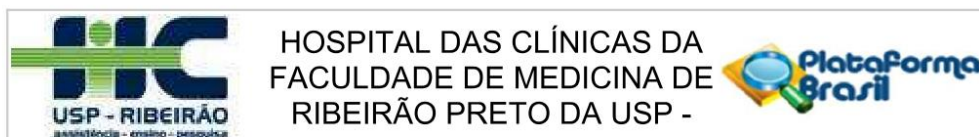
ZEUZEM, S. *et al.* Review article: management of patients with chronic hepatitis C virus infection and "normal" alanine aminotransferase activity. **Alimentary pharmacology and therapeutics**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 1133-1149, Out. 2006.

ZIGNEGO, A.L. *et al.* Extrahepatic manifestations of Hepatitis C Virus infection: a general overview and guidelines for a clinical approach. **Digestive and liver disease**, Amsterdam, v. 39, n. 1, p. 2-17, Jan. 2007.

ZHOU, S. *et al.* Evolutionary pathways to NS5A inhibitor resistance in genotype 1 hepatitis C virus. **Antiviral research**, Amsterdam, v. 158, p. 45-51, Out. 2018.

ZOLI, M. *et al.* Natural history of cirrhotic patients with small esophageal varices: a prospective study. **The American journal of gastroenterology**, New York, v. 95, n. 2, p. 503-508, Fev. 2000.

ANEXOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo da efetividade e da segurança de esquemas de tratamento envolvendo daclatasvir e/ou sofosbuvir indicados a pacientes com hepatite C crônica infectados pelo genótipo 3 do HCV.

Pesquisador: João Paulo Vilela Rodrigues

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 49875215.4.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.317.982

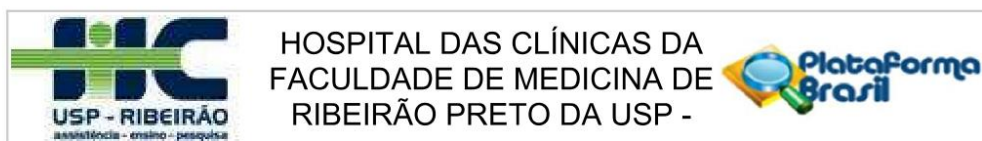
Apresentação do Projeto:

No estudo "Estudo da efetividade e da segurança de esquemas de tratamento envolvendo daclatasvir e/ou sofosbuvir indicados a pacientes com hepatite C crônica infectados pelo genótipo 3 do HCV", os autores estudarão o uso das drogas descritas acima no tratamento de portadores de hepatite C infectados com o genótipo 3.

Objetivo da Pesquisa:

Geral: "verificar a efetividade e a segurança dos esquemas de tratamento do HCV envolvendo DCV e/ou SOF e os fatores associados à efetividade em pacientes com hepatite C crônica infectados pelo genótipo 3". Específicos: "Avaliar a associação de fatores sociodemográficos (sexo e idade) e de outras morbidades com a RVS; Verificar a associação entre tipo de tratamento prévio, carga viral pré-tratamento e grau de fibrose hepática com a RVS; Analisar o papel das mutações de resistência ao DCV e ao SOF prévias ao tratamento com a RVS; Avaliar a associação entre a emergência de mutações de resistência ao DCV e ao SOF durante o tratamento e a RVS; Verificar persistência de mutações de resistência até 24 semanas após o tratamento farmacológico; Mensurar a incidência de reações adversas aos novos FAA; Mensurar as taxas de RVS de acordo com o esquema de tratamento farmacológico prescrito"

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 1.317.982

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O melhor entendimento da efetividade e segurança das drogas pode resultar em resultados relevantes do ponto de vista de saúde pública e para potenciais usuários das drogas no futuro. Mas a simples inclusão dos participantes no estudo não trará benefício direto a eles, isto deve ficar claro no texto.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo prospectivo a ser realizado no ambulatório de hepatites do HCFMRP-USP, que recrutará portadores de hepatite C infectados com o genótipo 3 do HCV, que iniciarão uso das medicações descritas acima. "serão coletadas informações sociodemográficas (idade, sexo) e valores basais de função renal (creatinina e ureia), valores basais de lesão e função hepáticas (ALT, AST, gama-GT, fosfatase alcalina, bilirrubina direta, bilirrubina indireta, bilirrubina total, albumina e TP), além dos valores de hemoglobina, leucócitos, plaquetas e a carga viral basal do HCV. Também serão levantadas informações clínicas como presença ou ausência de morbididades associadas (hipertensão arterial, diabetes mellitus, obesidade, síndrome metabólica, esteatose hepática, etilismo), tratamento prévio para HCV, tipo de resposta ao tratamento prévio e grau de fibrose hepática. Serão coletados ainda resultados dos exames citados realizados durante o tratamento com os novos FAA segundo protocolo adotado no hospital que prevê a realização mensal de exames de função renal, lesão e função hepáticas e de hemograma (hemoglobina, leucócitos e plaquetas). A quantificação do HCV-RNA (carga viral) é realizada na quarta semana de terapia, ao final do tratamento e nas 12 e 24 semanas após o tratamento"

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados TCLE, cronograma e orçamento, riscos e benefícios, porém solicita-se substituir a palavra "paciente" por "participante" em todo o texto.

Recomendações:

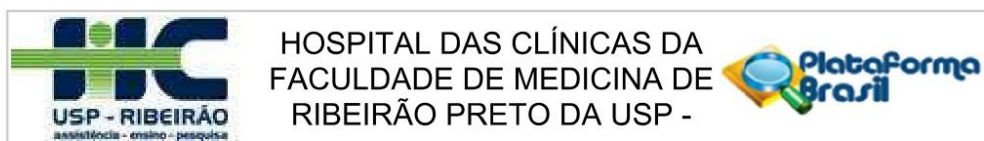
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assim como o Biorrepositório e o Termo de guarda de material biológico, podem ser enquadrados na categoria "APROVADO".

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 1.317.982

forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_589403.pdf	06/10/2015 15:14:14		Aceito
Outros	TCLE_Biorrepositorio.pdf	06/10/2015 15:12:44	João Paulo Vilela Rodrigues	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	06/10/2015 15:11:33	João Paulo Vilela Rodrigues	Aceito
Outros	Autorizacao_Biorrepositorio.pdf	06/10/2015 15:10:37	João Paulo Vilela Rodrigues	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	06/10/2015 15:08:35	João Paulo Vilela Rodrigues	Aceito
Outros	Autorizacao_Orcamento.pdf	06/10/2015 15:07:35	João Paulo Vilela Rodrigues	Aceito
Outros	Carta_ao_CEP.pdf	06/10/2015 15:02:30	João Paulo Vilela Rodrigues	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	06/10/2015 15:00:44	João Paulo Vilela Rodrigues	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 11 de Novembro de 2015

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
 (Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

Tabela Suplementar 1: Primers e temperaturas de anelamento usadas em cada reação de PCR para *NS5A* e *NS5B*.

Region	Reaction	Primer	5' → 3' Sequencing	Annealing temperature
NS5A	PCR	H.NS5AP-F4 (Forward)	TTGCCCGCCATACTATCT	47° C
		H.NS5AI.R2 (Reverse)	TTCTTGAAACACTCTGCAGC	
	NESTED	H.NS5AN-F4 (Forward)	GTVCAGTGGATGAACAG	45° C
		H.NS5AI.R1 (Reverse)	CACGGACACTTGAGCTCATC	
NS5B	PCR	G3.NS5BP.F (Forward)	GATAACACCATGTAGTGCTGAGG	50° C
		G3.NS5BP.R (Reverse)	AGAAAGATGCCTACCCCTAC	
	NESTED	G3.NS5BN.F (Forward)	TATTCAACGTCGTCTAGAAGCGC	53° C
		G3.NS5BN.R (Reverse)	AAAGCAGCAAATGGCGGGTT	

Tabela suplementar 2: Primers usados nas reações de sequenciamento para a região *NS5B* amplificada a partir das amostras coletadas.

NS5B 5' → 3' Primers NESTED	NS5B 5' → 3' Internal Primers
G3.NS5BN.F TATTCAACGTCGTCTAGAAGCGC	G3.NS5BI.F GGTATAGTGCGAAGGACGT
G3.NS5BN.R AAAGCAGCAAATGGCGGGTT	G3.NS5BI.R GAGAGTAACTGTGGAGCGT

APÊNDICES

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica
Av Bandeirantes, 3900 - Fone: (0xx16) 3602-2842/3602-3366
14.049-900 - Ribeirão Preto/SP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa “**Estudo da efetividade e da segurança de esquemas de tratamento envolvendo os novos fármacos de ação direta indicados a pacientes com hepatite C crônica**” a ser realizada no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP/USP) com colaboração do Laboratório de Estudos Genômicos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de São José do Rio Preto. O objetivo da pesquisa é avaliar a segurança e os fatores relacionados à efetividade do tratamento da hepatite C crônica que envolve os medicamentos daclatasvir, simeprevir e/ou sofosbuvir. Para a realização do trabalho, serão coletadas informações pessoais, a respeito de sua condição de saúde e sobre os medicamentos utilizados.

Participando desta pesquisa, o(a) Sr(a) contribuirá para que o tratamento da hepatite C crônica com os medicamentos citados seja avaliado e para que o atendimento aos pacientes seja qualificado por meio do maior conhecimento a respeito dos novos medicamentos.

Informamos que sua participação é totalmente voluntária e que o(a) senhor(a) não pagará e também não será remunerado(a) por sua participação. Caso aceite participar, poderá desistir a qualquer momento da pesquisa. Em caso de aceite e posterior desistência, o(a) Sr(a) deverá comunicar o pesquisador por meio dos contatos presentes neste documento. E, caso não aceite participar, ou desista, isto não acarretará em qualquer prejuízo ao seu tratamento neste hospital. Dessa forma, garantimos que todos os seus direitos serão assegurados e que sua autorização e participação **não são obrigatórias**.

Neste tipo de estudo, os riscos à sua participação são mínimos. Há o risco com relação à exposição de sua identidade ou das informações sobre sua saúde. Garantimos que sua identidade não será divulgada e que as informações obtidas serão resguardadas por um único pesquisador e utilizadas apenas para publicações científicas ou apresentações em congressos. Caso o(a) Sr(a) tenha qualquer desconforto durante a realização do estudo, poderá, conforme já mencionado, retirar seu consentimento e interromper sua participação na pesquisa

Além dos exames que fazem parte da rotina do tratamento e do hospital, serão realizadas coletas de sangue para a realização de testes que verificam características genéticas do(a) Sr(a) e do vírus da hepatite

C que podem influenciar a resposta ao tratamento. Estas coletas podem, eventualmente, originar inchaços ou hematomas. Para prevenir este risco, a coleta será realizada por pessoal treinado, utilizando-se de materiais com qualidade comprovada e descartáveis o que ameniza ainda riscos de contaminação. A identificação do sangue coletado durante transporte e armazenamento será realizado por codificação.

O(a) Sr(a) receberá uma via deste documento para que fique ciente e respaldado(a) das condições aqui descritas. As informações coletadas ficarão sob a guarda do pesquisador responsável por um período de cinco anos após a conclusão do estudo e serão incinerados (queimados) após este período.

Agradeço sua colaboração e coloco-me à disposição para esclarecimentos relacionados à pesquisa e a seus resultados.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 2019.

Pesquisador: João Paulo Vilela Rodrigues

Telefones: (16) 981162360 ou (16) 33150254; e-mail: jpvilela@fcfrp.usp.br

Comitê de Ética HCFMRP/USP – Campus Universitário, telefone: (16) 36022228

O(a) Sr(a) _____ declara, após ter recebido as devidas informações e estar ciente dos seus direitos, que concorda em participar da pesquisa “Estudo da efetividade e da segurança de esquemas de tratamento envolvendo os novos fármacos de ação direta indicados a pacientes com hepatite C crônica” como sujeito.

Assinatura do entrevistado: _____ data ____/____/____
Pesquisador responsável: _____ data ____/____/____

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO- HCFMRPUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO

**“Biorrepositório de amostras de material biológico de pacientes infectados pelo HCV
que tenham indicação de tratamento com daclastavir, simeprevir e/ou sofosbuvir”**

Responsável pelo Biorrepositório: Prof. Dra. Ana de Lourdes Candolo Martinelli.
Departamento de Clínica Médica, Divisão de Gastroenterologia.

O Sr(a) está sendo convidado(a) a autorizar a guarda de amostras de sangue para fins de pesquisa e análise científica. Sua participação é voluntária, desse modo o Sr(a) tem liberdade de aceitar ou não que sua amostra seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe vem sendo prestado nesta Instituição. O(a) Sr(a) também tem o direito de retirar seu consentimento a qualquer momento.

As coletas de sangue (aproximadamente 10 mL ou uma colher de sopa) serão realizadas por um profissional capacitado, sem necessidade de jejum, em uma veia do braço, do mesmo modo que é realizada na rotina deste Hospital. As amostras serão guardadas no laboratório de Gastroenterologia do HCFMRP-USP. Os riscos da coleta de sangue são os mesmos de uma coleta de rotina, ou seja, hematoma (mancha roxa) e dor no local da punção.

O(a) Sr(a) não terá nenhum benefício imediato ou ganho financeiro ao concordar com a guarda de sangue.

A equipe de pesquisa se compromete com a identificação por números das amostras e dos dados pessoais coletados, de modo que possam ser garantidos o sigilo e a confidencialidade dos doadores. Os resultados serão utilizados apenas para fins de pesquisa.

Solicitaremos seus dados de contato para que, caso necessário, possamos lhe localizar para prestação de informações relacionadas à pesquisa. O(a) Sr(a) tem o direito de solicitar as informações de seu interesse relacionadas a pesquisa, a qualquer momento, através do número de telefone: (16) 3602-2454 (Profa Dra. Ana Martinelli, HCFMRP-USP).

Caso concorde em participar, após esclarecimentos das dúvidas, duas vias deste termo de consentimento serão assinadas pelo Sr(a) e pelo responsável pela obtenção do mesmo, devendo todas as páginas serem rubricadas. O(a) Sr(a) ficará com uma via e a outra será arquivada nesse centro de pesquisa.

_____ Local: _____
 Nome do Paciente – letra de forma

_____ / ____ / ____
 (Assinatura do Paciente) dia mês ano

Telefones para contato: _____

Paciente não alfabetizado (impressão digital)



_____ Local: _____
 Nome da testemunha

_____ / ____ / ____
 (Assinatura da testemunha) dia mês ano

_____ Local: _____
 Nome do responsável pela obtenção do TCLE

_____ / ____ / ____
 (Assinatura do responsável pela obtenção do TCLE) dia mês ano